

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Determinação de castas no gênero *Melipona* (Hymenoptera, Apidae): Influência do alimento larval.

Cristiano Menezes

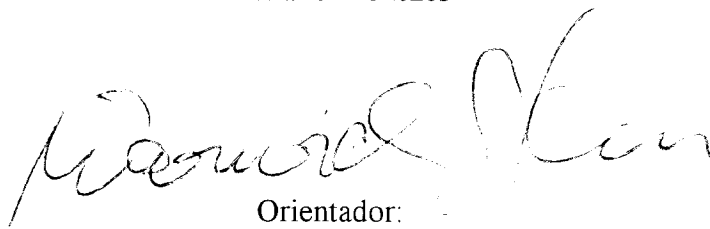
Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia – MG
Abril - 2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

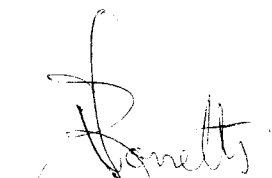
Determinação de castas no gênero *Melipona* (Hymenoptera, Apidae): Influência do alimento larval.

Cristiano Menezes



Orientador:

Prof. Dr. Warwick Estevam Kerr



Co-orientadora:

Profa. Dra. Ana Maria Bonetti

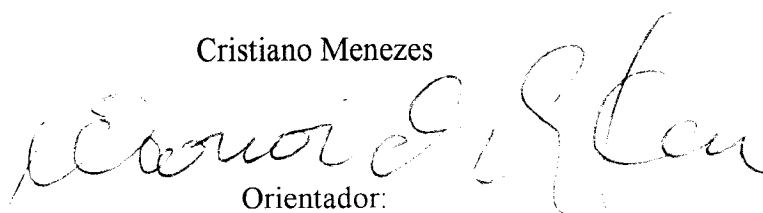
Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia - MG
Abril - 2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Determinação de castas no gênero *Melipona* (Hymenoptera, Apidae): Influência do alimento larval.

Cristiano Menezes



Orientador:

Prof. Dr. Warwick Estevam Kerr
Instituto de Genética e Bioquímica

Co-orientadora:

Profª. Dra. Ana Maria Bonetti
Instituto de Genética e Bioquímica



Homologado pela coordenação do Curso de
Ciências Biológicas em 27/04/06

Cecília Lomônaco de Paula

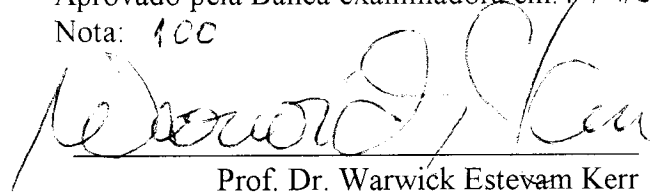
Uberlândia - MG
Abril - 2006

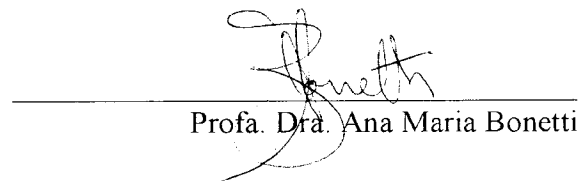
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

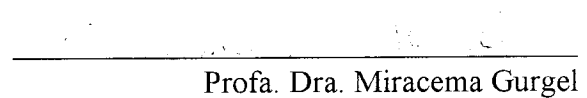
Determinação de castas no gênero *Melipona* (Hymenoptera, Apidae): Influência do alimento larval.

Cristiano Menezes

Aprovado pela Banca examinadora em: 10/04/2006
Nota: 100


Prof. Dr. Warwick Estevam Kerr


Profª. Dra. Ana Maria Bonetti


Profª. Dra. Miracema Gurgel

Uberlândia, 10 de Abril de 2006

RESUMO

A determinação de castas no gênero *Melipona* envolve um mecanismo genético-alimentar que ainda não foi completamente esclarecido. Ao longo do ano, essas abelhas alteram algo na alimentação larval que aumenta ou diminui o número de rainhas formadas. O presente estudo teve como objetivo identificar variações na constituição desse alimento entre alvéolos de uma colônia e testar a influência dessas variáveis nas castas formadas. Os principais elementos que variaram foram o volume total, o volume da camada inferior e o volume da camada superior do alimento. A criação de larvas *in vitro*, com alimentação controlada, mostrou que a quantidade de alimento não é o único fator responsável pela determinação de castas, pois o aumento da quantidade de pólen ou da camada superior do alimento diminuíram o número de rainhas formadas. O equilíbrio entre os seus constituintes é, portanto, mais importante que a quantidade total de alimento ingerido. Foi proposta a hipótese do “Equilíbrio Trófico” que, em função de estresses ambientais, ocorre desequilíbrio dos constituintes do alimento larval, diminuindo o número de rainhas formadas, pois elas representariam um desperdício energético.

Palavras chave: Determinação de Castas; Equilíbrio Trófico; Alimento Larval

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
2. MATERIAL E MÉTODOS	07
2.1 Análise da composição do alimento larval de <i>Melipona cutellaris</i> nos alvéolos	07
2.2 Relação entre composição do alimento larval e a determinação de castas em <i>Melipona scutellaris</i>	10
3. RESULTADOS	13
3.1 Análise da composição do alimento larval de <i>Melipona scutellaris</i> as variações entre os alvéolos	13
3.2 Relação entre composição do alimento larval e a determinação de castas em <i>Melipona scutellaris</i>	19
4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	20
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
6. ANEXOS: Normas da Revista Biota Neotropica para Citação Bibliográfica	37

1. Introdução:

Entre os Hymenoptera sociais, as operárias e as rainhas são fêmeas e nascem de ovos fertilizados, diplóides. Diferenciação de castas refere-se ao processo em que larvas fêmeas desenvolvem-se em rainhas ou operárias.

Rainhas são especializadas na postura de ovos e garantem a reprodução da espécie (Nogueira-Neto 1997). As operárias são especializadas em trabalhar para manutenção da colônia e, por isso, possuem ovários atrofiados. Mesmo que estes, eventualmente, funcionem (Sakagami 1982, Koedam & Imperatriz-Fonseca 2004), elas são incapazes de copular e produzir descendentes diplóides (Wilson 1971).

Existem basicamente três mecanismos que controlam a diferenciação das castas nas abelhas eussociais da família Apidae e que estão relacionados, especificamente, com as tribos Apini, Trigonini e Meliponini.

Na tribo Apini, em abelhas do gênero *Apis*, a quantidade e a qualidade de alimento possuem um papel fundamental para tal polimorfismo, principalmente, nos primeiros cinco dias de vida (Ishay et al. 1976; Asencot & Lensky 1984; Rembold et al. 1974, Weaver 1974). As larvas que darão origem às rainhas recebem geléia real durante seis dias e as que vão originar operárias, recebem uma mistura de mel e pólen, após o terceiro dia de alimentação larval. Durante as estações reprodutivas, a colônia constrói alvéolos especiais, chamados de realeiras, para a produção de rainhas.

Rembold et al. (1974) e Asencot & Lenky (1984) concluíram que a ingestão de grande quantidade de alimento acionaria os proprioceptores localizados nas paredes do intestino médio da larva, que enviaria estímulos ao cérebro. Esses, por sua vez, liberam hormônios que ativam os Corpora Allata produzindo Hormônio Juvenil, que é responsável pela diferenciação

da larva em rainha (Asencot & Lenky 1984; Campos 1977; Bonetti 1982, 1990; Bonetti & Kerr, 1985).

Enquanto Rembold et al. (1974) obtiveram sucesso na purificação parcial de alguns componentes determinantes da geléia real, estudos de criação de larvas, experimentalmente, levaram Dixon & Shuel (1963) e Weaver (1974) a concluir que a determinação de castas não poderia depender de uma substância “determinante” distinta e, sim, de uma composição equilibrada de nutrientes na geléia real. Mesmo com o progresso nas análises da composição da geléia real (Takenaka & Takahashi 1980, 1983) e o desenvolvimento de novas técnicas de criação de larvas *in vitro* (Rembold & Lackner 1981; Wittmann & Engels 1987) não foi possível ainda esclarecer essa controvérsia.

Na maioria dos Trigonini, apenas a quantidade de alimento é o fator responsável pela diferenciação entre as castas, de tal modo que larvas que se diferenciarão em rainha recebem maior quantidade de alimento do que aquelas que originarão operárias (Darchen & Delage-Darchen 1970, 1971, Camargo 1972, Terada 1974). Aparentemente, nestas abelhas não existe diferenciação qualitativa entre o alimento recebido por operárias e por rainhas (Hartfelder 1987). Assim como na tribo Apini, nas estações reprodutivas, alvéolos especiais são construídos para produção de rainhas.

Ihering (1903) notou, pela primeira vez, que nos favos de cria da tribo Meliponini todos os alvéolos eram do mesmo tamanho e deles emergiam operárias, rainhas ou machos. Ele sugeriu que as castas neste gênero seriam, possivelmente, condicionadas por algum mecanismo antes do ovo ser depositado sobre o alimento larval. Kerr (1950) e Kerr et al. (1966) propuseram a existência de uma predisposição genética para o desenvolvimento das castas, dependente de fatores alimentares. Segundo essa hipótese, as rainhas são heterozigotas para dois pares de alelos sexuais, X^a e X^b , transformando-se em rainhas apenas as que, durante a fase de larva, recebem uma quantidade de alimento suficiente para desenvolver as

características feminizantes (Figura 1). Dessa forma, de acordo com a disponibilidade de recursos alimentares no ambiente e na colônia, as operárias que constroem os alvéolos alteram a constituição do alimento larval que irá influenciar no número de rainhas que serão formadas (Kerr et al. 1966). Essa alteração na constituição do alimento larval ainda não foi totalmente elucidada, podendo envolver mudanças quantitativas e/ ou qualitativas.

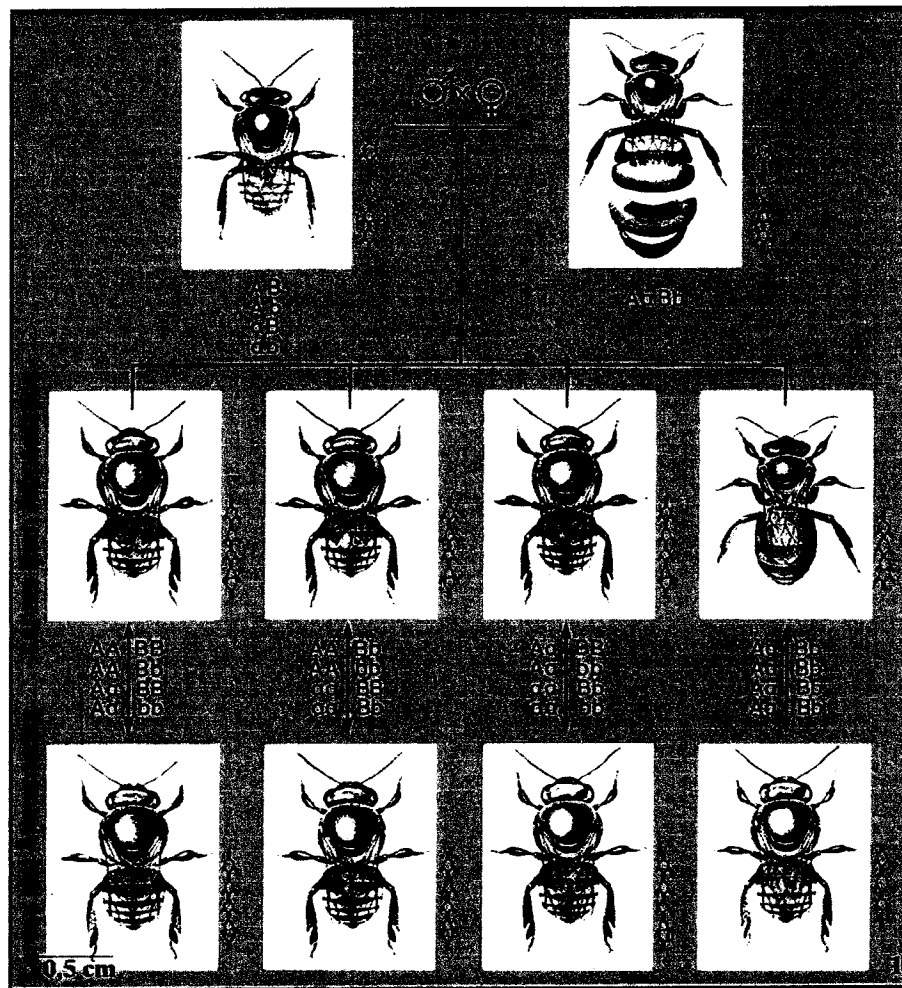


Figura 1: Esquema da hipótese de determinação de castas no gênero *Melipona* (Kerr 1950).

Almeida (1974) mostrou que, em condições de subalimentação, todas as larvas de *Melipona scutellaris* geram operárias. Em condições de superalimentação, $\frac{3}{4}$ das larvas originam operárias e $\frac{1}{4}$, rainhas. Camargo (1972) observou o mesmo para *M. rufiventris* e *M.*

quadrifasciata. Almeida (1974) observou, também, que não houve alteração na proporção entre as castas nas larvas que receberam alimentações ricas em glicose anidro ou acetilcolina. Baseado nesses dados, essas autoras concluíram que as rainhas do gênero *Melipona* (larvas duplo heterozigotas para os genes determinadores das castas) dependem de uma superalimentação ou de fatores ambientais diversos para se desenvolverem como fêmeas completas.

Em *Melipona quadrifasciata*, Kerr (1948) e Bezerra (1995) mostraram que os machos nascem, preferencialmente, no centro dos favos de cria e as rainhas nascem, principalmente, na periferia. Esses autores relacionaram esse padrão reprodutivo com a variação na quantidade de alimento entre os alvéolos do centro do favo para os da periferia.

Apesar da hipótese de Kerr (1950) e Kerr et al. (1987) estar bem fundamentada, o sistema de determinação de castas da tribo Meliponini tem recebido atenção diferenciada, pois há, ainda, muitas incógnitas e controvérsias para serem desvendadas.

Judice et al. (2004) mostraram relação significativa entre o nível de expressão de determinados genes com as castas. Esses genes são candidatos para serem estudados e relacionados com a determinação das castas em *Melipona*.

Outros estudos também têm gerado discussão, apontando novos caminhos para explicar o problema. Uma hipótese recentemente formulada, conhecida como “Self-determination”, afirma que as larvas, durante seu desenvolvimento, tem a capacidade de decidir sobre sua casta (operária ou rainha) de acordo com estímulos da colônia (Bourke & Ratnieks, 1999; Ratnieks, 2001; Wenseleers 2003), o que carece de dados experimentais consistentes e, por isso, é pouco aceita pela comunidade científica. A principal base dessa hipótese é o fato de que a maior parte das fêmeas que se desenvolvem em rainhas nas colônias do gênero *Melipona* são mortas pelas operárias, horas ou dias após sua emergência (Engels & Imperatriz-Fonseca 1990; Imperatriz-Fonseca & Zucchi 1995). Apesar da produção excessiva

de rainhas ter sido considerada paradoxal há tempos (Engels & Imperatriz-Fonseca 1990), isto poderia ser entendido à luz da hipótese do “Self Determination” (Ratnieks et al. 2001). Aparentemente, permite, também, explicar outros fatos intrigantes, como a formação de rainhas nos gêneros *Friesemelitta* e *Leurotrigona*, nos quais algumas larvas fêmeas percebem a necessidade de formação de rainha e perfuram a parede de alvéolos adjacentes, ingerindo quantidade extra de alimento larval, desenvolvendo-se em rainha (Terada, 1974; Faustino *et al.*, 2002).

Outro fato que tem intrigado muitos cientistas e, possivelmente, está relacionado com a evolução do sistema de determinação de castas nas abelhas sem ferrão (Trigonini e Meliponini) é o nascimento de rainhas a partir de células de onde deveriam nascer operárias em algumas espécies da tribo Trigonini (Campos & Costa 1989; Ribeiro 2004). Isso evidencia que, além da quantidade de alimento, existe algum fator ambiental e/ ou genético que interfere no desenvolvimento de características feminizantes nesse grupo de abelhas (Ribeiro 2004).

Apesar dos mecanismos morfo-fisiológicos de determinação de castas das abelhas sociais estarem sendo estudados, o controle da colônia sobre a proporção entre as castas, observado nas diferentes estações do ano, ainda permanece obscuro, principalmente no gênero *Melipona*.

Em Apini e Trigonini, esse controle é feito por meio da construção ou não de alvéolos reais, alvéolos maiores de onde deverão nascer rainhas. Dessa forma, *Apis mellifera* (Apini) produz, em média, uma rainha para cada 10.000 operárias ao longo do ano (Seeley 1985; Winston 1987), alterando essa proporção de acordo com a população da colônia e condições ambientais. Em *Tetragonisca angustula* (Trigonini), apenas quatro rainhas são produzidas por colônia em uma estação reprodutiva (van Veen & Sommeijer 2000).

Em Meliponini, o número de rainhas produzidas ao longo do ano varia entre 0% e 25% das fêmeas, da estação não reprodutiva para a reprodutiva (Kerr 1966; Almeida 1974;

Bezerra 1995). Uma das hipóteses é a de que, em função de uma má alimentação, o número de rainhas formadas diminuiria (Kerr 1966, Bezerra 1995). Contudo, a variação da qualidade/quantidade da alimentação larval ao longo do ano nunca foi estudada. Ainda não se sabe se é a quantidade ou a qualidade do alimento larval (ou ambos) que é responsável por essa grande mudança na proporção de rainhas e operárias ao longo do ano.

Muitos fatos acerca desses assuntos são contraditórios e uma das razões para isso é a escassez de dados, especialmente, acerca da influência de fatores ambientais no desenvolvimento larval, com destaque para a qualidade e constituição do alimento larval de abelhas sem ferrão.

O objetivo geral do presente trabalho é o de acrescentar dados aos conhecimentos sobre as propriedades do alimento larval e avaliar a influência de suas variações na determinação de castas no gênero *Melipona*.

Os objetivos específicos são: (1) caracterizar e quantificar atividades enzimáticas do alimento larval de *Melipona scutellaris*; (2) comparar a composição do alimento larval entre os alvéolos de cria de uma mesma colônia de *M. scutellaris*, estabelecendo uma proporção entre pólen, secreção glandular, atividade enzimática e quantidade total de alimento em cada alvéolo; (3) correlacionar a quantidade de pólen e de secreções glandulares com a determinação de castas do gênero *Melipona*.

2. Material e Métodos:

2.1. Análise da composição do alimento larval de *Melipona scutellaris* nos alvéolos

O material biológico foi retirado de colônia forte de *Melipona scutellaris*, proveniente da Bahia, criada em colméia racional em Uberlândia-MG desde o ano 2000. Foi retirado um disco de cria com cerca de 150 alvéolos, todos contendo ovos (Figura 2). Dessa mesma colônia, um favo mais velho, contendo pupas de olho preto, foi usado para saber a proporção entre machos, operárias e rainhas que estava ocorrendo no período do experimento.



Figura 2: Favo de cria recém construído, contendo apenas ovos, o que pode ser constatado por sua coloração escura e presença de alvéolos em construção nas bordas.

Os alvéolos foram abertos e, com auxílio de uma pinça, os ovos foram removidos. O alimento larval de cada um deles foi coletado, separadamente, com uma pipeta automática e

transferido para tubos plásticos de 0,5ml (EPPENDORF). Aleatoriamente, foram escolhidos 25 tubos para o estudo.

Os tubos foram centrifugados por 15 min a 10.000g, separando duas camadas: (1) superior, contendo basicamente secreção das glândulas hipofaríngeas, água, mel e subprodutos da digestão do pólen; (2) e inferior, contendo basicamente todo o pólen do alimento do alvéolo (Figura 3).

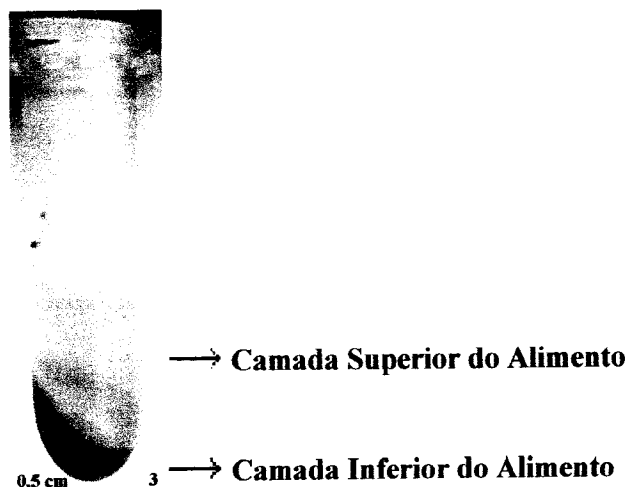


Figura 3: Alimento larval de *M. scutellaris* após centrifugação, mostrando as camadas.

A camada superior foi transferida para outro tubo e o volume foi quantificado com uma pipeta automática.

Foi adicionado à camada inferior (pólen) 100 μ l de água destilada, permitindo a medição do seu volume com uma pipeta automática, subtraindo o volume de água adicionado.

Somando-se o volume das duas camadas, obteve-se a quantidade total de alimento larval em cada alvéolo.

A camada superior do alimento de cada alvéolo foi submetida a um teste de reação enzimática qualitativo e semi-quantitativo com o Kit Api Zym (BIOMÉRIEUX) (Tabela 1) que identifica 19 tipos de enzimas diferentes a partir de pequena quantidade de amostra não purificada depositada em uma galeria com 20 poços, cada um contendo um substrato

específico para a enzima testada (Figura 4). O resultado da reação é mensurado pela alteração ou não da cor e sua intensidade está diretamente relacionada com o grau de reação com o substrato, permitindo estimar (em nmol) a quantidade de enzima presente na amostra.

Tabela 1: Informações sobre as enzimas analisadas pelo Kit Api Zym (Biomérieux).

N°	Enzima Detectada	Substrato	pH	Reação	
				Positiva	Negativa
1	Controle	-		Incolor ou cor da amostra	
2	Fosfatase alcalina	2-naftil fosfato	8,5	Violeta	
3	Esterase (C 4)	2-naftil butirato	6,5	Violeta	
4	Esterase Lipase (C 8)	2-naftil caprilato	7,5	Violeta	
5	Lipase (C 14)	2-naftil miristato	7,5	Violeta	
6	Leucina arilamidase	L-leucil-2-naftilamida	7,5	Laranja	
7	Valina arilamidase	L-valil-2-naftilamida	7,5	Laranja	
8	Cistina arilamidase	L-cistil-2-naftilamida	7,5	Laranja	
9	Tripsina	N-benzoil-DL-arginina-2-naftilamida	8,5	Laranja	
10	α -quimotripsina	N-glutaril-fenilalanina-2-naftilamida	7,5	Laranja	Incolor ou cor da amostra
11	Fosfatase ácida	2-naftil fosfato	5,4	Violeta	
12	Naftol-AS-BI-fosfohidrolase	Naftol-AS-BI-fosfato	5,4	Azul	
13	α -galactosidase	6-Br-2-naftil- α D-galactopiranosida	5,4	Violeta	
14	β -galactosidase	2-naftil- β D-galactopiranosida	5,4	Violeta	
15	β -glucuronidase	Naftol-AS-BI- β D-glucuronida	5,4	Azul	
16	α -glucosidase	2-naftil- α D-glucopiranosida	5,4	Violeta	
17	β -glucosidase	6-Br-2-naftil- β D-glucopiranosida	5,4	Violeta	
18	N-acetil- β -glucosaminidase	1-naftil-N-acetil- β D-glucosaminida	5,4	Castanho	
19	α -manosidase	6-Br-2-naftil- α D-manopiranosida	5,4	Violeta	
20	α -fucosidase	2-naftil- α L-fucopiranosida	5,4	Violeta	



Figura 4: Teste de reação enzimática qualitativa e semi-quantitativa do Kit Api Zym Biomérieux (exemplo ilustrativo).

Foram diluídos 30 μ l da camada superior do alimento de cada alvéolo em 1,5 ml de soro fisiológico, separadamente. Foram aplicados 60 μ l dessa solução em cada poço da galeria. Além do teste enzimático, o padrão de polipeptídios de cada alvéolo foi comparado,

por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE/SDS) 12%, segundo o método de Laemmli (1970). A quantificação total de proteínas foi feita pelo método de Bradford (1976).

Para avaliar alterações nas reações enzimáticas em função do tempo de operculação dos alvéolos também foi usado o Kit Api Zym, em dois grupos experimentais: um contendo três alvéolos recém operculados e outro, contendo três alvéolos operculados há nove dias, tempo necessário para o ovo de *M. scutellaris* eclodir (Almeida 1974).

Foram diluídos 30 μ L da camada superior do alimento do alvéolo, de cada grupo, em 1,5 ml de soro fisiológico, separadamente. Foram aplicados 60 μ l dessa solução em cada poço da galeria do Kit Api Zym.

2.2. Composição do alimento larval e a determinação de castas em *Melipona scutellaris*

Utilizando o método de criação de abelhas *in vitro* desenvolvido por Camargo (1972) e aprimorado por Menezes (2004) foi testada a importância relativa do pólen, da camada superior do alimento e da quantidade total de alimento larval na determinação de castas de *M. scutellaris*.

O método de criação de abelhas *in vitro* consiste na transferência de uma larva (de 1-2 dias de vida) e do alimento dos alvéolos naturais para alvéolos artificiais. Os alvéolos artificiais utilizados nesse estudo foram os orifícios de placas de teste de imuno-ensaio (ELISA), que possuem medidas semelhantes aos alvéolos naturais de *Melipona scutellaris* (Figura 5). As placas, que possuem 96 orifícios, eram cobertas com cera alveolada de *Apis mellifera* e mantidas, separadamente, dentro de vasilhames em uma estufa incubadora B.O.D. (CIEN TEC – Modelo CT 703) à 30 °C. A umidade foi mantida em 75% por meio de um béquer com solução saturada de Cloreto de Sódio dentro de cada vasilhame. Para evitar a proliferação de fungos, o béquer foi removido após a transformação das larvas em pupas.

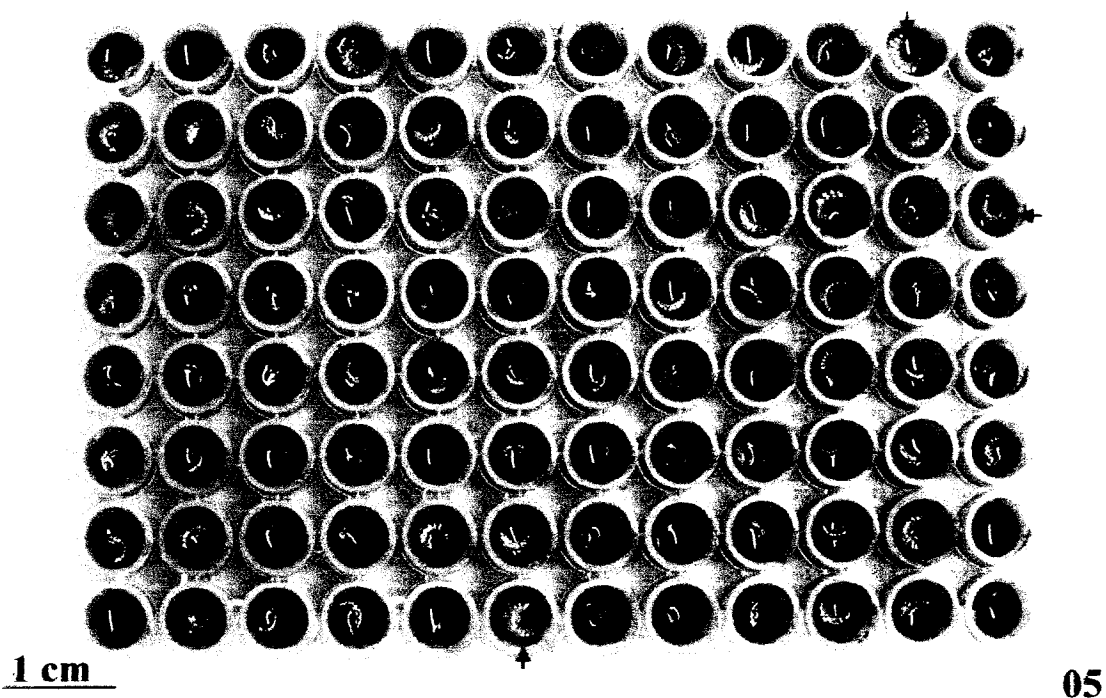


Figura 5: Placa para teste de imuno-ensaio (ELISA) usada para criação das larvas em laboratório. As setas apontam a larva sobre o alimento.

O teste foi aplicado em quatro grupos de 96 larvas cada: (1) controle; (2) experimental com o dobro da quantidade de alimento; (3) experimental com alimentação rica em secreção glandular e açúcares; (4) experimental com alimentação rica em pólen.

O alimento larval utilizado para os testes foi obtido dos favos recém operculados, contendo apenas ovos, de cinco colônias diferentes. Os ovos foram removidos com uma pinça e os favos comprimidos sobre um funil. O alimento foi homogeneizado e utilizado conforme descrito abaixo. Parte desse alimento foi centrifugada por 15 min a 10.000g para separação das duas camadas do alimento descritas acima.

Cada larva do grupo Controle (1) recebeu 120 μ l de alimento, volume que representa, aproximadamente, a média do volume total de alimento presente nos alvéolos naturais.

As larvas do grupo experimental (2) com o dobro da quantidade de alimento receberam 240 μl de alimento homogeneizado.

As larvas do grupo experimental (3) com alimentação rica em secreção glandular e açúcares receberam 120 μl de alimento homogeneizado mais 40 μl da camada superior do alimento do alvéolo, portanto total de 160 μl . O volume acrescentado representa, aproximadamente, 50 % do volume médio de camada superior presente nos alvéolos naturais processados.

As larvas do grupo experimental (4) com alimentação rica em pólen receberam 120 μL de alimento homogeneizado, mais 20 μL de pólen, proveniente da centrifugação do alimento do alvéolo, totalizando 140 μl de alimento. O volume acrescentado representa, aproximadamente, 50 % do volume médio de pólen presente nos alvéolos naturais processados. A viscosidade do pólen não permitiu a coleta de 20 μl com uma pipeta automática, por isso, o volume total de alimento que seria utilizado no experimento (12 ml) foi colocado em uma proveta e o pólen pastoso foi sendo adicionado até atingir o volume final desejado (14 ml). Depois de homogeneizado, foram distribuídos 140 μL dessa solução em cada alvéolo, para um volume final de 120 μl de alimento larval e 20 μl de pólen.

3. Resultados:

3.1. Composição do alimento larval de *Melipona scutellaris* e suas variações entre os alvéolos

O volume médio de alimento presente nos alvéolos de cria de *M. scutellaris* foi 119,3 μl ($\pm 16,9$), máxima de 141 μl e mínima de 72 μl (Tabela 2). O volume médio da camada superior do alimento centrifugado foi 82,4 μl ($\pm 9,2$), máxima de 99 μl e mínima de 63 μl (Tabela 2). O volume médio da camada inferior foi 36,9 μl ($\pm 12,6$), máxima de 60 μl e mínima de 8 μl (Tabela 2). Não houve diferença no volume total de alimento, para as camadas inferiores e superiores entre os alvéolos da borda e os do centro (Figura 6).

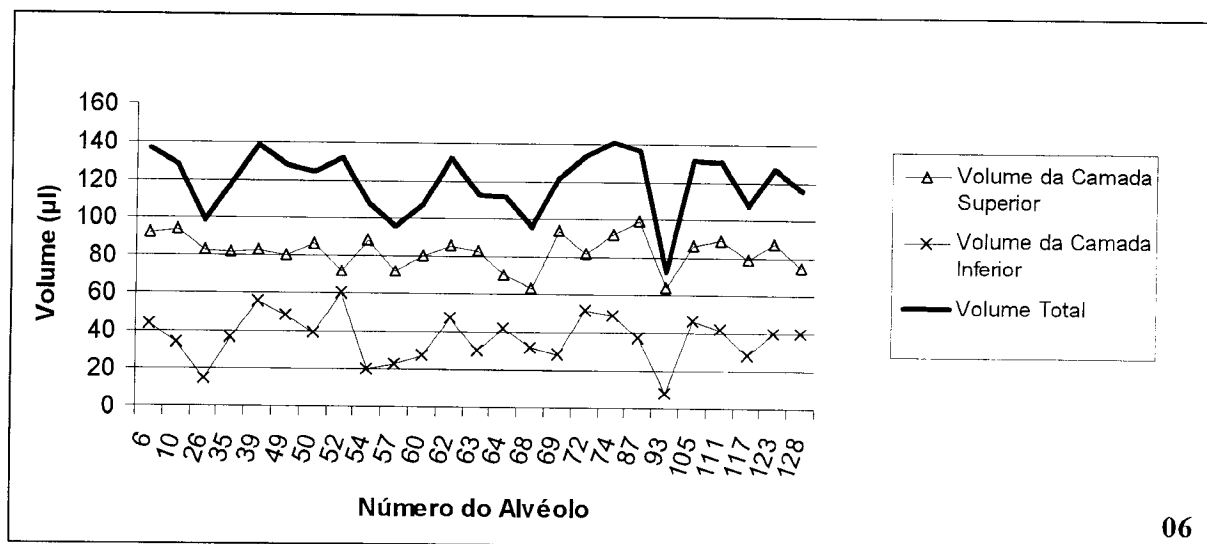


Figura 6: Variação do volume total, da camada superior e da camada inferior do alimento dos alvéolos em função da localização no favo de cria. Quanto maior o número do alvéolo, mais próximo ao centro do favo o alvéolo se localizava.

Tabela 2: Volume de alimento nos alvéolos de cria de *Melipona scutellaris* e de cada uma das duas camadas.

Quanto maior o número do alvéolo, mais próximo ao centro do favo o alvéolo se localizava.

Número do Alvéolo	Volume da Camada Superior (μl)	Volume da Camada Inferior (μl)	Volume Total (μl)
6	92	44	136
10	94	34	128
26	83	15	98
35	82	36	118
39	83	55	138
49	80	48	128
50	86	39	125
52	72	60	132
54	88	20	108
57	72	23	95
60	80	27	107
62	85	47	132
63	83	30	113
64	70	42	112
68	63	32	95
69	94	28	122
72	82	52	134
74	92	49	141
87	99	37	136
93	64	8	72
105	86	46	132
111	89	42	131
117	79	28	107
123	87	40	127
128	75	40	115
Média	82,4	36,9	119,3
Desvio Padrão	9,18	12,58	16,93

A análise de um favo mais velho, contendo pupas de olho preto, utilizado como Controle, mostrou que não estavam sendo produzidos machos no período dos experimentos (Dezembro/2005). Dos 105 alvéolos abertos, 100 continham operárias e 5 continham rainhas, portanto, proporção de 20:1 (operárias: rainhas).

Os testes enzimáticos mostraram a presença das seguintes enzimas no alimento larval: Fosfatase Alcalina, Esterase (C4), Esterase Lipase (C8), Fosfatase Ácida, Naftol-AS-BI-fosfohidrolase, α -galactosidase, β -galactosidase, α -glicosidase e β -glicosidase.

Verificou-se diminuição na intensidade das reações das enzimas à medida que os alvéolos analisados se aproximavam do centro do favo, com exceção da enzima β -galactosidase, que apresentou intensa atividade na maioria dos alvéolos analisados (Tabela 3).

Tabela 3: Intensidade das reações das enzimas presentes no alimento larval de *M. scutellaris*. Quanto maior o número do alvéolo, mais próximo ao centro do favo o alvéolo se localizava. A intensidade de reação é avaliada pela intensidade da coloração: 1 e 2 representam reações negativas e 3, 4 e 5 representam reações positivas.

Reações Enzimáticas									
Número do Alvéolo	Fosfatase Alcalina	Esterase (C4)	Esterase Lipase (C8)	Fosfatase Ácida	Naftol-AS-BI-fosfo hidrolase	α -galactosidase	β -galactosidase	α -glicosidase	β -glicosidase
6	3	3	3	5	5	3	5	5	5
10	3	3	2	5	4	3	5	5	4
26	3	2	2	4	4	2	4	4	4
35	3	2	2	3	3	1	4	3	3
39	3	2	2	4	3	2	5	4	4
49	3	2	2	3	3	2	5	3	3
50	3	2	2	3	3	2	5	5	4
52	3	3	2	3	3	2	5	3	4
54	3	3	3	4	3	2	5	4	4
57	3	3	3	4	3	2	5	3	3
60	3	2	2	4	3	2	5	4	4
62	3	3	2	4	3	2	5	3	3
63	3	2	2	4	3	2	5	4	3
64	3	2	2	3	3	2	5	3	3
68	3	2	2	4	3	2	5	3	3
69	3	2	2	3	3	2	5	3	3
72	3	2	2	3	3	2	5	3	3
74	3	2	2	3	3	2	5	3	3
87	3	3	2	3	3	2	5	3	3
93	3	2	2	3	3	2	5	3	3
105	3	2	2	3	3	2	5	2	3
111	3	2	2	3	3	2	5	2	3
117	2	1	1	3	3	2	5	2	3
123	2	1	1	3	3	1	5	1	3
128	2	1	1	3	3	2	5	2	3

Quando as reações enzimáticas de alvéolos recém operculados foram comparadas com alvéolos operculados há nove dias, foi observada diminuição na intensidade de reação mais acentuada para as enzimas fosfatase alcalina, esterase (C4), esterase lipase (C8), fosfatase

ácida, naftol-AS-BI-fosfohidrolase e α -glicosidase e menos acentuada para as enzimas α -galactosidase, β -galactosidase e β -glicosidase (Tabela 4).

Tabela 4: Comparação da intensidade das reações das enzimas presentes no alimento larval de *M. scutellaris* entre favos operculados recentemente e favos operculados há nove dias. A intensidade de reação é avaliada pela intensidade da coloração: 1 e 2 representam reações negativas e 3, 4 e 5 representam reações positivas.

	Reações Enzimáticas								
	Fosfatase Alcalina	Esterase (C4)	Esterase Lipase (C8)	Fosfatase Ácida	Naftol- AS-BI-fosfo hidrolase	α -galactosidase	β -galactosidase	α -glicosidase	β -glicosidase
Favos recém operculados	5	3	3	5	5	3	5	5	4
Favos operculados há nove dias	3	1	1	3	3	2	4	2	3

A quantidade média de proteínas por alvéolo foi 652,01 μ g (\pm 89,66) e a concentração média foi 7,92 (\pm 0,73) (Tabela 5). Quando analisados em gel de eletroforese PAGE/SDS, foi observada diferença no perfil protéico do alimento dos alvéolos, desaparecendo algumas bandas à medida que o alvéolo se aproximava do centro do favo (Figura 7 e 8).

Tabela 5: Quantidade e concentração de proteínas totais nos alvéolos estudados. Quanto maior o número do alvéolo, mais próximo ao centro do favo de cria ele se localizava.

Número do Alvéolo	Concentração de Proteínas ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Quantidade de Proteínas por Alvéolo (μg)
6	5,52	507,75
10	8,80	826,92
26	8,58	712,14
35	7,76	636,24
39	8,11	672,96
49	8,11	648,64
50	8,30	713,97
52	7,83	563,76
54	7,95	699,42
57	8,16	587,52
60	9,00	720,00
62	8,04	683,57
63	9,67	802,61
64	7,82	547,12
68	7,90	497,76
69	7,79	732,45
72	7,54	618,12
74	7,83	719,90
87	7,62	754,18
93	7,90	505,66
105	7,18	617,39
111	7,85	698,56
117	7,24	572,04
123	7,55	656,59
128	8,07	604,95
Média	7,92	652,01
Desvio Padrão	0,74	89,66

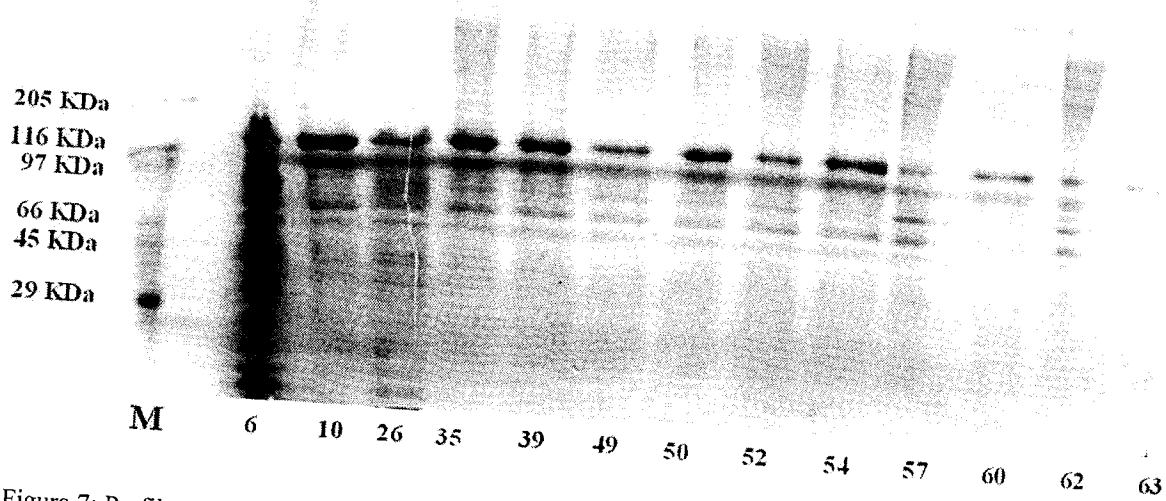


Figura 7: Perfil protéico do alimento larval de *Melipona scutellaris*. M = Padrão de Peso Molecular; 6 a 63 = Número dos alvéolos correspondentes. Quanto maior o número do alvéolo, mais próximo ao centro do favo o alvéolo se localizava.

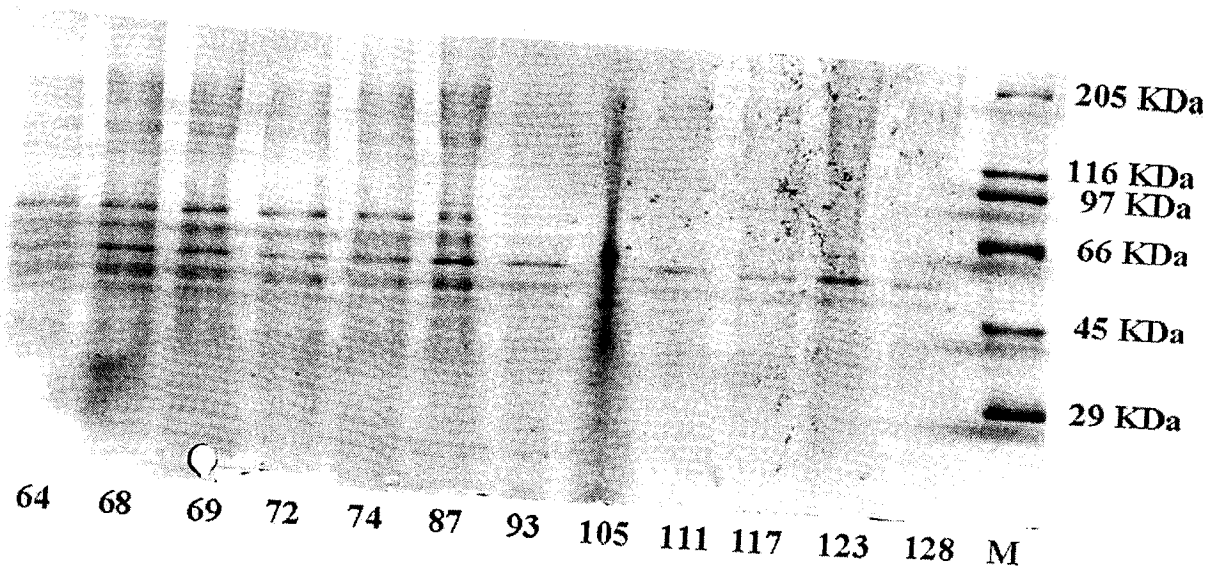


Figura 8: Perfil protéico do alimento larval de *Melipona scutellaris*. M = Padrão de Peso Molecular; 64 a 128 = Número dos alvéolos correspondentes. Quanto maior o número do alvéolo, mais próximo ao centro do favo o alvéolo se localizava.

3.2. Composição do alimento larval e a determinação de castas em *Melipona scutellaris*

O grupo (1) controle, que recebeu 120 μ l de alimento larval homogeneizado, apresentou taxa de sobrevivência de 51,04%. Dos 49 indivíduos que atingiram o estágio de imago, 39 (79,59%) eram operárias e 10 (20,41%) eram rainhas. A média do peso das rainhas foi 85,22 mg (\pm 12,72) e das operárias foi 91,01 mg (\pm 11,81) (Tabela 6).

Todos os indivíduos do grupo (2) experimental, com o dobro da quantidade de alimento, morreram antes de atingir o estágio de pupa. O excesso de alimentação gerou desenvolvimento exagerado no tamanho das larvas, o que impediu a sua movimentação dentro dos alvéolos, sendo essa, provavelmente, a causa da morte (Tabela 6).

O grupo (3) experimental, com alimentação rica em secreções glandulares e açúcares, apresentou taxa de sobrevivência de 58,33%. Dos 56 indivíduos que atingiram o estágio de imago, 55 (98,21%) eram operárias e 1 (1,79%) era rainha. O peso da rainha foi de 78,5 mg e a média do peso das operárias foi 95,35 mg (\pm 9,07) (Tabela 6).

O grupo (4) experimental, com alimentação rica em pólen, apresentou taxa de sobrevivência de 42,71%. Dos 41 indivíduos que atingiram o estágio de imago, 38 (92,68%) eram operárias e 3 (7,32%) eram rainhas. A média do peso das rainhas foi 89,63 mg (\pm 6,13) e das operárias foi 92,80mg (\pm 8,26) (Tabela 6).

Tabela 6: Resultados da criação de abelhas *in vitro*.

	Tipo de Alimentação	Volume Total de Alimento (μ l)	Número de Operárias	Número de Rainhas
Grupo (1)	Controle	120	39	10
Grupo (2)	Dobro de Alimento	240	-	-
Grupo (3)	Camada Superior do Alimento	160	55	1
Grupo (4)	Camada Inferior do Alimento	140	38	3

4. Discussão e Conclusão:

A caracterização de alguns dos elementos do alimento larval e de suas variações entre os alvéolos de uma mesma colônia representou um passo importante em direção aos mecanismos de controle da proporção de castas no gênero *Melipona*. O alimento larval é ainda pouco conhecido e é provável que suas variações influenciem a determinação de castas, até o limite de 25%. Os resultados preliminares obtidos neste trabalho propõem novos caminhos para analisar o problema.

A intensidade das atividades enzimáticas testadas diminuiu à medida que os alvéolos analisados se aproximavam do centro do favo de cria. A priori, seria possível pensar que essa variação está relacionada à determinação de castas, já que Bezerra (1995) observou que as rainhas geralmente emergem nas bordas dos favos de cria e operárias emergem, em maior número, no centro do favo.

Quando as reações enzimáticas de alvéolos recém operculados foram comparadas com alvéolos operculados há nove dias, foi observada diminuição significativa na intensidade de reação das enzimas, chegando a ser nula em algumas. A variação encontrada entre os alvéolos da região central do favo e das bordas pode estar refletindo sua ordem de construção, que ocorre do centro para a periferia. Isso pode explicar, também, o desaparecimento de bandas protéicas no perfil eletroforético à medida que o alvéolo se aproximava do centro do favo de cria.

Provavelmente, as enzimas estudadas estão relacionadas exclusivamente à funções digestivas, especialmente, na conversão de carboidratos e digestão do pólen. Velthuis (1992) sugeriu que a função original das secreções hipofaríngeas das abelhas é, em geral, simplesmente digestiva e esse padrão é ainda prevalente em *Bombinae* e *Meliponinae*. Pereboom (2000) mostrou que essas secreções não tem nenhuma função na determinação de

castas de *Bombus terrestris*, sendo igualmente fornecidas a machos, operárias e rainhas. Kerr (1966) também não observou em uma colônia de *Melipona quadrifasciata*, comportamento que justificasse diferenças qualitativas nas secreções entre os diferentes alvéolos, durante o processo de provisionamento de cada alvéolo.

Essas evidências, juntamente com o fato de não ter sido encontrado diferenças entre as enzimas estudadas, permitem deduzir que, dificilmente, elas estariam relacionadas à determinação de castas no gênero *Melipona*.

Avaliando o perfil protéico do alimento observou-se que, apesar da ampla variação da quantidade de proteínas totais por alvéolo (Coeficiente de Variação - CV = 13,75%), a sua concentração apresentou-se razoavelmente estável (CV = 9,34%). A ampla variação deve estar mais relacionada à mudanças na quantidade total de alimento do alvéolo do que à concentração de proteínas. Hartfelder (1985) mostrou que o alimento larval dos alvéolos de operária de *Scaptotrigona postica* possui três vezes menos quantidade de proteína do que a geléia real de *Apis mellifera*. Isso deve ocorrer porque a geléia real possui uma função nutritiva fundamental para as larvas de rainhas, que neste grupo de abelhas, são alimentadas, exclusivamente, com geléia real. A diferença no conteúdo protéico é suprida pela presença do pólen no alimento das abelhas sem ferrão.

Os outros fatores analisados variaram amplamente entre os alvéolos analisados. O volume total de alimento variou entre 72 μl e 141 μl (CV = 14,19%), o volume do pólen variou entre 8 μl e 60 μl (CV = 34,09%) e o volume da camada superior do alimento variou entre 64 μl e 99 μl (CV = 11,14%).

Para estimar a importância relativa da variação desses elementos, comparamos esses dados com a proporção entre operárias e rainhas, que estava ocorrendo na colônia no momento da análise da composição do alimento, que era de 20:1 (operárias: rainhas) e nenhum macho.

O primeiro fator considerado foi a quantidade total de alimento. Partiu-se da premissa de que esse seja o fator usado pela colônia para regular o número de rainhas formadas, conforme defendido por vários autores (Kerr et al 1966, Camargo 1972, Almeida 1974, Maciel-Silva & Kerr 1991, Bezerra 1995). No presente estudo, deveria ter sido encontrada uma variação na quantidade de alimento que mantivesse a proporção de 20:1, conforme estava ocorrendo, naturalmente, no momento da análise, na colônia.

A criação das larvas em laboratório, com 120 μ l de alimento, gerou uma proporção entre operárias e rainhas de 3:1, sendo esse um volume considerado suficiente para que um indivíduo, heterozigoto para os genes X^a e X^b se torne rainha. De acordo com Almeida (1974), Camargo (1972) e Maciel-Silva & Kerr (1991), todas as larvas que recebem sub-alimentação geram operárias e as que recebem maior quantidade de alimento geram a proporção 3:1 (operária: rainha). Para a presente análise, usamos como valor limiar para sub-alimentação, volumes abaixo de 120 μ l de alimento, no alvéolo.

As larvas em desenvolvimento nos alvéolos com menos de 120 μ l de alimento gerariam somente operárias e as que estavam em alvéolos com mais alimento, se transformariam em operárias ou rainhas, segundo a proporção de 3:1 (operárias: rainhas). Nos 25 alvéolos estudados, 11 indivíduos se desenvolveriam em operárias, probabilisticamente, e 14 estariam sujeitos à proporção 3:1 (Tabela 7). Nesse caso, de acordo com a probabilidade, seriam formadas 3,5 rainhas e 10,5 operárias. Nos 25 alvéolos, então, a previsão é de 3,5 rainhas e 21,5 operárias, proporção aproximada de 6:1, diferente dos 20:1 observados. Caso a condição de sub-alimentação fosse um volume menor que 120 μ l, a proporção obtida se distanciaria ainda mais do esperado.

Portanto, a afirmativa de que a quantidade de alimento é o fator determinante da proporção entre as castas é controversa e não pode ser sustentada de acordo com os métodos usados nesta análise.

Tabela 7: Previsão de diferenciação de castas nos 25 alvéolos estudados em função da quantidade total de alimento.

Número do Alvéolo	Volume Total de Alimento (µl)	Previsão de Casta
6	136	Rainha ou Operária
10	128	Rainha ou Operária
26	98	Operária
35	118	Operária
39	138	Rainha ou Operária
49	128	Rainha ou Operária
50	125	Rainha ou Operária
52	132	Rainha ou Operária
54	108	Operária
57	95	Operária
60	107	Operária
62	132	Rainha ou Operária
63	113	Operária
64	112	Operária
68	95	Operária
69	122	Rainha ou Operária
72	134	Rainha ou Operária
74	141	Rainha ou Operária
87	136	Rainha ou Operária
93	72	Operária
105	132	Rainha ou Operária
111	131	Rainha ou Operária
117	107	Operária
123	127	Rainha ou Operária
128	115	Operária

O segundo fator considerado é a quantidade de pólen. Partindo-se do mesmo raciocínio anterior, com a premissa de que o pólen é o fator responsável pelo desencadeamento de mecanismos envolvidos na determinação de castas em *Melipona*, deveria ser encontrada uma variação na quantidade de pólen que mantivesse a proporção de 20:1, observada naturalmente, na colônia.

As larvas criadas em laboratório com 120 µl de alimento homogeneizado apresentaram proporção entre operárias e rainhas de 3:1. Se o alimento é homogeneizado, o volume de pólen nesse experimento deve ser próximo à média encontrada nos 25 alvéolos analisados, portanto 36,9 µl. Por isso, seguindo a premissa de que o pólen é o fator responsável pela

determinação de castas, esse foi considerado um volume suficiente para que um indivíduo, heterozigoto para os genes X^a e X^b , se torne rainha. Para a presente análise, usamos como valor de sub-alimentação de pólen, volumes abaixo de $36 \mu\text{l}$.

Assim, as larvas dos alvéolos com menos de $36 \mu\text{l}$ de alimento gerariam somente operárias e as que estavam em alvéolos com mais, originariam operárias ou rainhas, seguindo a proporção 3:1 (operárias: rainhas). Logo, nos 25 alvéolos estudados, 10 indivíduos se transformariam em operárias, obrigatoriamente, e 15 estariam sujeitos à proporção 3:1 (Tabela 8). De acordo com a probabilidade, seriam produzidas 3,75 rainhas e 21,25 operárias, proporção aproximada de 6:1, diferente do 20:1 observado. Caso a condição de sub-alimentação de pólen fosse um volume menor do que $36,9 \mu\text{l}$, a proporção obtida se distanciaria ainda mais do observado.

Tabela 8: Previsão de diferenciação de castas nos 25 alvéolos estudados em função da quantidade de pólen no alimento.

Número do Alvéolo	Volume da Camada Inferior do Alimento (μ l)	Previsão de Casta
6	44	Rainha ou Operária
10	34	Operária
26	15	Operária
35	36	Rainha ou Operária
39	55	Rainha ou Operária
49	48	Rainha ou Operária
50	39	Rainha ou Operária
52	60	Rainha ou Operária
54	20	Operária
57	23	Operária
60	27	Operária
62	47	Rainha ou Operária
63	30	Operária
64	42	Rainha ou Operária
68	32	Operária
69	28	Operária
72	52	Rainha ou Operária
74	49	Rainha ou Operária
87	37	Rainha ou Operária
93	8	Operária
105	46	Rainha ou Operária
111	42	Rainha ou Operária
117	28	Operária
123	40	Rainha ou Operária
128	40	Rainha ou Operária

A quantidade de pólen parece, também, não ser o fator determinante da proporção de castas, de acordo os métodos usados nesta análise.

Usando-se o mesmo raciocínio para estimar a importância de um terceiro fator na determinação de castas, a camada superior do alimento, chegou-se à mesma conclusão. O volume considerado suficiente para que uma larva, heterozigota para os genes X^a e X^b , se torne rainha, corresponde à média encontrada nos testes anteriores (82 μ l). Esse valor deve ser próximo ao fornecido ao grupo de larvas que obteve proporção 3:1 (operárias : rainhas) em laboratório.

Assim, as larvas dos alvéolos com menos de 82 μ l de alimento gerariam somente operárias e as outras seguiriam a proporção 3:1 (operárias: rainhas) e, nesse caso, seriam produzidas, novamente, 3,5 rainhas e 21,5 operárias, proporção de 6:1, diferente dos 20:1 observado (Tabela 9). Logo, a camada superior do alimento (secreções glandulares e açúcares) também não deve ser o fator determinante da proporção de castas.

Tabela 9: Previsão de diferenciação de castas nos 25 alvéolos estudados em função do volume da camada superior do alimento.

Número do Alvéolo	Volume da Camada Superior do Alimento (μl)	Previsão de Casta
6	92	Rainha ou Operária
10	94	Rainha ou Operária
26	83	Rainha ou Operária
35	82	Rainha ou Operária
39	83	Rainha ou Operária
49	80	Operária
50	86	Rainha ou Operária
52	72	Operária
54	88	Rainha ou Operária
57	72	Operária
60	80	Operária
62	85	Rainha ou Operária
63	83	Rainha ou Operária
64	70	Operária
68	63	Operária
69	94	Rainha ou Operária
72	82	Rainha ou Operária
74	92	Rainha ou Operária
87	99	Rainha ou Operária
93	64	Operária
105	86	Rainha ou Operária
111	89	Rainha ou Operária
117	79	Operária
123	87	Rainha ou Operária
128	75	Operária

A criação de larvas sob condições alimentares controladas aponta resultados coerentes aos discutidos acima.

A proporção entre operárias e rainhas só foi igual ao esperado, 3:1, quando o alimento foi homogeneizado e distribuído em quantidade igual à média encontrada nos alvéolos naturais.

Este resultado contraria o que foi obtido para *M. compressipes* por Maciel-Silva & Kerr (1991) em que todas as larvas alimentadas com a quantidade média de alimento homogeneizado transformaram-se em operárias. Contraria, também, o obtido para *M. scutellaris*, por Almeida (1974) e para *M. rufiventris* e *M. quadrifasciata* por Camargo (1972). Em todos esses trabalhos, a proporção 3:1 só foi obtida em condições de alimentação que fossem superiores à média dos alvéolos naturais.

Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que não foi necessária grande quantidade de alimento, ou de outro elemento, para as larvas heterozigotas para os genes X^a e X^b produzirem rainhas, mas sim, uma quantidade normal e equilibrada.

Mesmo recebendo a quantidade mínima (120 μ l) de alimento homogeneizado, as larvas dos grupos experimentais que se alimentaram de mais pólen e mais secreções glandulares e açúcares, respectivamente, não geram proporção de 3:1. O mesmo foi observado por Almeida (1974), quando alimentou larvas de *M. scutellaris* com três vezes mais pólen e com mais açúcar que a quantidade normal.

Todos esses dados reforçam a hipótese levantada por Dixon & Shuel (1963) e Weaver (1974) de que, em *Apis mellifera*, a determinação de castas não poderia depender de uma substância “determinante” distinta e sim, de uma composição equilibrada de nutrientes na geléia real. O mesmo deve acontecer no gênero *Melipona*, pois as larvas que receberam quantidade suficiente de alimento, mas desequilibrado, não apresentaram a proporção obtida no grupo Controle, de 3:1 (operária: rainha).

Analisando os dados sobre a constituição do alimento larval dos 25 alvéolos, é possível encontrar uma relação entre o equilíbrio e o número de rainhas formadas naquele momento, na colônia e, por isso, propusemos a hipótese do “Equilíbrio Trófico”.

Foi usado como critério as diferenças na proporção entre a camada superior do alimento e a quantidade de pólen, conforme a seguinte fórmula:

$$VE = \frac{CSA}{CIA}$$

VE = Valor de Equilíbrio; CSA = Camada Superior do Alimento;

CIA = Camada Inferior do Alimento

O estudo dos 25 alvéolos evidenciou um amplo desequilíbrio na constituição do alimento larval, na situação natural da colônia que apresentou proporção 20:1 (operária: rainha). A partir dessa proporção 20:1 que estava ocorrendo, naturalmente, no momento do estudo, foi estimado que apenas uma ou duas rainhas, probabilisticamente, deveriam emergir daqueles 25 alvéolos. Para isso, entre quatro e oito larvas deveriam receber condições ideais de alimentação, quanto à quantidade e ao equilíbrio de nutrientes. As larvas que estiverem recebendo alimentação equilibrada, em quantidade suficiente, deverão apresentar proporção de 3:1 (operária: rainha) e as que não receberem uma alimentação equilibrada, deverão produzir operárias em maior proporção.

Na situação natural, a média de VE foi de 2,65. Para suprir as condições da proporção 20:1, foi encontrada variação em VE de 0,5 para cima ou para baixo, ou seja, 9 dos 25 alvéolos estudados encontrava-se equilibrados entre 2,15 e 3,15 em relação ao VE. As larvas desses alvéolos, que recebessem quantidade suficiente de alimento, produziriam operárias e rainhas segundo a proporção 3:1 e as larvas dos demais alvéolos, cujo VE estava abaixo ou acima de 2,15 e 3,15, respectivamente, gerariam somente operárias (Tabela 10).

Tabela 10: Relação entre o Valor de Equilíbrio (VE) e previsão de diferenciação de castas.

Número do Alvéolo	Volume da Camada Superior do Alimento (μ l)	Volume da Camada Inferior do Alimento (μ l)	VE	Previsão de Casta
6	92	44	2,09	Operária
10	94	34	2,76	Rainha ou Operária
26	83	15	5,53	Operária
35	82	36	2,28	Rainha ou Operária
39	83	55	1,51	Operária
49	80	48	1,67	Operária
50	86	39	2,21	Rainha ou Operária
52	72	60	1,20	Operária
54	88	20	4,40	Operária
57	72	23	3,13	Rainha ou Operária
60	80	27	2,96	Rainha ou Operária
62	85	47	1,81	Operária
63	83	30	2,77	Rainha ou Operária
64	70	42	1,67	Operária
68	63	32	1,97	Operária
69	94	28	3,36	Operária
72	82	52	1,58	Operária
74	92	49	1,88	Operária
87	99	37	2,68	Rainha ou Operária
93	64	8	8,00	Operária
105	86	46	1,87	Operária
111	89	42	2,12	Operária
117	79	28	2,82	Rainha ou Operária
123	87	40	2,18	Rainha ou Operária
128	75	40	1,88	Operária

Durante a estação reprodutiva, devido à maior disponibilidade de alimento na colônia e no ambiente, o VE deve se aproximar do valor ideal, na maioria dos alvéolos. Apesar de não ser possível determinar com segurança esse valor somente com esses dados, provavelmente, ele deve se aproximar ao estimado acima, pois a homogeneização do alimento gerou a proporção 3:1.

Durante as estações não reprodutivas ou em situações de estresse, em que a produção de rainhas representaria um gasto energético muito alto e a quantidade de alimento disponível na colônia é menor, um desequilíbrio na alimentação das larvas poderia aumentar a proporção entre operárias e rainhas de 3:1 para 20:1 ou até mais.

Esse desequilíbrio, provavelmente, envolve mais fatores que a proporção entre a camada superior e inferior do alimento. Ao longo de milhares de anos de evolução, esse grupo de abelhas aprimorou os mecanismos de regulação das castas, envolvendo uma teia de fatores ambientais e genéticos que, juntos, irão otimizar os gastos energéticos da colônia, produzindo mais operárias nas situações em que a manutenção da colônia é prioritária e mais rainhas (e machos) nas situações em que a reprodução seja importante (Kerr 1966, Camargo 1972, Almeida 1974, Bezerra 1995). A eficiência desse mecanismo é comprovada pelo número de espécies existentes atualmente no gênero *Melipona*, que é superior ao de qualquer outro gênero de abelhas sociais (Silveira et al. 2002).

Por se tratar de um estudo preliminar, não foi possível embasar a hipótese do “Equilíbrio Trófico” com dados suficientes para substituir ou alterar as já existentes para a diferenciação de castas em *Melipona*. Para isso, seria necessário um número de alvéolos e de colônias maior, comparando as variações na constituição do alimento ao longo do ano e testando essas variações em laboratório, sob condições controladas. Está aberto, entretanto, um novo caminho para tentar elucidar os mecanismos que regem a determinação de castas no gênero *Melipona* e conhecer o mecanismo de regulação das castas nas diferentes estações do ano.

5. Referências Bibliográficas:

1. ALMEIDA, M.G. 1974. Aspectos bionômicos, ecológicos e genéticos da abelha *Melipona scutellaris escutellaris*, Latreille (1811). Ribeirão Preto, São Paulo. Tese de doutorado, p. 128.
2. ASENCONT, M. & LENSKY, Y. 1984. Juvenile hormone induction “queenliness” on female honey bee (*Apis mellifera* L.) larvae reared on worker jelly and on stored royal jelly. *Comp. Biochem. Physiol.* 78 B (1):109-117.
3. BEZERRA, J.M.D. 1995. Implicações genéticas do investimento sexual em *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae). Viçosa: UFV-MG. Tese para obtenção do Título de “Magister Scientiae”. P. 144.
4. BONETTI, A.M. 1982. Ação do hormônio juvenil sobre a expressão gênica em *Melipona* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). Dissertação de Mestrado. FMRP-USP, 140 pp.
5. BONETTI, A.M. 1990. Genética da determinação de casta em *Melipona*. Ação do hormônio juvenil sobre esterases e *corpora allata* durante desenvolvimento pós-embrionário. Tese de Doutorado FMRP-USP, 165 pp.
6. BONETTI, A.M. & KERR, W.E. 1985. Sex determination in bees. XX. Estudo da ação gênica em *Melipona marginata* e *Melipona compressipes* a partir da análise morfométrica. *Ver. Brasil. Genet.* VIII 4: 629-638.
7. BOURKE, A.F.G. & RATNIEKS, F.L.W. 1999. Kin conflict over caste determination in social Hymenoptera. *Behavioral and Social Biology* 46: 287-297.
8. BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry.* 72: 248-254.

9. CAMARGO, C.A. 1972. Aspectos da reprodução dos Apídeos sociais. Dissertação de Mestrado. FMRP-USP, 63 pp.
10. CAMPOS, L.A.O. 1977. O hormônio juvenil nas abelhas: seu papel na diferenciação de castas e nos aspectos do controle social. Ribeirão Preto, São Paulo. (Tese de Doutorado)
11. CAMPOS, L.A.O., KERR, W.E. & SILVA, D.L.N. 1979. Sex determination in bees. VIII. Relative action of genes *xa* and *xb* on sex determination in *Melipona* bees. *Revista Brasileira de Genética* 2 (4): 267-277.
12. CAMPOS, L.A.O. & COSTA, M.A. 1989. Determinação do sexo em abelhas XXVIII. Determinação das castas em *Schwarziana quadripunctata* (Hymenoptera, Apidae). *Rer. Bras. Biol.*, 49 (4): 999-1001.
13. CHALESWORTH, B. 2003. Sex determination in the honeybee. *Cell*, Vol. 114, 397-398.
14. DARCHEN R. & DELAGE-DARCHEN B. 1970. Facteur déterminant les castes chez les Trigones (Hyménoptères, Apides). *Rev. Brasil. Biol.*, 32, 133-138.
15. DARCHEN, R & DELAGE-DARCHEN B. 1971. Le déterminisme des castes chez les Trigones (Hyménoptères, Apidés). *Insectes Soc.*, 18, 121-134.
16. DIXON S.E. & SHUEL R.W. 1963. Studies in the mode of action of royal jelly in honeybee development. III The effect of experimental variation in diet on growth and metabolism of honeybee larvae. *Can. J. Zool.*, 41, 733-739.
17. ENGELS, W. & IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. 1990. Caste development, reproductive strategies, and control of fertility in honeybees and stingless bees. In: Engels, W. (ed.), *Social Insectes, an Evolutionary Approach to Castes and Reproduction*. Berlin, Springer-Verlag, 167-230.

18. FAUSTINO, C.D., MATOS, E.V.S., MATEUS, S. & ZUCCHI, R. 2002. First record of emergence of queen rearing in stingless bees. *Ins. Soc.*, 49(2):111-113.
19. HARTFELDER, K. 1985. Composition of larval food in the stingless bee, *Scaptotrigona postica*. *Mitt. dtsh. Ges. allg. angew. Ent.* 4
20. HARTFELDER, K. 1987. Caste differentiation in stingless bees: A comparative analysis of larval food from 7 species. In: *Chemistry and biology of social insects*, Eder J. Rembold H., eds., Verl. Peperny, Munich, p. 174.
21. IHERING, H VON 1903. Biologia das abelhas mellifera do Brasil. *Bol. Agric.* 32 (5, 6), 32 (7, 8), 649-714 (1930); transl *Zool Jahrb* 19, 179-287.
22. ISHAY, J., FISCHL, J. & ALPERN, G. 1976. Study of honeybee caste differentiation by glucose level differences during development. *Insectes Sociaux*, 23(1):23-28
23. IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. & ZUCCHI, R. 1995. Virgin queens in stingless bee (*Apidae*, *Meliponinae*) colonies: a review. *Apidologie* 26: 231-244.
24. JUDICE C., HARTFELDER, K. & PEREIRA, G.A.G. 2004. Caste-specific gene expression in the stingless bee *Melipona quadrifasciata* – Are there common patterns in highly eusocial bees? *Insect. Soc.* 51, 352-358.
25. KERR, W.E. 1948. Estudos sobre o Gênero *Melipona*. *Na. Esc. Sup. Agr. "Luiz de Queiroz"*. 5:181-276.
26. KERR, W.E. 1950. Genetic determination of castes in the genus *Melipona*. *Genetics*, 35: 143-152.
27. KERR, W.E. 1987. Sex determination in bees. XVII. Systems of caste determination in the *Apinae*, *Meliponinae* and *Bombinae* and their phylogenetical implications. *Braz. J. Genet.* 10: 685-694.

28. KERR, W.E., STORT, A.C.G. & MONTENEGRO, M.J. 1966. Importância de alguns fatores ambientais na determinação de castas no gênero *Melipona*. An. Acad. Bras. Ciênc. 38(1): 149-168.
29. KOEDAM, D. & IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. 2004. The sharing of male production among worker cohorts in *Melipona* (Apidae, Meliponini). Proceedings of the 8th IBRA International Conference on Tropical bees and VI Encontro sobre Abelhas. Ribeirão Preto, SP. Brasil. pp. 264-270.
30. LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. Nature. v.227, p. 680.
31. MACIEL-SILVA, V.L. & KERR, W.E. 1991. Sex determination in bees. XXVII. Castes obtained from larvae fed homogenized food in *Melipona compressipes* (Hymenoptera, Apidae). Apidologie 22: 15-19.
32. MENEZES, C; KERR, W.E.; BONETTI, A.M.; SIQUIEROLI, A.C.S.; OLIVEIRA, C.C. 2004. Methods improvements of stingless bee “in vitro” rearing. Proceedings of the 8th IBRA International Conference on Tropical bees and VI Encontro sobre Abelhas. Ribeirão Preto, SP. Brasil. p. 766.
33. NOGUEIRA-NETO, P. 1997. Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão. São Paulo, Editora Nogueirapis, 445 p.
34. PEREBOOM, J.J.M. 2000. The composition of larval food and the significance of exocrine secretions in the bumblebee *Bombus terrestris*. Insectes soc. 47: 11-20.
35. RATNIEKS, F.L.W. 2001. Heirs and apares: caste conflict and excess queen production in *Melipona* bees. Behavioral and Social Biology.
36. REMBOLD, H. & LACKNER, B. 1981. Rearing of honey bee larvae in vitro: Effect of yeast extract on queen differentiation. J. Apic. Res., 20, 165-171.

37. REMBOLD, H.; CZOPPELT, C. & RAO, P.J. 1974. Effect of juvenile hormone treatment on caste differentiation in the honeybee, *Apis mellifera*. J. Insect Physiol, 20:1193-1202.
38. RIBEIRO, M.F. 2004. Miniature queens in stingless bee species – a review. Proceedings of the 8th IBRA International Conference on Tropical bees and VI Encontro sobre Abelhas. Ribeirão Preto, SP. Brasil. pp. 280-286.
39. SAKAGAMI, S.F. 1982. Stingless bees. In: Hermann H.R. (ed) Social Insectes III. Academic Press; New York. Pp. 361-423.
40. SEELEY, T.D. 1985. Honey bee Ecology. A study of adaptation in Social Life. Princeton University Press, Princeton, HJ.
41. SILVEIRA, F.A., MELO, G.A.R. & ALMEIDA, E.A.B. 2002. Abelhas brasileiras: sistemática e identificação. Fundação Araucária. Belo Horizonte-MG. 1º Edição. 253p.:il.
42. TAKENAKA T. & TAKAHASHI E. 1980. General chemical composition of the Royal jelly. Bull. Fac. Agric. Tamagawa Univ.,20:71-78.
43. TAKENAKA T. & TAKAHASHI E. 1983. Proteins and peptides in royal jelly Nippon Nôg. Kaishi, 57, 1203-1209.
44. TERADA, Y. 1974. Contribuição ao estudo da regulação social em *Leurotrigona muelleri* e *Frieseomallita varia* (Hymenoptera, Apidae). Tese de Mestrado, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
45. VAN VEEN, J.W. & SOMMEIJER, M.J. 2000. Colony reproduction in *Tetragonisca angustula* (Apidae, Meliponinae). Insectes Soc. 47: 70-75.
46. VELTHUIS, H.H.W. 1992. Pollen digestion and the evolution of sociality in bees. Bee world. 73: 77-88.

47. WEAVER, N. 1974. Control of dimorphism in the female honeybee. 3. The balance of nutrients: *J. Apic. Res.*, 13, 93-101.
48. WENSELEERS, T; RATNIEKS, F.L.W. & BILLEN, J. 2003. Caste fate conflict in swarm-founding social Hymenoptera: an inclusive fitness analysis. *J. Eviol. Biol.* 16, 647-658.
49. WILSON, E.O. 1971. *The Insect Societies*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
50. WINSTON, M.L.L. 1987. *The Biology of the Honey Bee*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
51. WITTMANN, D. & ENGELS, W. 1987. Welche Diät ergibt Arbeiterinnen bei in vitro Aufzucht von Honigbienen? *Apidologie*, 18, 279-288.

ANEXOS

Normas da Revista Biota Neotropica para Citação Bibliográfica

Citação:

Colocar as citações bibliográficas de acordo com o seguinte padrão: Silva (1960) ou (Silva 1960); Silva (1960, 1973); Silva (1960a, b); Silva & Pereira (1979) ou (Silva & Pereira 1979); Silva et al. (1990) ou (Silva et al. 1990); (Silva 1989, Pereira & Carvalho 1993, Araujo et al. 1996, Lima 1997). Citar referências a resultados não publicados ou trabalhos submetidos da seguinte forma: (A.E. Silva, dados não publicados). Em trabalhos taxonômicos, detalhar as citações do material examinado, conforme as regras específicas para o tipo de organismo estudado.

Referências:

Adotar o formato apresentado nos seguintes exemplos:

1. SMITH, P.M. 1976. The chemotaxonomy of plants. Edward Arnold, London.
2. SNEDECOR, G.W. & COCHRAN, W.G. 1980. Statistical Methods. 7 ed. Iowa State University Press, Ames.
3. SUNDERLAND, N. 1973. Pollen and anther culture. In Plant tissue and cell culture (H.F. Street, ed.). Blackwell Scientific Publications, Oxford, p.205-239.
4. BENTHAM, G. 1862. Leguminosae. Dalbergiae. In Flora Brasiliensis (C.F.P. Martius & A.G. Eichler, eds.). F. Fleischer, Lipsiae, v.15, pars 1, p.1-349.
5. MANTOVANI, W., ROSSI, L., ROMANIUC NETO, S., ASSAD-LUDEWIGS, I.Y., WANDERLEY, M.G.L., MELO, M.M.R.F. & TOLEDO, C.B. 1989. Estudo fitossociológico de áreas de mata ciliar em Mogi-Guaçu, SP, Brasil. In Simpósio sobre mata ciliar (L.M. Barbosa, coord.). Fundação Cargil, Campinas, p.235-267.
6. FERGUSON, I.B. & BOLLARD, E.G. 1976. The movement of calcium in woody stems. Ann. Bot. 40:1057-1065.
7. STRUFFALDI-DE VUONO, Y. 1985. Fitossociologia do estrato arbóreo da floresta da Reserva Biológica do Instituto de Botânica de São Paulo, SP. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Abreviar títulos dos periódicos de acordo com o "World List of Scientific Periodicals".