

LUCIANE CRISTINA DE OLIVEIRA LISBOA

**HISTOLOGIA E ULTRA-ESTRUTURA DOS OVÁRIOS NAS CASTAS DE
ALGUNS MELIPONÍNEOS: UM ESTUDO COMPARADO**

Orientadora: Profa. Dra. Carminda da Cruz Landim

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Rio Claro, para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular)

Rio Claro

2006

*“Sei que a arte é irmã da ciência
Ambas filhas de um Deus fugaz
Que faz num momento
E no mesmo momento desfaz”*

Gilberto Gil “Quanta”

“

GUITARRA

AD LIBITUM

ALLEGRO BRILLANTE

“

Las Abelhas Agustin Barrios

Dedicatória

Dedico, à minha família, a conclusão de mais esta etapa da minha vida. Ela me ensinou a trabalhar honesta e pacificamente pelos meus interesses, a oferecer meu trabalho para a minha santificação e a transformar tudo o que aprendi com o meu trabalho em conhecimento acessível para todos.

AGRADECIMENTOS

Durante todo este tempo, pude contar com pessoas que se envolveram com o meu trabalho. Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para que este trabalho se realizasse, e que por isto serão lembrados sempre, com muito carinho:

- Professora Dra. Carminda da Cruz Landim, pela orientação, cuidado e apoio com que me orientou e assistiu;
- Professor Dr. Lúcio Antônio de Oliveira Campos, que participou desde o primeiro ano de graduação da minha vida acadêmica e tem estado presente sempre;
- Professor Dr. José Eduardo Serrão, por ter me acompanhado todo o tempo à distância ou no laboratório;
- Professora Gláucia Maria Cavasin, por ter aceitado nosso convite e por ter colaborado muito com suas sugestões;
- Professor Fábio Camargo Abdalla, que me acompanhou desde o mestrado, pela sua amizade e por estar presente neste momento tão importante;
- Professor Dr. Adilson Ariza Zacaro, pelas sugestões que foram muito úteis desde o início;
- Professora Dra. Doralice Maria Cella, pela amizade e por ajudar sempre a resolver os problemas;
- Prof. Cláudio Cezar Coutinho Leitão, Presidente do Instituto Doctum Educação e Tecnologia, pela valorização do meu trabalho;

- Prof. Pedro Cláudio Coutinho Leitão, Diretor Regional das Faculdades Doctum, campus Teófilo Otoni, pelo apoio e incentivo na fase de conclusão da tese;
- Meu pai, Geraldo Lisboa e minha mãe, Maria das Graças Lisboa, por tudo o que vocês conseguiram ser e fazer para nós, os filhos;
- Meus Irmãos, Gracinha, Darlan e Júnior: pela força, pelas “injeções” de ânimo e por tornar a nossa casa tão alegre;
- Meu namorado Edmilson, por ter estado sempre presente mesmo à distância, resolvendo todos os problemas, pela grande ajuda com o trabalho e por cuidar tão bem de mim;
- Minha amiga Conceição, pelas vezes que me ajudou e por sua lealdade há tantos anos;
- Érika e Diego, pela amizade e pela presença tão importante na etapa final do trabalho;
- Lila, minha amiga e parceira, “coordenadora” de todos os eventos do Apiário;
- Gustavo, por se lembrar de enviar sempre os trabalhos do meu interesse e pelas palavras de incentivo;
- Amigos, colegas de curso: Vagner, Lorena, Thaísa, Fernanda, com quem convivi dentro e fora da Unesp;
- Funcionários do Centro de Microscopia Eletrônica: Mônica Lamonti e Antônio Yabuki, por terem tido tanto cuidado e dedicação sempre que precisei de ajuda;
- Lucila, secretária do Departamento de Biologia pela atenção;
- Funcionárias da Seção de Pós-Graduação: Heloísa, Rute e Catalina, por me manterem informada sobre os compromissos com o Programa;
- Funcionários do Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa: Íris Raimundo Stanciola e Geraldo Paiva, pela obtenção dos ninhos e por cuidarem das abelhas na minha ausência;

Enfim, desejo que vocês continuem, cada um à sua maneira, contribuindo para formar profissionais e pessoas, e que cresçam cada vez que uma nova conquista acontecer. Obrigada por tudo!!!!

ÍNDICE

Página

1- RESUMO	8
2- ABSTRACT	10
3- INTRODUÇÃO	12
4- OBJETIVOS	20
5- RESULTADOS	20
CAPÍTULO 1: Desenvolvimento dos ovários em <i>Frieseomelitta varia</i>	21
INTRODUCAO	21
MATERIAL E MÉTODOS	25
RESULTADOS	28
DISCUSSAO	42
CAPÍTULO 2: Diferenciação do ovário entre as castas de <i>Trigona spinipes</i>	45
INTRODUCAO	45
MATERIAL E MÉTODOS	50
RESULTADOS	51
DISCUSSAO	55
CAPÍTULO 3: Desenvolvimento dos ovários e postura em Operárias de Meliponini	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

RESUMO

Entre as abelhas altamente eussociais, o estudo de aspectos da morfologia e da ultra-estrutura tem ajudado a esclarecer uma série de questões sobre a sua biologia.

A divisão de trabalho distingue as fêmeas em duas castas, sendo uma com função reprodutiva (rainha) e outra que desempenha as mais diversas tarefas dentro da colônia (operária).

Espécies do gênero *Frieseomelitta* mostram esta divisão de forma mais clara, uma vez que suas operárias nunca põem ovos; começando um processo degenerativo nos ovários ainda no final de sua diferenciação.

Porém, nas diferentes espécies e em diferentes condições, as operárias podem desenvolver seus ovários e realizar postura de ovos tróficos que são comidos pelas rainhas, ou dar origem a machos. O primeiro caso mostra que além da contribuição dada pelas operárias na produção de alimento para a cria com suas secreções glandulares, elas contribuem também com seus ovos para produzir alimento. Já o segundo caso pode ser um indicativo de que a divisão do trabalho reprodutivo ainda não está totalmente definida.

A fertilidade das rainhas também parece se manifestar de diferentes formas. Em *Apis mellifera*, é evidenciada pela enorme diferença no número de ovaríolos, bem maior nas rainhas do que nas operárias. Esta diferença é devido a uma redução sofrida pelas operárias durante o desenvolvimento pós-embriônico. Já nos

meliponíneos o número de ovariolos de rainhas e operárias é, para a maioria das espécies, igual e em número de quatro por ovário.

Em *Trigona spinipes*, o número de ovariolos dos ovários das operárias é sempre igual a quatro, enquanto que nas rainhas pode variar entre oito e quinze, entre as rainhas e entre os ovários da mesma rainha.

De qualquer maneira o número de ovariolos presentes nos ovários das rainhas dos meliponíneos é muito pequeno comparado a *Apis mellifera*; o que sugere que sua eficiência em produzir ovos seja mais elevada e em parte atribuída ao comprimento dos ovariolos.

Aspectos referentes ao comportamento dos ovários das fêmeas dos meliponíneos durante o seu desenvolvimento são abordados neste trabalho, levando-se em consideração características histológicas e ultra-estruturais. Alguns dados são apresentados com base em estudos feitos particularmente em *Frieseomelitta varia* e *Trigona spinipes*, sobre os ovários de operárias e rainhas.

Palavras chave: ovário, desenvolvimento, ovariolos, histologia, ultra-estrutura, postura.

ABSTRACT

The survey of morphological and ultrastructural aspects of highly eusocial bees, have cleared and supported many questions about their biology.

The division of labour discern the females in to two castes, being one with reproductive function (queen) and other that perform different tasks within the colony (worker).

Frieseomelitta shows this division clearly. The workers never lay eggs; starting a degenerative process in the ovaries yet in the ending your differentiation.

However, in different species and in different conditions, the workers can develop their ovaries and lay eggs that can be trophic and be eaten by the queens, or give rise males. The first condition show that further of the contribution given by the workers in the food production for the brood with yours glandular secretions, they contribute also with yours eggs for to produce food. The second condition can be an evidence that division of reproductive labour is not entirely solved yet.

Queen's fertility also seems to be expressed in different ways. In honey bees *Apis mellifera*, there is a large difference in ovarioles number, which are bigger in queens than workers. This difference is due to the decrease in workers ovarioles number during the post-embryonic development. In Meliponini the ovarioles number of queens and workers is, for most of the species, the same; four per ovary.

In *Trigona spinipes*, the ovarioles number in workers is always four, while in queens can vary from eight to fifteen among queens and among the ovaries of the same queen.

Anyway, the ovariole number present in the ovary of queens in Meliponini is very small if compared to *Apis mellifera*; that suggest that their efficiency in egg production can be higher and attached to the ovarioles length.

Some references to the behavior of the ovary in Meliponini females during their development are approached in this work, considering histologicals and ultrastructural features. Some data obtained in studies done particularly in *Frieseomelitta varia* and *Trigona spinipes*, about queen's and worker's ovaries are showed.

Key words: ovary, development, ovarioles, histology, ultrastructure, egg laying.

INTRODUÇÃO

O sistema reprodutor das fêmeas dos insetos constitui-se basicamente de um par de ovários, dois ovidutos laterais e um oviduto comum (SNODGRASS, 1935; CHAPMAN, 1998). Em alguns insetos o oviduto comum continua-se posteriormente por uma vagina que se abre para o exterior através do oviporo. Outras estruturas como uma bursa copulatrix podem também estar presentes e, associadas a todos os tipos de aparelhos reprodutores femininos, há ainda uma bolsa chamada espermateca, que recebe e armazena os espermatozóides durante o intervalo entre a cópula e a fecundação do óvulo, e glândulas acessórias com funções variadas.

Os ovários localizam-se látero-dorsalmente ao tubo digestivo, enquanto os ovidutos laterais e o oviduto comum são ventrais. Os ovários dos insetos são, com raras exceções, constituídos de unidades chamadas de ovaríolos, ou tubos de ovos. Os ovaríolos prolongam-se para a região anterior dorsal, onde se prendem, conjuntamente, a um mesmo ponto do exoesqueleto, enquanto a base dos ovários e os ovidutos laterais se dirigem para a região ventral onde se ligam ao oviduto único, ventralmente ao tubo digestivo.

Os ovários podem ser classificados em dois grupos, considerando a existência ou não de células especializadas denominadas células nutridoras ou trofócitos, associadas às células germinativas:

-panoísticos: quando não existem células nutridoras. Em ovários panoísticos, todas as células germinativas se diferenciam em ovócitos, que são subseqüentemente envolvidos por células foliculares derivadas de tecido pré-folicular (ROCKSTEIN, 1973).

-meroísticos: quando existem células nutridoras. Os ovários meroísticos podem ser telotróficos ou politróficos. Nos ovários meroísticos telotróficos, as células nutridoras permanecem na região apical, ligadas aos ovócitos por um cordão citoplasmático, nutrindo o ovócito à distância. Nos ovários meroísticos politróficos, grupos de células nutridoras se formam e se movem junto com o ovócito encerradas no folículo, ao longo do vitelário (CHAPMAN, 1998; ROCKSTEIN, 1973).

Os ovariolos são as unidades funcionais dos ovários, onde ocorre a ovogênese e a vitelogênese. São constituídos de estruturas alongadas delimitadas por células somáticas, que formam uma camada envoltória, a túnica ou camada peritoneal. No interior do ovariolo encontram-se células de linhagem germinativa; desde ovogônias primárias até ovócitos prontos para a postura, separados e sustentados por células somáticas intra-ovariolares (CRUZ-LANDIM, 2004; BÜNING, 1994). Um ovariolo típico é um tubo alongado no qual os ovócitos em desenvolvimento estão dispostos uns atrás dos outros numa cadeia simples, sendo que o ovócito mais desenvolvido fica situado próximo à sua união com o oviduto lateral.

No ovariolo são reconhecidas quatro regiões:

1) o filamento terminal, que é um prolongamento apical fino da bainha peritoneal contendo células indiferenciadas, empilhadas; os filamentos terminais dos ovariolos de um ovário formam um feixe que se une com aquele do ovário do lado oposto para formar o ligamento mediano que prende os ovários ao tegumento dorsal;

2) o germário vem a seguir ao filamento terminal. É o local onde ocorre a diferenciação do ovócito (ENGELMAN, 1970; CRUZ-LANDIM, 2004). Consiste de uma massa de células germinativas primordiais, que formarão células nutridoras e ovócitos, além do tecido pré-folicular, que formará o epitélio folicular;

3) O vitelário, que se constitui na maior porção do ovaríolo, contém os ovócitos em desenvolvimento e as células nutridoras quando presentes, sendo a região onde ocorre a deposição de vitelo nos ovócitos;

4) o pedicelo é um tubo curto na base do ovaríolo e o liga ao oviduto lateral.

No vitelário, podem ser identificados folículos que são formados pelos ovócitos em maturação (e no caso dos ovários meroísticos politróficos também pelas células nutridoras) e pelo epitélio folicular que os reveste. Os vários folículos são separados entre si por um tecido interfolicular também originado do tecido pré-folicular. O número de folículos por ovaríolo pode *variar* de espécie para espécie, mas se mantém constante dentro da espécie. *Schistocerca* apresenta 20 folículos por ovaríolo, *Drosophila* 6 e *Melophagus* apenas 1 (CHAPMAN, 1998) e nas rainhas de *Apis mellifera* são muito numerosos, ultrapassando uma centena.

Os ovários sofrem mudanças anatômicas, morfológicas e ultra-estruturais durante a vida do inseto, conforme a fase reprodutiva em que eles se encontram, caracterizadas por alterações morfológicas e fisiológicas nas células que os compõem.

O desenvolvimento ovariano em abelhas

As principais características do comportamento eussocial são a divisão de trabalho entre os membros do grupo, o hábito de guardar provisões e a sobreposição de gerações. As abelhas altamente eussociais reúnem, como outros insetos eussociais, todas estas características.

A divisão do trabalho reprodutivo é, sem dúvida, a característica mais discutida em abelhas eussociais. Isto se deve ao fato de que esta é a característica que as distingue de todos os grupos que as antecedem em relação aos níveis de sociabilidade. Esta divisão de trabalho entre as fêmeas é evidenciada pela existência de castas femininas: rainhas e operárias.

A divisão de trabalho nas abelhas altamente eussociais evoluiu de tal modo que nos indivíduos de cada uma das castas, é possível verificar diferenças

morfológicas, fisiológicas e comportamentais, adequando-os às suas respectivas tarefas (MICHENER, 1974). Estas diferenças podem ser verificadas internamente, como por exemplo, no acentuado dimorfismo observado entre os ovários das rainhas e das operárias. Em *Apis mellifera* a rainha tem de 180 a 200 longos ovariolos por ovário, enquanto as operárias têm somente de 2 a 12 ovariolos curtos. Nas abelhas sem ferrão, nos Meliponini, o número de ovariolos não difere tanto entre as castas. Com bastante freqüência a diferença diz respeito apenas ao comprimento dos ovariolos (CRUZ-LANDIM, 2000)

Exceto para o gênero *Melipona*, as diferenças entre as castas das abelhas eussociais avançadas são ambientalmente determinadas, mais especificamente, determinadas pela dieta das larvas (MICHENER, 1974).

Embora as operárias não sejam uma casta reprodutiva nestas abelhas, e o comportamento social tenha também implicações morfológicas e fisiológicas, na maioria das espécies de abelhas altamente eussociais as operárias podem desenvolver ovários e realizar postura.

O estudo do desenvolvimento dos ovários e da postura nas operárias contribui para a compreensão da regulação da diferenciação das castas, (REGINATO E CRUZ-LANDIM, 2001; STAURENGO DA CUNHA e CAMPOS, 1993; BOLELI *et al.*, 1999) bem como para a da produção de machos. Os ovários das operárias das abelhas altamente eussociais normalmente permanecem filamentosos, ou quando se desenvolvem, dão origem a ovos tróficos, dados à rainha como alimento no caso dos Meliponini, ou funcionais que originam machos; por que estas não realizam cópula. Já nas rainhas, grandes quantidades de ovos férteis capazes de originar fêmeas e machos são produzidos.

Em *A. mellifera* o desenvolvimento dos folículos e a ovogênese nos ovários das operárias são controlados por feromônios produzidos pela rainha. Mesmo assim, uma certa porcentagem de operárias escapa deste controle e realiza postura de ovos não fertilizados que são postos fora das células de cria, ou mais de um por célula e geralmente são retirados por outras operárias; as policiadoras (MILLER e RATNIEKS, 2001). No entanto, alguns podem se desenvolver e dar origem a machos.

Nos Meliponini a condição mais freqüente é que as operárias desenvolvam ovos no ovário e realizem postura, e esses ovos em geral sirvam para a alimentação das rainhas; são os ovos tróficos. No entanto, alguns desses ovos também podem dar origem a machos; são os ovos funcionais. A taxa de postura das operárias é, em geral, pequena. O ovário das operárias de *Nannotrigona testaceicornis* é formado por quatro ovariolos em diferentes fases do desenvolvimento. O vitelário contém somente um folículo tal como ocorre em operárias de outros meliponíneos, como: *Scaptotrigona postica*, *Frieseomelitta languida* e *Frieseomelitta varia varia*, *Melipona quadrifasciata* (STAURENGO-DA-CUNHA e IIDE, 1992; CRUZ-LANDIM, 2000).

Entre as abelhas sem ferrão existem diferentes padrões de desenvolvimento ovariano e de postura entre as operárias, desde aquelas que põem ovos mesmo na presença da rainha, até aquelas que possuem ovários indiferenciados, que é o caso das espécies do gênero *Frieseomelitta* (BOLELI *et al.*, 2000; STAURENGO-DA-CUNHA e CAMPOS, 1993). Em *Frieseomelitta* e *Duckeola ghiliani* (SAKAGAMI & ZUCCHI, 1968, CAMILLO-ATIQUE, 1977; STAURENGO-DA-CUNHA, *et al.*, 1986; CRUZ-LANDIM, 2000), entretanto, nunca se observou postura de ovos por operárias, mesmo na ausência da rainha (TERADA, 1974; STAURENGO DA CUNHA *et al.*, 1986; STAURENGO DA CUNHA e CAMPOS, 1993). Isto foi inicialmente atribuído à falta da morfogênese dos ovariolos (STAURENGO-DA-CUNHA *et al.*, 1986; STAURENGO-DA-CUNHA e CAMPOS, 1993).

Assim como em *Frieseomelitta languida*, nas operárias de *Frieseomelitta varia* os ovários apresentam-se indiferenciados em todas as fases da vida, em colônias normais ou órfãs; e quando apresentam alguma diferenciação, normalmente em seguida degeneram (STAURENGO-DA-CUNHA & CAMPOS, 1993). Na maioria dos Meliponini, o desenvolvimento de ovos nos ovários das operárias não sofre o controle pela rainha; ao contrário, a presença desta parece estimular sua produção de ovos e a postura desta casta (CRUZ-LANDIM, 2000).

Contudo, existem também espécies, como *Leurotrigona muelleri* e *Friesella schottkyi*, em que as operárias como em *Apis mellifera*, só desenvolvem seus ovários quando na ausência da rainha ou em colônias superpopulosas.

Portanto, a regra nas espécies de abelhas sem ferrão, assim como em *A. mellifera* é que as operárias embora tendo ovários atrofiados em comparação com os da rainha, os têm funcionais e produzindo ovos sob determinadas condições.

Em *Frieseomelitta silvestri*, que é um dos exemplos extremos, a reabsorção dos ovários da operária ocorre ainda na pupa (CRUZ-LANDIM, 2000), mas em *Frieseomelitta varia varia*, que é uma espécie do mesmo gênero, foi verificado que ocorre diferenciação dos ovariolos com a formação de um folículo com um único ovócito que, no entanto, se mostrou incapaz de completar a vitelogênese; ou seja, a degeneração é também para esta espécie uma condição normal para as operárias (STAURENGO-DA-CUNHA & CAMPOS, 1993), só ocorrendo mais tardiamente já no adulto.

Segundo Staurengo-da-Cunha (1989), para esta espécie, este fato pode estar relacionado à baixa produção de hormônio juvenil nas abelhas adultas. Durante o desenvolvimento, o hormônio juvenil junto a outros hormônios relacionados à muda, regula este processo partir do último ínstar larval, passando pela fase de pupa (CAMPOS, 1977; CAMPOS e COSTA, 1989, BOLELI *et al.*, 2000). Sua produção e liberação estão diretamente relacionadas à quantidade de alimento ingerido, fazendo com que as larvas se mantenham por mais tempo se alimentando; o que ocasiona um diferencial no desenvolvimento dos ovários das rainhas em relação às operárias.

Do exposto deduz-se que parece haver uma tendência evolutiva para uma total inabilidade para a produção de ovos férteis pelas operárias, fato que tem sua representação extrema na reabsorção do ovário na pupa, como observado em *Frieseomelitta silvestri* (CRUZ-LANDIM, 2000).

Portanto, os insetos sociais, através do sistema de castas, exibem extremas especializações reprodutivas. A fertilidade da fêmea *varia* de completa esterilidade à hiperfecundidade. O processo de determinação de castas e o processo fisiológico de determinação da performance reprodutiva são controlados pela

regulação da nutrição. A alocação de nutrientes entre os membros da colônia de espécies altamente eussociais desempenha, portanto, um papel crucial na geração das diferentes castas e no suporte da hiperfecundidade das rainhas (WHEELER, 1996).

Acredita-se que nos Meliponini, com exceção do gênero *Melipona*, o fator determinante para a diferenciação das castas seja somente a quantidade de alimento, embora alguns autores defendam a idéia de que assim como em *A. mellifera*, a determinação de castas em Meliponini, esteja relacionada com a qualidade e a quantidade de alimento larval (DARCHEN & DELAGE, 1970; CAMARGO, 1972).

Em Meliponini, como a alimentação das larvas é massal, ou seja, estas têm à sua disposição todo o alimento de uma só vez, as larvas que darão origem às operárias recebem uma determinada quantidade de alimento e as larvas que darão origem às rainhas, recebem um suprimento adicional que pode tanto induzir um aumento no número de ovariolos, como torná-los muito mais longos, aumentando sua capacidade de produzir ovos (CRUZ-LANDIM, 2000).

As espécies de abelhas sem ferrão com determinação trófica das castas, em situação de orfandade, não podem resolver o problema de produção de novas rainhas como *A. mellifera*, pelo fato da alimentação ser massal, e do forte descontrole provocado no ninho pela ausência da rainha (FAUSTINO *et al.*, 2002). A produção de rainhas nos meliponíneos com determinação trófica das castas é, então, condicionada pelas operárias ao construírem células de cria de tamanhos maiores, capazes de receber mais alimento.

No entanto, em *F. varia*, não ocorre construção de células reais diferentes das células de operárias e de machos, mas se duas células ocorrem contíguas, a larva mais velha pode perfurar a célula próxima a sua, ingerir o alimento nela depositado e se tornar rainha (MICHENER, 2000).

Recentemente, Faustino *et al.* (2002) mostraram que em *F. varia*, colônias mantidas sob condição de orfandade são capazes de produzir rainhas, construindo células auxiliares e depositando alimento, próximas às células que contém larvas que ainda estejam se alimentando. Estas células auxiliares, através

de uma conexão com as células que contém as larvas, fornecem um suprimento extra de alimento para as mesmas. Ao final deste período de alimentação “extra”, a larva, que dá origem a uma rainha, é duas vezes maior que uma larva de operária da mesma idade.

Baptistella *et al.* (2005), verificaram que o volume médio de alimento larval existente em uma célula de cria de *F. varia* é de 20, 103±2,69 µl. Em experimentos realizados pelo grupo, tanto larvas jovens (entre um e dois dias) quanto pré-defecantes de operárias que receberam a partir de 30 µl de alimento diferenciaram-se em rainhas, havendo uma diferença apenas no tempo total de desenvolvimento; 38 dias para as primeiras e 29,25 ±2,63 dias para as últimas.

As larvas de *F. varia* são totipotentes, ou seja, capazes de diferenciarem-se em rainhas ao se alimentarem do conteúdo de suas células e de uma quantidade adicional de alimento larval, como já observado em colônias naturais por Terada (1974) e Faustino *et al.* (2002).

Em rainhas de *Trigona spinipes*, produzidas com diferentes doses de alimento, verificou-se que larvas de último instar, independente da quantidade de alimento ingerido, apresentaram quatro ovariolos. No estágio de pupa de olho branco foram encontrados de 10-14, na pupa de olho rosa de 9-14 e na pupa de olho marrom 11-15. Exceto para a pupa de olho rosa não se observou resultados significativos correlacionando quantidade de alimento ingerida com o número dos ovariolos dos ovários de rainhas de *T. spinipes* (LISBOA *et al.*, 2005).

Lisboa, *et al.* (2005), estudando *T. spinipes* mostraram pela primeira vez que rainhas no final da fase larval também apresentam quatro ovariolos por ovário, sugerindo que pode ocorrer um acréscimo no número de ovariolos no início da fase de pupa, em razão da alimentação recebida por esta casta.

O acréscimo no número de ovariolos durante o desenvolvimento das rainhas é comum para as espécies de Meliponini. No entanto, o processo celular responsável por este acréscimo ainda não é conhecido (LISBOA *et al.*, 2005).

Apesar do interesse no desenvolvimento dos ovários das operárias para a compreensão dos vários mecanismos envolvidos no estabelecimento das diferenças de fertilidade entre operárias e rainhas pouco se conhece sobre o que

acontece na diferenciação dos ovários no gênero *Frieseomelitta*, principalmente no que se refere aos fatores que o influenciam e de que forma isto ocorre.

Conforme o relato acima deixa claro, uma das questões fundamentais na diferenciação das castas nas abelhas eussociais, é o desenvolvimento dos ovários das operárias; e, quaisquer que sejam as variações de fertilidade entre as operárias, existem vários pontos ainda obscuros.

OBJETIVO

Em vista do exposto o objetivo do presente trabalho é, através do estudo da histologia e ultra-estrutura de ovários de abelhas sem ferrão, contribuir para o entendimento de como se estabelecem as diferenças de fertilidade entre as castas de *Frieseomelitta varia* e *Trigona spinipes*.

RESULTADOS

Os resultados serão apresentados sob a forma de artigos, denominados capítulos, cada um contendo o material e os métodos utilizados.

Capítulo 1: Desenvolvimento dos ovários em Frieseomelitta varia

INTRODUÇÃO

Um estudo feito por Boleli *et al.* (1999) com operárias mostrou o que acontece com os ovários de *Frieseomelitta varia* do início da fase de pupa até a fase adulta.

Estes autores relatam que, quando se inicia a fase de pupa, o ovário das operárias de *F. varia* apresentam, como as operárias (e até mesmo rainhas) das espécies de abelhas sem ferrão, quatro ovaríolos em cada um dos ovários. Estes ovaríolos possuem as seguintes regiões definidas: filamento terminal, germário, pedúnculo (pedicelo) e células basais. São agrupados por uma bainha peritoneal que os envolve também individualmente. Existem também fagócitos alojados na cavidade subperitoneal.

À medida que a fase de pupa avança, os ovaríolos entram em um processo de morte celular programada, perdendo boa parte de sua estrutura. Este processo é mais intenso na pupa de olho branco, reduzindo-se a partir da pupa de olho rosa, até a operária adulta, onde o processo se restringe principalmente ao germário.

Desta forma, o processo de diferenciação celular que dá origem a regiões especializadas nos ovaríolos acontece simultaneamente com a degeneração

celular. Este processo provoca uma profunda modificação na estrutura do ovário da operária adulta. Em operárias nutridoras, os ovaríolos são reduzidos a partes do germário, contendo agrupamento de cystócitos em degeneração.

A primeira região do ovaríolo a sofrer com a morte celular é o filamento terminal. Ele começa a desaparecer na pupa de olho marrom. Logo após a pupação, a massa de células alongadas e justapostas que formam o filamento terminal, começam a apresentar sinais de morte: núcleo grande com sinais de fragmentação, acompanhado por pequenos fragmentos escuros de cromatina, figuras mielínicas e corpos apoptóticos elétron-densos no citoplasma. Na operária recém emergida, o filamento terminal já desapareceu completamente.

No germário, nas fases de pupa de olho branco e olho rosa é possível observar células apoptóticas (células pré-foliculares e cystócitos) co-existindo com células intactas. Os cystócitos de um mesmo grupo sofrem degeneração simultânea, enquanto alguns grupos permanecem intactos. O processo de morte celular parece ocorrer da mesma forma em cystócitos e células pré-foliculares, apresentando um aspecto característico: condensação da cromatina levando à formação de áreas elétron-densas, próximas ao envoltório nuclear. Nestas células, poucas organelas são visíveis em contraste com inúmeras figuras mielínicas e vacúolos.

Os cystócitos e células pré-foliculares em degeneração apresentam núcleo menos elétron-denso do que o citoplasma e com contorno irregular. O citoplasma apresenta mitocôndrias dilatadas, retículo endoplasmático granular e ribossomos dispersos. As células pré-foliculares freqüentemente apresentam depósitos de glicogênio. Células existentes entre o germário e as células basais, nas operárias recém-emergidas apresentam-se também com os sinais de degeneração já mencionados além de numerosos lisossomos secundários.

Todas as mudanças morfológicas e ultra-estruturais ocorrem simultaneamente em todos os ovaríolos de ambos os ovários de *F. varia*. Isto mostra um alto grau de sincronia da morte celular para diferentes regiões gonadais e também para os ovários direito e esquerdo. No desenvolvimento dos ovários das operárias, a morte celular programada transforma o ovário com quatro

ovariolos encontrado no início da fase de pupa, em uma massa celular amorfa encontrada na operária adulta (BOLELI *et al.* 1999).

Comportamento semelhante foi observado em *F. silvestri* por Cruz-Landim (2000). Nesta espécie os ovariolos são visíveis na larva e pré-pupa, envoltos por uma cápsula na pupa de olho marrom e separados, mas em degeneração na operária recém-emergida, na qual a apoptose é visível nos ovariolos. A degeneração final caracteriza-se por um acúmulo de lipídios, glicogênio e figuras mielínicas nas células que restam do ovário, principalmente as células somáticas.

Embora a morte celular ocorra nos ovários de *Apis mellifera* durante a vida larval (HARTFELDER e STEINBRÜCK, 1997; REGINATO e CRUZ-LANDIM, 2001¹; REGINATO e CRUZ-LANDIM, 2001²), o processo não leva a uma perda completa dos ovariolos, que ainda apresentam folículos contendo cistócitos na operária adulta, como descrito por Boleli *et al.* (1999) e Cruz-Landim (2000) para espécies do gênero *Frieseomelitta*. Núcleos picnóticos em espécies desse gênero já haviam sido observados por Staurengo-da-Cunha e Campos (1993) em ovários de rainha adulta. Trabalhos anteriores como Terada (1974) e Staurengo-da-Cunha *et al.* (1989) também se referem aos ovários que passam pela degeneração em operárias adultas de *Frieseomelitta varia*, embora Staurengo-da-Cunha e Campos (1989) tenham relatado que a permanência dos ovariolos chega a ocorrer em condições de orfandade. Boleli *et al.* (1999) mostraram que, semelhante ao que ocorre em *Apis* (ZACARO, 1993; ZACARO e CRUZ-LANDIM, 1996) e em *Melipona quadrifasciata* (HARTFELDER e STEINBRÜCK, 1997), a morfogênese dos ovariolos ocorre normalmente, mas os cistócitos do germário não vão adiante, tornando a maturação dos ovócitos e a vitelogênese impossíveis. Isto torna as operárias de *F. varia*, definitivamente estéreis (BOLELI *et al.*, 1999).

Os ovários das operárias adultas de *Frieseomelitta silvestri languida* foram descritos como indiferenciados por Staurengo-da-Cunha *et al.* (1986). Conforme verificado por Cruz-Landim (2000), eles passam por processo similar ao que ocorre nos ovários de *F. varia*.

Uma outra questão importante a considerar na infertilidade das operárias é a impossibilidade de acasalamento.

Estudos feitos por Boleli *et al.* (2000) sobre a diferenciação pós-embrionária de *Frieseomelitta* mostraram que no início da fase de pupa (pupa de olho branco), os ovários, direito e esquerdo começam a se separar um do outro, processo que continua até a fase de pupa de olho rosa. Nesta fase, em *Frieseomelitta*, quatro ovaríolos podem ser distinguidos em cada ovário. Ainda nesta fase os ovidutos laterais se encurtam, ficam mais grossos e com a extremidade posterior dilatada. Os ovidutos laterais terminam em um oviduto comum, que desemboca em uma câmara genital situada ventralmente. Todas estas transformações ocorrem rapidamente de forma que, na pupa de olho marrom, os ovidutos estão mais curtos e difíceis de observar externamente. Nas operárias recém-emergidas, o aparelho reprodutor é anatomicamente semelhante ao observado na pupa de olho marrom, porém, com os ovidutos tendo regredido completamente.

Os eventos mais importantes da morfogênese do aparelho reprodutor de *Melipona* e *Frieseomelitta* são a separação dos ovários e o encurtamento dos ovidutos laterais. A separação dos ovários e individualização dos ovaríolos ocorre devido ao processo de rearranjo das células da bainha do ovário e sua subsequente diferenciação em células musculares e células traqueais (BOLELI *et al.*, 2000).

Apesar do controle que rainhas de algumas espécies de abelhas como *A. mellifera*, por exemplo, exercem sobre a ativação dos ovários das operárias adultas, a morfogênese dos ovários não é influenciada pela presença das rainhas, mas por outros fatores ambientais.

Reforçando o que foi afirmado por Sakagami *et al.* (1963) e Zucchi (1994), os autores mencionados reafirmam que a degeneração dos ovários das operárias do gênero *Frieseomelitta* representa um ponto final, tendendo a eliminar a participação das operárias na reprodução. Desta forma, a divisão de trabalho caminha para uma completa divisão das tarefas reprodutivas; operárias não mais contribuirão para a produção de machos (o que pode reduzir a variabilidade genética), aumentando o controle da população dentro do ninho pela rainha.

Este trabalho apresenta um estudo comparativo entre o desenvolvimento do ovário em operárias e em rainhas de *F. varia*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

As abelhas foram obtidas de ninhos de *Frieseomelitta varia* e *Trigona spinipes* instalados no Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa.

Das fases imaturas foram coletadas: larvas de operárias em diferentes etapas do desenvolvimento, classificadas como: larva2, larva3, larva4 e larva5, pré-pupas e pupas de diferentes idades (olho branco, olho rosa e olho marrom). Estes indivíduos foram fixados por inteiro em formalina, de Millonig & Karlson a 10%. As operárias adultas escolhidas foram aquelas que se encontravam circulando sobre os favos de cria e que provavelmente aprovencionam as células. De acordo com a literatura, para espécies em que as operárias desenvolvem seus ovários, esta é a fase em que ocorre a postura.

Duas rainhas virgens, recém-emergidas foram obtidas de um único ninho, onde estavam sendo mantidas em celas de aprisionamento.

Três mini-colônias foram montadas baseado em FAUSTINO *et al.* (2002), na tentativa de produzir rainhas. Cada mini-colônia foi acondicionada em uma caixa de madeira, medindo 27 x 9 x 6 cm, cobertas por uma tampa de vidro.

Foi retirado da colônia-mãe alimento (mel e pólen), que foi embalado com uma lâmina de cera de *Apis mellifera*. Aproximadamente 20 operárias jovens foram transferidas da colônia-mãe para cada mini-colônia, juntamente com cria velha e cria nova, aproximadamente 40 e 10 células, respectivamente. De uma das três mini-colônias, obteve-se uma rainha que foi utilizada, também virgem, recém-emergida.

As operárias adultas e as rainhas de *F. varia* foram dissecadas, seus ovários foram retirados e fixados em formalina, de Millonig & Karlson a 10%, para

microscopia de luz e em solução de Karnovsky e Tetróxido de Ósmio para microscopia eletrônica de transmissão.

Métodos

Histologia do ovário

Após a fixação, os indivíduos das fases imaturas e os ovários dos adultos foram desidratados em uma série crescente de etanol (70%, 80%, 90% e 95%), permanecendo por 20 minutos em cada solução. Após a desidratação, o material foi transferido para historresina de embebição e, após 24 horas, transferido para moldes com historresina de inclusão. Os cortes variaram entre 4 e 8 μm de espessura e foram feitos no terço posterior do abdome, sempre que possível, transversalmente, e recolhidos sobre lâminas histológicas.

Após a secagem das lâminas, estas foram submetidas à coloração. Os cortes histológicos contidos nas lâminas foram re-hidratados por 3 minutos, corados com Hematoxilina por 10 minutos, lavados em água corrente, corados com Eosina de 2 a 3 minutos e lavados novamente.

Depois de coradas e secas, as lâminas foram cobertas com lamínulas, seladas com bálsamo do Canadá.

Finalmente foram observadas ao microscópio de luz para a identificação dos ovários que em seguida foram fotografados ao fotomicroscópio.

Ultra- Estrutura do Ovário

Os ovários dissecados foram fixados por 2h à temperatura ambiente com a mistura de Karnovsky (Glutaraldeído a 2% em tampão Cacodilato de Sódio 0,1M, pH 7,4, contendo 4% de Paraformaldeído).

Após a fixação, os ovários foram lavados duas vezes em tampão cacodilato 0,1M, por 15 minutos. Em seguida foram pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato 0,1M por 2 horas. O material foi novamente lavado por duas vezes com tampão cacodilato 0,1M por 15 minutos e passado em uma solução de álcool 10% por 15 minutos. A contrastação pré- inclusão foi feita com uma solução de acetato de uranila 2% e etanol a 10% durante 12 horas. O material passou então por uma desidratação em uma série com crescentes concentrações de acetona (50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%) por 5 minutos em cada uma e finalmente 100%, duas vezes por 5 minutos. Depois de desidratado, o material foi embebido na resina de inclusão através de passos sucessivos de misturas da resina e acetona nas proporções de 1:2, 2:2, 2:1 e finalmente resina pura, com duração de 2h cada passo. Os ovários foram, então incluídos na resina Epon Araldite contendo catalisador de polimerização e polimerizados em estufa a 60°C por 24 a 48 horas. Os espécimes foram cortados em ultra-micrótomo.

Os “cortes grossos” foram corados com Azul de toluidina e fotografados ao Fotomicroscópio.

As secções ultrafinas recolhidas em telinhas foram contrastadas com citrato de chumbo, analisadas e fotografadas ao microscópio eletrônico de transmissão Phillips CM100.

RESULTADOS

Em todos os indivíduos, os ovários encontram-se dispostos dorso-lateralmente ao terço posterior do tubo digestivo, lado a lado, com os filamentos terminais dirigindo-se para a região anterior do corpo e fundindo-se na região mediana do corpo. Durante a fase larval inicia-se a formação dos ovidutos laterais a partir da região posterior ventral de cada ovário. Estes ovidutos alongam-se e contornam o tubo digestivo fundindo-se ventralmente a este em um ducto único, o oviduto comum.

Ovários de Operárias

Os ovários observados durante toda a fase larval apresentam-se com organização histológica semelhante: são envolvidos por uma cápsula formada por células da linhagem somática contendo no interior os ovaríolos, cada qual envolto por uma bainha peritoneal, também de células somáticas, achatadas, como células com características epiteliais ou de forma irregular, com núcleos arredondados ou achatados, acompanhando a forma das células (Fig. 1, A-D). No

interior do ovaríolo encontram-se células germinativas intercaladas com células somáticas chamadas de pré-foliculares por que farão parte da constituição do folículo quando ele se formar, podem dar origem também a células mioepiteliais ou com atividade fagocítica dentro do folículo. O núcleo das células apresenta-se pouco nítido, relativamente grande e com cromatina pouco condensada (Fig. 1, A-D). Separando o ovaríolo da bainha peritoneal, encontra-se uma camada acelular onde repousam as células pré-foliculares. Esta camada é chamada de túnica própria (Fig. 1, A-D).

Nas fases de L2, L3 e L5 das operárias foi possível observar a presença de somente dois ovaríolos. Nas larvas L4 e também na fase de pré-pupa observaram-se três ovaríolos em alguns ovários, mas isto pode dever-se à posição dos cortes que é preferencialmente longitudinal ou oblíqua. Os cistoblastos formam um preenchimento homogêneo no ovaríolo, não têm seus limites bem visíveis, mas, os núcleos interfásicos apresentam-se bem arredondados (Fig. 1-D).

Na fase de pré-pupa os ovários apresentaram-se com seus cistoblastos em proliferação. Foi possível visualizar as células resultantes das divisões, portanto, cistócitos. Na região basal do ovaríolo forma-se o pedúnculo que se continua com o oviduto (Fig. 3A-B).

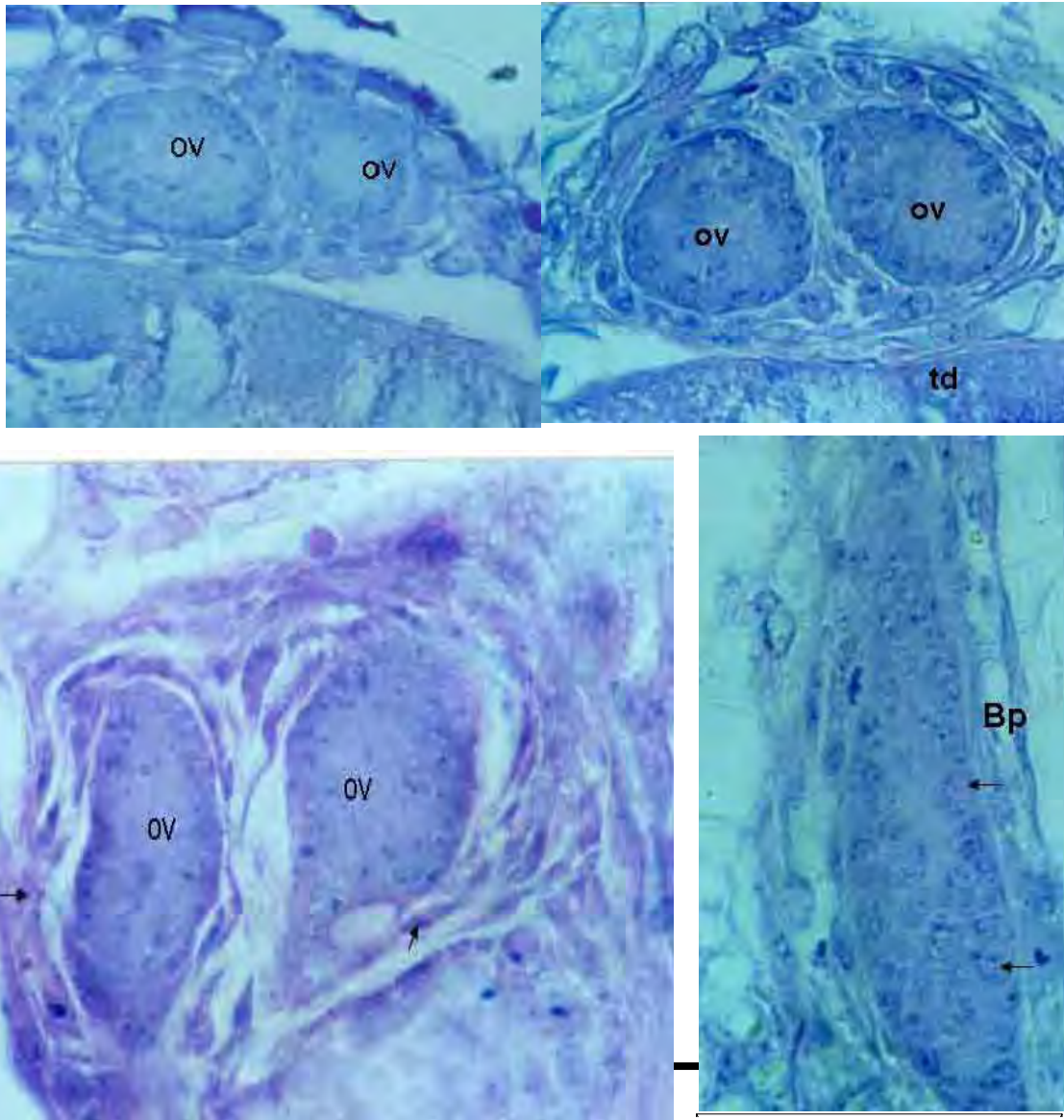


Figura 1: Fotografias dos cortes histológicos dos ovários das larvas de *F. varia*, mostrando ovaríolos (OV), envolvidos pelas células (setas) da bainha peritoneal (Bp) No espaço que se forma entre os ovaríolos e a bainha peritoneal encontra-se a túnica própria. O epitélio do tubo digestivo (Td) encontra-se logo abaixo dos ovários. **A.** Ovário de Larva 2, mostrando dois ovaríolos (OV); escala: 50 μ m. **B.** Ovário de Larva 3, mostrando células pré-foliculares mais visíveis (setas); escala: 50 μ m. **C.** Ovário de Larva 4, onde se observa novamente dois ovaríolos (OV); escala: 50 μ m. **D.** Ovário de Larva 5; cistoblastos (setas); escala: 50 μ m.

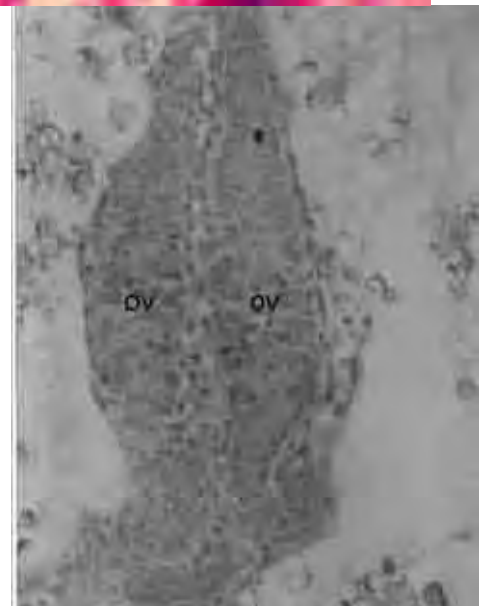
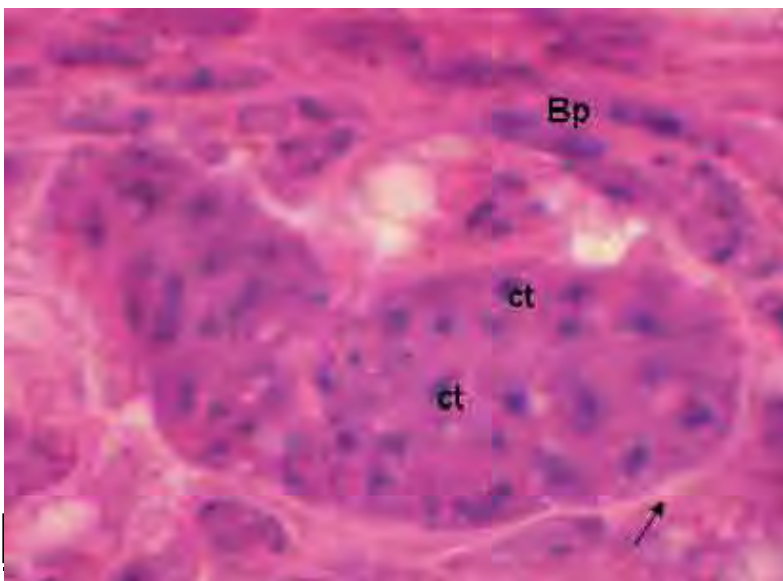
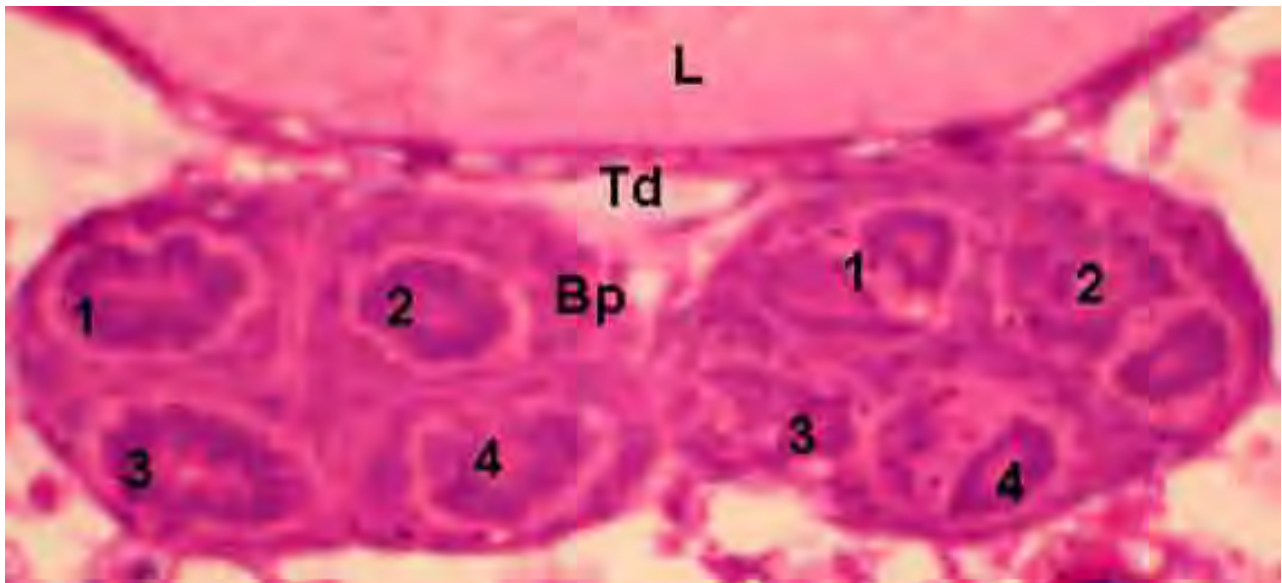


Figura 2: Fotografia dos cortes histológicos de pupas e pré-pupa de *F. varia*. **A.** ovário de pupa de olho branco, corte transversal. Os números indicam os ovaríolos de ambos os ovários; Td: tubo digestivo; L: lúmen; escala: 50 μ m. **B.** Ovário de pupa de olho rosa, mostrando cystócitos (ct) e a túnica própria (seta); escala: 10 μ m. **C.** Pré-pupa, mostrando dois ovaríolos (OV) escala: 50 μ m.

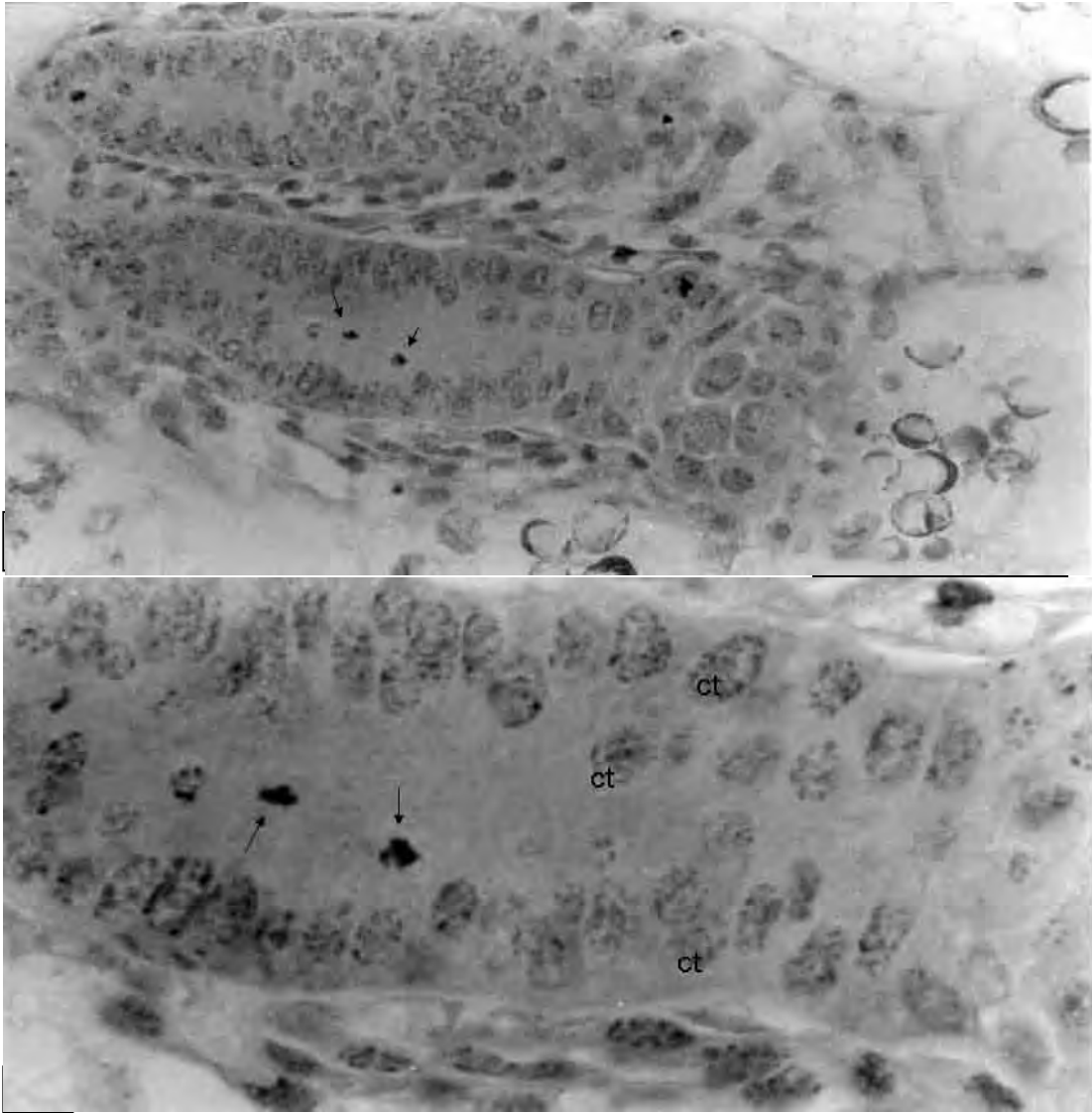


Figura 3: Ovários de pré-pupa de *F. varia* em detalhe, mostrando células germinativas (cistoblastos) em divisão na região central do ovaríolo (setas) e células dispostas na periferia do ovaríolo (cistócitos), caracterizando a região basal. **A.** escala: 50 μ m. **B.** Detalhe de A, evidenciando células em divisão (setas) e uma célula com núcleo picnótico (pi). escala: 50 μ m.

Embora os cortes sejam da região basal, não permitindo observar bem as células da linhagem germinativa, foi possível verificar no corte transversal a existência de quatro ovariolos em cada ovário (Fig. 2A). Na região basal, pode-se observar a disposição característica das células alongadas, com seu ápice voltado para o centro, característica da formação dos ductos ovarianos (Fig.3 A-B). É possível, inclusive, observar uma região central mais clara, livre de células, que constituirá a luz dos ductos ovarianos (Fig. 3A-B). Nesta região encontram-se células com núcleos picnóticos, indicando morte celular.

Na pupa de olho rosa, os cortes não possibilitaram uma observação muito detalhada, além do fato de que o corte foi feito tangencialmente ao ovário, permitindo a visualização de somente três ovariolos distintos. A região observada é, certamente, o germário, por conter cystócitos (ct) igualmente distribuídos, envolvidas pela túnica própria (seta) e externamente a bainha peritoneal (Bp) (Fig. 2B).

Na tentativa de observar algum sinal de atividade nas células germinativas além da degeneração, as operárias adultas utilizadas foram as nutridoras; fase em que, em outras espécies de abelhas, as operárias desenvolvem os ovários.

Os ovários das operárias adultas são constituídos na maior parte por células somáticas (Fig.4A-B), no entanto, os ovariolos ainda podem ser distinguidos, embora com as células muito compactadas (Fig. 5A-B).

Apesar disto podem ser distinguidos cystócitos (Fig. 4C), que mostram sinais nítidos de degeneração como figuras mielínicas, vacuolização e vesículas elétron-densas formadas no citoplasma, além de poucas organelas e dificilmente distinguíveis. No entanto, em alguns casos o núcleo parece normal, com cromatina descondensada e grande nucléolo (Fig. 4C e 5B), enquanto em outros se apresenta muito irregular. Os núcleos estão em células que estão sofrendo degeneração (Fig. 5A). A degeneração tem reflexo no folículo como um todo, que se retrai, formando dobras na túnica própria, que se destaca das células foliculares da bainha peritoneal externas a ela e dos cystócitos internamente (Fig. 5-C).

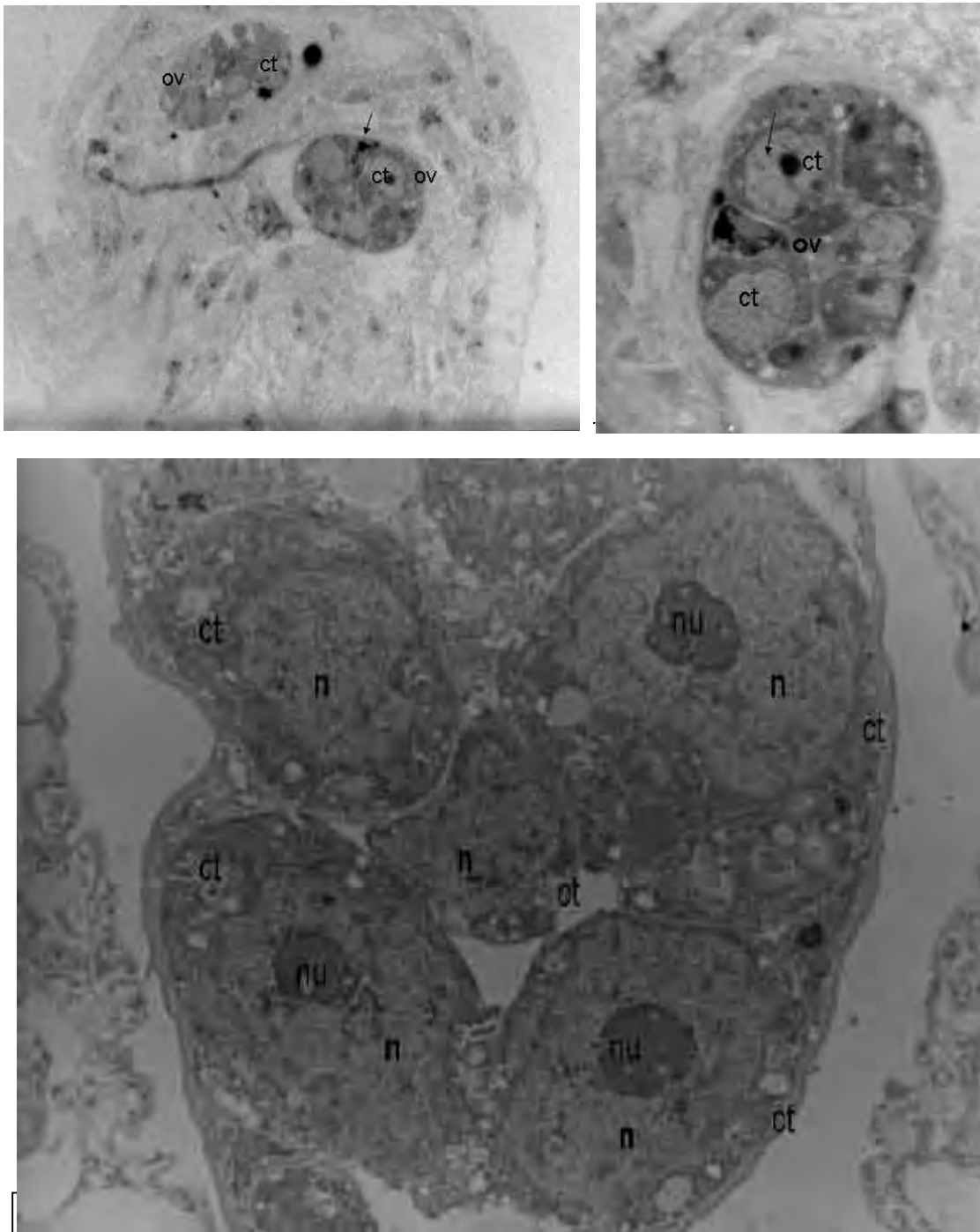


Figura 4: Histologia e ultra-estrutura de ovários de operárias de *F. varia*. **A.** Corte histológico mostrando uma espessa bainha peritoneal (Bp) formada por células somáticas envolvendo ovaríolos (OV); escala: 50 μ m. **B.** Detalhe do corte, onde se observam os cystócitos (ct) contidos no ovaríolo, um deles com sinais de degeneração; escala: 50 μ m. **C.** Ultra-estrutura do ovário de operária. Cistócitos visíveis (4), com núcleos (n) e uma célula interfollicular; escala: 1,0 μ m.

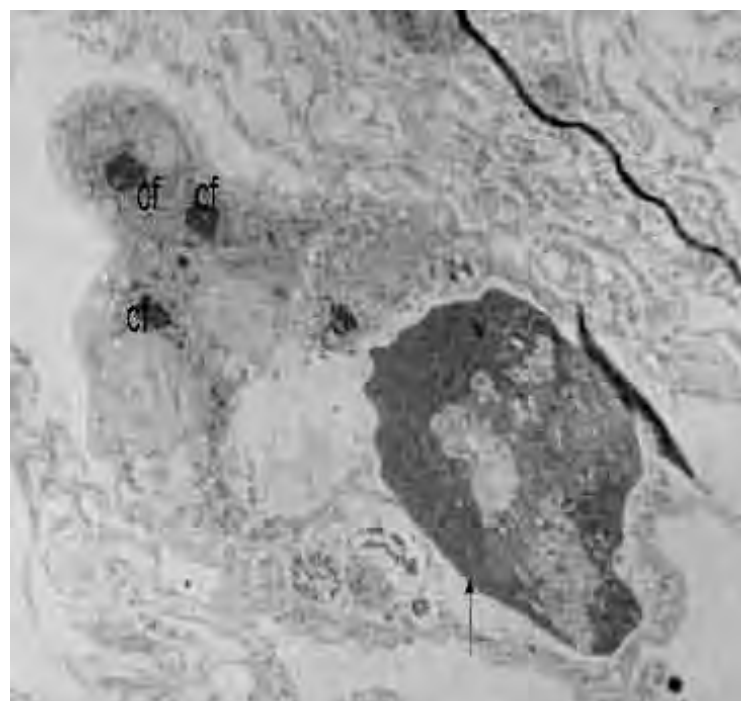
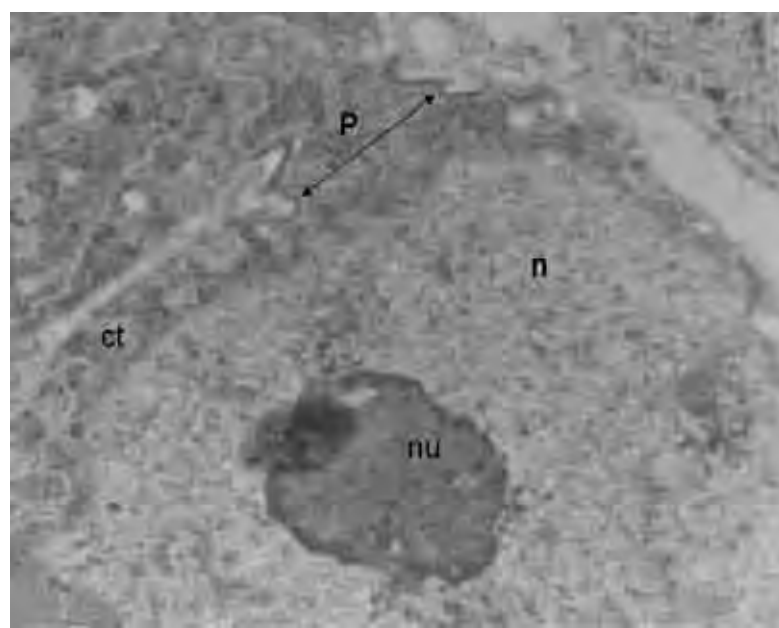
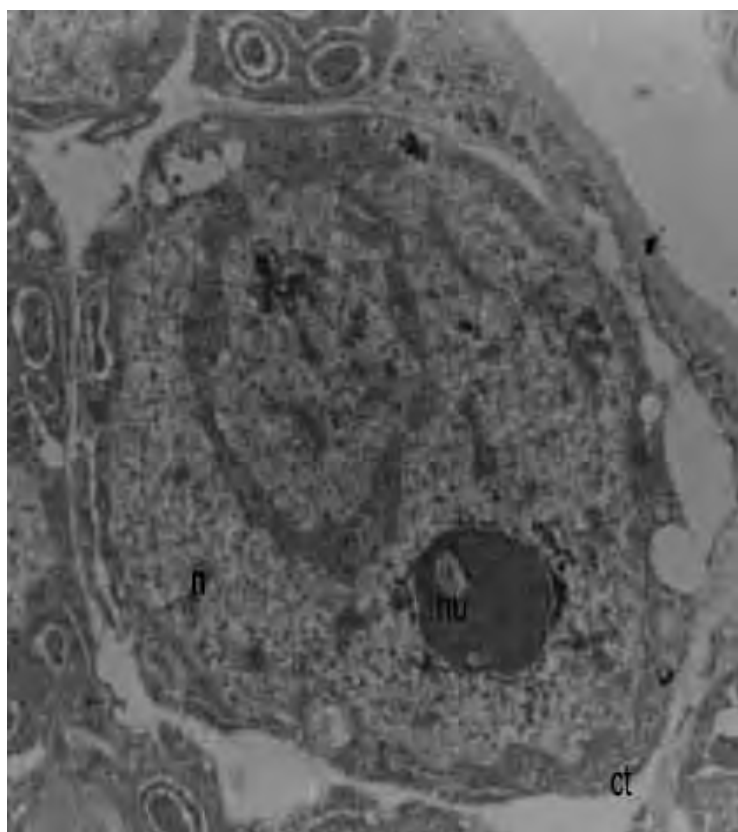


Figura 5: Ultra-estrutura dos ovários de operárias de *F. varia*. **A.** Cistócito (ct); escala: 1 μ m. **B.** Cistócito com grande núcleo (n) e ponte citoplasmática (seta); escala: 1 μ m. **C.** Célula em degeneração (seta) com alguns cistócitos (ct) próximos; células pré-foliculares (cf). Escala: 1 μ m.

Apesar da degeneração tão evidente, é possível observar pontes citoplasmáticas entre os cistócitos (Fig.5B), o que mostra a diferenciação e a degeneração ocorrendo simultaneamente. Percebe-se que o ovário em degeneração chega a se diferenciar, podendo distinguir-se a membrana peritoneal, células pré-foliculares e cistócitos, alguns mostrando pontes intercelulares (Fig. 5C).

Ovários de Rainhas

Em corte transversal do ovário da rainha obtida na mini-colônia, foi possível visualizar quatro ovaríolos em cada ovário, na região do germário (Fig. 6), já bem próximo ao filamento terminal. Nesta região, como em todo o ovário é possível visualizar muitos tubos alongados e translúcidos; são as traqueíolas. Estão presentes em grande quantidade nos ovários das rainhas e são muito escassos, praticamente ausentes nos ovários das operárias.

A bainha peritoneal forma um revestimento relativamente fino e uniforme ao redor dos ovaríolos, com células com núcleos arredondados e algumas células sofrendo divisão. Os ovaríolos, limitados pela túnica própria, mostram-se arredondados no corte transversal, sem sinais de retração. Os cistócitos apresentam uma organização perceptível, estando reunidos em torno de um centro de coloração mais clara (Fig. 6B). Isto indica a região do fusoma e a formação de um cisto em forma de roseta. Em algumas regiões é possível identificar células maiores entre os cistócitos, de núcleo grande e corado levemente; provavelmente sejam ovócitos já diferenciados e uma ponte celular entre o cistócito e o ovócito em diferenciação (Fig.6C). Em um dos ovaríolos destas rainhas encontram-se muitas células em processo de morte (Fig.D)

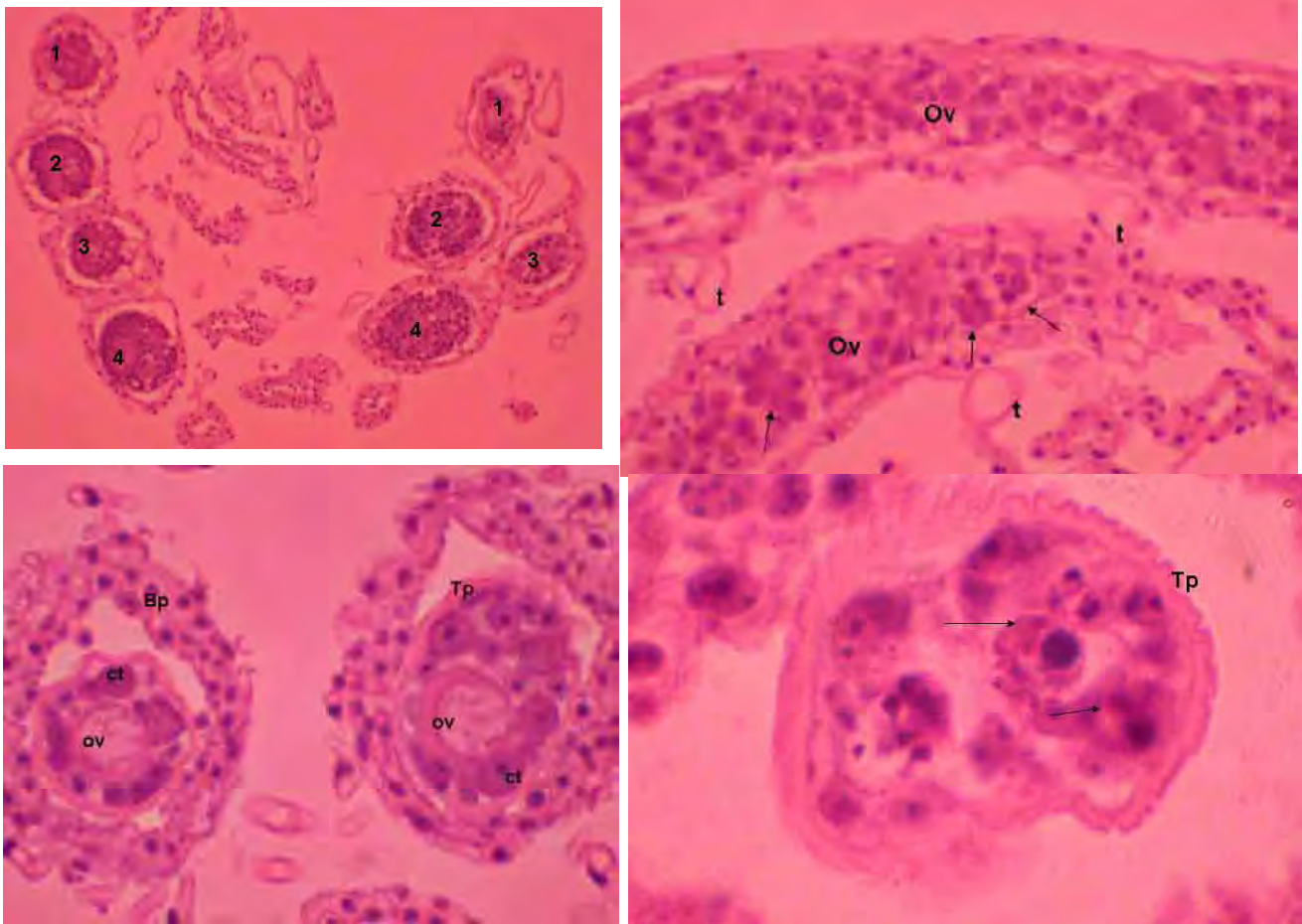
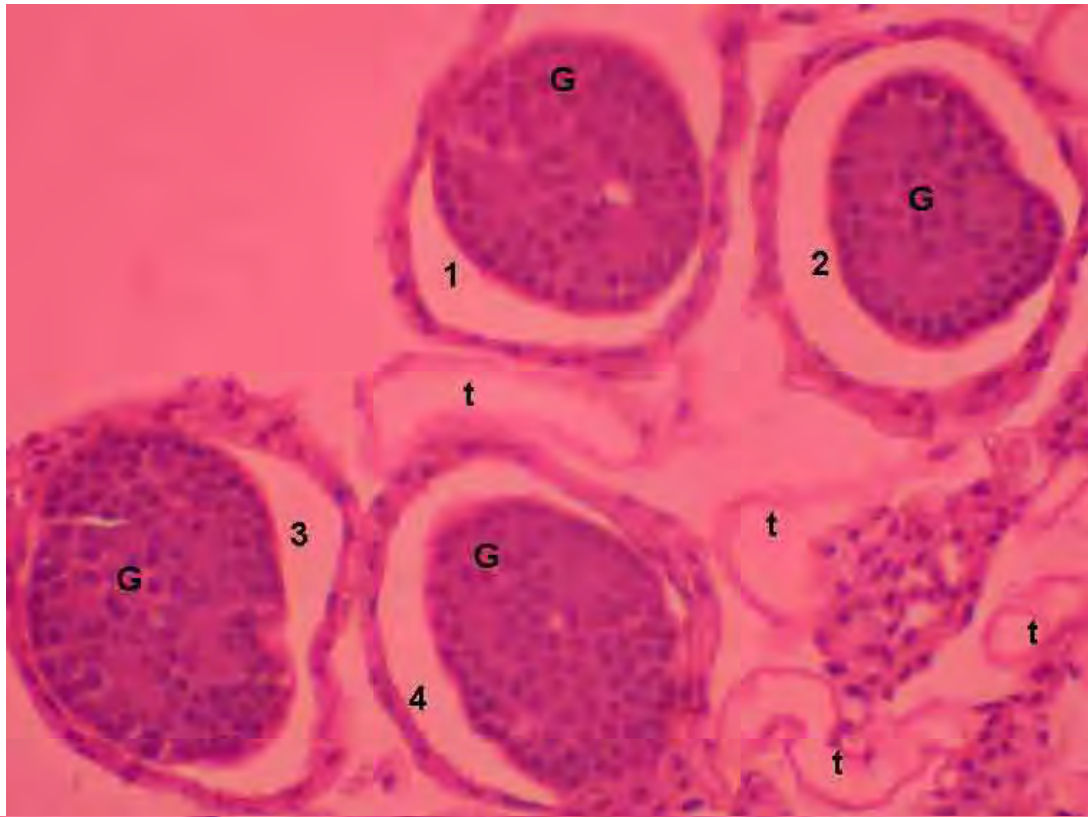


Figura 6: Histologia dos ovários da rainha de *F. varia* produzida na mini-colônia. **A**, vista geral do ovário. Os números indicam os ovariolos, quatro em cada ovário; escala: 50 μ m. **B**. Corte longitudinal da região do germário. Ov: ovariolo; fusomas (setas); t: traqueíolas; escala:20 μ m. **C**. Corte transversal da região do germário em detalhes, mostrando a bainha peritoneal (Bp), a túnica peritoneal (Tp) e cystócitos (ct) ao redor de uma ovogônia (ov); escala: 5 μ m. **D**. corte transversal da região do germário mostrando sinais de degeneração: túnica própria (Tp) retraída e células com núcleos picnóticos (setas); escala: 10 μ m.

Figura 7: Histologia dos ovários da rainha natural recém-emergida de *F. varia*. **A.** Ovariolos do mesmo ovário, discriminados pela numeração; os cortes mostram a região do germário (G), e traqueíolas (t) ao redor; escala: 50 μ m. **B.** Detalhe do ovariolo preenchido por células germinativas, algumas divisões visíveis (seta) e células somáticas formando a bainha peritoneal (Bp); Tp: túnica própria; Ov: ovariolo; escala:20 μ m.



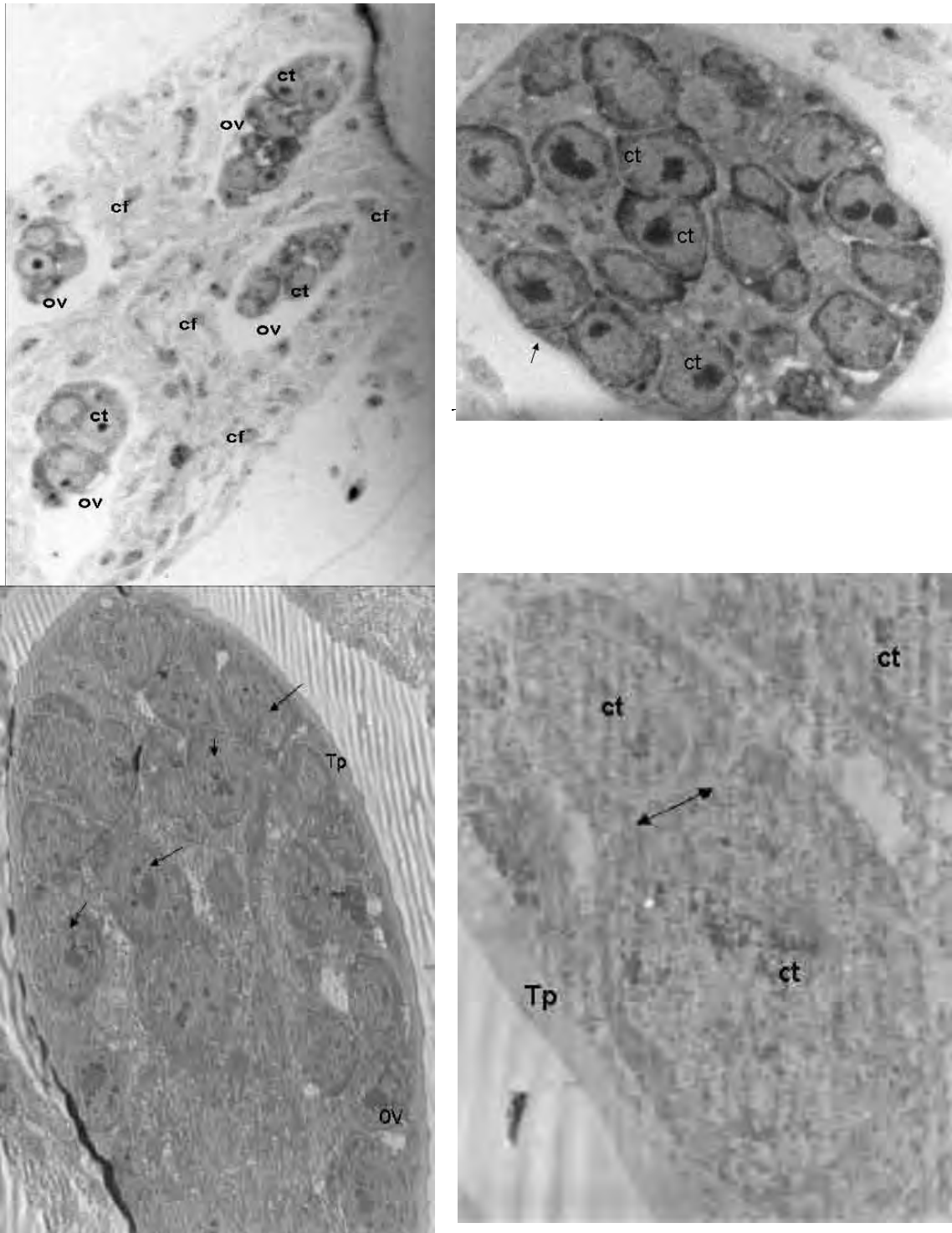


Figura 8: Histologia e Ultra-estrutura do dos ovários da rainha natural recém-emergida de *F. varia*. **A.** vista geral do ovário em corte transversal; cf: células foliculares; ct: cistócitos; Ov: ovariolos; escala: 50 μ m. **B.** Corte transversal do ovariolo, mostrando os cistócitos (ct) e a túnica própria (seta); escala: 50 μ m. **C.** vários cistócitos indicados pelas setas dentro do ovariolo (Ov), envolvido pela túnica própria (Tp); escala: 10 μ m. **D.** Em detalhe, cistócitos (ct) unidos por uma ponte citoplasmática (seta); Tp: túnica própria; escala: 1 μ m.

As rainhas obtidas naturalmente de celas de aprisionamento das colônias apresentaram ovários visivelmente maiores; no entanto, o fato de os cortes transversais dos ovários mostrarem ovariolos com diâmetro maior pode ser devido ao corte ter sido feito numa região do germário com maior diâmetro (Fig. 7). De qualquer forma, em relação à organização dos diferentes tipos celulares, os ovários das rainhas naturais são semelhantes à obtida na mini-colônia.

Nos cortes transversais dos ovários das rainhas naturais, é possível visualizar quatro ovariolos, contendo cistócitos envolvidos por camadas de células pré-foliculares (Figs. 7A; 8A).

As micrografias eletrônicas mostram os ovariolos bem organizados (Fig.8B-D), com muitos cistócitos e sem sinais de degeneração aparentemente já tendo dado início ao processo de ovogênese. Várias pontes citoplasmáticas entre os cistócitos são visíveis (Fig. 8D). As pontes conectam os cistócitos uns aos outros. É possível visualizar uma célula bem arredondada, núcleo também arredondado e maior em relação ao tamanho da célula e com poucas regiões de condensação da cromatina e sem outras células próximas. Trata-se, provavelmente, de um cistoblasto, ou seja, uma ovogônia (Fig. 8D).

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos mostram uma particularidade quanto ao número de ovariolos nos ovários das operárias. Nas espécies de abelhas eussociais até agora examinadas, o número mínimo de ovariolos encontrados por ovário foi 4 (STAURENGO-DA-CUNHA, *et al.*, 1986; STAURENGO-DA-CUNHA e CAMPOS, 1993; CRUZ-LANDIM, *et al.* 1998; MARTINS e SERRÃO, 2004), e as operárias sempre apresentaram esse número, com exceção de *Apis*. A hipótese de que o número (2) aqui encontrado deva-se à posição do corte está descartada, porque mesmo quando os cortes são transversais, este número aparece em alguns indivíduos.

Os ovários das operárias, no entanto, desenvolvem normalmente durante a fase larval e pupação, em concordância com os dados da literatura, chegando à fase adulta com características próprias de ovários de operárias recém-emergidas (STAURENGO-DA-CUNHA e CAMPOS, 1993), e permanecem presentes pelo menos até à fase de operária nutridora. No entanto, em comparação com a rainha apresentam intensa degeneração ovariolar e parecem ser incapazes de iniciar a vitelogênese, visto que isto já deveria estar acontecendo nas operárias nesta fase. Portanto, no que se refere à regressão que normalmente ocorre nos ovários das operárias deste gênero, conforme verificado por Staurengo-da-Cunha e Campos

(1993) esta não ocorre durante a pupação, como em *F.silvestri*, mas mais tarde durante a vida adulta. Esta ocorrência explica porque a construção de células adicionais com alimento junto a células que contém larvas de operárias em fim da fase larval é capaz de transformá-las em rainhas (FAUSTINO *et al.*, 2001). Se a degeneração ovariana fosse mais precoce, isso não seria possível. Os resultados sugerem, também, que não é a quantidade de alimento recebida pela operária que é responsável pela degeneração do ovário, pois esta só acontece depois de finda a fase de alimentação. Segundo Berger e Abdalla (2005), a morte celular programada ocorre durante o desenvolvimento dos ovários das rainhas de *Apis mellifera*, independentemente de qualquer fator externo.

Um aspecto importante verifica-se na diferenciação dos ovários das operárias, com ocorrência depois de finda a fase de alimentação, isto é, durante a pupação. Trata-se da regressão dos dutos ovarianos, conforme já mencionado por BOLELI, *et al.* (2000). Este fato é importante por que significa um impedimento não só para o acasalamento, como verificado em outras espécies que têm o trato genital atrofiado, mas também para uma eventual postura de ovos que viessem a formar-se nesses ovários. Outro indicativo da progressão da esterilidade das operárias neste gênero está representado pelo fato de aparentemente estas não apresentarem os quatro ovaríolos por ovário, típicos dos Meliponini.

Parece que está havendo uma evolução no sentido de uma esterilização completa das operárias, ainda operando em níveis diferentes do desenvolvimento destas, ou seja, a degeneração ovariana durante a pupação ou na fase adulta. Contudo, o impedimento da postura parece determinado desde o início pela regressão dos ovidutos, que já não existem no adulto.

Quanto ao modo pelo qual os ovários são reabsorvidos, a morfologia indica morte celular do tipo autofágica e em alguns casos do tipo apoptótica. Estas mortes atingem tanto células germinativas como somáticas. No caso das células germinativas parece incidirem principalmente sobre os cistoblastos, isto é, antes de iniciada a fase de proliferação mitótica. Como nem todos os cistoblastos são atingidos, alguns cistócitos unidos por pontes podem ser observados, mas raramente chegam a formar rosetas, as quais são vistas nos ovários das rainhas.

O tipo de morte celular verificada, independentemente de seus aspectos morfológicos, é uma morte celular programada visto que ocorre em fases definidas do desenvolvimento e tem por finalidade um resultado fisiológico espécie-específico, mais uma vez, indicando que seu controle não é alimentar (BERGER e ABDALLA, 2005).

No caso das rainhas os ovários apresentam-se plenamente formados, com 4 ovaríolos cada um. A rainha obtida na mini-colônia, no entanto, apresentou morte celular em um deles. Esta ocorrência pode dever-se ao fato de que a dose alimentar recebida não tenha sido suficiente para produzir uma rainha completamente diferenciada, ou ao fato da época do acasalamento ter sido ultrapassado ou ainda às condições artificiais em que se encontrava.

Como condução das observações feitas, pode-se concluir que nesta espécie as operárias são completamente estéreis, devido não só à inviabilidade de produção de ovos pelos ovários, mas também à ausência dos dutos ovarianos.

Capítulo 2: Diferenciação do ovário entre as castas de *Trigona spinipes*

INTRODUÇÃO

Os Hymenoptera apresentam ovários do tipo meroístico politrófico característica esta compartilhada por outros Insecta, tais como os Dermaptera, Psocoptera, Pthiraptera, Trichoptera, Lepidoptera e Diptera (KING & BÜNNING, 1985, citados por ZACARO e CRUZ-LANDIM, 1996).

O aparelho reprodutor feminino em abelhas é, a exemplo de *A. mellifera*, constituído de um par de ovários formados por ovariolos ou túbulos de ovos, os quais estão conectados por ovidutos laterais que se unem em um oviduto comum ou oviduto mediano, o qual se continua em uma vagina (SNODGRASS, 1956).

Nos meliponíneos, o número de ovariolos é pequeno, podendo ser igual entre rainhas e operárias em algumas espécies (4 em *Melipona quadrifasciata anthidioides*, *Melipona rufiventris*, *Plebeia droryana*, *Scaptotrigona postica*, e *Frieseomelitta varia*) (SAKAGAMI, *et al*, 1963; ZACARO e CRUZ-LANDIM, 1996). Em outras espécies, a amplitude de variação é pequena (4 nas operárias, até ao redor de dez nas rainhas) (CRUZ-LANDIM *et al.*, 1998; CRUZ-LANDIM, 2000).

A determinação de castas nos Apidae pode ser de origem trofogênica ou trofogenética. A determinação trofogênica ocorre quando as diferenças entre as castas surgem somente devido às diferenças alimentares, ou seja, na quantidade ou na qualidade do alimento ingerido, ou ambas (CAMARGO, 1972; CAMPOS, 1975; HARTFELDER, 1986; CAMPOS e COELHO, 1993; BUSCHINI e CAMPOS, 1995; BERGER e ABDALLA, 2005). Em algumas espécies, como *Trigona spinipes* e *Apis mellifera* por exemplo, a célula real é facilmente identificada no favo, por ser maior, construída para receber maior quantidade de alimento

Em *A. mellifera*, além da quantidade, a qualidade do alimento disponibilizado para rainhas e operárias também é diferente durante o desenvolvimento larval (COPIJN *et al.*, 1979). Em relação às diferenças na qualidade, a alta concentração de glicose e frutose no alimento larval das rainhas funciona como um regulador de apetite (ASENCOT & LENSKY, 1988), estimulando as larvas de rainhas a ingerirem o alimento mais rapidamente que as larvas de operárias. Como consequência, ocorre uma distensão da parede do intestino das rainhas, o qual, por mecanismo de reflexo, leva a um aumento do nível de hormônio juvenil.

O hormônio juvenil, por sua vez, é responsável pelo aparecimento de características de rainhas durante o desenvolvimento larval (ASENCOT & LENSKY, 1988). Provavelmente nos Meliponini, com exceção do gênero *Melipona*, o fator determinante para a diferenciação das castas seja somente a quantidade de alimento, embora alguns autores defendam a idéia de que assim como em *A. mellifera*, a determinação de castas em Meliponini, parece estar relacionada com a qualidade e a quantidade de alimento larval (DARCHEN & DELAGE, 1970; CAMARGO, 1972).

Segundo BUSCHINI & CAMPOS (1995), uma operária de *T. spinipes* come aproximadamente 36µL de alimento, enquanto uma rainha chega a comer dez vezes mais (360µL).

Na determinação trofogenética, os ovos que originam operárias e rainhas trazem informações genéticas diferentes, e sua expressão é influenciada pela quantidade de alimento ingerida pela larva. Em espécies do gênero *Melipona*,

onde as células de cria apresentam o mesmo tamanho e forma que as células de operárias e machos, a determinação ocorre desta maneira. As rainhas resultam de larvas duplo heterozigotas, adequadamente alimentadas, ao passo que as operárias resultam de larvas subalimentadas (homozigotas ou heterozigotas) (KERR *et al.*, 1996). Os machos resultam, por sua vez, das larvas haplóides.

As espécies de abelhas sem ferrão com determinação trófica das castas, em situação de orfandade, não podem resolver o problema de produção de novas rainhas como *A. mellifera*, pelo fato da alimentação ser massal, e do forte descontrole provocado no ninho pela ausência da rainha (FAUSTINO *et al.*, 2002)

A produção de rainhas nos meliponíneos com determinação trófica das castas é, então, condicionada pelas operárias ao construírem células de cria de tamanhos maiores, capazes de receber mais alimento. No entanto em *F. varia*, não ocorre construção de células reais diferentes das células de operárias e machos; se duas células ocorrem contíguas, a larva mais velha pode perfurar a célula próxima a sua, ingerir o alimento nela depositado e se tornar rainha (MICHENER, 2000).

Recentemente, FAUSTINO *et al.* (2002) mostraram que em *F. varia*, colônias mantidas sob condição de orfandade são capazes de produzir rainhas, construindo células auxiliares próximas às células que contém larvas que ainda estejam se alimentando. Estas células auxiliares, através de uma conexão com as células que contém as larvas, fornecem um suprimento extra de alimento para as mesmas. Ao final deste período de alimentação “extra”, a larva, que dá origem a uma rainha, é duas vezes maior que uma larva de operária da mesma idade.

Os insetos sociais, através do sistema de castas, exibem extremas especializações reprodutivas. A fertilidade da fêmea varia de completa esterilidade à hiperfecundidade. O processo de determinação de castas e o processo fisiológico de determinação da performance reprodutiva são dominados pela regulação da nutrição. A alocação de nutrientes entre os membros da colônia de espécies altamente eussociais desempenha um papel crucial na geração de diferentes castas e no suporte da hiperfecundidade das rainhas (WHEELER, 1996).

No entanto, a questão alimentar, embora crucial em algumas espécies, parece não ser a única a influenciar a determinação de castas. Já foi mencionada a ocorrência de uma determinação trofogenética nas espécies de *Melipona*, nas quais não são construídas células reais e a alimentação parece ter papel menor. Por outro lado, estudos realizados em *Scaptotrigona quadripunctata* mostraram que rainhas podem emergir de células de operárias na colônia sendo resultantes de larvas que receberam uma quantidade de alimento pouco maior que aquela recebida pelas operárias normais. Estas se apresentam como mini-rainhas, ou rainhas-anãs, embora preservem todas as características da casta. Neste caso, acredita-se que o número de rainhas que são produzidas em conseqüência da variação da quantidade de alimento contido nas células, também seja controlado geneticamente (CAMPOS & COSTA, 1989).

Freqüentemente, em *Plebeia remota*, rainhas pequenas ou anãs são produzidas em células de operárias sem influência do alimento, enquanto rainhas normais são produzidas em células reais construídas para conter uma maior quantidade de alimento. O modo de determinação de castas nesta espécie é também trofogenico, no entanto, a produção de rainhas que não receberam alimentação diferencial sugere que a determinação seja genética e que o alimento apenas seja um fator determinante para a formação de algumas características de rainhas, como proposto por Cruz-Landim (2000) para *Melipona*. Em *S. quadripunctata*, normalmente, a quantidade de alimento recebido pela larva que origina rainha é duas vezes maior àquela recebida pelas larvas que originam operárias, enquanto que, em *T. spinipes*, é dez vezes maior (CAMPOS & COSTA, 1989).

Segundo Buschini & Campos (1995), em *T. spinipes* a quantidade de alimento exerce uma influência positiva no número de ovariolos e no peso das operárias. Segundo estes autores, existe a sugestão de que o aumento na quantidade de alimento eleve, como em *A. mellifera*, a concentração de hormônio juvenil na hemolinfa durante a fase larval, ocasionando a formação de um maior número de ovariolos e o desenvolvimento em rainhas. Camargo (1972)

demonstrou que o fornecimento de doses extras de alimento às larvas de operárias de *Scaptotrigona postica*, fez com que se transformassem em rainhas.

Em *A. mellifera*, o início da diferenciação em função do alimento recebido pelas larvas pode acontecer até dois dias após a eclosão do ovo. Mas, em princípio, larvas de operárias e rainhas com três dias, apresentam, aproximadamente o mesmo número de ovários. A partir desta fase, nas larvas que originarão operárias, ocorre uma redução do número de ovários que, na fase de adulto, contabilizam aproximadamente uma dezena por ovário. Já no caso das rainhas, este número permanece em torno de 160-180 ovários por ovário (SNODGRASS, 1956; BUENO, 1981; REGINATO e CRUZ-LANDIM, 2001¹). Nesta espécie a determinação das castas é progressiva, assim como a alimentação.

Em rainhas de *T. spinipes*, as larvas de último ínstar, independente da quantidade de alimento ingerido, sempre apresentam quatro ovários. No entanto, se receberem doses extras de alimento, no estágio de pupa de olho branco este número aumenta. Foram encontrados de 10-14, na pupa de olho rosa de 9-14 e na pupa de olho marrom 11-15. Exceto para a pupa de olho rosa não se observou resultados significativos correlacionando à quantidade de alimento ingerida com o número dos ovários nos ovários de rainhas de *T. spinipes* (LISBOA, *et al.* 2005).

O aumento na fecundidade é observado nos Hymenoptera pelo aumento no número de ovários funcionais ou aumento na eficiência de cada ovário, através do aumento da capacidade de produção de ovos, geralmente representada pelo comprimento dos ovários.

Enquanto em *A. mellifera* o dimorfismo ovariano é expresso pela quantidade de ovários, nos Meliponini, este é expresso, principalmente, por um aumento no comprimento do ovário da rainha, mas em algumas espécies as rainhas também têm número maior de ovários do que as operárias, em seus ovários (CRUZ-LANDIM, 2000).

Tendo em vista que a alimentação das larvas nos Meliponini é massal ao contrário de *A. mellifera* em que é progressiva, e, levando em consideração que

também diferentemente de *A. mellifera* todas as operárias da maioria das espécies têm apenas quatro ovaríolos (CRUZ-LANDIM, 1998), o presente objetivo é determinar o momento do desenvolvimento pós-embrionário em que ocorre a diferenciação ovariana entre operárias e rainhas.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Alguns ninhos de *T. spinipes* foram capturados na natureza, mantidos em condições semelhantes às naturais no Apiário Central da UFV, de onde se obtiveram larvas de último estágio, pupas de olhos brancos, rosa e marrom e adultos. Destes indivíduos foram dissecados os ovários utilizados no presente estudo.

Métodos

Histologia do ovário

Os ovários dissecados das pupas e adultos foram fixados em paraformaldeído a 4%, em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2. Em seguida foram desidratados em uma série crescente de etanol (70%, 80%, 90% e 95%). Após a desidratação, o material foi transferido para historresina de embebição e, após 24 horas, transferido para moldes com historresina de inclusão. Os cortes foram feitos com 4 µm de espessura e as secções, recolhidas sobre lâminas histológicas. As larvas foram fixadas inteiras, mas o restante dos procedimentos foi o mesmo.

Após a secagem das lâminas, estas foram submetidas à coloração com Dominici para distinguir os componentes das células de acordo com seu caráter ácido ou básico.

Coloração

A coloração dos cortes histológicos foi feita com Dominici e Hematoxilina e Eosina. A coloração de Dominici é constituída por duas soluções: solução A (orange G+eritrosina) e solução B (azul de toluidina).

As lâminas histológicas contendo os cortes foram hidratadas por 3 minutos, coradas com solução A por 10 minutos, lavadas e em seguida coradas com solução B de 2 a 3 minutos e lavadas novamente.

RESULTADOS

As larvas obtidas das células de cria de rainhas e de operárias, no último estágio desta fase, não apresentaram variação no número de ovariolos, que foi sempre igual a 4 por ovariolo (Fig 1A). Este número foi mantido nas larvas de operárias durante a pupação, fase em que foi possível acompanhar a diferenciação dos ovidutos (Fig. 1B) embora tenham sido observadas células em processo de morte celular em quantidade significativa (fig. 3-C).

As pupas de rainhas sempre apresentaram número de ovariolos maior que 4 por ovário, embora este número fosse variável (Fig. 2 A-D). O número de ovariolos encontrados variou entre 8 e 15, sendo que este freqüentemente era diferente entre os ovários do mesmo indivíduo.

O número de ovariolos presente não manteve relação com o avanço da pupação, isto é, desde o início desta fase (pupa de olho branco) o número de ovariolos se mostrou aumentado e não foi acrescido nas pupas mais velhas.

Além do aumento no número de ovariolos, verificou-se nas pupas de rainhas grande alongamento dos ovariolos, principalmente do filamento terminal, que se apresentava enrolado (Fig. 3A). Por outro lado, enquanto nas rainhas se observaram divisões celulares nos ovariolos (Fig. 3B), nas operárias observaram-se figuras de morte celular; células com núcleos picnóticos (Fig. 3C).

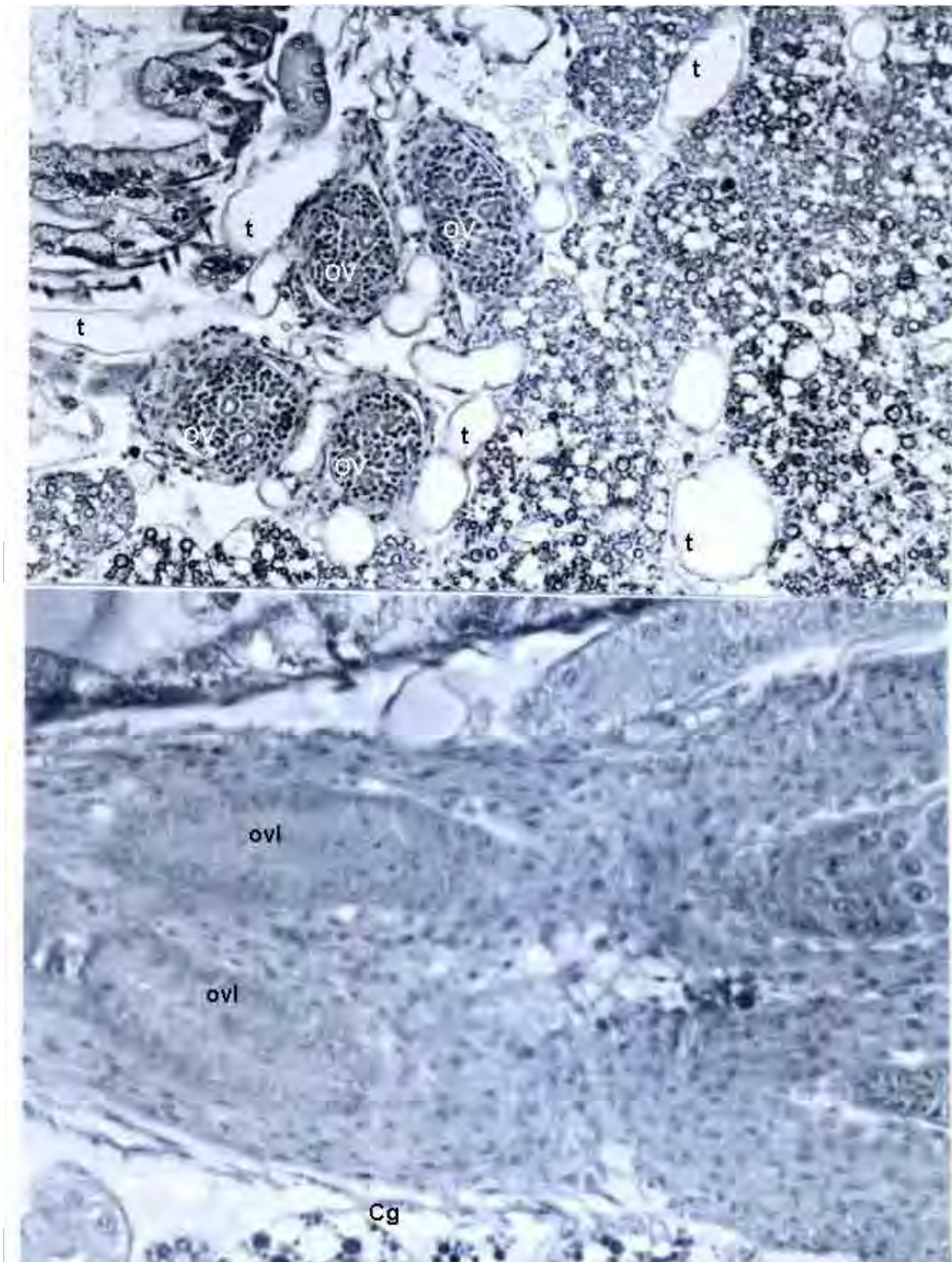


Figura1: Ovariolos presentes nos ovários de larvas dos meliponíneos. **A.** Ovário de larva de último estágio obtida em uma célula real, mostrando a presença de quatro ovariolos (OV). Nota-se a grande quantidade de traquéias (t); escala: 50 μ m. **B.** Região basal do ovário de pupa de operária, onde se vê a diferenciação dos ovidutos laterais (ovl); corpo gorduroso (Cg); escala: 50 μ m.

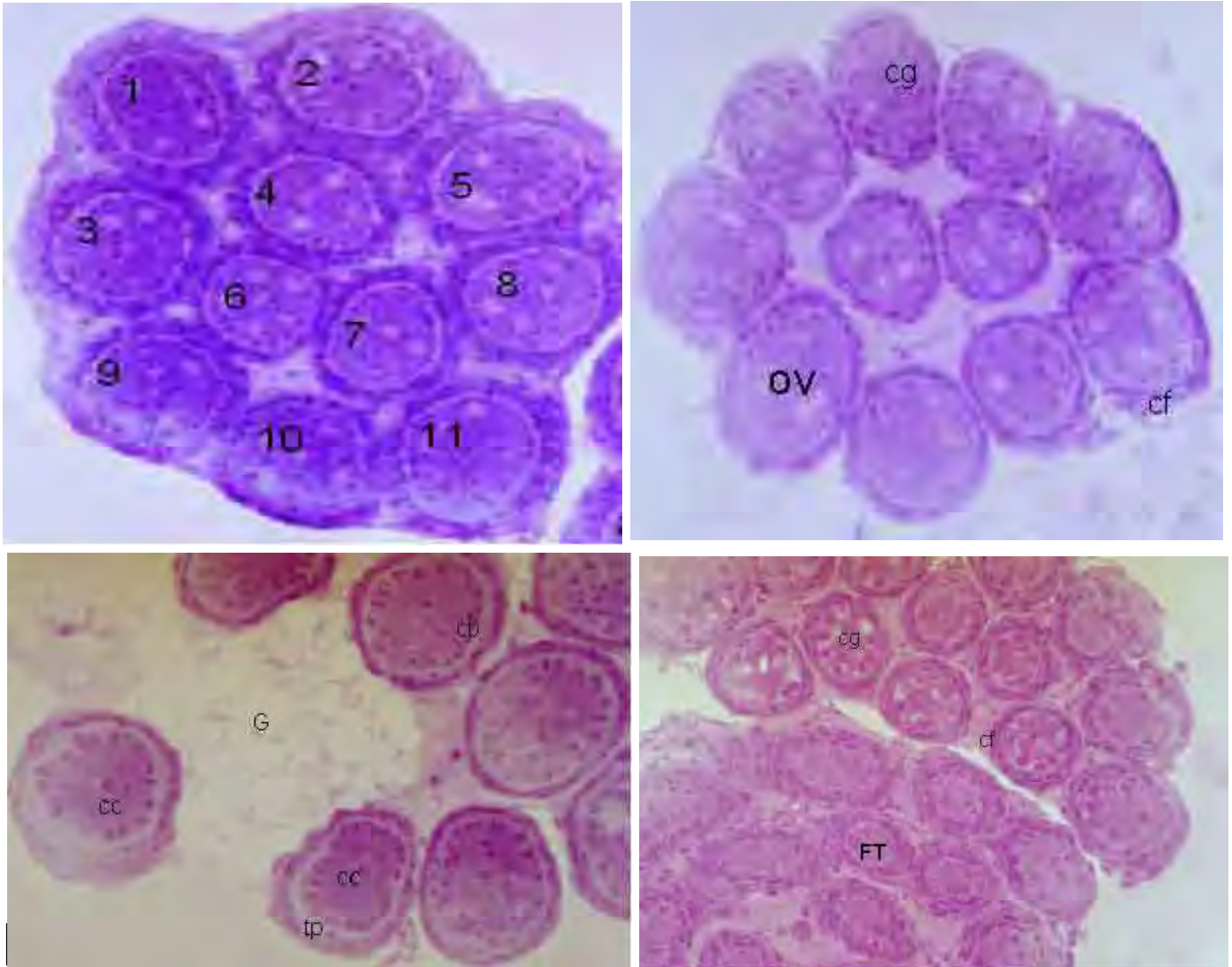


Figura 2. **A-D.** Ovários de pupas e adultos de rainhas de *T. spinipes*, mostrando a variação do número de ovaríolos (OV). **A.** pupa de olho branco, com ovaríolos numerados (11); escala: 50 μ m. **B.** pupa de olho rosa, com ovaríolos mostrando células germinativas (cg) e células foliculares (cf); escala: 50 μ m. **C.** pupa de olho marrom, mostrando gordura (G) entre os ovaríolos, túnica própria (tp) evidente e células centrais (cc) na região basal; escala: 50 μ m. **D.** Adulto, mostrando diferentes regiões do ovário, que se mostra longo e enrolado. Abaixo, região do filamento terminal (FT) e acima o germário com células germinativas (cg) e foliculares (cf); escala: 50 μ m.

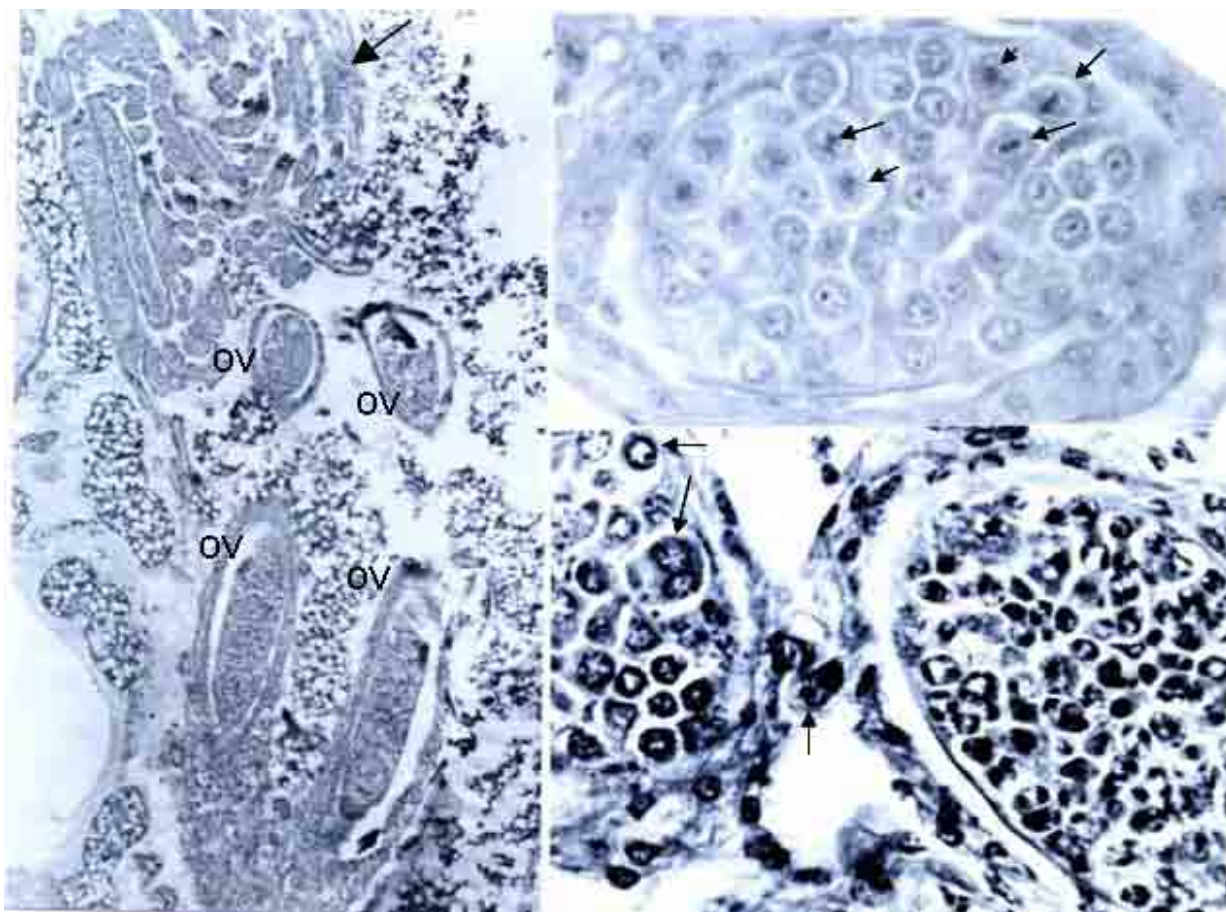


Figura 3-Ovariolos de pupas dos meliponíneos. **A.** corte longitudinal de ovário de pupa de olho branco de rainha, mostrando os ovariolos (OV) longos com a extremidade distal enrolada (seta); escala: 50 μ m. **B.** ovariole de rainha mostrando divisões celulares (setas); escala: 50 μ m. **C.** Ovariole de operária mostrando mortes celulares (setas); escala: 50 μ m.

DISCUSSÃO

As larvas das espécies de abelhas que têm determinação trófica das castas, ao eclodir do ovo são bipotentes, isto é, podem originar tanto rainhas como operárias.

Em *A. mellifera*, a bipotencialidade desaparece a partir do segundo ao terceiro dia depois da eclosão (CAPELLA e HARTFELDER, 1997), conforme o conhecimento de qualquer apicultor que pratica a produção artificial de rainhas.

A partir dessa idade a alimentação dada pelas operárias às larvas destinadas a serem operárias e rainhas passa a ser quantitativa e qualitativamente diferentes. Experimentos em que a geléia real, alimento próprio das larvas de rainha, começa a ser fornecida às larvas depois do terceiro dia, resultam em rainhas imperfeitas ou intercastas (CAMPOS e COSTA, 1989; HARTFELDER e ENGELS, 1992; DEDEJ *et al.*, 1998). A alimentação das larvas em *A. mellifera* é progressiva e também a determinação das castas (BEETSMA, 1979). Embora o número de ovários nos ovários em ambas as castas continue a aumentar durante o desenvolvimento larval (CHAUD-NETTO e BUENO, 1979; CRUZ-LANDIM, 2004), este aumento é menor na operária e acompanhado por mortes celulares com resultante desintegração de alguns ovários (REGINATO e CRUZ LANDIM, 2001¹; 2001²) e no final do estágio larval e na pré-pupa estas mortes intensificam-se, resultando nos poucos ovários presentes nas operárias adultas. Portanto, embora o ápice da diferenciação entre os ovários das operárias e das rainhas ocorra entre o último estágio larval e o início da pupação (CAPELLA e HARTFELDER, 1997) esta vem ocorrendo paulatinamente desde o terceiro ínstar larval.

Nas espécies já estudadas de Meliponini as operárias sempre apresentam 4 ovários por ovário (SAKAGAMI *et al.*, 1963; CRUZ LANDIM *et al.*, 1998). Nas espécies que têm determinação das castas trofôgena, o número de ovários por ovário nas rainhas é o mesmo, como nas espécies do gênero *Melipona*, mas nas espécies com determinação trófica pode ser maior. Em *S. postica*, espécie com determinação trófica, o número de ovários por ovário é o mesmo em ambas as

castas, mas os ovariolos das rainhas são muito mais longos. Durante a pupação verificam-se mortes celulares nos ovários das operárias e divisões nos das rainhas (SANTOS e CRUZ-LANDIM, 2002).

Os resultados do presente estudo mostram que em *T. spinipes* não só os ovariolos são mais longos como mais numerosos nas rainhas. Também nesta espécie a diferenciação ocorre na transição de larva para pupa, visto que todas as larvas, mesmo as obtidas em células reais apresentam 4 ovariolos. Como desde o início da pupação já se observa a diferenciação entre o número de ovariolos nas operárias e nas rainhas, fica claro que a mudança não é paulatina como em *A. mellifera*, e sim brusca. Isto faz sentido quando se leva em conta que quantidades adicionais de alimento dadas a larvas de operárias no fim do estágio larval, mas que ainda estão se alimentando fazem com que se transformem em rainhas (CAMARGO, 1972; LISBOA *et al.*, 2005; BAPTISTELLA *et al.*, 2005), bem como a aplicação de hormônio juvenil em larvas nessa fase (CAMPOS, 1975; CAMPOS, 1977; IMPERATRIZ-FONSECA, *et al.*, 1977)

O efeito do alimento, tanto em *A. mellifera* como nos Meliponini com determinação trófica das castas, atua através do aumento no título de hormônio juvenil presente na hemolinfa das larvas que se destinam a rainhas (HARTFELDER e ENGELS, 1992; CAPELLA e HARTFELDER, 1997; PINTO *et al.*, 2002).

Contudo em *A. mellifera* a aplicação desse hormônio em larvas do último estágio não as transforma em rainhas (CAPELLA e HARTFELDER, 1997), visto que a determinação das castas vem ocorrendo ao longo da vida larval.

A diferença na quantidade de alimento posta à disposição das larvas destinadas a serem operárias e destinadas a serem rainhas não promovem apenas o número de ovariolos, mas também o aumento do comprimento destes. Este alongamento verifica-se principalmente à custa do filamento terminal, o qual de tão longo, apresenta-se enovelado. Esta região do ovariolo foi durante muito tempo considerada apenas como tendo a função de fazer a ligação entre os ovários e deste com o tegumento. No entanto, há evidências de que as ovogônias primárias estão aí localizadas ou se diferenciam das células contidas nesta região (CRUZ-LANDIM, 2004). Neste sentido o alongamento desta região seria, mesmo nas espécies em que o número de ovariolos não varia entre as castas, o responsável pelas diferenças na capacidade de produção de ovos entre elas.

Os presentes resultados mostram divisões celulares nos ovariolos das rainhas e mortes celulares nos ovários de operárias conforme já observado por SANTOS e CRUZ-LANDIM (2002), mostrando que os ovariolos das operárias são mais curtos por que além de não haver proliferação celular, ocorrem mortes. Isto diminui muito a sua capacidade de produção de ovos.

Nesta espécie as operárias são capazes de realizar postura, embora não se acasalem.

Em conclusão pode ser dito que nesta espécie, conforme já havia sido verificado pela produção artificial de rainhas (LISBOA, *et al.* 2005) a alimentação influencia o número e o comprimento dos ovariolos, embora não tenha sido encontrado correlação estatística entre estes valores e a quantidade de alimento fornecida.

Pode-se concluir também que a transição não é paulatina como em *A. mellifera* mas, abrupta em concordância com o modo de alimentação larval que é o mesmo no que se refere à qualidade até o último estágio, sendo apenas prolongada a fase de alimentação.

Capítulo 3: Desenvolvimento dos ovários e postura em Operárias de *Meliponini*

Entre as abelhas sem ferrão existem diferentes padrões de desenvolvimento ovariano entre as operárias, desde aquelas que põem ovos mesmo na presença da rainha, até aquelas que possuem ovários indiferenciados, que é o caso das espécies do gênero *Frieseomelitta* (BOLELI *et al.*, 2000; STAURENGO-DA-CUNHA e CAMPOS, 1993). Neste contexto, Boleli *et al.*, 2000 consideram operárias de *M. quadrifasciata* e *F. varia* como casos extremos no que se refere ao desenvolvimento ovariano em *Meliponini*: enquanto operárias de *M. quadrifasciata* normalmente desenvolvem ovários e põem ovos mesmo na presença da rainha, operárias de *Frieseomelitta* não o fazem nem mesmo em condições de orfandade (STAURENGO-DA-CUNHA *et al.*, 1986; STAURENGO-DA-CUNHA e CAMPOS, 1993); condição esta propensa à ocorrência de desenvolvimento ovariano em operárias.

Embora as operárias constituam uma casta considerada em princípio não reprodutiva, na maioria de espécies de abelhas altamente eussociais, estas podem na maioria dos casos desenvolver e produzir ovos em seus ovários e realizar postura. Os ovários das operárias, nestes casos, embora tendo menor número de ovariolos e ovariolos mais curtos, são plenamente funcionais. A

produção de ovos acontece na medida em que a vitelogênese ocorre nestes ovários.

As condições sob as quais a vitelogênese ocorre, o seu controle e as suas implicações sociais, no entanto, diferem entre as espécies.

Em *A. mellifera* admite-se como princípio geral que as rainhas são capazes de controlar a produção de ovos pelas operárias através da substância de rainha; feromônio produzido pelas glândulas mandibulares das rainhas (SAKAGAMI *et al.*, 1963; STAURENGO-DA-CUNHA & IIDE, 1992). Portanto, nos ovários das operárias só se diferenciam ovócitos e ocorre vitelogênese na ausência da rainha ou quando há deficiência na produção de seu feromônio (rainha velha) ou na sua distribuição (colônias muito populosas). No entanto, vários relatos, alguns até bastante antigos (SAKAGAMI *et al.*, 1963; STAURENGO DA CUNHA, 1978; STAURENGO-DA-CUNHA *et al.*, 1986) dão conta de que mesmo na presença da rainha as operárias amadurecem ovócitos em seus ovários e realizam postura. Em geral os ovos postos pelas operárias são retirados pelas operárias policiadoras (MILLER e RATNIEKS, 2001; RATNIEKS, 2002), mas, mesmo assim, alguns deles se desenvolvem por partenogênese arrenótoca, originando machos, de maneira que nem todos os machos produzidos na colônia são filhos da rainha (MAKERT, 2002).

A postura de operárias chega ao máximo em *A. mellifera capensis*, que pode ser considerada uma espécie parasita de *A. mellifera*, (pois suas operárias põem ovos que dão origem a fêmeas por partenogênese telítoca), a sua postura é tão numerosa, devido ao número de operárias poedeiras que a população filha da rainha acaba por ser sobrepujada (MAKERT, 2002).

Mas mesmo neste caso a postura individual de cada operária é pequena.

Em *A. mellifera*, a redução da fertilidade das operárias, resultante da diminuição drástica do número e do comprimento dos ovaríolos por ovário, tem por função “desviar” estas fêmeas das atividades reprodutivas para as atividades de manutenção da colônia, não só através da construção do ninho e seu provisionamento, mas também, através da produção de alimento glandular para a cria e para a rainha.

Mas, a esterilidade das operárias não sendo completa, pode gerar certo “conflito” entre as castas na produção dos machos, e no caso de *A. mellifera capensis* esta condição está exacerbada, havendo concorrência também na produção de fêmeas (MILLER e RATNIEKS, 2001; RATNIEKS, 2002).

Nos Meliponini há certa variação quanto à capacidade de produção de ovos pelas operárias e quanto à postura.

Na maioria das espécies as rainhas não exercem controle sobre a produção de ovos no ovário das operárias, mas, o exercem sobre sua postura. Nestas espécies é freqüente que, os ovos postos pelas operárias sejam comidos pela rainha. Portanto, neste caso, as operárias produzem alimento para as rainhas, não apenas nas suas glândulas hipofaríngeas, mas também em seus ovários. Alguns estudos mostram que em algumas espécies dois tipos de ovos são produzidos pelas operárias: ovos alimentares ou ovos tróficos e ovos férteis e funcionais, como relatado para *S. postica* por STAURENGO DA CUNHA, 1978.

Os ovos tróficos muitas vezes são postos na borda das células de cria (SAKAGAMI *et al.*, 1963; KLEINERT-GIOVANNINI *et al.*, 1991) ao invés de sobre o alimento, sinalizando desde o início sua diferenciação.

O número de ovos que uma operária tem a capacidade de produzir parece ser pequeno, mesmo que em algumas espécies numerosos ovos de operárias possam ser postos na mesma célula (KLEINERT-GIOVANNINI *et al.*, 1991), estes provavelmente não são postos pela mesma operária.

As operárias de *Nannotrigona testaceicornis* apresentam somente um folículo em vitelogênese, produzindo, assim, apenas um ovócito durante sua vida. Operárias de *S. postica* formam dois ovócitos no máximo, sendo um no ovário direito e outro no esquerdo, podendo ser um tipo funcional e outro nutritivo, nunca ambos funcionais ou nutritivos. Embora, pela literatura, as operárias desta espécie, formem apenas o tipo nutritivo de ovo, foi observado por análises histológicas que as operárias de meia-idade põem dois tipos de ovos: um semelhante ao ovo nutritivo de *S. postica* e o outro, semelhante ao ovo funcional. Além da oofagia, os ovos nutritivos estão mais sujeitos à reabsorção, ambos os mecanismos normais de reciclagem de nutrientes (STAURENGO-CUNHA e IIDE,

1992).

Em algumas espécies não fica clara a distinção entre ovos tróficos e funcionais.

Nos Meliponíneos ocorre muitas vezes que os ovos de operárias não comidos pela rainha sejam comidos por outras operárias (KLEINERT-GIOVANNINI *et al.*, 1991). Quando um ovo de operária é funcional e escapa de ser ingerido, dá origem a machos. Portanto, aqui também existe uma concorrência entre a rainha e a operária e até entre as operárias na produção de machos (OLDROYD *et al.*, 1994). Acredita-se que em *S. postica* os machos são filhos das operárias, no entanto, outros estudos têm mostrado que não se trata de uma regra geral.

Nestas espécies de Meliponini as operárias também foram desviadas da função reprodutiva, mas ao contrário de *A. mellifera* em que a produção de ovos pelas operárias parece não ter uma função proveitosa para a sociedade, neste caso, a produção dos ovos tróficos tem a função de alimentar a rainha e neste sentido o desenvolvimento de ovos no ovário das operárias não é impedido pela rainha e talvez seja até estimulado, visto que sua produção ocorre justamente na fase em que as interações entre as castas são mais intensas.

A oofagia é comum no estabelecimento de indivíduos dominantes. Em *Bombus* é comum que a rainha imponha sua dominância na colônia comendo os ovos de outras fêmeas (DUCHATEAU & VELTHUIS, 1989). Este caráter manteve-se nos meliponíneos. Mesmo assim a rainha não consegue impedir totalmente que as operárias tenham descendência (assim como em *A. mellifera*) e, portanto, um certo conflito ocorre tanto entre rainhas e operárias como entre operárias.

No entanto, há espécies de Meliponini, como *L. muelleri* e *F. schottkyi* que, semelhante *A. mellifera*, as operárias somente desenvolvem seus ovários na ausência da rainha ou em colônias superpopulosas. Neste caso, a rainha parece exercer um controle sobre a produção e a postura de ovos pelas operárias (SAKAGAMI *et al.*, 1963; TERADA, 1974; CAMILLO-ATIQUE, 1977; STAURENGO-DA-CUNHA, *et al.*, 1986; CRUZ-LANDIM, 2000).

Contudo existem poucos dados a respeito do comportamento reprodutivo desta espécie para que comparações possam ser feitas com outras espécies.

Em espécies do gênero *Frieseomelitta* e em *Duckeola ghiliani* (SAKAGAMI & ZUCCHI, 1968, CAMILLO-ATIQUE, 1977; STAURENGO-DA-CUNHA, *et al.*, 1986; CRUZ-LANDIM, 2000), nunca se observou postura de ovos por operárias, mesmo na ausência da rainha (TERADA, 1974; STAURENGO-DA-CUNHA *et al.*, 1986; STAURENGO-DA-CUNHA *et al.*, 1989; STAURENGO-DA-CUNHA e CAMPOS, 1993). Isto foi inicialmente atribuído à falta da morfogênese dos ovariolos (STAURENGO-DA-CUNHA *et al.*, 1986; STAURENGO-DA-CUNHA e CAMPOS, 1993). No entanto, tendo em vista a constatação de que ovários com ovariolos ainda contendo células germinativas (cistócitos) estão presentes em operárias provisionadoras de cria (ver cap. 1) e que os dutos ovarianos regredem na pupa (BOLELI, 2001), é possível que a ausência de postura se deva também a uma impossibilidade de fazê-lo. Aliás, parece que o maior impedimento para que as operárias possam deixar descendentes de ambos os sexos não está no funcionamento de seus ovários, mas nos dutos genitais atrofiados, que impedem que possam se acasalar.

Em *F. silvestri*, que é um dos exemplos extremos, a reabsorção dos ovários da operária ocorre ainda na pupa (CRUZ-LANDIM, 2000), mas em *Frieseomelitta varia varia*, que é uma espécie do mesmo gênero, foi verificado que ocorre diferenciação dos ovariolos com a formação de um folículo com um único ovócito que, no entanto, se mostrou incapaz de completar a vitelogênese; ou seja, a degeneração é também para esta espécie uma condição normal para as operárias (STAURENGO-DA-CUNHA & CAMPOS, 1993).

Portanto, a regra nas espécies de abelhas sem ferrão, assim como em *A. mellifera* é que as operárias embora tendo ovários atrofiados em comparação com os da rainha, os têm funcionais e podem produzir ovos em determinadas condições.

Na condição mais freqüente em que a capacidade reprodutiva das operárias se apresenta, esta casta pode ser mãe de machos e, portanto, não é completamente infértil, mas subfértil. O fato de seus ovários serem atrofiados em

relação aos das rainhas confere a cada indivíduo em particular a condição de subfertilidade, mas como são numerosas, podem eventualmente, suplantar a rainha na produção de machos. No entanto, parece haver uma tendência evolutiva para uma total inabilidade para a produção de ovos pelas operárias, visto que algumas espécies não produzem ovos funcionais e até para a produção de qualquer tipo de ovo, fato que tem sua representação extrema na reabsorção do ovário na pupa, como observado em *F. silvestri* (STAURENGO DA CUNHA *et al.*, 1986; CRUZ-LANDIM, 2000) e em *F. varia* (STAURENGO DA CUNHA e CAMPOS, 1993; BOLELI *et al.*, 1999; BOLELI *et al.*, 2000).

Segundo MICHENER (1974), o funcionamento dos ovários das operárias é de especial interesse na consideração da sociabilidade por causa dos graus das diferenças fisiológicas e comportamentais entre rainhas e operárias que resultam na divisão do trabalho reprodutivo entre as castas nas abelhas eussociais. Nestas abelhas encontram-se desde condições em que fêmeas funcionando como operárias têm, no entanto, plenas condições de serem fecundadas e fazerem posturas, como em *Bombus*, até a completa infertilidade das espécies que nunca desenvolvem seus ovários nos adultos.

Se por um lado a postura de ovos pelas operárias gera conflitos com as rainhas quando estes são funcionais e dão origem a machos, por outro lado quando ela deriva para a produção de ovos tróficos para alimentar a rainha, o desenvolvimento dos ovários passa a ser benéfico, sugerindo que a oofagia como maneira da rainha controlar a descendência das operárias tende a evoluir para uma produção de alimento para estas pelas operárias, como já acontece em *A. mellifera*, com a diferença de que neste caso o alimento é produzido nas glândulas hipofaríngeas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASENCOT, M. & LENSKEY, Y. **The effect of soluble sugars in stored royal jelly on the differentiation of the female honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae to queens.** *Insect Biochem.*, 18 (2): 127-133, 1988.

BAPTISTELLA, A. R, T. O.; SOUZA, C. C. M.; SANTANA, W. C.; SOARES, A. E. E. 2005. **Quantidade de alimento larval em células de operárias e produção de rainhas em *Frieseomelitta varia* (Hymenoptera, Apidae).** I Simpósio Brasileiro de Insetos Sociais.

BEETSMA, J. (1979). **The process of queen-worker differentiation in the honeybee.** *Bee World*, 60 (1): 24-39.

BERGER, B. e ABDALLA, F. C. (2005). **Programed Cell Death during Ovarian Differentiation in Queens of *Apis mellifera* LINNÉ, 1758 (Hymenoptera, Apini).** *Bras. J. morphol. Sci.* (2005) 22 (1):1-4.

BOLELI, I. C.; PAULINO-SIMOES, Z. L.; BITONDI, M. M. G. (1999). **Cell Death in Ovarioles causes Permanent Sterility in *Frieseomelitta varia* Worker Bees.** *J. of Morphol.* 242: 271-282.

BOLELI, I. C.; PAULINO-SIMÕES, Z. L.; BITONDI, M. M. G. 2000. **Regression of the Lateral Oviducts During the Larval-Adult Transformation of the Reproductive System of *Melipona quadrifasciata* and *Frieseomelitta varia*.** *J. of Morphol.* 243: 141-151.

BUENO, O.C. **Diferenciação dos ovários e determinação do número de ovários em *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae), São Paulo, 1981.** 59p. Tese (Doutorado)- Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.

BÜNING, J. 1994. **The Insect Ovary: ultrastructure, previtellogenic, growth and evolution**. London: Chapman & Hall. 400p.

BUSCHINI, M. L. T.; CAMPOS, L. A. O. 1995. **Caste Determination in *Trigona spinipes* (Hymenoptera, Apidae): Influence of the Available Food and Juvenile Hormone**. Rev. Bras. Biol. 55 (1): 121-129.

CAMARGO, C. A. (1972). **Determinação de Castas em *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera, Apidae)**. Rev. Brasil. Biol. 32 (1): 133-138.

CAMILLO-ATIQUE, C. (1977). **Estudo da variabilidade etológica de *Friesella* incluindo a caracterização de espécies crípticas**. FMRP-USP. 203p. Tese de doutorado.

CAMPOS, L. A. O. (1975). **Determinação de Casta no Gênero *Melipona* (Hymenoptera, Apidae): Papel do Hormônio Juvenil**. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 48p. Dissertação de Mestrado.

CAMPOS, L. A. O. 1977. **O Hormônio Juvenil nas Abelhas: Seu papel na Diferenciação das Castas e nos Aspectos do Controle Social**. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo. 67p. Tese de Doutorado

CAMPOS, L. A. O.; COELHO, C. D. P. 1993. **Determinação de Sexo em Abelhas XXX. Influência da Quantidade de Alimento e do Hormônio Juvenil na Determinação de Castas em *Partamona cupira helleri* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae)**. Rev. Bras. Zool. 10 (3): 449-452.

CAMPOS, L. A. O.; COSTA, M. A. 1989. **Determinação do sexo em Abelhas XXVIII. Determinação das Castas em *Schwarziana quadripunctata* (Hymenoptera, Apidae)**. Rev. Bras. Biol., 49(4): 999-1001.

CAPELLA, I. C. S. & HARTFELDER, K. (1998). **Juvenile Hormone Effect on DNA Synthesis and Apoptosis in Caste- Especific Differentiation of the Larval Honeybee (*Apis mellifera*, L.) Ovary.** Journal of Insect Physiology. 44: 385-391.

CHAPMAN, R. F., (1998). **The Insects Structure and Function.** Fourth Edition. Cambridge University Press. 770p.

COPIJN, G. M.; BEETSMA, J. e WIRTZ, P. (1979). **Queen differentiation and mortality after application on different juvenile hormone analogues to worker larvae of the honeybee (*Apis mellifera* L.).** Entomology, 82 (1): 29-42.

CRUZ-LANDIM, C., (2000). **Ovarian Development in Meliponinae bees (Hymenoptera: Apidae): the effect of queem presence and food on worker ovary development and egg production.** Genetics and Molecular Biology. 23(1):83-88.

CRUZ-LANDIM, C. **Biologia do desenvolvimento em abelhas.** Depto. Biologia, Instituto de Biociências, Unesp/Rio Claro, 2004, Disponível em <<http://www.rc.unesp.br/ib/biologia/carmina.html/>. Acesso em 15/02/06.

CRUZ- LANDIM, C; REGINATO, R. D. & IMPERATRIZ- FONSECA, V. L. (1998). **Variation on Ovariole Number in Meliponinae (Hymenoptera, Apidae) Queens Ovaries, with Comments on Ovary Development and Caste Differentiation.** Papéis Avulsos de Zoologia, São Paulo. 40 (18): 289-296.

DARCHEN, R. & DELAGE (1970). **Facteur déterminant des castes chez les Trigones (Hyménoptères, Apides).** Ibidem 270:1372-1373.

DUCHATEAU, M. J. & VELTHUIS, H. H. W. (1989). **Ovarian Development and egg laying in workers of *Bombus terrestris*.** Entomol. Exp. Appl. 51: 199-213.

ENGELMAN, F. (1970). **The Physiology of Insect Reproduction**. First Edition. Pergamon Press. 307p.

FAUSTINO, C. D.; SILVA-MATOS, E. V.; MATEUS, S. E ZUCCHI, R. (2002). **First Record of emergency queen rearing in stingless bees (Hymenoptera, Apinae, Meliponini)**. *Insects Soc.* 49:111-113.

HARTFELDER, K. Trophogene basis und endokrine reaktion in der kastenentwicklung bei stachellosen bienen. **Tübingen., s. ed., 1986, 146p. Tese de Doutorado.**

HARTFELDER, K.; & STEINBRUCK, G. (1997). **Germ cell cluster formation and cell death are alternatives in caste-specific differentiation of the larval ovary**. *Invertebr. Reprod. Dev.* 31: 237-250.

KERR, W. E.; CARVALHO, G. A.; NASCIMENTO, V. A. (1996). **Abelha Uruçu: Biologia, Manejo e Conservação**. Coleção Manejo da Vida Silvestre. Volume 2. Fundação Acangaú.143p.

KLEINERT-GIOVANNINI, A.; HODL, V. L.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. (1991). **Oviposition Process in Brazilian Stingless Bees (Meliponinae, Apidae)**. Begleitveroeffentlichung zum wissenschaftlichen Film C 2198 des OWF. *Wiss. Film (Wien) Nr. 42: 78-89.*

LISBOA, L. C. O.; SERRÃO, J. E.; CRUZ-LANDIM, C. E CAMPOS, L. A. O., (2005). **Effect of Larval Food Amount on Ovariole Development in Queens of *Trigona spinipes* (Hymenoptera, Apinae)**. *Anat. Histol. Embriol.* 34: 179-184.

MAKERT, G. R. (2002). **Efeito da linhagem paterna sobre a ativação dos ovaries e produção de zangões em operárias de *Apis mellifera* deixadas órfãs.** Anais do V Encontro sobre Abelhas, Ribeirão Preto-SP, 236-239.

MARTINS, G. F.; SERRÃO, J. E. (2004). **A Comparative Study of the Ovaries in Some Brazilian Bees (Hymenoptera, Apoidea).** Pap. Av. Zool. 44(3): 45-53.

MICHENER, C. D. (1974) **The Social Behavior of the Bees. Comparative Study by Charles Michener.** The Belkman Press of Harward University Press. Cambridge Massachusetts. 404p.

MICHENER, C. D. (2000) **The Bees of the World.** The Johns Hopkins University Press. 913p.

MILLER, D. G.; RATNIEKS, F. L. W. (2001). **The timing worker reproduction and breakdown of policing behavior in queenless honey bee (*Apis mellifera* L.) societies.** Insects soc. 48: 178-184.

RATNIEKS, F. L. W. (2002). **Cooperation through coercion: policing of male production and female caste fate in honey bees and stingless bees.** Anais do V Encontro sobre Abelhas, Ribeirão Preto-SP, 10-14.

REGINATO, R. D.; CRUZ-LANDIM, C. (2001¹). **Morphological Characterization of Cell Death During the Ovary Differentiation in Worker Honey Bee.** Cell Biology International 2002, vol 26, 3: 243-251.

REGINATO, R. D.; CRUZ-LANDIM, C. (2001²). **Differentiation of the worker's ovary in *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae) during life of the larvae.** Invertebrate Reproduction and Development, 39: 2 (2001) 127-134.

ROCKSTEIN, M., 1973. **The Physiology of Insecta**. Second Edition. Academic Press. 512p.

SAKAGAMI, F. S.; BEIG, D.; ZUCCHI, R. and AKAHIRA, Y. (1963). **Occurrence of ovary-developed workers in queenright colonies of stingless bee**. Rev. Bras. Biol. 23: 115-129.

SAKAGAMI, S. F. and ZUCCHI, R. (1968). **Oviposition behavior of an Amazonic stingless bee, *Trigona (Duckeola) ghilianii***. J. Fac. Sci. Hokkaido. Univ. Ser. VI Zool. 16: 564-581.

SANTOS, T. C. A. e CRUZ-LANDIM, C. (2002). **Determinação das castas em *Scaptotrigona postica* (Latreille) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): diferenciação do ovário**. Rev. Bras. Zool., 19 (3): 703-704.

SNODGRASS, R. F. (1935). **Principles of Insect Morphology**. McGraw-Hill Book Co., New York.

SNODGRASS, R. E., (1956). **Anatomy of the Honeybee**. First Edition. Comstock Publishing Associates. 334p.

STAURENGO DA CUNHA, M. S., (1978). **Desenvolvimento ovariano de operárias adultas de *Scaptotrigona postica* Latr. (Hym., Apidae) III: Aspectos Histológicos e Histoquímicos**. Papéis avulsos de Zool., 32 (6): 71- 86.

STAURENGO DA CUNHA (1989). **Relação entre o desenvolvimento dos ovários e atividade dos *corpora allata* em operarias de *Frieseomelitta silvestri languida***. (Hymenoptera, Apidae). Rev. Bras. Zool. 6: 245-254.

STAURENGO DA CUNHA, M. A. S. & CAMPOS, L. A. O. (1993). **Desenvolvimento ovariano em operárias de *Frieseomelitta varia varia* (Lep. 1836) (Hymenoptera, Apidae)**. Rev. Bras. Biol. 53 (1): 63-69.

STAURENGO DA CUNHA, M. A. S.; GOMES, G. M. E CAMPOS, L. A. O. (1986). **Desenvolvimento ovariano em operárias adultas de *Frieseomelitta silvestri languida* (Hymenoptera, Apidae) sob condições normais e de orfandade**. Ciência e Cultura 38(10): 1725-1732.

STAURENGO DA CUNHA, M. S. e IIDE, A. A., (1992). **Histologia do Desenvolvimento ovariano em operárias de *Nannotrigona testaceicornis* (Lepelletier, 1836) (Hymenoptera, Apidae)**. Naturalia, 17: 119-128.

TERADA, Y. (1974). **Contribuição ao estudo da regulação social em *Leurotrigona muelleri* e *Frieseomelitta varia* (Hym. Apidae)**. FMRP-USP. 96p. Tese de mestrado.

WHEELER, D. **The role of nourishment in oogenesis**. Annu. Rev. Entomol. 41: 407-431, 1996.

ZACARO, A. A., 1993. **Comportamento dos Complexos Sinaptonêmicos durante a Espermatogênese e Ovogênese de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera; Apidae)**. Universidade Estadual Paulista- Rio Claro-SP. Dissertação de Mestrado. 141p.

ZACARO, A. A. e CRUZ-LANDIM, C., 1996. **Ovogênese Previtelogênica e Diferenciação dos Ovariolos Prepostura: Considerações Ultra- Estruturais em *Apis mellifera***. Anais do Encontro sobre Abelhas, 2: 95-104.

ZUCCHI, R. (1994). **A evolução do processo de tratamento das células de cria de Meliponinae: do antagonismo à dominância ritualizada (Hymenoptera, Apidae)**. Anais do Encontro sobre Abelhas, Ribeirão Preto, SP, 1: 38-45.