

**CONTRIBUIÇÃO À ANÁLISE DO PROCESSO DE
AFRICANIZAÇÃO DE *Apis mellifera* (HYMENOPTERA,
APIDAE): CARACTERÍSTICAS DO DESENVOLVIMENTO
DAS GLÂNDULAS DE DUFOUR E DE VENENO**

ROBERTA CORNÉLIO FERREIRA NOCELLI

**Tese apresentada ao
Instituto de Biociências da
Universidade Estadual
Paulista “Julio 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
Estado de São Paulo – Brasil
Julho de 2003**

**CONTRIBUIÇÃO À ANÁLISE DO PROCESSO DE
AFRICANIZAÇÃO DE *Apis mellifera* (HYMENOPTERA,
APIDAE): CARACTERÍSTICAS DO DESENVOLVIMENTO
DAS GLÂNDULAS DE DUFOUR E DE VENENO**

ROBERTA CORNÉLIO FERREIRA NOCELLI

Orientador: Profa. Dra. Regina Lúcia M. Silva de Moraes

**Tese apresentada ao
Instituto de Biociências da
Universidade Estadual
Paulista “Julio 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
Estado de São Paulo – Brasil
Julho de 2003**

Aos meus pais, Gilberto e Dirce, e a meu irmão, Júnior, por constituírem, comigo, uma família maravilhosa;

Ao meu marido, Luismar, por empenhar a vida para tornar meus sonhos realidade;

Dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho e, em especial:

- À Professora Dra. Regina Lúcia Morelli Silva de Moraes, que me recebeu sem me conhecer profundamente, confiou em mim, me orientou, foi e será, sempre, uma grande amiga.
- À Professora Dra. Márcia Heloíza Vilas Boas Mota, por acreditar tão cegamente em mim.
- À Professora Dra. Miriam Ribeiro Campos, por ter me apresentado ao mundo científico.
- A todos os Professores do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da UNESP – Rio Claro, por seus ensinamentos, conselhos, auxílios, amizade e dedicação.
- Aos Professores Dr. José Chaud Netto e Dra. Carminda da Cruz Landim, por serem tão solícitos, disponíveis e pacientes para qualquer dúvida que eu tivesse.
- À Professora Dra. Doralice Maria Cella, por enxergar além do estudante, por pensar em nós como pessoas.
- Aos funcionários do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da Unesp – Rio Claro: Anderson Rodrigues, Antônio T. Yabuki, Cristiane Márcia Mileo, Gerson Melo Souza, Lucila de Lourdes Segalla Franco, Monika Iamonte e Rogilene Aparecida Prado pela ajuda e atenção dedicadas a mim.
- À minha mãe Rio Clareense, Neuza Ap. Borsonello Perinotto , e Celina Silva Francisco, pelos deliciosos cafés e quitutes que animavam minhas tardes.
- Em especial, ao amigo Antônio Sérgio Pascon, apicultor e orquidófilo, sem o qual este trabalho não teria sido realizado.
- Às secretarias da Seção de Pós-Graduação pela atenção.

- A Thaísa Cristina Roat. Um dia recebi a incumbência de co-orientar uma aluna de graduação, para minha alegria, ganhei uma amiga para a vida inteira.
- Aos colegas de pós-graduação, que sempre tornaram as coisas mais fáceis e divertidas.
- Àqueles, que além de colegas, tornaram-se meus amigos, com os quais sei que posso contar: Elaine Cristina Mathias da Silva Zacarin e Alberto José Arab Olavarrieta.
- Às Reginet's, espécie destinada a extinção, Giovana e Elaine.
- A Deus, por me conceder o milagre da vida.

Palavras de Pórtico (Fernando Pessoa)

Navegadores antigos tinham uma frase gloriosa: "Navegar é preciso; viver não é preciso."

Quero para mim o espírito desta frase, transformada a forma para a casar com o que eu sou: Viver não é necessário; o que é necessário é criar.

Não conto gozar a minha vida, nem gozá-la penso. Só quero torná-la grande, ainda que para isso tenha de ser o meu corpo e a minha alma a lenha desse fogo.

Só quero torná-la de toda a humanidade; ainda que para isso tenha de a perder como minha.

Cada vez mais assim penso. Cada vez mais ponho na essência anímica de meu sangue o propósito impessoal de engrandecer a pátria e contribuir para a evolução da humanidade.

É a forma que em mim tomou o misticismo de nossa raça.

Eu quisera ver o mundo (Carlos Drummond de Andrade)

*Eu quisera ver o mundo
Como o vê Sérgio Bernardo:
Ver, no mundo, os muitos signos
Que vigiam sob as coisas.*

*Sentir, sob a forma, as formas,
Os segredos da matéria
Mais a textura dos sonhos
De que se forma o real.*

*Ver a vida em plenitude
E em seu mistério mais alto;
Decifrar a linha, a sombra,
A mensagem não ouvida*

*Mas que palpita na Terra.
Eu quisera ter os olhos
Que assim penetram o arcano
E o tornam (poder da imagem)*

Um conhecimento humano.

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1 Material.....	29
3.2 Métodos.....	29
3.2.1 Análises histológicas do desenvolvimento pós-embrionário das glândulas de veneno e de Dufour de operárias e rainhas.....	29
3.2.2 Análises histológicas de glândulas de veneno de operárias africanizadas tratadas com hormônio juvenil durante o 5º estágio larval.....	30
3.2.3 Análises histológicas de glândulas de veneno de operárias africanizadas tratadas com hormônio juvenil na emergência e de rainhas virgens e fecundadas.....	30
3.2.4 Análise do comprimento das glândulas de veneno e de Dufour de três subespécies de <i>Apis mellifera</i> em relação à abelha africanizada.....	31
3.2.5 Dosagem de proteínas das glândulas de veneno de três subespécies de <i>Apis mellifera</i> em relação à africanizada...	32
3.2.6 Padrão eletroforético protéico das glândulas de veneno de três subespécies de <i>Apis mellifera</i> em relação à africanizada.....	32
4. RESULTADOS.....	34
4.1 Análises histológicas do desenvolvimento pós-embrionário das glândulas de veneno e de Dufour de operárias e rainhas.....	35
4.2 Análises histológicas de glândulas de veneno de operárias africanizadas tratadas com hormônio juvenil durante o 5º estágio larval.....	44
4.3 Análises histológicas de glândulas de veneno de operárias africanizadas tratadas com hormônio juvenil na emergência e de rainhas virgens e fecundadas.....	51

4.4 Análise do comprimento das glândulas de veneno e de Dufour de três subespécies de <i>Apis mellifera</i> em relação à abelha africanizada.....	57
4.5 Dosagem de proteínas das glândulas de veneno de três subespécies de <i>Apis mellifera</i> em relação à africanizada.....	60
4.6 Padrão eletroforético protéico das glândulas de veneno de três subespécies de <i>Apis mellifera</i> em relação à africanizada.....	62
5. DISCUSSÃO.....	65
6. CONCLUSÕES.....	78
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
8. RESUMO.....	100
9. SUMMARY.....	103

1. INTRODUÇÃO

O grande interesse que a abelha *Apis mellifera* vem despertando, principalmente após o processo de africanização ocorrido nas Américas, tem levado ao desenvolvimento de inúmeros trabalhos sobre a biologia dessa espécie, porém, muitos aspectos ainda necessitam de um estudo mais aprofundado. Apesar de o ferrão e de uma de suas glândulas anexas, a glândula de veneno, estarem relacionados à defesa e os híbridos se mostrarem mais agressivos do que as subespécies européias, trabalhos já demonstraram que estas duas características são geneticamente independentes. A outra glândula anexa ao aparelho de ferrão, denominada glândula de Dufour, parece envolvida com a reprodução, característica em que os híbridos, também, se destacam. As glândulas de veneno e de Dufour formam-se durante a metamorfose, tanto em operárias quanto em rainhas de *Apis mellifera*. Estudos sobre o processo de morfogênese dessas glândulas em abelhas são antigos, escassos e contraditórios em alguns pontos.

A metamorfose dos insetos sociais é desencadeada por níveis apropriados de hormônio juvenil e ecdisona, com redução do nível do primeiro e aumento do segundo, na hemolinfa de larvas no final do 5º estágio, em *Apis mellifera* (NIJHOUT & WHEELER, 1982). Nessa espécie, o hormônio juvenil, conforme mostram inúmeros trabalhos, atua no polimorfismo de castas (RACHINSKY *et al.*, 1990) e no polietismo etário dos adultos (ROBINSON, 1987), o qual resulta, pelo menos em parte, da ação hormonal sobre o desenvolvimento e atividade de algumas glândulas exócrinas.

Embora já se conheça a sensibilidade das glândulas de Dufour ao hormônio juvenil exógeno, aplicado topicamente em operárias de *Apis mellifera*, registrando-se, neste caso, aumento do tamanho glandular (ABDALLA *et al.*, 2001), o efeito deste hormônio sobre o desenvolvimento pós-embrionário das glândulas de veneno e sua influência sobre o seu ciclo secretor não estão, ainda, avaliados. O que se conhece é que, em colônias de *Apis mellifera*, quando as operárias ainda são jovens e desempenham atividades dentro da colônia, elas apresentam níveis de hormônio juvenil circulantes mais baixos do que as operárias mais velhas, que estão forrageando (ROBINSON, 1992). Esse aumento de hormônio juvenil na hemolinfa coincide com o final do ciclo secretor da glândula de veneno e início da degeneração da porção glandular, que ocorre por

volta do 16º dia de vida adulta. Nesta época, portanto, em que a operária passa a desempenhar tarefas fora da colônia, todo o veneno que ela possa, eventualmente necessitar, como parte de seu sistema de defesa, já foi produzido e está armazenado no reservatório da glândula, pronto para ser utilizado. Portanto, a degeneração da glândula de veneno coincide com níveis mais altos de hormônio juvenil na hemolinfa. A comprovação da relação entre os dois eventos pode ser obtida pela análise do efeito de aplicações tópicas de hormônio juvenil, como tem sido realizado no caso do estudo do controle hormonal de outras glândulas exócrinas.

OBJETIVOS

O presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de contribuir para o melhor conhecimento do processo de morfogênese das glândulas de veneno e de Dufour no híbrido africanizado de *Apis mellifera*, bem como entender o papel do hormônio juvenil sobre o desenvolvimento e ciclo secretor das glândulas de veneno de três subespécies de *Apis mellifera* (*Apis mellifera ligustica*, *Apis mellifera carnica* e *Apis mellifera caucasica*) em relação ao híbrido africanizado.

Para atingir os objetivos propostos foram realizadas:

- 1 – Análises histológicas do desenvolvimento pós-embrionário das glândulas de veneno e de Dufour de operárias e rainhas da abelha africanizada;
- 2 – Análises histológicas dos efeitos da aplicação tópica de hormônio juvenil, em larvas de 5º estágio e na operária recém-emergida, sobre o desenvolvimento da glândula de veneno e seu ciclo secretor, comparando-as com a glândula de rainhas virgens e fecundadas;
- 3 – Análises morfométricas comparativas das glândulas de veneno e de Dufour de três subespécies de *Apis mellifera* com a abelha africanizada;
- 4 - Análises bioquímicas (dosagem de proteínas e eletroforese) comparativas das glândulas de veneno das três subespécies de *Apis mellifera* com a abelha africanizada.

2. REVISAO DA LITERATURA

O gênero *Apis* apresenta apenas quatro espécies: *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758), *Apis florea* (Fabricius, 1787), *Apis dorsata* (Fabricius, 1793) e *Apis cerana* (Fabricius, 1793). Dentre as quatro, *Apis mellifera* sempre despertou interesse, devido a sua grande importância econômica (CAMARGO & STORT, 1973) e, sobretudo, pelas novas possibilidades de uso de seus produtos na área médica.

Como espécie, *Apis mellifera* apresenta uma grande complexidade, incluindo, segundo RUTTNER (1988), 24 subespécies diferentes, que podem ser identificadas por análises morfométricas, por sua biogeografia e comportamento, tendo sido 14 delas confirmadas, através de estudos de DNA mitocondrial (ARIAS and SHEPPARD, 1996). Possui ampla distribuição, podendo ser encontrada desde locais de clima temperado frio a zonas tropicais. No entanto, apesar disso e de sua adaptação nas Américas, *Apis mellifera* é uma espécie exótica no Brasil, sendo *Apis mellifera mellifera* (Linnaeus, 1758) a primeira subespécie a ser introduzida pelos imigrantes alemães, por volta de 1830. Esta foi seguida por outras subespécies de origem européia, como *Apis mellifera carnica* (Pollmann, 1879), *Apis mellifera ligustica* (Spinola, 1806), *Apis mellifera caucasica* (Gorbachev, 1916) entre outras, todas originárias de regiões de clima temperado a frio, o que levou a uma produtividade, nas condições climáticas brasileiras, abaixo do esperado.

Com o intuito de melhorar a produção brasileira de mel, desenvolveu-se um projeto (KERR, 1967) que visava o melhoramento genético das subespécies européias, através do cruzamento com uma subespécie africana, inicialmente classificada como *Apis mellifera adansonii* e, posteriormente, constatado que se tratava de *Apis mellifera scutellata*, boas produtoras de mel e adaptadas ao clima tropical. Em 1956, foram importadas algumas rainhas desta subespécie, que, acidentalmente, iniciaram uma miscigenação descontrolada com as subespécies européias, que já se encontravam aqui, promovendo o processo de africanização. Este, embora tenha sido inicialmente problemático em termos de produtividade, foi um sucesso em termos adaptativos. O híbrido resultante superou todos os seus parentais, mostrando-se melhor adaptado e mais eficiente. Distribuiu-se rapidamente, da Argentina ao sul dos Estados Unidos, a uma velocidade de 100-

300 Km por ano (RUTTNER, 1988), a ponto de ser a única subespécie encontrada, vivendo de modo selvagem no continente americano.

Ainda é incerta a carga genética que os híbridos carregam, apesar de apresentarem um comportamento muito mais condizente com a subespécie africana (RUTTNER, 1988) e de estarem, de acordo com estudos realizados com DNA mitocondrial, dentro do mesmo braço filogenético que as subespécies africanas (ARIAS and SHEPPARD, 1996). Tal incerteza deve-se ao cruzamento ocorrido com várias subespécies européias e, posteriormente, entre os próprios híbridos, não constituindo assim uma nova subespécie, sendo designada apenas como abelha africanizada. Entre as características apresentadas pelas abelhas africanizadas em relação às européias, são encontrados maior produtividade de mel (COSENZA, 1972), comportamento de forrageamento mais longo durante o dia (KERR *et al.*, 1970), maior agressividade (STORT, 1971), maior capacidade de recrutamento para defesa (NUÑEZ, 1974), maior eficiência na transmissão de informações (KERR, 1975), maior eficiência na coleta de alimentos (MALASPINA & STORT, 1987), além de maior resistência às infestações pelo ácaro *Varroa jacobsoni*, como tem demonstrado os estudos de DE JONG *et al.* (1984) e MORETTO (1993).

Embora apresente grande número de subespécies, a espécie *Apis mellifera* exibe um ciclo biológico comum a todas elas, bastante interessante. Esta abelha tem uma organização social onde existem os machos, chamados de zangões, indivíduos haplóides originados de óvulos não fecundados e que tem papel apenas reprodutivo, e as fêmeas, que se dividem em duas castas: a rainha e as operárias, ambas originadas de óvulos fertilizados sendo, portanto, diplóides. A diferenciação entre as duas castas se dá por meio de alimentação diferencial que é oferecida às larvas, a partir do 3º dia de vida. Existe uma única rainha em cada colônia, responsável pela produção de ovos e, conseqüentemente, pela manutenção de um grande número de operárias dentro da colônia, que desempenham todas as outras tarefas necessárias à manutenção da mesma.

De modo geral, em abelhas sociais, a diferenciação de castas e a divisão de trabalho entre as operárias são fundamentais para o perfeito funcionamento da colônia. A divisão de trabalho baseia-se, segundo ROBINSON (1992), em duas características principais: 1 - todas as diferentes tarefas necessárias são

desempenhadas ao mesmo tempo, por operárias especializadas em cada uma delas, exceto a postura de ovos, que é realizada exclusivamente pela rainha, 2 - estas especializações são fisiológicas e mudam, no caso das operárias, conforme a idade da abelha. Em *Apis mellifera*, as diferenças fisiológicas entre operárias e rainhas são trofôgenicas, ou seja, originadas por meio de uma alimentação diferenciada, o que altera o balanço hormonal dos indivíduos. No entanto, segundo PAGE & PENG (2001), os componentes do alimento responsáveis pelo processo de diferenciação, ainda não foram identificados.

O período de desenvolvimento difere entre os sexos e entre as castas. Os zangões adultos emergem no 24º dia, após a postura do ovo, as operárias no 21º e as rainhas no 16º. A larva é ápoda, áptera e não apresenta muitas das estruturas presentes no adulto, tais como antenas, olhos compostos e genitália externa. As estruturas do adulto surgem, durante a metamorfose, a partir de discos imaginais.

Os discos imaginais foram descritos, anatomicamente, pela primeira vez, por LYONET (1762 *apud* OBERLANDER, 1985) e seu significado no desenvolvimento foi abordado por WEISMANN (1864 *apud* OBERLANDER, 1985). Os discos imaginais são grupamentos de células embrionárias indiferenciadas, derivadas de uma pequena população de células fundadoras no embrião, que funcionam, segundo GEHRING & NOTHIGER (1973), como grupos especiais de células que foram determinadas geneticamente durante o período embrionário, mas que foram reservadas para desempenhar seu papel, no desenvolvimento, apenas numa fase posterior. SVÁCHA (1992), no entanto, questiona a postulada característica de células indiferenciadas para os discos imaginais, uma vez que, trabalhando com os discos imaginais antenais de *Bombyx mori*, verificou que os mesmos são parte integrante do corpo da larva, e não um grupo indiferenciado de células, esperando o início da metamorfose para se manifestarem, tendo, inclusive, atividade secretora, produzindo cutícula. Além das células imaginais agrupadas nos discos, também são encontrados ninhos de células imaginais pouco organizados, chamados de histoblastos (GEHRING & NOTHIGER 1973; OBERLANDER, 1985).

Externamente, os discos imaginais são vistos como pequenos pontos translúcidos com localização fixa, sob a cutícula larval (MYSER, 1954).

Histologicamente, são formados, no início do desenvolvimento embrionário, por uma camada de células epidérmicas cilíndricas, justapostas, de maneira a constituir uma massa compacta, com difícil visualização de seus limites celulares (NEVES, 1984). O disco é circundado por uma membrana basal, contínua com a lâmina basal da epiderme larval e bem suprida de traquéias. Divisões celulares promovem o crescimento dos discos durante a fase larval. Com exceção dos discos dos olhos compostos, todos os outros, genitais, halteres, asas, 1°, 2° e 3° par de pernas, antenas, protorácico dorsal e cípeo-labial (tendo como base os dípteros), desenvolvem-se invaginados em uma cavidade chamada bolsa peripodial, resultante de uma invaginação da epiderme (NEVES, 1984; OBERLANDER, 1985).

Durante a metamorfose, os órgãos externos que foram formados no interior das bolsas peripodiais, a partir dos discos imaginais, são evertidos, através, principalmente, de movimentos celulares (FRISTROM & FRISTROM, 1993; USUI & SIMPSON, 2000) e de mudanças na forma das células (OBERLANDER, 1985). O crescimento e eversão dos discos imaginais é controlado, da mesma forma que a metamorfose, por hormônios.

Os discos imaginais da genitália de *Apis mellifera* aparecem externamente, na larva, como três pares, havendo divergência entre os autores quanto a sua distribuição. Segundo D'ROZÁRIO (1942) existe um par em cada um dos segmentos 7°, 8° e 9°, mas MYSER (1954) indica um par no 8° e dois no 9° segmento, todos visíveis a partir do 2º estágio larval. Histologicamente, esses discos seguem o mesmo padrão dos demais, conforme descrito anteriormente.

Na maioria dos insetos, os discos imaginais da genitália são responsáveis pela formação do ovipositor (CARLET, 1884; 1890 *apud* ABDALLA, 1999), dutos genitais e anexos de origem ectodérmica (D'Rozário, 1942). Além das descrições anatômicas do desenvolvimento dos discos imaginais genitais de *Apis mellifera*, com ênfase nas partes do ferrão, realizadas por D'ROZÁRIO (1942) e MYSER (1954) e que são contraditórias, não existem outros dados na literatura sobre o desenvolvimento pós-embrionário das glândulas de veneno e de Dufour.

As glândulas de veneno e de Dufour, como todas as outras glândulas exócrinas das abelhas, são de origem ectodérmica. Segundo SNODGRASS (1956), evolutivamente, a glândula de veneno originou-se a partir das glândulas

anexas ao ovipositor dos himenópteros não aculeados, enquanto a glândula de Dufour é uma glândula homóloga às glândulas colaterais dos outros insetos. Anatomicamente, ambas estão ligadas ao ferrão, sendo descritas, rotineiramente, como glândulas anexas ao ferrão. Isoladamente, a glândula de veneno é designada como glândula ácida e a glândula de Dufour como glândula básica, apesar de LELLO (1968) ter comprovado que o pH de suas secreções não condiz com a denominação. A autora, através da aferição do pH, utilizando papel de Tournasol e, posteriormente, um potenciômetro, constatou que a secreção da glândula de veneno possui pH em torno de 7 e 8, o que caracteriza uma secreção básica. Ao analisar a secreção da glândula de Dufour, obteve pH ao redor de 6, o que caracteriza uma secreção ácida. Segundo os trabalhos de ABREU (2000), a secreção da glândula de veneno, eliminada na ferroadada, apresenta caráter ácido, mas quando presente na luz do reservatório glandular, ou mesmo intracelularmente, ela é básica. Essa modificação no caráter da secreção pode ser devido, conforme sugerido por ABREU (2000), à provável ação de uma estrutura encontrada na parede dorsal do reservatório, sob a forma de bolsa, que agiria sobre os componentes da secreção.

O primeiro estudo da glândula de Dufour de que se tem registro, segundo SNODGRASS (1956), foi realizado por DUFUR em 1841, que a descreveu com uma localização relacionada ao aparelho reprodutor feminino e com a provável função de secretar uma substância viscosa, com a qual as fêmeas cobririam seus ovos. As primeiras descrições de Dufour, sobre abertura e função glandular foram contestadas por CARLET (1884 *apud* ABDALLA, 1999), e este não foi o último.

A morfologia da glândula de Dufour encontra-se bem estabelecida na maioria dos Hymenoptera (KERR & LELLO, 1962; FERREIRA & CAMARGO, 1965; LELLO, 1968; PATRICIO, 1995; ABDALLA, 1999; ABDALLA & CRUZ-LANDIM, 2001 a, b e c). Frequentemente, a glândula de Dufour é descrita como tendo a forma de um bastão alongado com coloração branco-leitosa, revestida, externamente, por uma capa muscular e uma rede de traqueíolas, apresentando diferenças entre as castas, nos insetos sociais (LELLO, 1968; ABDALLA, 1999; ABDALLA & CRUZ-LANDIM, 2001 a, b, c). Histologicamente, apresenta um epitélio sem estratificação, revestido por uma fina camada cuticular, secretada pelas células glandulares, fazendo parte das glândulas de classe I, de acordo com

a classificação de NOIROT & QUENNEDEY (1974, 1991). Apresentam, porém, segundo ABDALLA (2003), características peculiares, tais como invaginações da membrana basal, associadas com material eletrondenso, o que sugere uma capacidade de captação de substâncias diretamente da hemolinfa, principalmente porque o número de invaginações varia com a atividade da glândula. Além disso, segundo ABDALLA (1999), a morfologia dessas células, também, varia bastante durante a vida da abelha, de acordo com o seu estado fisiológico e tarefa desempenhada dentro da colônia. O epitélio simples dobra-se inúmeras vezes e essas dobras acomodam-se, intercalando-se, de forma que, quando vazia, sua luz parece colabada. Quando a secreção é liberada a glândula pode se distender para armazená-la, aumentando muitas vezes seu tamanho (ABDALLA, 1999).

Em *Apis mellifera*, existem diferenças no tamanho da glândula de Dufour entre as operárias que estão desempenhando diferentes tarefas dentro da colônia, entre operárias e rainhas e entre rainhas virgens e em postura (ABDALLA, 1999; ABDALLA & CRUZ-LANDIM, 2001 a, b). Existem, também, diferenças na composição da secreção de operárias e rainhas. Nas operárias, ela é constituída somente por hidrocarbonetos, enquanto nas rainhas pode-se encontrar, além dos hidrocarbonetos, ésteres de cadeia longa, semelhantes aos encontrados na cera (KATZAV-GOZANSKY *et al.*, 1997). Nessa espécie, ABDALLA (1999) sugere que a secreção glandular possa ser usada para comunicação entre as abelhas, reconhecimento e atração sexual. O mesmo autor encontrou, além das diferenças no desenvolvimento e fisiologia da glândula de Dufour, alterações devido a fatores externos, como o confinamento de rainhas, o declínio da atividade de postura e os níveis de hormônio juvenil circulante.

A secreção da glândula de Dufour em outras abelhas constitui-se de uma mistura complexa de hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, acetatos, cetonas, ésteres e outros derivados, que podem variar quanto à presença e concentração conforme a espécie analisada (PATRICIO, 1995). Esta complexidade na composição de sua secreção pode estar relacionada à grande variedade de funções propostas, como produção de substâncias para construção e revestimento do ninho (LELLO, 1968; HEFETZ *et al.*, 1982; HEFETZ, 1987), reconhecimento dos indivíduos de um mesmo ninho (HEFETZ *et al.*, 1993), marcação da localização e entrada do ninho (BERGSTRÖM & TENGÖ, 1974;

HEFETZ, 1987, 1990), atração sexual (SMITH *et al.*, 1985) e feromônio de trilha ou para demarcação de área de coleta (VINSON *et al.*, 1978).

As várias funções sugeridas para a secreção da glândula de Dufour, podem ter ligação com o local de desembocadura dessa glândula no adulto. Em formigas, apesar de serem glândulas independentes quanto à produção e descarga de suas secreções, a glândula de Dufour desemboca na base do ferrão, juntamente com a glândula de veneno (HERMANN & BLUM, 1981). Em vespas e abelhas, porém, a glândula de Dufour desemboca na vagina, não tendo relação, no adulto, com a glândula de veneno (BILLEN, 1987).

A glândula de veneno localiza-se na parte posterior do abdômen, entre o reto e os ovários, e é formada por um tubo longo, fino e convoluto que apresenta a porção distal bífida e a proximal conectada a um reservatório, que desemboca no ferrão através de um duto excretor (SNODGRASS, 1956). Ela foi descrita pela primeira vez por SWAMMEDAN (1792 apud MASCHWITZ & KLOFT, 1971) e sua morfologia, dentro dos Hymenoptera, encontra-se bem detalhada (PAWLOWSKY, 1927; CRUZ-LANDIM & KITAJIMA, 1966; CRUZ-LANDIM & BALDISSERA, 1967; ROBERTSON, 1968; LELLO 1968; MASCHWITZ & KLOFT, 1971; BRIDGES & OWEN, 1984; SILVEIRA & CAETANO, 1993; MOREIRA & DELLA LUCIA, 1993; SCHOETERS & BILLEN, 1995; ABREU, 1996; SCHOETERS & BILLEN, 1998; BARBALHO & PENTEADO-DIAS, 1997). Apresenta aspecto variável entre abelhas, formigas e vespas mas, de maneira geral, consiste de um ou mais túbulos secretores, que podem se abrir diretamente ou se unir e desembocar conjuntamente em um reservatório, o qual liga-se ao ferrão através de um duto excretor.

Em *Apis mellifera* a glândula de veneno está presente tanto em operárias quanto em rainhas, mas existem diferenças casta-específicas entre elas (CRUZ-LANDIM & BALDISSERA, 1967), sendo que as rainhas apresentam glândulas significativamente maiores do que as operárias. Suas características histológicas, no entanto, são muito semelhantes (KERR & LELLO, 1962).

O epitélio da porção tubular é formado por células secretoras cilíndricas altas, delimitando um lúmen, revestido por espessa cutícula. Canalículos são encontrados atravessando essa camada de cutícula, indo em direção ao epitélio secretor, terminando em uma estrutura conhecida como aparato terminal. Nessa

região, podem ser observadas inúmeras microvilosidades, através das quais a secreção é eliminada para o canalículo que a despeja na luz da glândula, sendo, posteriormente, estocada no reservatório (CRUZ-LANDIM & KITAJIMA, 1966; BRIDGES & OWEN, 1984). Os núcleos das células secretoras são grandes e esféricos, localizados mais basalmente. Núcleos menores, elípticos, estão localizados próximos à luz e pertencem às células formadoras dos canalículos (OWEN & BRIDGES, 1976). A presença de canalículos coletores de secreção em cada uma das células coloca esta glândula na classe III de NOIROT & QUENNEDEY (1974, 1991).

As células secretoras do veneno são encontradas ao longo de toda a porção tubular da glândula e na porção distal do reservatório (BRIDGES & OWEN, 1984; ABREU *et al.*, 2000). Histologicamente, a parede interna do reservatório apresenta uma região distal, com células bastante baixas, com citoplasma basófilo, que não sofre alterações com a idade, nem com as estações do ano, e uma região proximal, que apresenta um epitélio simples e fino, com células achatadas, mais baixas que as da região distal (CRUZ-LANDIM & KITAJIMA, 1966; ABREU *et al.*, 2000). Externamente, segundo ABREU *et al.* (2000), que estudou a glândula de veneno sob microscopia eletrônica de transmissão e de varredura, o reservatório de veneno pode ser dividido em três regiões: proximal, intermediária e distal. De acordo com a mesma autora, não ocorre musculatura associada ao saco de veneno.

Durante a vida da operária, as células do epitélio secretor da glândula de veneno apresentam um único ciclo secretor, que se inicia no final da pupação e alcança seu máximo por volta do 16º dia de vida da abelha (CRUZ-LANDIM *et al.*, 1967). O veneno produzido é estocado no reservatório e a glândula entra em processo de degeneração (CRUZ-LANDIM & KITAJIMA, 1967; ABREU *et al.*, 2000), caracterizado por uma redução na altura das células, vacuolização, desintegração do citoplasma e aumento da corabilidade dos núcleos, que se tornam picnóticos e irregulares (CRUZ-LANDIM & BALDISSERA, 1967; ABREU *et al.*, 2000). De acordo com CRUZ-LANDIM *et al.* (1967) e OWEN & BRIDGES (1976), a degeneração progride da região do saco de veneno para a bifurcação e se completa, nas operárias, por volta dos 30 dias de idade.

O trabalho de ABREU *et al.* (2000) mostra, através de estudos histológicos, que a degeneração é diferenciada ao longo da glândula. Ao final do ciclo secretor apenas as células da região proximal mostram-se totalmente degeneradas, enquanto as da porção distal permanecem altas, não apresentando sinais muito evidentes de degeneração. Esses dados foram confirmados pelos estudos citoquímicos, realizados pela mesma autora (ABREU, 2000), que indicam, também, maior atividade de síntese aos 14 dias de idade. Após o término da síntese, os núcleos da região proximal apresentam-se metacromáticos, refletindo uma maior condensação da cromatina e, conseqüentemente, menor atividade de transcrição. Em rainhas, a degeneração é muito mais lenta, uma vez que operárias vivem em média 60 dias e rainhas podem viver de 2 a 3 anos (CRUZ-LANDIM & BALDISSERA, 1967). Além da modificação da atividade secretora das glândulas de veneno durante a vida da abelha e, também, entre as células da região proximal e distal, o ciclo secretor pode ser influenciado pela estação do ano (CRUZ-LANDIM *et al.*, 1967; NOGUEIRA, 1976; ABREU *et al.*, 2000), por fatores alimentares (REKOS, 1975) e pelo tamanho da colônia (NOGUEIRA, 1976).

O veneno produzido pelas glândulas de *Apis mellifera* já possui mais de 50 componentes diferentes identificados, sendo que muitos deles apresentam efeitos tóxicos sobre vários animais (BRIDGES & OWEN, 1984). Segundo PALMA & BROCHETTO-BRAGA (1994), o veneno produzido pela glândula fica armazenado no reservatório, sob a forma de precursores que seriam ativados, posteriormente. CRUZ-LANDIM & KITAJIMA (1966) sugerem que a glândula produza uma parte do veneno, à qual seriam adicionadas outras substâncias, secretadas pelas células proximais do saco de veneno. Estas substâncias poderiam determinar a especificidade do veneno de cada espécie. Além disso, os trabalhos de ABREU (2000), mostram que existe uma assincronia na secreção dos componentes, as proteínas sendo produzidas por todo epitélio glandular até os 14 dias de idade, e os polissacarídeos neutros sendo produzidos, mais tardiamente, pelas células da região distal, que não apresentam sinais de degeneração. Outras substâncias, ainda, podem vir da hemolinfa, absorvidas, segundo BLUM & HERMANN (1969), pelas células dos túbulos secretores.

É muito difícil separar todos os componentes existentes no veneno dos Hymenoptera, devido à complexidade de sua mistura (MELLO, 1970). Trata-se de uma mistura de aminas biogênicas, polipeptídios e enzimas.

As aminas biogênicas são, em sua maioria, constituintes comuns dos venenos de insetos e cobras, sendo a histamina a mais comum delas, e seu conteúdo, em *Apis*, está relacionado com a idade, aumentando de zero, após a emergência, para 2000 ng entre 35 e 45 dias de vida (OWEN *et al.*, 1977; OWEN, 1978). Aminas biogênicas, como a octopamina, também estão relacionadas à divisão de trabalho (SCHULZ & ROBINSON, 1999; WAGENER-HULME *et al.*, 1999), tendo sido verificado no cérebro de abelhas forrageiras quantidades maiores de octopamina, do que nos das operárias que estão desempenhando atividades dentro da colônia. O tratamento com esta amina biogênica também induz ao forrageamento precoce, efeito semelhante ao do hormônio juvenil.

Os fatores alergênicos do veneno das abelhas são representados pelas enzimas, entre as quais são encontradas fosfolipases, hialuronidases, lipases e fosfatases (HABERMANN, 1972; PALMA & BROCHETTO-BRAGA, 1994). A fosfolipase, que age sobre os fosfolipídeos da membrana plasmática, levando à lise celular, é encontrada em quantidades muito maiores no veneno das abelhas africanizadas, em relação às européias (SCHUMACHER *et al.*, 1992) e, dentro destas, em quantidade maior no veneno das operárias (MARZ *et al.*, 1981). Através de análises enzimológicas, ABREU (2000) constatou a ocorrência de enzimas que variam quantitativamente conforme a idade da operária e, também, de enzimas características de determinadas idades. De um modo geral, a autora detectou maior atividade enzimática aos 14 dias, sendo a enzima de maior atividade, a fosfatase ácida que, além de fazer parte da secreção do veneno, participa do processo de degeneração glandular. Pode-se encontrar, também, melitina que representa, aproximadamente, 50% do peso seco do veneno, apamina, peptídeo degranulador de mastócito, secapina, tertiapina e inibidor de proteases (HABERMANN, 1972). Outros compostos do veneno, provenientes da hemolinfa, são representados por aminoácidos (NELSON & O'CONNOR, 1968), carboidratos e constituintes lipídicos (BANKS & SHIPOLINI, 1986).

O veneno, produzido pelas operárias no final da pupação e nos primeiros dias de vida é armazenado no saco de veneno. O fato de as operárias do gênero

Apis ferroarem uma única vez, não necessitando de um segundo processo de síntese do veneno, poderia ser a explicação para a degeneração precoce da glândula. No entanto, extraindo o veneno através de choques elétricos, ABREU *et al.* (2000) demonstraram que a glândula é capaz de ressintetizar veneno com capacidade variada conforme a idade da abelha. Operárias com 7 dias de idade, que estão desempenhando atividades dentro da colônia, apresentam pouca reatividade ao estímulo de ferrear, porém, é nessa idade que a glândula apresenta maior capacidade de ressíntese, pois todo epitélio está ativo. Quando a operária atinge, aproximadamente, 20 dias de idade e já está desempenhando atividades fora da colônia, a glândula apresenta grande reatividade ao estímulo, mas uma menor capacidade de ressíntese, uma vez que a porção proximal glandular já entrou em degeneração.

O fim da síntese e a degeneração precoce da glândula de veneno poderiam, então, ser determinados por uma alteração no ambiente hormonal, como acontece com outras glândulas exócrinas. Tanto durante o desenvolvimento pós-embrionário, quanto no decorrer da vida de operárias adultas, ocorrem grandes mudanças no organismo, inclusive com desenvolvimento, ativação e degeneração de certas glândulas. Esses processos, no entanto, são muito plásticos, podendo ser acelerados ou retardados, de acordo com os estímulos e/ou condições ambientais.

O hormônio juvenil é responsável pelo desencadeamento de estímulos internos muito importantes nas abelhas, desde a eclosão do ovo até o final da vida adulta (NIJHOUT & WHEELER, 1982). Este hormônio é produzido pelos *corpora allata*, descritos pela primeira vez em um estudo comparativo, morfológico e sistemático em insetos, realizado por NABERT (1913). Em *Apis mellifera* esses órgãos são representados por um par de glândulas localizadas no sistema retrocerebral (HARTFELDER, 2002).

Vários trabalhos têm estudado os efeitos do hormônio juvenil sobre a diferenciação de castas em abelhas. Durante o desenvolvimento pós-embrionário, nas larvas de rainhas, que continuam a receber geléia real, enquanto as operárias passam a receber mel e pólen, ocorre um aumento no tamanho dos *corpora allata* em relação aos das operárias, o que leva a uma maior produção de hormônio juvenil, que se perpetuará na vida adulta da rainha (WIRTZ & BEETSMA, 1972;

REMBOLD *et al.*, 1974; RACHINSKY and HARTFELDER, 1990; RACHINSKY and ENGELS, 1995).

Dessa forma, a dieta diferenciada das larvas pode alterar a quantidade de hormônio juvenil produzido, de maneira que níveis maiores de hormônio circulante levam ao desenvolvimento de rainhas (WIRTZ, 1973; REMBOLD, 1976). O'BRIEN & SHUEL (1972) sugerem que altas concentrações de açúcar são necessárias para a determinação de castas. ASECOT & LENSKY (1976) em estudos com *Apis mellifera*, concluíram que a diferenciação de larvas em rainhas pode ser conseguida com a adição de altas doses de açúcar à alimentação da operária ou pela aplicação tópica de hormônio juvenil.

Na fase adulta, além dos níveis de hormônio juvenil serem diferentes entre rainhas e operárias, as operárias apresentam variações, conforme sua idade e a tarefa desempenhada dentro da colônia. Operárias jovens, que permanecem no interior da colônia, tem níveis baixos de hormônio juvenil, que aumenta progressivamente, atingindo seu máximo quando a operária sai para tarefas externas. (LAERE, 1971; JAYCOX *et al.*, 1974; FLURI *et al.*, 1982; ROBINSON, 1987; SULLIVAN *et al.* 2000; SCHULZ *et al.*, 2002). A passagem de uma tarefa a outra demanda alterações fisiológicas, mudanças no desenvolvimento e ciclo secretor de diversas glândulas. Segundo muitos autores, a mudança comportamental e conseqüente ativação e desativação das glândulas envolvidas, está sob a influência do hormônio juvenil (JAYCOX, 1976; FLURI *et al.*, 1982; ROBINSON, 1985, 1987; ROBINSON *et al.*, 1992; SULLIVAN *et al.*, 2000).

Diferenças em relação aos níveis de hormônio juvenil são também encontradas entre as fases de desenvolvimento dos insetos. Assim, durante o período larval, a presença do hormônio juvenil, juntamente com a ecdisona, induz as células epidermais a produzirem cutícula larval. Quando ocorre a redução do hormônio juvenil circulante, no final do período larval, acontece a metamorfose e a pupação. No final da pupação, com níveis de hormônio juvenil muito baixos, um adulto emerge (WIGGLESWOTH, 1985).

Segundo NIJHOUT & WHEELER (1982), os conjuntos de genes larvais, pupais e adultos seriam diferentemente sensíveis ao hormônio juvenil. Os genes larvais estariam ativos somente na presença de altos níveis de hormônio juvenil. Com a diminuição do nível hormonal, no final da vida larval, os genes pupais seriam

ativados pela ecdisona e, posteriormente, quando o hormônio juvenil praticamente desaparece, os genes do adulto passariam a se expressar.

Além de influenciar a ativação ou desativação de genes que promovem o progresso do desenvolvimento temos também, em *Apis mellifera*, a influência sobre um desenvolvimento diferencial entre as larvas de operárias e de rainhas, resultado de níveis hormonais diferentes. Essa diferença no nível de hormônio juvenil, apesar de poder ser sempre observada entre operárias e rainhas, é mais proeminente por volta do 5º estágio larval (RACHINSKY *et al.*, 1990), quando ocorre um pico de secreção nas larvas de rainhas, que passam a produzir 26 vezes mais hormônio juvenil que as operárias. Segundo RACHINSKY & ENGELS (1995), esse pico antecede em, aproximadamente, 2 dias os primeiros sinais evidentes da rainha adulta. Um segundo pico, que ocorre na fase de pré-pupa, é mais discreto e acontece em ambas as castas estando, provavelmente, relacionado à passagem para a fase pupal. Após este segundo pico, o nível de hormônio juvenil circulante cai bruscamente, praticamente desaparecendo na pupa de olho branco. Quando o indivíduo emerge, há um novo aumento no título de hormônio juvenil que progride com a idade (HARTFELDER & ENGELS, 1998). Esse aumento no título do hormônio juvenil age sobre os genes ativando-os ou desativando-os quando necessário, modulando o estado fisiológico e as características morfológicas necessárias para que as estruturas certas estejam ativas na hora correta, controlando o metabolismo geral e o polietismo etário (AKAMATSU *et al.*, 1975; REMBOLD, 1976; BUENO, 1977; ROBINSON, 1987; BONETTI, 1990).

Mudanças de comportamento que ocorrem ao longo da vida da operária, como alterações no desenvolvimento e atividade das glândulas exócrinas, podem ser induzidas através da aplicação tópica de hormônio juvenil (JAYCOX *et al.*, 1974; RUTZ *et al.*, 1976; PLETTNER *et al.*, 1977; ROBINSON, 1985; ROBINSON & RATNIEKS, 1987; BONETTI *et al.*, 1994; GRACIOLI, 1998; JASSIM *et al.*, 2000; ABDALLA *et al.*, 2001; SCHULZ *et al.*, 2002).

O efeito do hormônio juvenil foi estudado em duas glândulas, anatomicamente relacionadas ao aparelho de ferrão, a glândula de Dufour e a de Koschewnikow (ABDALLA *et al.* 2001). Em seus estudos, desenvolvidos com

aplicação tópica de hormônio juvenil, diluído em acetona, em larvas de operárias pré-defecantes e em recém-emergidas de *Apis mellifera*, ambas as glândulas apresentaram-se sensíveis à aplicação tópica do hormônio juvenil, porém, com respostas contrárias. O hormônio juvenil promoveu, na glândula de Koschewnikow, diminuição da área das células glandulares, e induziu maior desenvolvimento da glândula de Dufour, tornando-as semelhantes às encontradas em operárias poedeiras e rainhas. A glândula de Dufour tem funções mais ligadas à reprodução, realizada pela rainha, enquanto a de Koschewnikow produz um feromônio de alarme, uma substância necessária, portanto, às operárias principalmente quando elas desempenham tarefas fora da colônia, mesma fase da vida da operária em que a glândula de veneno tem papel importante.

3. MATERIAL E METODOS

3.1 Material

Foram estudados os discos imaginiais larvais e as glândulas de veneno e de Dufour de pupas e adultos de operárias e rainhas de *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae), segundo os métodos descritos abaixo. Os exemplares foram coletados no apiário do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - Campus de Rio Claro.

3.2 Métodos

Favos limpos foram introduzidos em colméias em plena atividade para que suas rainhas realizassem a postura e transferidos, 24 horas depois, para as respectivas áreas de criação, onde foram monitorados para obtenção das larvas, pupas e adultos de operárias com idades determinadas. As rainhas foram obtidas utilizando-se o método descrito por DOOLITTLE (1899), transferindo-se larvas com menos de 32 horas após a eclosão do ovo para cúpulas artificiais que foram devolvidas à colônia. Estas larvas continuaram a ser alimentadas pelas operárias e foram monitoradas para a obtenção das larvas, pupas e adultos de rainhas com idades determinadas. Todas as coletas foram realizadas durante o verão para evitarmos diferenças causadas pelas estações do ano.

3.2.1 Análises histológicas do desenvolvimento pós-embrionário das glândulas de veneno e de Dufour de operárias e rainhas africanizadas

Para o estudo foram utilizadas a parte posterior do corpo de larvas de 2º, 3º, 4º, 5º estágios e pré-pupa, os abdomens das pupas de olho branco, rosa, marrom e preto e de imagos recém-emergidos, tanto de operárias como de rainhas. O material foi fixado em paraformaldeído 4%, por 2 horas e, em seguida, transferido para tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,4, onde permaneceu até o início de seu processamento para inclusão em historesina. Neste momento, procedeu-se a desidratação em soluções de etanol com concentrações crescentes (70%, 80%, 90% e 95%), por uma hora em cada solução, seguida pela infiltração em historesina Leica, por 24 horas. Decorrido este período, o material foi transferido para moldes previamente preenchidos com historesina Leica,

misturada a 1ml do catalisador (Hardner), permanecendo em estufa a 37°, por 24 horas. Secções com aproximadamente 5µm de espessura foram obtidas, utilizando um histomicrotomo BIO-RAD JB-4 e navalhas de vidro. Os cortes foram transferidos para lâminas histológicas e corados com hematoxilina e eosina. O material foi examinado e fotografado em fotomicroscópio ZEISS para análises posteriores.

3.2.2 Análises histológicas de glândulas de veneno de operárias africanizadas tratadas com hormônio juvenil durante o 5º estágio larval

Larvas de 5º estágio, obtidas de acordo com o método descrito no item 3.2 foram divididas em três grupos experimentais por meio de marcação do próprio favo. Esta marcação consistiu no acoplamento de uma armação com as mesmas dimensões do favo, dividida em nove quadrados de 49cm² cada, designados, na horizontal como quadros A, B e C e na vertical com os números 1, 2 e 3, possibilitando a identificação de cada um deles. Antes da emergência, os quadros eram cobertos com tela, promovendo-se, dessa forma, o isolamento entre os grupos de operárias recém-emergidas.

O primeiro grupo de larvas recebeu, topicamente, 1µL de hormônio juvenil (JH-III Sigma), na concentração de 2µg/µL de hexano (grupo HJ). No segundo grupo, aplicou-se somente 1µL de hexano (grupo Hx) e o terceiro não recebeu nenhum tipo de tratamento (grupo C). Após a aplicação, o favo foi devolvido à colônia para coletas de pupas de olho marrom e preto e de operárias recém-emergidas. Para a coleta de operárias com 14 e 21 dias de idade, algumas foram marcadas no tórax com tinta atóxica. As glândulas de veneno foram retiradas, fixadas em paraformaldeído 4% e processadas para a obtenção de cortes histológicos conforme técnica descrita no item 3.2.1.

3.2.3 Análises histológicas de glândulas de veneno de operárias africanizadas tratadas com hormônio juvenil na emergência e de rainhas virgens e fecundadas

Operárias recém-emergidas foram divididas em três grupos experimentais,

por meio de marcação com tinta atóxica de cores diferentes, no tórax. O primeiro grupo recebeu a aplicação tópica de 1 μ L de hormônio juvenil (JH-III Sigma) diluído em hexano, na concentração de 2 μ g/ μ L (grupo HJ), o segundo recebeu 1 μ L de hexano puro (grupo Hx) e o terceiro sem nenhum tipo de tratamento, constituindo o grupo controle (grupo C). Após a marcação e tratamento, as abelhas foram devolvidas à colônia e coletadas aos 14, 21 e 35 dias de idade.

Além dos três grupos de operárias, foram formados dois grupos de rainhas. Após a emergência, um grupo de rainhas virgens foi coletado (grupo RV) e as do outro grupo foram introduzidas em núcleos diferentes, permitindo que seacasalasse livremente, constituindo, assim, o grupo de rainhas fecundadas (RF). Este grupo foi monitorado e as rainhas coletadas quando estavam realizando postura.

As glândulas de veneno de todos os indivíduos coletados foram retiradas, fixadas em paraformaldeído 4% e processadas conforme técnica histológica descrita no item 3.2.1.

3.2.4 Análise do comprimento das glândulas de veneno e de Dufour de três subespécies de *Apis mellifera* em relação à africanizada

Foram medidos os comprimentos totais das glândulas de veneno e de Dufour de operárias recém-emergidas, aos 15 e 30 dias de idade e de rainhas virgens e fecundadas de *Apis mellifera ligustica* (Spinola, 1806), *A. mellifera carnica* (Pollmann, 1879) e *A. mellifera caucasica* (Gorbachev, 1916), obtidas por inseminação artificial, bem como de abelhas conhecidas como africanizadas. Para tal, 20 indivíduos de cada grupo foram dissecados e as glândulas, isoladas, foram estendidas sobre lâminas de vidro, contendo solução salina para insetos (NaCl – 9g, KCl – 0,2g, CaCl₂ – 0,2g, NaHCO₃ – 0,2g, H₂O - qsp 1.000 mL). As observações foram realizadas em estereomicroscópio Zeiss, sob aumento de 20x e com o auxílio de uma ocular graduada acoplada, na qual cada conjunto de 100 divisões equivalem a 5mm. Cada glândula foi medida duas vezes consecutivas, obtendo-se uma média final em mm. Os resultados foram analisados estatisticamente através de análise de variância, com aplicação do teste *t* de Student (BEIGUELMAN, 2002). Após as medições, cinco glândulas de veneno de

cada grupo foram colocadas em tubos tipo Eppendorf para posterior realização de dosagens protéicas e eletroforese em gel de poliacrilamida.

3.2.5 Dosagem de proteínas das glândulas de veneno de três subespécies de *Apis mellifera* em relação à africanizada

Os tubos contendo as glândulas de veneno das três subespécies de *Apis mellifera* e da abelha africanizada, receberam 50 μ L de água bidestilada e deionizada e as glândulas foram maceradas por 1 minuto, com o auxílio de um bastão de vidro. Após a maceração, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 10.000g e o sobrenadante, representando os extratos glandulares, foram transferidos para novos tubos para realização da dosagem.

A dosagem de proteínas foi feita de acordo com o método descrito por BRADFORD (1976) modificado, usando a albumina bovina como padrão. Em cubetas de quartzo foram colocados 0,75mL de água destilada deionizada, dos quais foram retirados e descartados 5 μ L. Estes foram substituídos pelo mesmo volume de cada uma das amostras, adicionando-se, também, 0,75 mL do corante Comassie Blue G. A cubeta que representou o branco da reação recebeu apenas água destilada e deionizada e o corante. Todas as amostras foram analisadas em duplicata, em espectrofotômetro (Ultrospec 3000 – Pharmacia / Biotech), sob o comprimento de onda de 595nm. As médias das absorbâncias obtidas das leituras em duplicata foram utilizadas para o cálculo das concentrações protéicas finais de cada grupo.

3.2.6 Padrão eletroforético protéico das glândulas de veneno de três subespécies de *Apis mellifera* em relação à africanizada

Conhecidas as concentrações protéicas de cada amostra, foram realizadas eletroforeses em gel de poliacrilamida polimerizada em gradiente de 5% a 20% em condições denaturantes (SDS-PAGE), segundo HAMES & RICKWOOD (1990). As amostras, com quantidade total de proteínas de 60 μ g, utilizadas para corrida do gel foram preparadas em tampão de amostra. Antes de serem aplicadas ao gel, as amostras foram fervidas por 5 minutos e, em seguida,

centrifugadas também por 5 minutos a 10.000g. Cada raia de corrida recebeu 20µL da amostra. Para que as bandas resultantes pudessem ser identificadas foram usados marcadores de pesos moleculares conhecidos (SDS Molecular Weights Markers - Sigma). A corrida foi realizada em temperatura ambiente, em cuba BIO-RAD com tampão TRIS-base 0,025M, sob corrente constante de 87v por, aproximadamente, 2 horas. Após o término da corrida, os géis foram corados com Comassie Blue para evidenciação das bandas e, em seguida, descorados em uma solução de ácido acético, metanol e água na seguinte proporção 1:3:6. Posteriormente, os géis foram digitalizados para análise de bandas e cálculos para determinar a mobilidade relativa das proteínas e seus pesos moleculares.

4. RESULTADOS

4.1 Análises histológicas do desenvolvimento pós-embriônico das glândulas de veneno e de Dufour de operárias e rainhas africanizadas

As análises histológicas mostram que não existem diferenças quanto ao desenvolvimento pós-embriônico das glândulas de veneno e de Dufour entre rainhas e operárias. Ambas apresentam o mesmo número de fases desenvolvimentais que apenas são, nas rainhas, mais aceleradas. Os resultados aqui apresentados são referentes às operárias por sua facilidade de obtenção e, conseqüentemente, de repetição.

Histologicamente foram detectados três pares de discos imaginais, distribuídos no 7º, 8º e 9º segmentos abdominais, já no segundo estágio larval de *Apis mellifera*. O par presente no 7º segmento não será tratado neste estudo por não estar envolvido na formação das glândulas de veneno e de Dufour, mas sim à formação da parte final do aparelho reprodutor. São os pares de discos presentes no 8º e 9º segmentos que dão origem ao aparelho do ferrão e suas glândulas anexas.

No início do desenvolvimento larval os discos imaginais aparecem como espessamentos da epiderme, que apresentam células muito altas e finas (Figs. 1A, 1B). Durante a fase larval, eles são vistos como espessamentos do tegumento, representados por uma massa de células, sem limites visíveis, que aumenta por divisões celulares. Aparentemente, sobre os discos, acumulam-se células de outro tipo, em geral alongadas, provavelmente de origem mesodérmica, mas ainda indiferenciadas (Fig. 1C). Há indicação, também, de que durante todo o desenvolvimento larval, cada disco permanece associado a um ramo traqueal (Figs. 1A, 1B).

Embora os discos imaginais tenham sido visualizados desde o 2º estágio larval é a partir do último, quando se inicia a morfogênese, que os mesmos passam por inúmeras transformações, originando os diversos órgãos e apêndices para os quais estavam determinados desde a embriogênese. O grande aumento do número de células contidas num mesmo espaço faz com que, a partir do 5º estágio, os discos se invaginem para o interior do abdômen, pois, devido à rigidez da cutícula do exo-esqueleto (Fig. 1B), encontram resistência para se projetarem em direção ao exterior.

No final do 5º estágio, surgem duas invaginações (Fig. 2) associadas à porção mais interna do par presente no 9º segmento, que se dividiu ao meio (Fig. 3A), através de um sulco mediano. Além das glândulas de veneno e de Dufour que se originam dessas invaginações, o disco do 9º segmento origina, também, os palpos do ferrão e a bainha (Fig. 3B). A formação das lancetas do ferrão está ligada ao par presente no 8º segmento (Figs. 3A, 3B), o qual, juntamente com o 9º, retraem-se sob o 7º (Figs. 3C, 3D) durante a metamorfose. Essa retração permite o correto posicionamento das partes do ferrão e de suas glândulas anexas, ficando a abertura da glândula de veneno no ferrão e a de Dufour no canal da vagina.

Quando a metamorfose termina, a glândula de veneno e de Dufour encontram-se formadas (Fig. 4) e, a partir daí, ocorre um aumento de tamanho do conjunto, além da pigmentação e endurecimento do mesmo. Assim, no estágio de pupa de olho branco, a glândula de Dufour apresenta morfologia externa semelhante à encontrada no adulto, sob a forma de uma estrutura tubular, localizada mais ventralmente em relação à glândula de veneno. Histologicamente, apresenta-se como uma massa de células com núcleos esféricos (Fig. 5A). Este aspecto permanece inalterado até o estágio de pupa de olho preto, no qual a glândula exibe um epitélio simples com células cúbicas e formando inúmeras dobras. O epitélio é revestido por cutícula, que delimita uma estreita luz (Fig. 5B). A glândula preserva estes aspectos no adulto recém-emergido, embora exibindo células maiores (Fig. 5C).

A glândula de veneno pode ser reconhecida por sua morfologia externa característica, já no estágio de pupa de olho branco, podendo-se identificar o reservatório e o filamento secretor, que pode ou não apresentar a extremidade bifurcada. Histologicamente, no início da pupação, ou seja, na fase de pupa de olho branco, o filamento secretor é constituído por células semelhantes, cúbicas e com núcleos grandes, formando um epitélio revestido por uma espessa camada de cutícula (Fig. 6A). No estágio de pupa de olho marrom não há, praticamente, mudanças histológicas (Fig. 6B), mas na fase de pupa de olho preto pode-se distinguir, claramente, um outro tipo celular no filamento secretor, provavelmente, células formadoras dos canalículos. Uma cutícula espessa e organizada reveste a luz já individualizada. As células secretoras de veneno são altas e seus núcleos

deslocados para a região basal do epitélio, enquanto os núcleos das células formadoras dos canalículos encontram-se próximas à luz (Fig. 6C). Quando a abelha emerge, o epitélio secretor está bem diferenciado e alto, com núcleos grandes e cromatina dispersa em seu interior, indicando grande atividade. As células formadoras dos canalículos não apresentam nenhuma alteração em relação à fase anterior. A cutícula reveste toda a luz da porção secretora e é possível identificar os canalículos coletores (Fig. 6D).

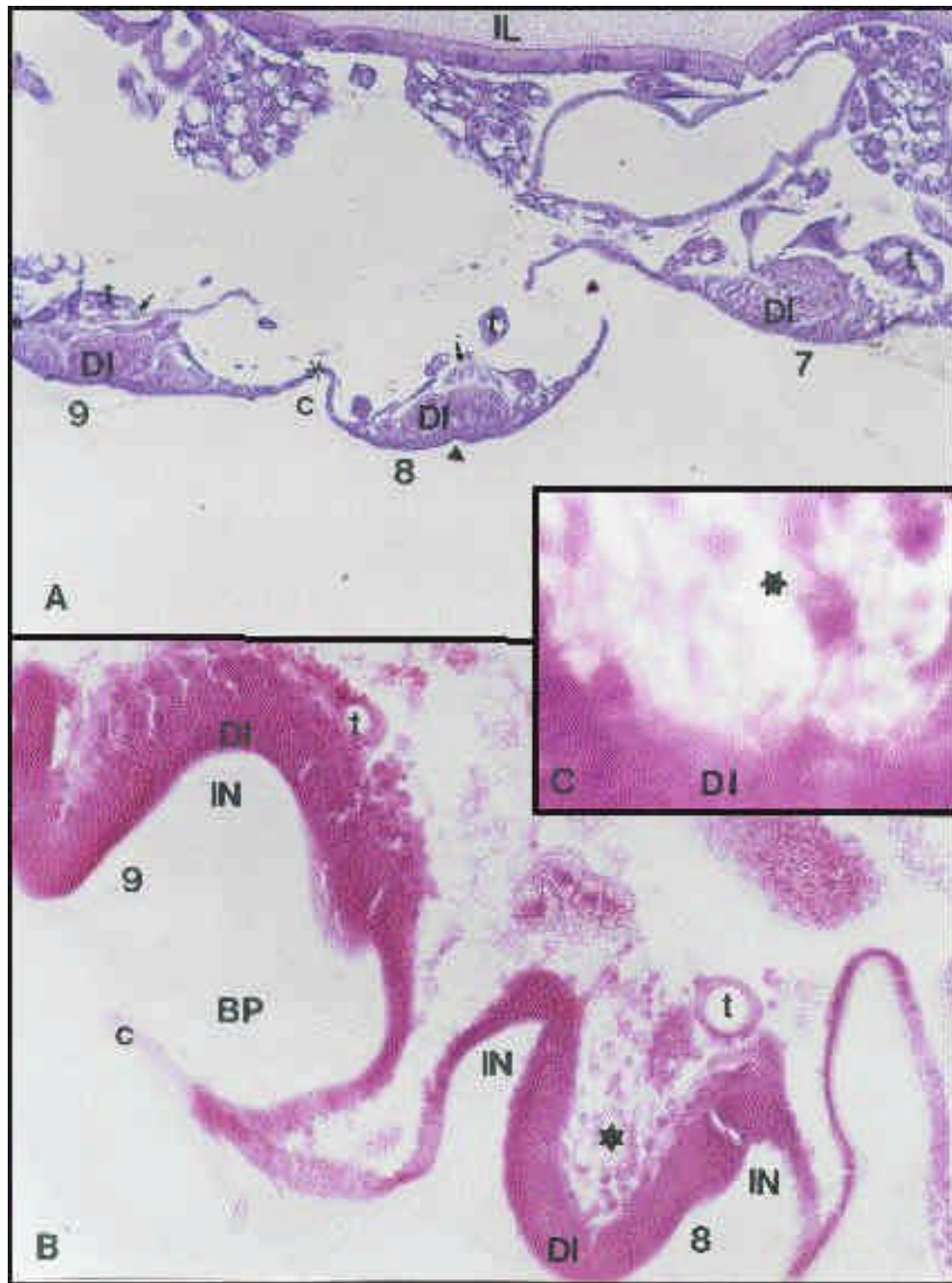


Figura 1: Corte longitudinal da parte posterior do abdômen. **A** – 2º estágio larval, mostrando as células altas e finas que formam os discos e o ramo traqueal associado a cada um deles (200x). **B** – 5º estágio larval, onde pode-se visualizar os ramos traqueais associados aos discos e a cutícula larval (200x). **C** – Detalhe das células mesodérmicas que se acumulam sobre os discos imaginiais da larva de 5º estágio (1250x). HE

DI = Disco Imaginal

BP = Bolsa Peripodial

IL = Intestino Larval

c = cutícula larval

t = traquéia

7, 8 e 9 = segmentos abdominais

★ = células mesodérmicas

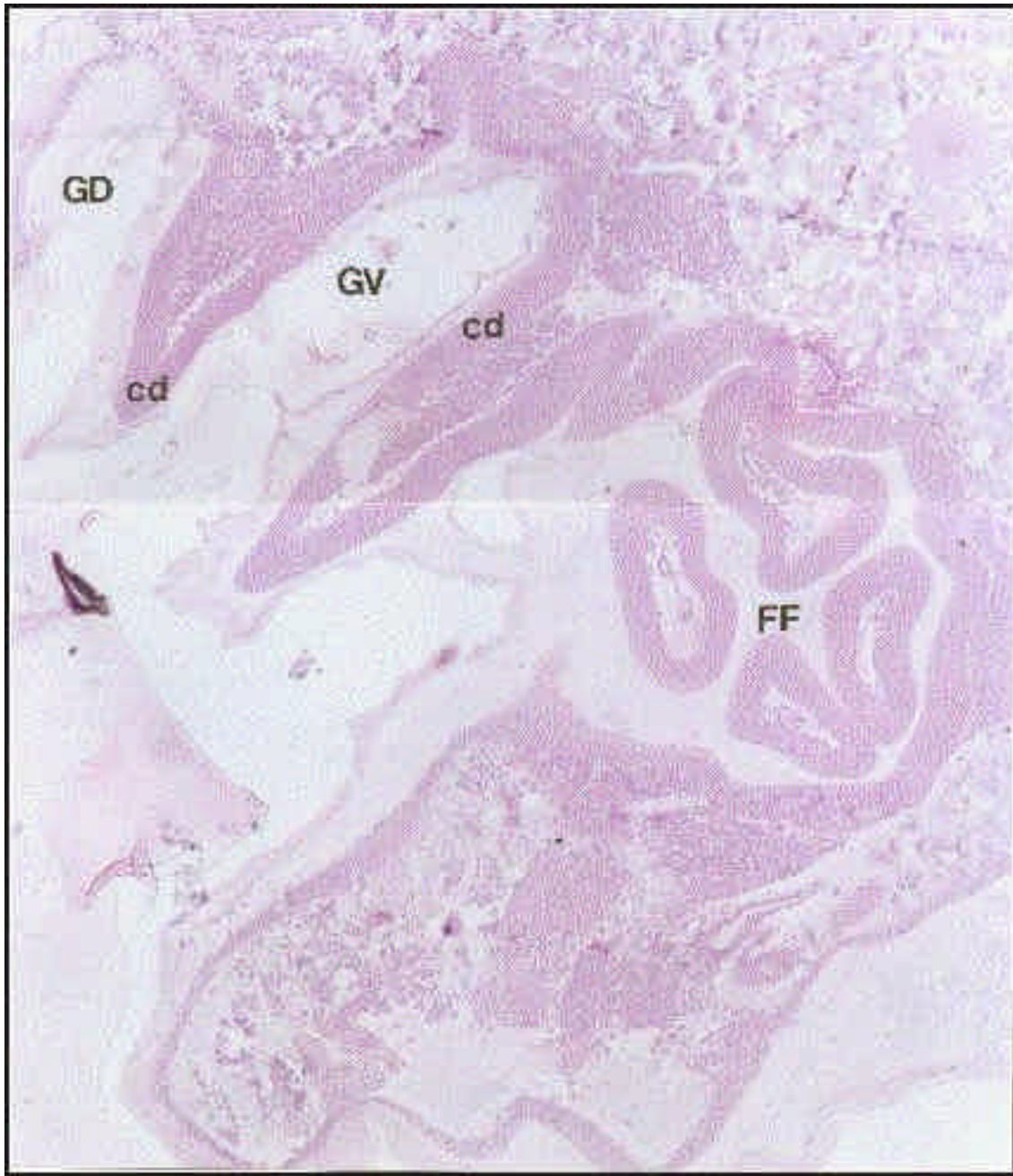


Figura 2: Corte longitudinal de larva no final do 5º estágio, mostrando as duas invaginações que surgem associadas ao par de discos imaginais localizados no 9º segmento abdominal, que também originará a bainha e os palpos do ferrão (80x). HE

GD = Glândula de Dufour

GV = Glândula de veneno

FF = Partes do aparato de ferrão em formação

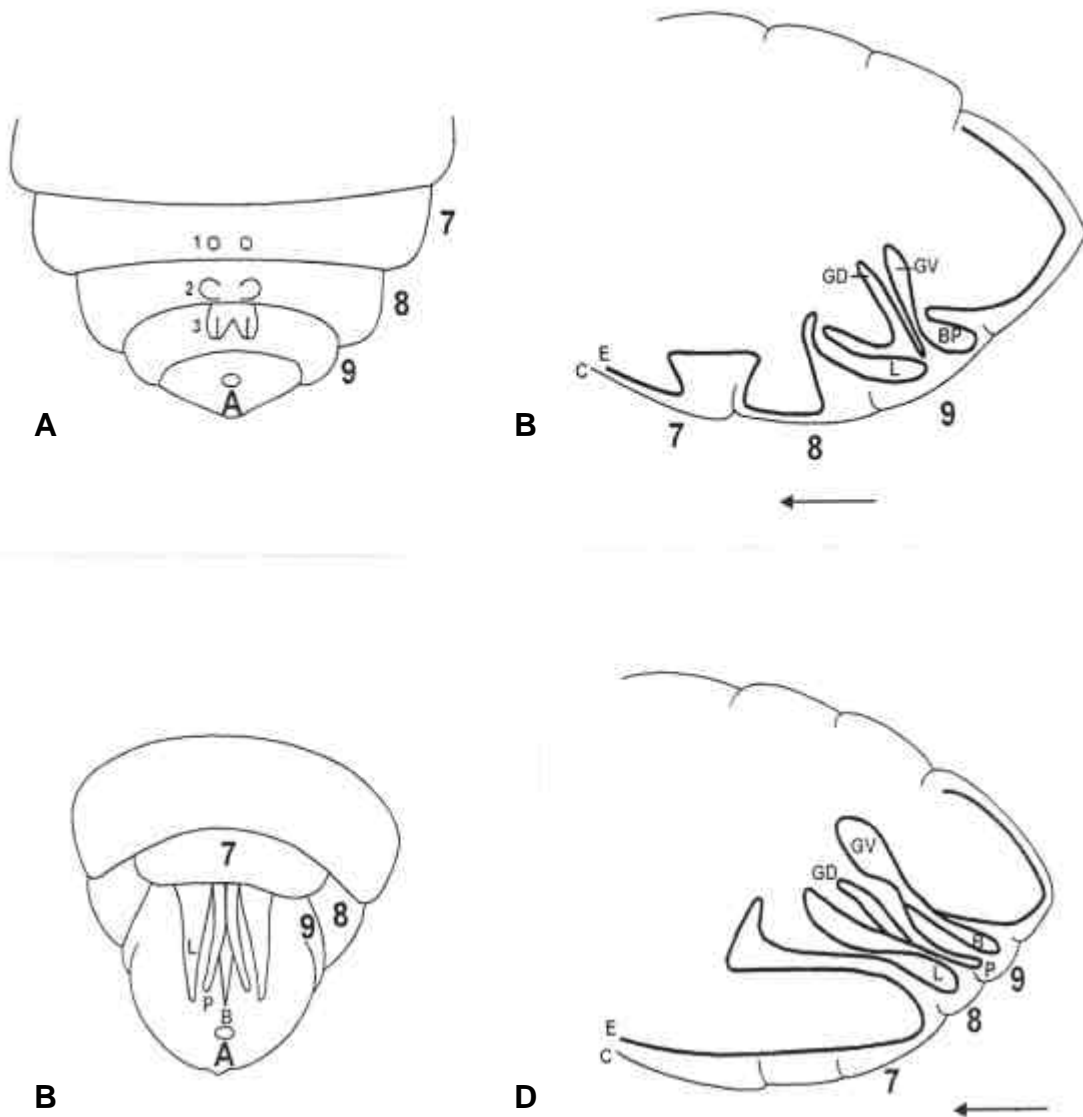


Figura 3 Representação esquemática do desenvolvimento pós-embriônico dos discos imaginiais genitais de *Apis mellifera*. A – Vista ventral da parte posterior do abdômen de larva de 2º estágio, mostrando os três pares de discos imaginiais visualizados (1, 2 e 3), localizados no 7º, 8º e 9º segmentos abdominais. B – Vista ventral da parte posterior do abdômen de larva no final do estágio de pré-pupa, mostrando as partes externas do ferrão que se formam a partir dos discos imaginiais. C – Corte longitudinal da parte posterior do abdômen de larva no início do estágio de pré-pupa, mostrando as invaginações que ocorrem nos discos imaginiais genitais para a formação da glândula de veneno e de Dufour e das partes do ferrão. D – Corte longitudinal da parte posterior do abdômen de larva no final do estágio de pré-pupa, mostrando as invaginações que ocorrem nos discos imaginiais genitais para a formação da glândula de veneno e de Dufour e das partes do ferrão. A = Ânus. B = Bainha. C = Cutícula. E = Epiderme larval. GD = Glândula de Dufour. GV = Glândula de veneno. L = Lanceta. P = Palpos do ferrão. 1, 2 e 3 = pares de discos imaginiais genitais. 7, 8 e 9 = Segmentos abdominais. Seta = Indica o sentido da retração do 8º e 9º segmentos sob o 7º. (Modificado de DADE, 1992)

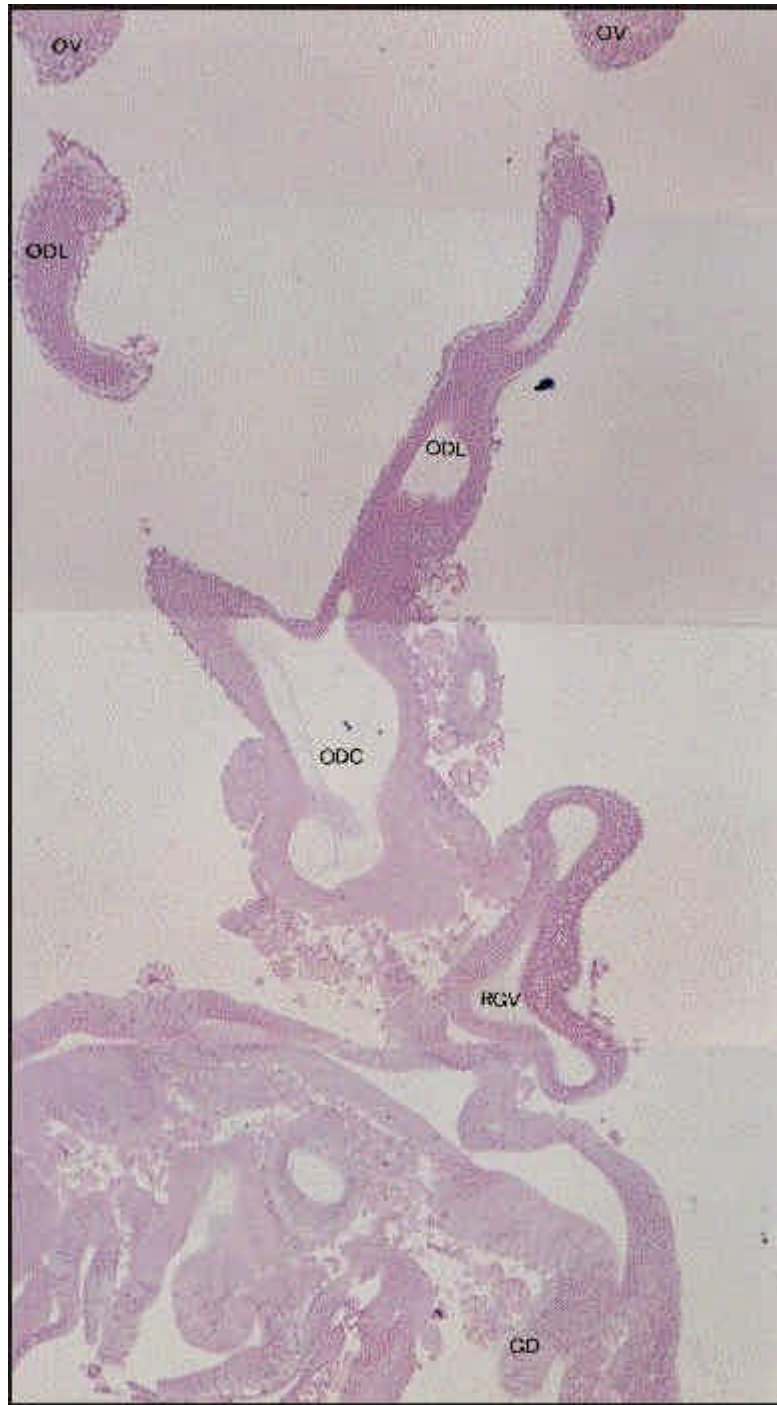


Figura 4 Cortes sagital da parte posterior do abdômen de pupa de olho branco mostrando as glândulas anexas e o aparelho reprodutor já formados (80x). HE

GD = Glândula de Dufour

RGV = Reservatório da glândula de veneno

ODC = Oviduto comum

ODL = Oviduto lateral

OV = Ovariolo

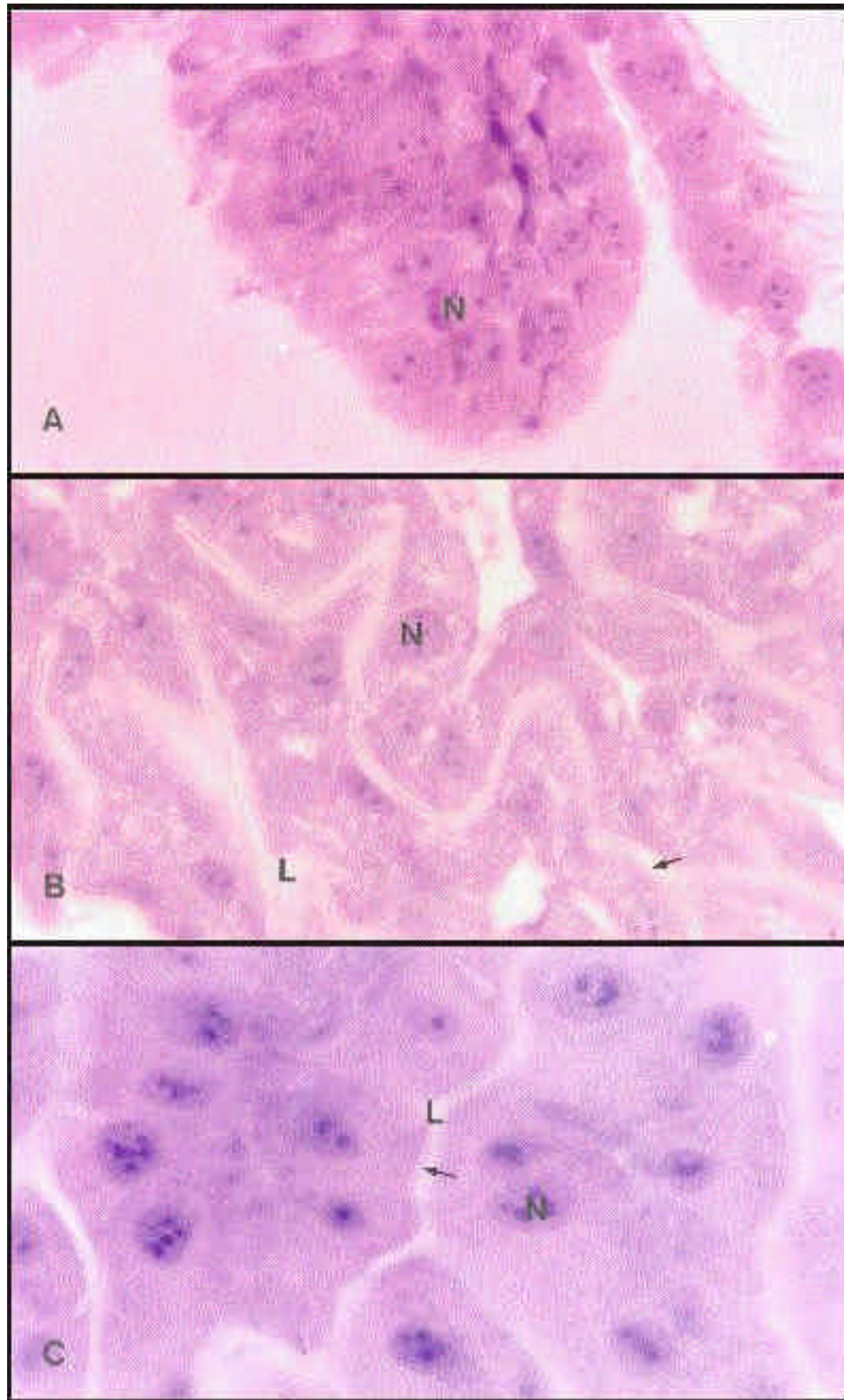


Figura 5: Cortes da glândula de Dufour. **A** – Corte longitudinal da glândula de Dufour de pupa de olho branco (1250x). **B** – Corte transversal da glândula de Dufour de pupa de olho preto (1250x). **C** – Corte transversal da glândula de Dufour de operária recém-emergida (1250x). HE

L = Luz

N = Núcleo

→ = cutícula

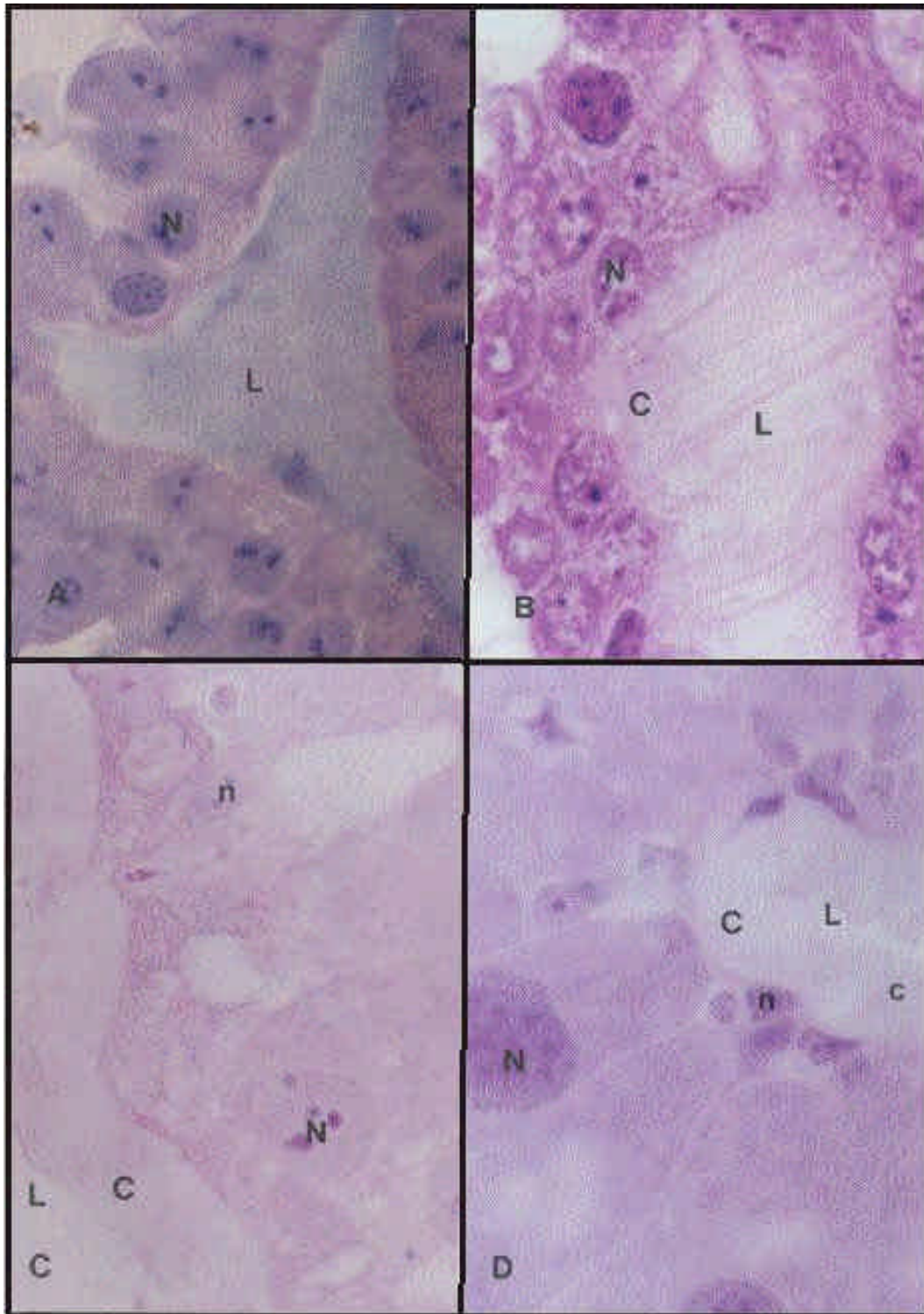


Figura 6: Cortes da glândula de veneno. **A** – Corte longitudinal da glândula de veneno de pupa de olho branco (1250x). **B** – Corte longitudinal da glândula de veneno de pupa de olho marrom (1250x). **C** – Corte transversal da glândula de veneno de pupa de olho preto (1250x). **D** – Corte transversal da glândula de veneno de operária recém-emergida (1250x). HE

C = Cutícula

L = Luz

N = Núcleo

c = canalículo

n = núcleo da célula secretora de canalículo

4.2 Análises histológicas de glândulas de veneno de operárias africanizadas tratadas com hormônio juvenil durante o 5º estágio larval

A aplicação de hormônio juvenil diluído em hexano e de hexano puro em larvas de 5º estágio, sob aspectos histológicos, promove alterações no ciclo secretor glandular das glândulas de veneno em todas as fases analisadas. No estágio de pupa de olho marrom, as células secretoras da glândula de veneno do grupo C (Fig. 7A) apresentam-se cúbicas, com núcleos esféricos, contendo numerosos nucléolos e cromatina dispersa. Estas células formam um epitélio simples, que aparece revestido por uma espessa cutícula (Fig. 7A). Nos grupos Hx (Fig. 7B) e HJ (Fig. 7C) as células passam de cúbicas a cilíndricas e o núcleo apresenta-se mais deslocado para a região basal da célula. As células formam um epitélio simples e bem organizado tanto nas glândulas tratadas com hormônio juvenil (Fig. 7C), como naquelas tratadas pelo hexano (Fig. 7B), não sendo possível a visualização da cutícula. Nestes grupos, tanto o citoplasma quanto o núcleo das células exibem menor afinidade pelo corante do que os do grupo C. Os epitélios glandulares de indivíduos dos grupos Hx (Fig. 7B) e HJ (fig. 7C) apresentam-se mais altos do que nos indivíduos do grupo C (Fig. 7A).

Em pupas de olho preto são mantidas as diferenças entre as células secretoras dos grupos C (Fig. 8A) e aquelas dos grupos Hx (Fig. 8B) e HJ (Fig. 8C), com relação à forma e tamanho, embora em todos os três casos, as células glandulares mostrem-se maiores do que aquelas de pupas de olho marrom. Até a fase de pupa de olho preto não se distingue as células formadoras dos canalículos, porém nessa fase é possível observar, claramente, a camada cuticular que reveste a glândula de veneno, internamente, ao contrário do que acontece na pupa de olho marrom. O epitélio de glândulas do grupo controle permanece, ainda, mais baixo do que nos grupos tratados.

Quando a operária emerge a glândula de veneno já se encontra totalmente diferenciada. Os três grupos apresentam um epitélio secretor bastante desenvolvido, com núcleos grandes e basais, sendo possível visualizar um grande número de núcleos pertencentes às células formadoras dos canalículos (Figs. 9A, 9B, 9C). Tanto no grupo C (Fig. 9D) quanto nos grupos tratados Hx (Fig. 9E) e HJ (Fig. 9F) uma área acidófila aparece, sempre próxima ao núcleo.

Em operárias com 14 dias de idade, as células secretoras da glândula de veneno aumentam muito em altura e exibem um citoplasma granular, onde as áreas acidófilas, descritas anteriormente, são visualizadas nas células glandulares do grupo C (Fig. 10A) e do grupo tratado com hexano (Fig. 10B), ambas contendo material basófilo. Nas células de glândulas provenientes de operárias tratadas com hormônio juvenil, o citoplasma apresenta-se livre dessas áreas. Todos os núcleos exibem cromatina dispersa e uma posição ainda mais basal do que na fase anterior (Figs. 10A, B e C). Tanto nas recém-emergidas, quanto aos 14 dias de idade, os epitélios das glândulas dos grupos Hx (Fig. 10B) e HJ (Fig.10C) mostram-se mais altos do que aqueles de glândulas do grupo controle.

Quando as abelhas estudadas atingem 21 dias, as células do epitélio secretor do grupo C apresentam um aspecto, ainda, normal (Fig. 11A), mas nos grupos Hx (Fig. 11B) e HJ (Fig. 11C), as células glandulares mostram aspectos de degeneração, refletidos pela grande perda citoplasmática e pela presença de núcleos picnóticos, com forma e localização irregulares, mais evidente no grupo HJ. Além disso, nestes dois últimos grupos há variação na altura do epitélio, que passa a ser constituído por porções de células mais altas, alternando-se com outras de células mais baixas, evidenciadas mesmo numa mesma secção (Fig. 11C).

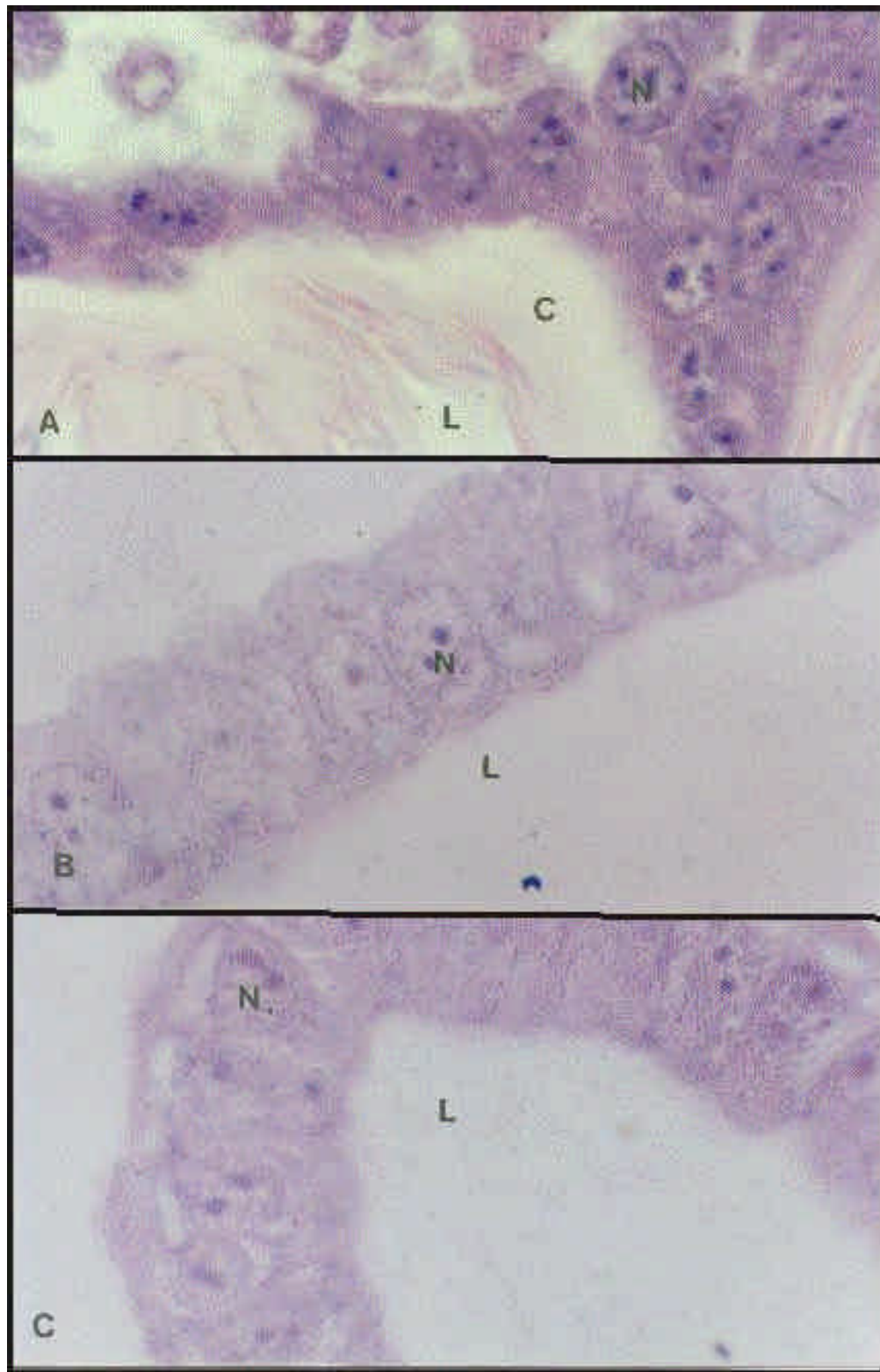


Figura 7. Cortes transversais da glândula de veneno de pupa de olho marrom (POM) de *Apis mellifera* tratadas com hormônio juvenil durante o 5º estágio. **A** – Grupo C (1250x). **B** – Grupo Hx (1250x). **C** – Grupo HJ (1250x). HE

C = Cutícula

L = luz

N = Núcleo

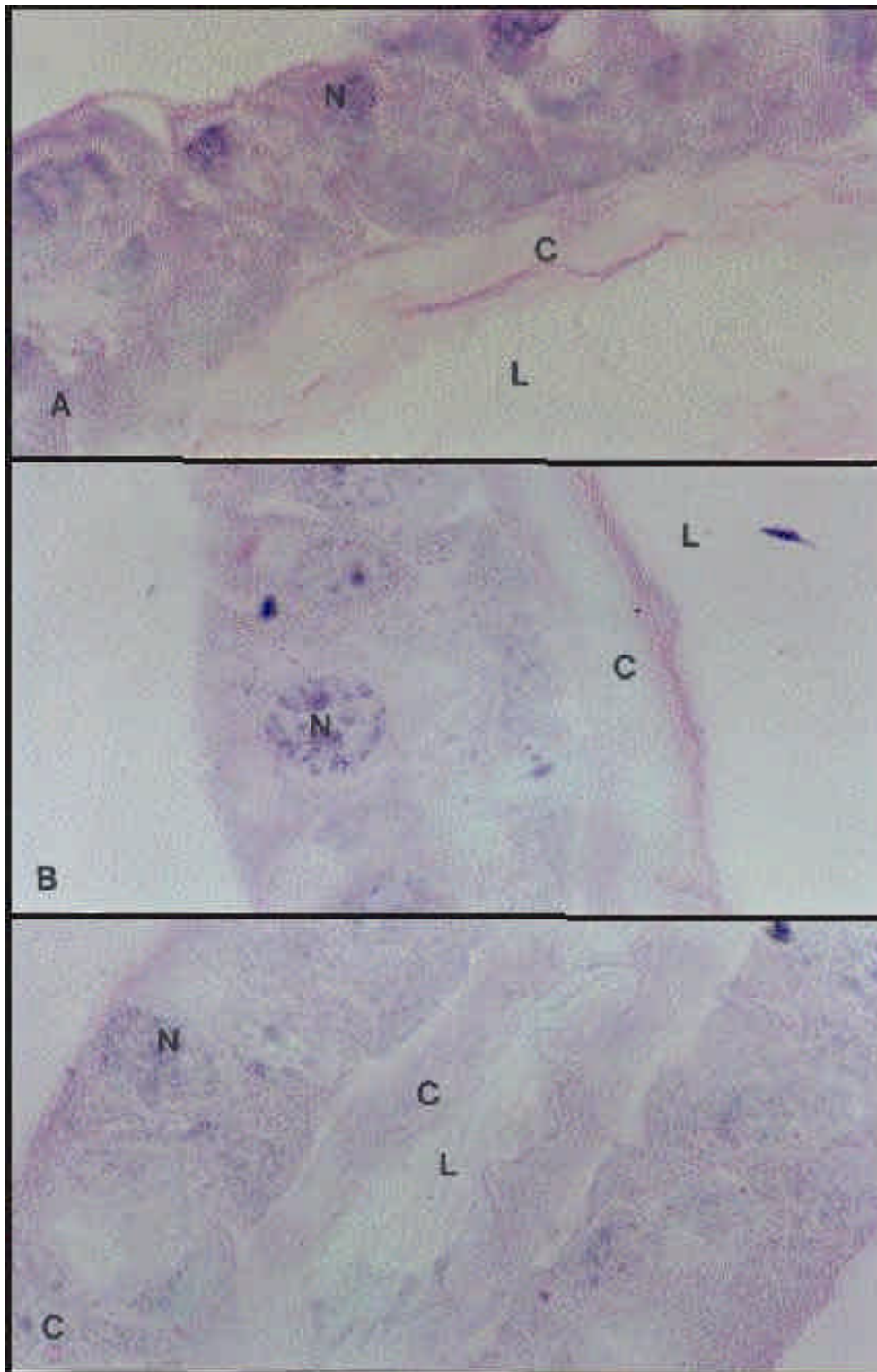


Figura 8: Cortes transversais da glândula de veneno de pupa de olho preto (POP) de *Apis mellifera* tratadas com hormônio juvenil durante o 5º estágio. **A** – Grupo C (1250x). **B** – Grupo Hx (1250x). **C** – Grupo HJ (1250x). HE

C = Cutícula

L = luz

N = Núcleo

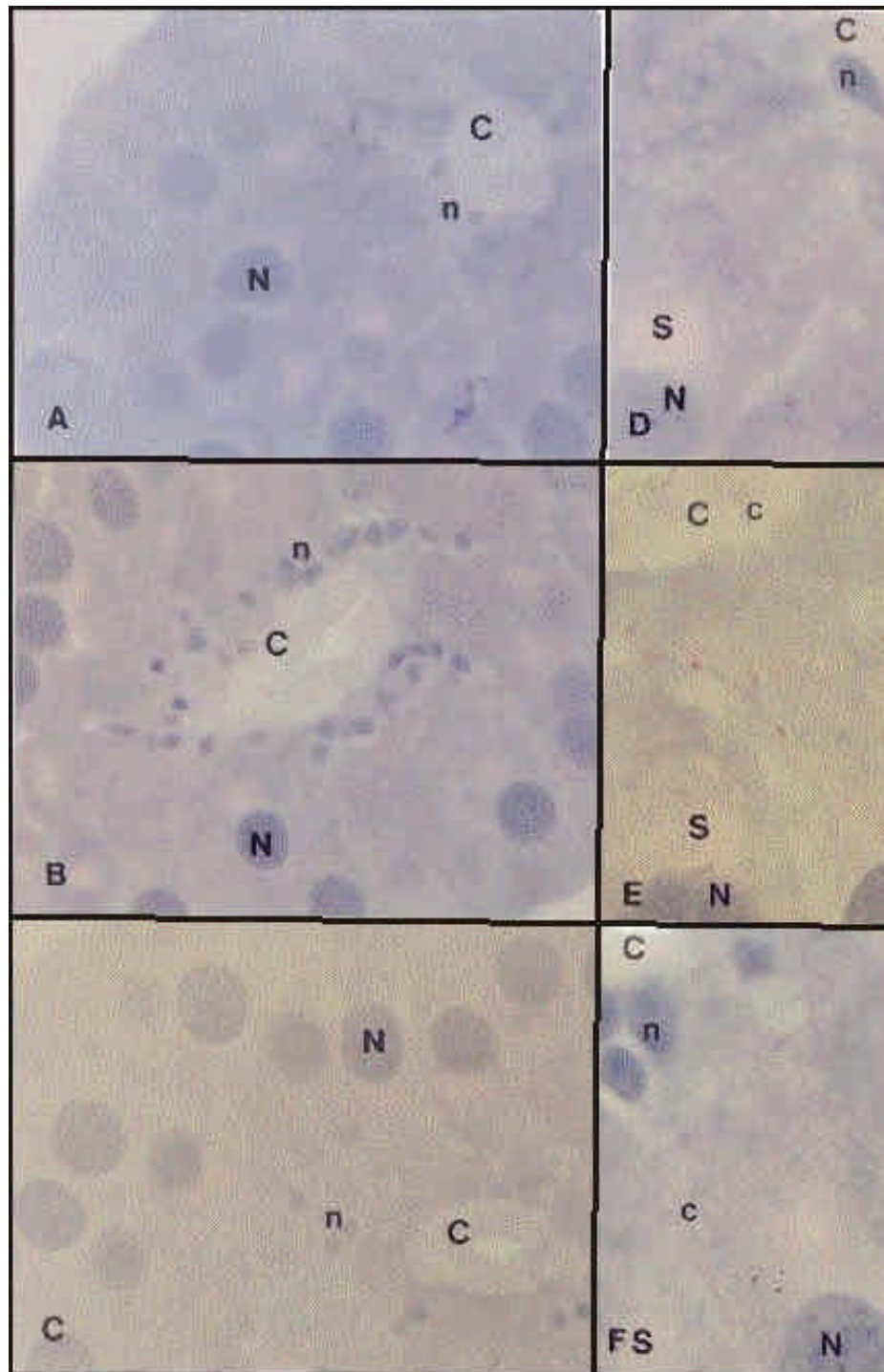


Figura 9 Cortes transversais da glândula de veneno de operárias de *Apis mellifera* recém-emergidas tratadas com hormônio juvenil durante o 5º estágio. **A** – Grupo C (500x). **B** – Grupo Hx (500x). **C** – Grupo HJ (500x). **D** – Grupo C (1250x). **E** – Grupo Hx (1250x). **F** – Grupo HJ (1250x). HE

C = Cutícula

L = Luz

N = Núcleo

S = Secreção

c = canalículo

n = núcleo da célula secretora de canalículo

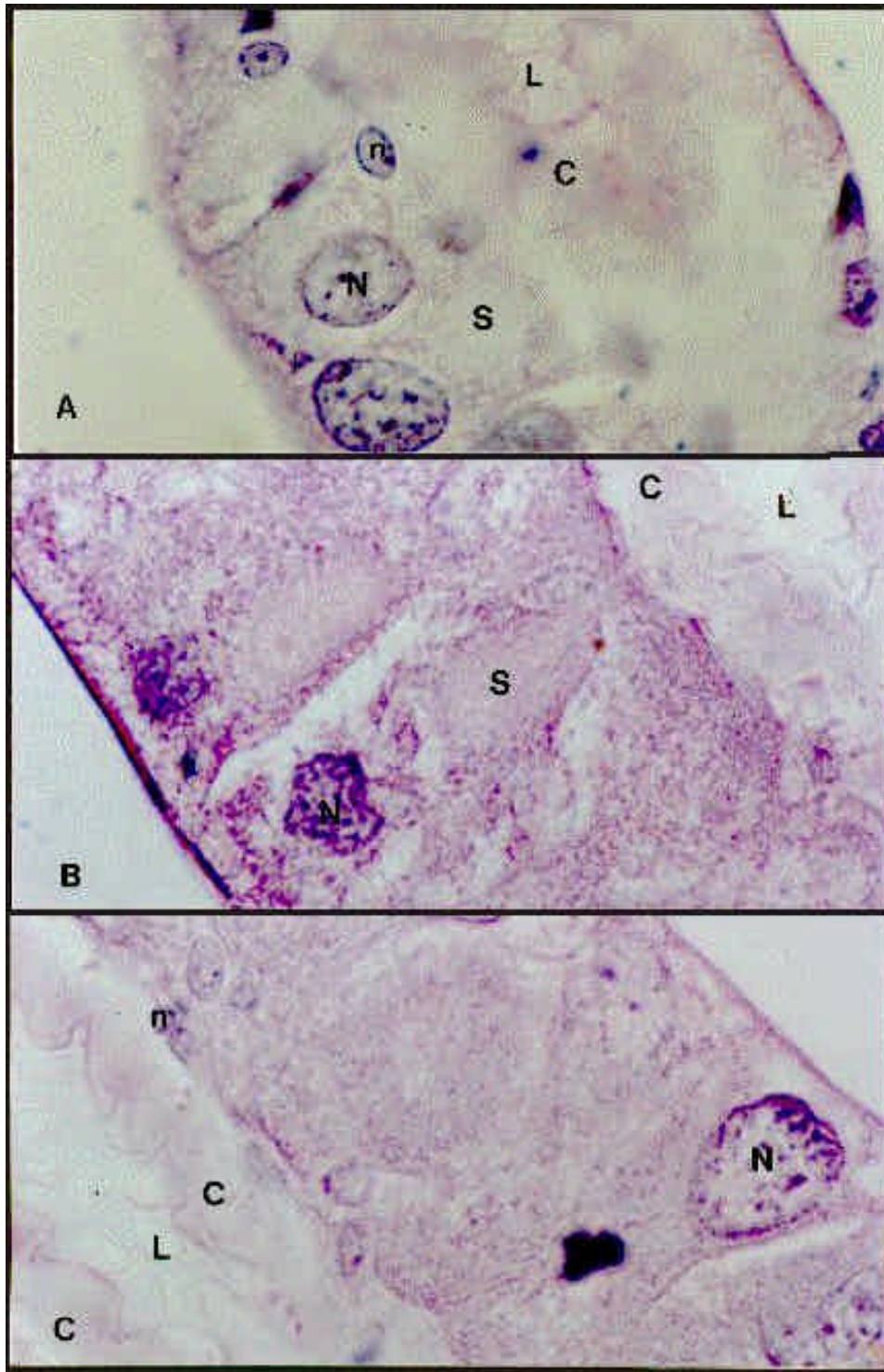


Figura 10: Cortes transversais da glândula de veneno de operárias de *Apis mellifera* aos 14 dias de idade, tratadas com hormônio juvenil durante o 5º estágio. **A** – Grupo C (1250x). **B** – Grupo Hx (1250x). **C** – Grupo HJ (1250x). HE

C = Cutícula

L = Luz

N = Núcleo

S = Secreção

n = núcleo da célula secretora de canáliculo

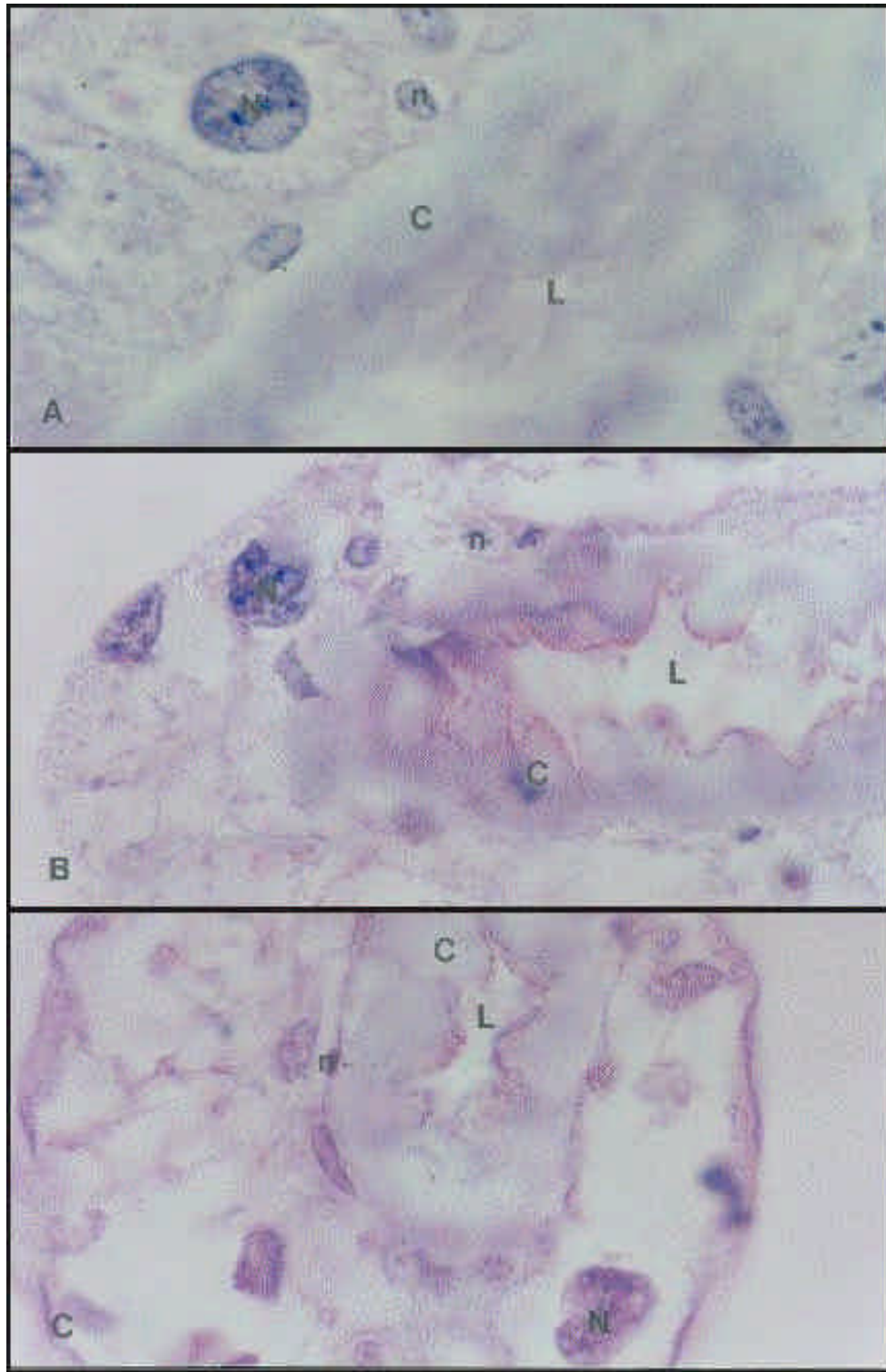


Figura 11: Cortes transversais da glândula de veneno de operárias de *Apis mellifera* aos 21 dias de idade, tratadas com hormônio juvenil durante o 5º estágio. **A** – Grupo C (1250x). **B** – Grupo Hx (1250x). **C** – Grupo HJ (1250x). HE

C = Cutícula

L = Luz

N = Núcleo

S = Secreção

n = núcleo da célula secretora de canalículo

4.3 Análises histológicas de glândulas de veneno de operárias africanizadas tratadas com hormônio juvenil na emergência

As glândulas de veneno de indivíduos tratados com hormônio juvenil diluído em hexano e com hexano puro no momento da emergência, apresentam diferenças histológicas entre si e com relação às daquelas dos indivíduos do grupo controle.

Aos 14 dias de idade, a glândula mostra, no grupo C (Figs. 12 A, 12D) um epitélio secretor constituído por células altas com citoplasma acidófilo, no qual aparecem áreas mais claras. Os núcleos são grandes, arredondados e ocupam posição basal na célula. As células formadoras de canaliculos são bem evidentes. A luz, onde já se observa secreção, está revestida pela cutícula (Fig. 12A). No citoplasma, canais coletores de secreção podem ser visualizados (Fig. 12D). De maneira geral, as características das células glandulares descritas em operárias do grupo C persistem nas glândulas de indivíduos tratados com Hx (Figs. 12B, 12E) e com HJ (Figs. 12C, 12F), sendo revelados nos dois grupos a presença de secreção na luz glandular. A diferença que pode ser apontada entre os grupos analisados refere-se ao conteúdo nuclear, que aparece morfologicamente homogêneo nas glândulas do grupo Hx (Figs. 12B, 12E) e granular nos outros dois, C (Figs. 12A, 12D) e HJ (Figs. 12C, 12F).

Aos 21 dias, o processo de degeneração glandular é evidente em todos os grupos, tanto no citoplasma, quanto nos núcleos (Fig. 13). Embora os núcleos adquiram forma irregular, eles se conservam grandes, com cromatina granular e nucléolos desenvolvidos no grupo C (Figs. 13A, 13D) e HJ (Figs. 13C, 13F). No grupo Hx (Fig. 13B, 13E), alguns dos núcleos, também com forma irregular, exibem seu conteúdo com aspecto homogêneo.

Aos 35 dias os indivíduos dos três grupos apresentam glândulas com grau de degeneração mais avançado. O grupo controle conserva núcleos irregulares com cromatina sob a forma de grumos, mas sem nucléolos evidentes (Fig. 14A). Já nas glândulas de indivíduos dos grupos Hx (Fig. 14B) e HJ (Fig. 14C) os núcleos são redondos, muito grandes, parecendo intumescidos, com material interno de aspecto homogêneo. No citoplasma das células glandulares de todos os grupos há regiões claras, representando, provavelmente, perda de substâncias

(Fig. 14). Praticamente, não são mais observadas as células formadoras de canáliculos e há perda dos limites entre as células glandulares.

A glândula de veneno de rainha virgem tem aspecto semelhante ao de operárias recém-emergidas, com epitélio de células altas com citoplasma uniforme, onde são vistas vesículas de secreção (Fig. 15A). Os núcleos são arredondados, grandes, com grumos cromatínicos (Fig. 15C). A luz glandular, revestida por cutícula, está cheia de secreção (Fig. 15B). Em rainhas fecundadas, a glândula aparece degenerada, com perda citoplasmática e dos limites celulares e núcleos irregulares (Fig. 15 D). Na luz glandular não se observa secreção e o epitélio apresenta-se mais baixo do que na rainha virgem (Fig. 15E). Pode-se observar regiões claras, com muitas microvilosidades, conhecidas como aparato terminal (Fig. 15D).

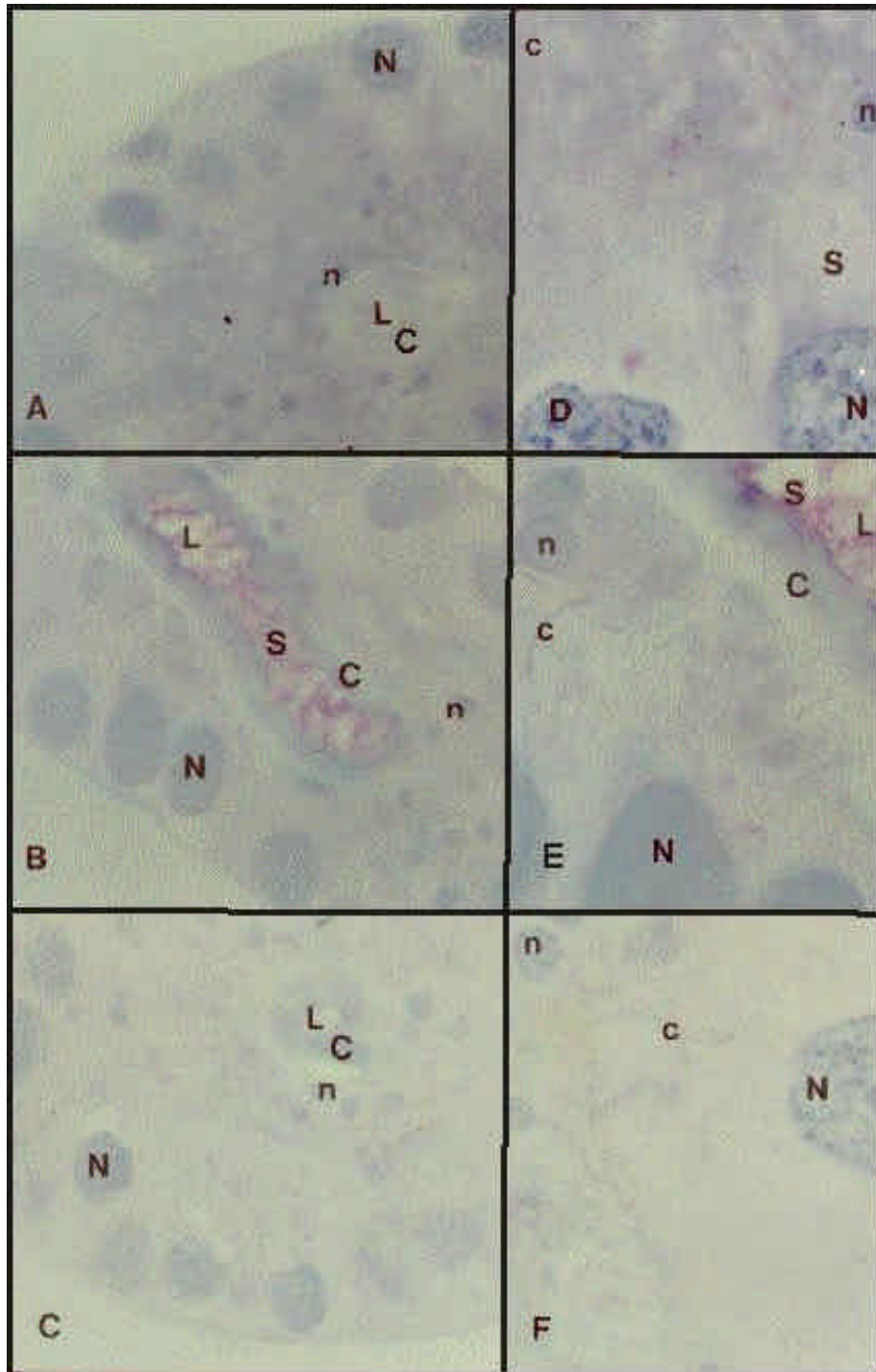


Figura 12: Cortes transversais da glândula de veneno de operárias de *Apis mellifera* aos 14 dias de idade, tratadas com hormônio juvenil quando emergiram. **A** – Grupo C (500x). **B** – Grupo Hx (500x). **C** – Grupo HJ (500x). **D** – Grupo C (1250x). **E** – Grupo Hx (1250x). **F** – Grupo HJ (1250x). HE

C = Cutícula

L = Luz

N = Núcleo

S = Secreção

c = canalículo

n = núcleo da célula secretora de canalículo

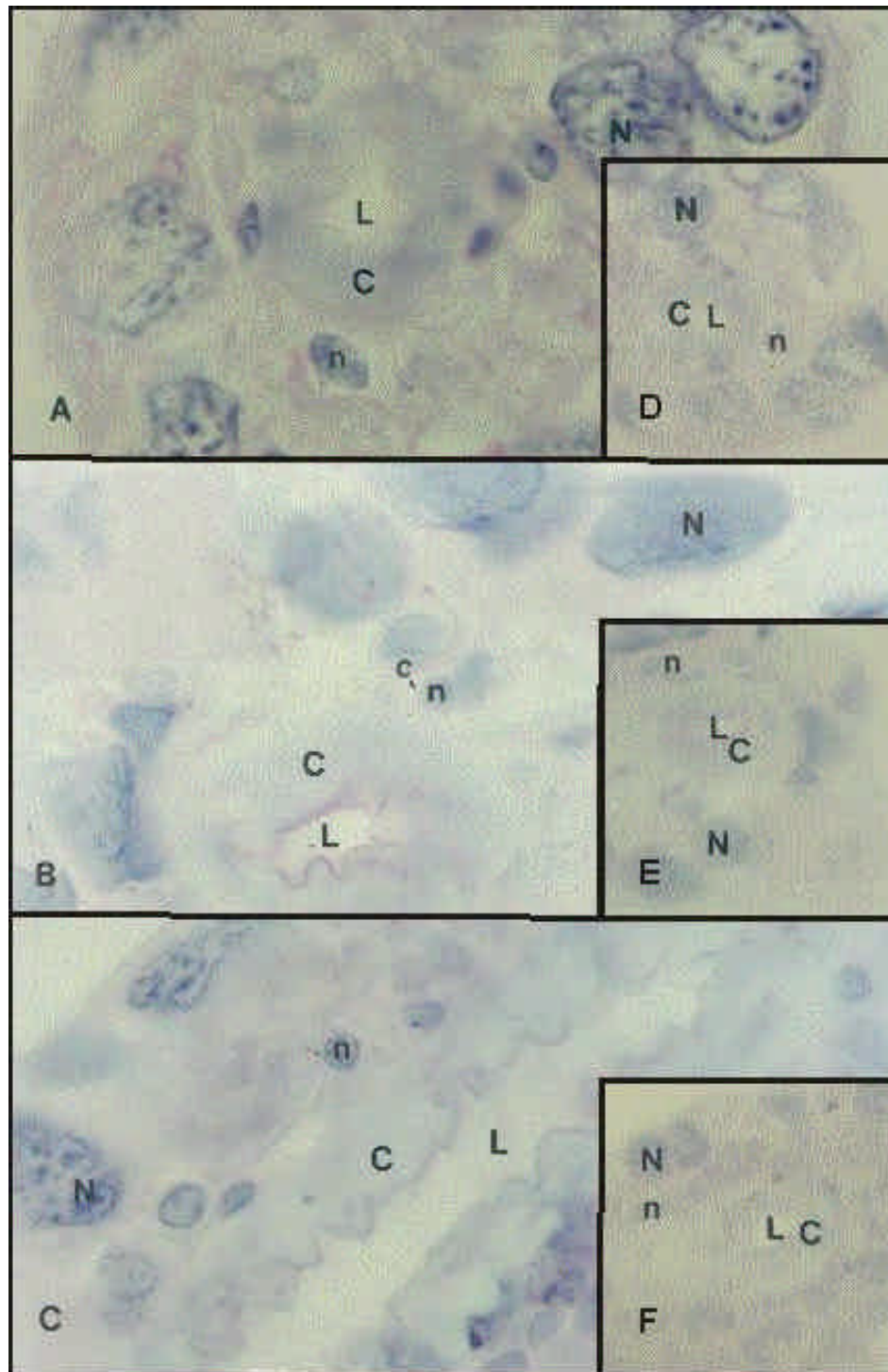


Figura 13: Cortes transversais da glândula de veneno de operárias de *Apis mellifera* aos 21 dias de idade, tratadas com hormônio juvenil quando emergiram. **A** – Grupo C (1250x). **B** – Grupo Hx (1250x). **C** – Grupo HJ (1250x). **D** – Grupo C (500x). **E** – Grupo Hx (500x). **F** – Grupo HJ (500x). HE

C = Cutícula

L = Luz

N = Núcleo

c = canalículo

n = núcleo da célula secretora de canalículo

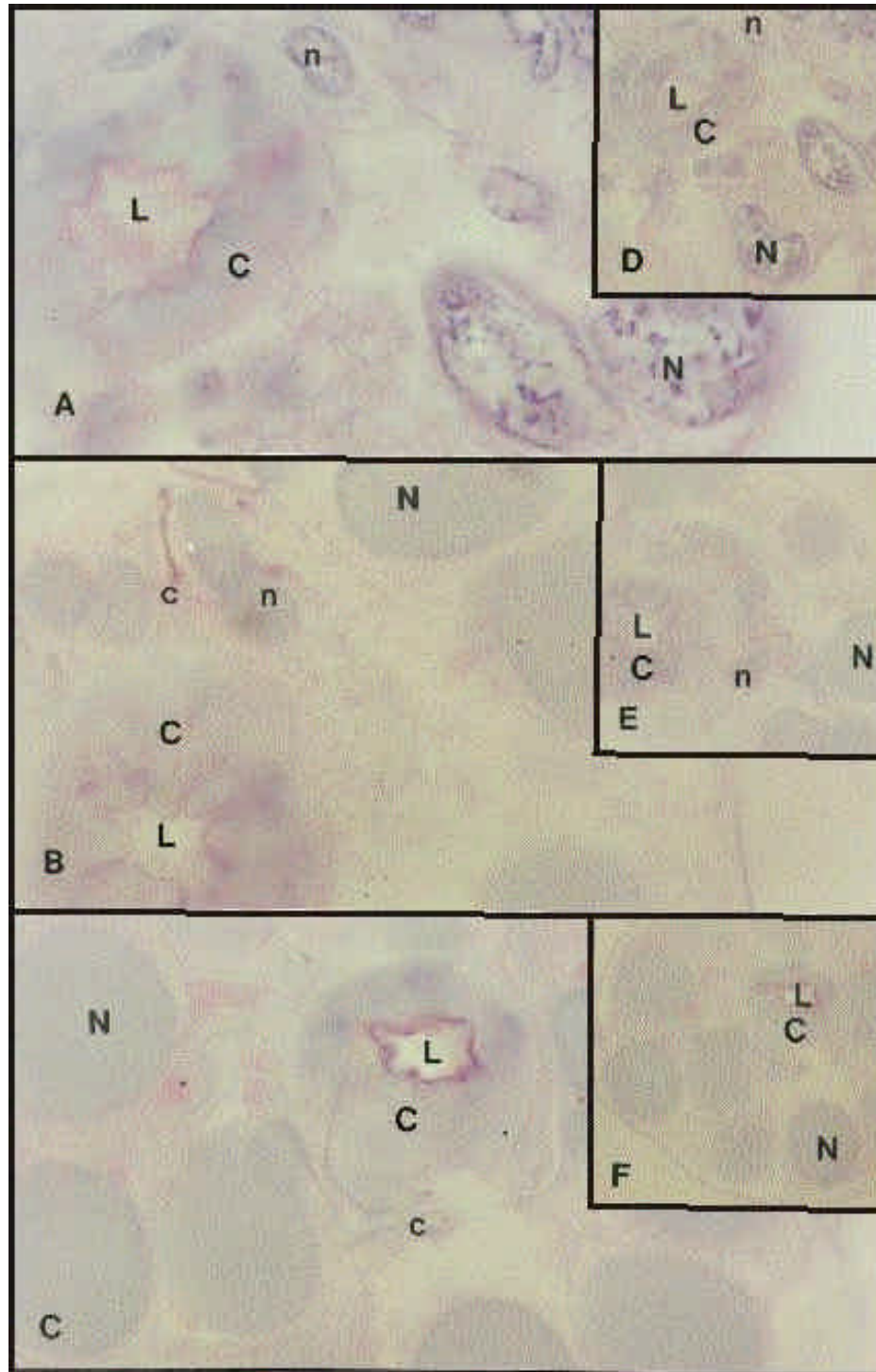


Figura 14 - Cortes transversais da glândula de veneno de operárias de *Apis mellifera* aos 35 dias de idade, tratadas com hormônio juvenil quando emergiram. **A** – Grupo C (1250x). **B** – Grupo Hx (1250x). **C** – Grupo HJ (1250x). **D** – Grupo C (500x). **E** – Grupo Hx (500x). **F** – Grupo HJ (500x). HE

C = Cutícula

L = Luz

N = Núcleo

c = canalículo

n = núcleo da célula secretora de canalículo

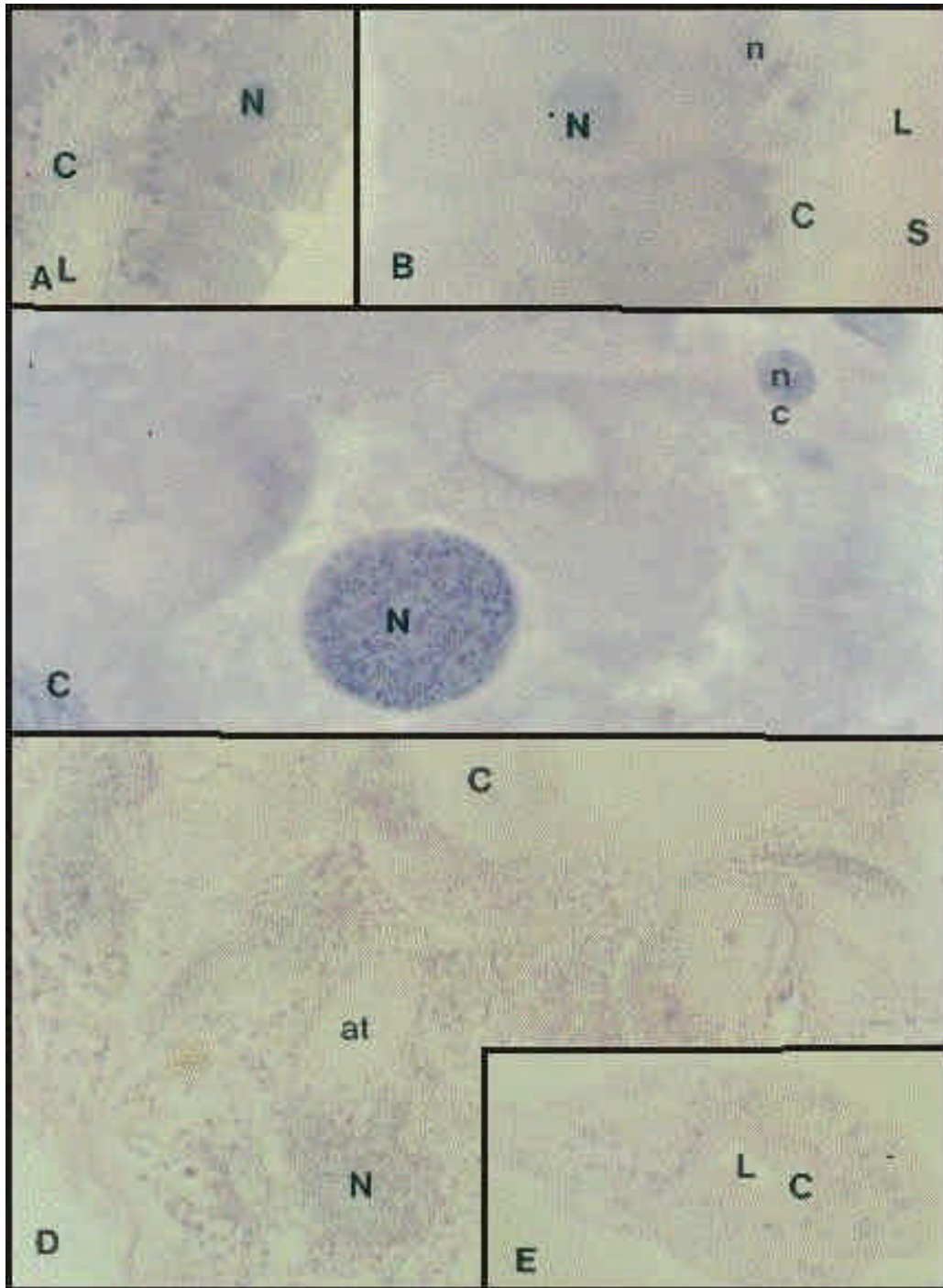


Figura 15 – Cortes transversais da glândula de veneno de rainhas de *Apis mellifera*. **A** – Rainha virgem (200x). **B**–Rainha virgem (500x). **C** – Rainha virgem (1250x). **D**– Rainha fecundada (1250x). **E**– Rainha fecundada (200x). HE

C = Cutícula

L = Luz

N = Núcleo

S = Secreção

c = canaliculo

n = núcleo da célula secretora de canaliculo

at = aparato terminal

4.4 Análise do comprimento das glândulas de veneno e de Dufour de três subespécies de *Apis mellifera* em relação à africanizada

Em relação ao comprimento das glândulas de veneno, as análises estatísticas apresentadas na Tabela I, mostram ausência de diferenças significativas entre as operárias de idades diferentes e entre rainhas virgens e fecundadas, dentro de cada grupo analisado. Entre os grupos verifica-se que as glândulas de veneno da subespécie *Apis mellifera ligustica* não são, em nenhuma idade estudada, estatisticamente diferentes daquelas das africanizadas. No entanto, as glândulas de *Apis mellifera carnica* e *Apis mellifera caucasica* são menores do que aquelas das africanizadas, nas três idades estudadas: recém-emergidos, 15 e 30 dias de idade (Tabela I).

Entre as rainhas virgens, apenas *A. m. carnica* apresenta diferença significativa, sendo o comprimento glandular menor que o da rainha africanizada. Entre as rainhas fecundadas, nenhuma das subespécies apresenta diferença significativa em relação à africanizada (Tabela I).

Quanto à glândula de Dufour, também não há diferenças estatisticamente significativas entre as idades dos indivíduos pertencentes a uma mesma subespécie, nem entre os indivíduos africanizados, bem como entre rainhas virgens e fecundadas de um mesmo grupo. No entanto, entre as subespécies e a abelha africanizada, diferenças significativas ocorrem nas três idades estudadas. Em recém-emergidos de *A. m. ligustica* e *A. m. carnica* as glândulas de Dufour são significativamente maiores do que as das operárias africanizadas. Nas abelhas com 15 dias de idade, apenas *A. m. ligustica* apresenta-se significativamente maior, mas aos 30 dias de idade, as operárias africanizadas que apresentam glândulas de Dufour significativamente maiores do que das outras três subespécies estudadas.

Entre as rainhas virgens, não se observam diferenças significativas entre a abelha africanizada e as subespécies estudadas. Nas rainhas fecundadas, apenas as subespécies *A. m. ligustica* e *A. m. carnica* apresentam um comprimento glandular significativamente menor que as abelhas africanizadas (Tabela II).

Tabelas I: Média, em milímetros, e desvio padrão das glândulas de veneno de operárias recém-emergidas, aos 15 e 30 dias de idade e de rainhas virgens e fecundadas de *Apis mellifera* africanizada e das subespécies *A. m. ligustica*, *A. m. carnica* e *A. m. caucasica*.

Glândula de Veneno (em mm)								
Grupo	<i>A. mellifera</i> africanizada		<i>A. mellifera ligustica</i>		<i>A. mellifera carnica</i>		<i>A. mellifera caucasica</i>	
	média	DP	média	DP	média	DP	média	DP
RE	15,260	1,253	14,362	2,208	14,215*	1,254	11,912*	1,562
15 DIAS	17,618	2,543	16,407	2,357	13,595*	2,102	12,137*	1,752
30 DIAS	16,240	1,769	16,505	2,010	13,225*	2,480	11,250*	1,289
RV	43,120	8,318	38,785	6,049	37,912*	9,173	45,462	8,223
RF	39,190	6,468	39,627	7,129	39,437	8,685	37,785	6,940 *

*Significativo a 5%

RE – operária recém-emergida

15 dias – operária com 15 dias de idade

30 dias – operária com 30 dias de idade

RV – rainha virgem

RF – Rainha fecundada

Tabelas II: Média, em milímetros, e desvio padrão das glândulas de Dufour de operárias recém-emergidas, aos 15 e 30 dias de idade e de rainhas virgens e fecundadas de *Apis mellifera* africanizada e das subespécies *A. m. ligustica*, *A. m. carnica* e *A. m. caucasica*.

Glândula de Dufour (em mm)								
Grupo	<i>A. mellifera</i> africanizada		<i>A. mellifera ligustica</i>		<i>A. mellifera carnica</i>		<i>A. mellifera caucasica</i>	
	média	DP	média	DP	média	DP	média	DP
RE	0,932	0,141	1,255*	0,206	1,092*	0,136	0,947	0,130
15 DIAS	1,112	0,135	1,260*	0,238	1,080	0,171	1,107	0,181
30 DIAS	1,292	0,277	1,160*	0,214	1,025*	0,206	1,002*	0,118
RV	3,795	0,567	3,905	0,875	3,724	1,003	3,820	0,839
RF	3,895	0,537	3,270*	0,407	3,302*	0,458	3,855	0,696

* Significativo a 5%

RE – operária recém-emergida

15 dias – operária com 15 dias de idade

30 dias – operária com 30 dias de idade

RV – rainha virgem

RF – Rainha fecundada

4.5 Dosagem de proteínas das glândulas de veneno de três subespécies de *Apis mellifera* e da africanizada

A análise da dosagem do conteúdo de proteína total, dado em $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, das glândulas de veneno, dentro de um mesmo grupo, aumenta significativamente com a idade, desde a emergência até os 30 dias. Diferença significativa é, também, registrada entre rainhas virgens e fecundadas, sendo o conteúdo protéico das rainhas fecundadas maior que a das virgens, em todos os grupos estudados. Ambas, porém, apresentam um conteúdo protéico total maior do que o das operárias, em todos os grupos analisados.

Comparando-se os valores da dosagem protéica das três subespécies estudadas com os da africanizada, as análises estatísticas mostram que não existem diferenças significativas entre as operárias recém-emergidas e com 30 dias. Aos 15 dias de idade, foram encontradas diferenças entre a abelha africanizada, que possui uma quantidade de proteína total menor, e as subespécies *A. m. ligustica*, *A. m. carnica* e *A. m. caucasica*, as quais não diferiram entre si. Entre as rainhas virgens não se observam diferenças significativas da abelha africanizada com qualquer das subespécies. Entre as rainhas fecundadas, mantêm-se as diferenças verificadas em operárias com 15 dias de idade, a abelha africanizada com um teor protéico significativamente menor que as das outras três subespécies (Tabela III).

Tabelas III: Média, em microgramas/microlitro, e desvio padrão do teor protéico total das glândulas de veneno de operárias recém-emergidas, aos 15 e 30 dias de idade e de rainhas virgens e fecundadas de *Apis mellifera* africanizada e das subespécies *A. m. ligustica*, *A. m. carnica* e *A. m. caucasica*.

Dosagem Proteica da Glândula de Veneno (em mg ^µ ml)								
Grupo	<i>A. mellifera</i> africanizada		<i>A. mellifera ligustica</i>		<i>A. mellifera carnica</i>		<i>A. mellifera caucasica</i>	
	média	DP	média	DP	média	DP	média	DP
RE	1,933	0,725	1,889	0,286	1,953	0,431	1,528	0,154
15 DIAS	8,339	1,207	10,111*	0,675	10,135*	0,616	11,977*	0,990
30 DIAS	14,695	1,199	15,065	1,087	17,483	1,893	14,418	0,905
RV	5,717	1,574	8,374	5,083	4,438	1,504	5,017	0,262
RF	15,574	1,577	27,144*	2,266	23,433*	2,089	25,053*	2,274

* Significativo a 5%

RE – operária recém-emergida

15 dias – operária com 15 dias de idade

30 dias – operária com 30 dias de idade

RV – rainha virgem

RF – Rainha fecundada

4.6 Perfil eletroforético protéico das glândulas de veneno de três subespécies de *Apis mellifera* em relação à africanizada

A análise do perfil eletroforético protéico da glândula de veneno de *Apis mellifera ligustica*, *Apis mellifera carnica*, *Apis mellifera caucasica* e da abelha africanizada, realizada com o método SDS-PAGE, mostra o padrão protéico de operárias com diferentes idades, de rainhas virgens e fecundadas. De uma maneira geral, as operárias apresentam proteínas com pesos moleculares entre 105,4 kDa e 26 kDa, enquanto as rainhas têm proteínas com pesos entre 161,3 kDa e 57,6 kDa, em bandas.

Em indivíduos recém-emergidos, duas bandas mais proeminentes podem ser identificadas, a primeira com 105,4 kDa e a segunda com 29kDa, com exceção da subespécie *A. m. caucasica*, que apresenta apenas a segunda banda (Fig. 16). Quando a operária atinge 15 dias de idade podem ser visualizadas três bandas, a primeira, mais fraca, com peso molecular de 97 kDa, a segunda com 29 kDa e a terceira com 26 kDa (Fig. 16). Aos 30 dias de idade, estas duas últimas bandas permanecem bastante fortes, enquanto a banda com 97 kDa desaparece, surgindo outra com 77,6 kDa (Fig. 17). Aos 15 e 30 dias as bandas encontradas são comuns a todas subespécies estudadas e à abelha africanizada.

Em rainhas virgens (Fig. 18) pode-se observar cinco bandas mais destacadas, com pesos moleculares de 161,3, 108,3, 97, 96,4 e 57,6 kDa, com exceção da subespécie *A. m. ligustica* que não apresenta a banda com peso molecular de 161,3 kDa. Essa banda desaparece nas outras subespécies e na abelha africanizada em rainhas fecundadas (Fig. 18), constituindo tal desaparecimento a única diferença de padrão eletroforético entre estas e as rainhas virgens, sob as condições analisadas.

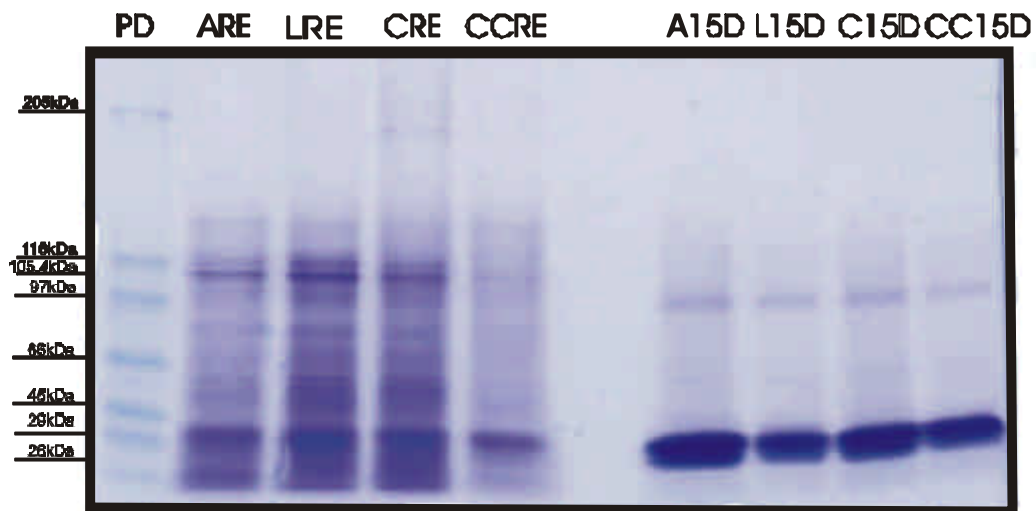


Figura 16 - Eletroforese, em gel de gradiente de 5 a 20%, das proteínas totais da glândula de veneno de *Apis mellifera* africanizada (**A**) e das subespécies *A. mellifera ligustica* (**L**), *A. mellifera carnica* (**C**) e *A. mellifera caucasica* (**CC**) coletadas no período da emergência (**RE**) e aos 15 dias de idade (**15D**).

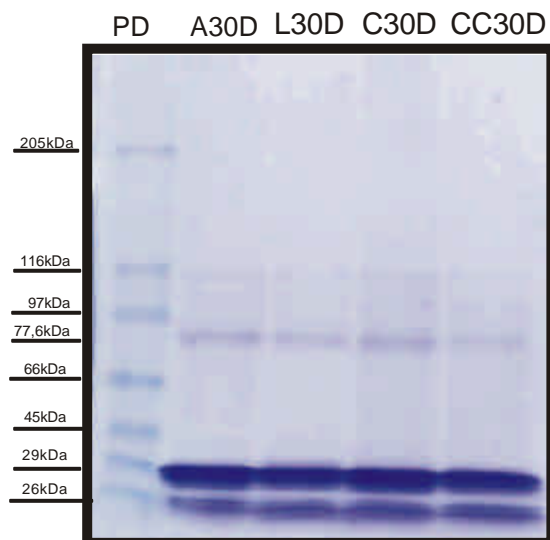


Figura 17 - Eletroforese, em gel de gradiente de 5 a 20%, das proteínas totais da glândula de veneno de *Apis mellifera* africanizada (**A**) e das subespécies *A. mellifera ligustica* (**L**), *A. mellifera carnica* (**C**) e *A. mellifera caucasica* (**CC**) coletadas aos 30 dias de idade (**30D**).

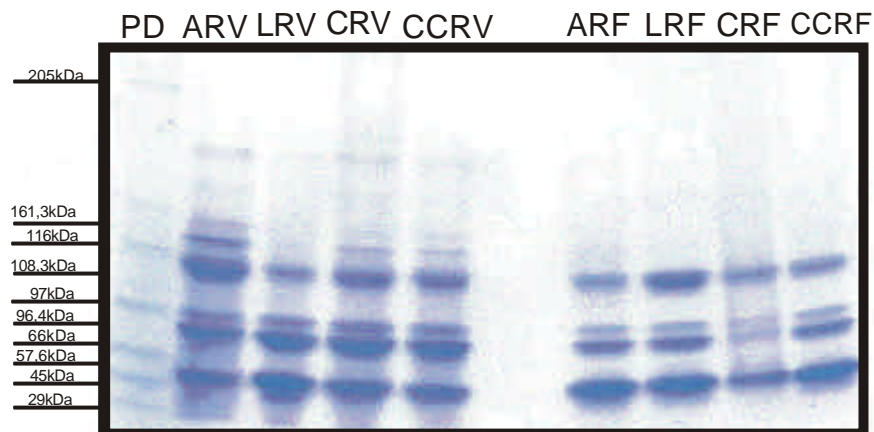


Figura 18 - Eletroforese, em gel de gradiente de 5 a 20%, das proteínas totais da glândula de veneno de rainhas virgens (**RV**) e fecundadas (**RF**) de *Apis mellifera* africanizada (**A**) e das subespécies *A. mellifera ligustica* (**L**), *A. mellifera carnica* (**C**) e *A. mellifera caucasica* (**CC**).

5. DISCUSSAO

Evolutivamente, a glândula de veneno dos himenópteros aculeados é um caráter derivado (apomórfico), associado ao ferrão, usado na defesa e resultante da modificação das glândulas anexas ao ovipositor de seus ancestrais não aculeados, enquanto que a glândula de Dufour é um caráter sinapomórfico, homólogo às glândulas colaterais de outros insetos. Na maioria dos insetos, os discos imaginais da genitália são responsáveis pela formação do ovipositor (CARLET, 1884; 1890 *apud* ABDALLA, 1999) e pelas glândulas anexas ao sistema reprodutor feminino (ROBERTSON, 1968; MATSUDA, 1976). De acordo com nossos resultados, em *Apis mellifera*, tanto a glândula de veneno quanto a glândula de Dufour surgem durante a metamorfose, a partir dos discos imaginais genitais localizados no 9º segmento abdominal. O desenvolvimento dessas duas glândulas, bem como das partes do ferrão, em rainhas e operárias difere, apenas, quanto a sua duração, que, em rainhas, é mais curto.

A verificação da presença de três pares de discos imaginais, desde o 2º estágio larval, distribuídos no 7º, 8º e 9º segmentos abdominais corrobora os dados obtidos por D'ROZÁRIO (1942), mas contraria, em parte, os de MYSER (1954). Tal autor relatou a ocorrência de três pares de discos imaginais da genitália, também a partir do 2º estágio larval de *Apis mellifera*, porém com distribuição diferente, estando um par, no segmento 8º e dois, no segmento 9º. Portanto, os autores concordam quanto à presença de um par de discos no 8º segmento, mas diferem quanto à quantidade de pares presentes no 7º e 9º.

O par de discos presente no 7º segmento, tem localização semelhante à descrita em *Apis mellifera* por D'ROZÁRIO (1942) e em *Scaptotrigona postica* por NEVES (1984), ou seja, situa-se na porção central do segmento. Esses discos não se desenvolvem dentro de uma bolsa peripodial, como os demais, permanecendo, em *Scaptotrigona postica*, sob a forma de um par de rudimentos (NEVES, 1984). O desenvolvimento desse par de discos imaginais em *Apis mellifera* não foi acompanhado em nossos estudos por não participarem da formação das glândulas de veneno e de Dufour e nem das partes que constituem o ferrão. Segundo D'ROZÁRIO (1942), os elementos do par fundem-se para originar a placa subgenital, estando, portanto, mais ligado à formação do sistema reprodutor.

Os nossos resultados mostram que apenas os pares encontrados no 8º e 9º segmentos abdominais participam da formação do ferrão e suas glândulas anexas. Os membros do par localizam-se na região central de seus respectivos segmentos, estando os componentes do par do 8º segmento mais distantes entre si do que os do 9º, confirmando os dados de D'ROZÁRIO (1942) e MYSER (1954). O par de discos presente no 8º segmento originam as lancetas do ferrão, pelo aumento do número de células, que ficam restritas ao mesmo espaço devido à presença da cutícula. Isto faz com que o disco sofra dobramentos que levam à formação de duas estruturas alongadas, os primórdios das lancetas, que podem ser observadas no início da fase de pré-pupa.

As observações realizadas durante o presente estudo evidenciam apenas um par de discos imaginais no 9º segmento. No início da metamorfose, cada um dos discos do par divide-se longitudinalmente, ficando, cada um, constituído por duas partes, uma externa e outra interna. As porções internas de cada disco fundem-se para formar a bainha do ferrão, e as partes externas dão origem aos palpos, ambos com desenvolvimento semelhante ao descrito para as lancetas, formadas a partir do par de discos do 8º segmento. Estes dados confirmam os de D'ROZÁRIO (1942), mas contradizem os de MYSER (1954), segundo o qual são os dois pares de discos, presentes no 9º segmento e inicialmente separados, que se fundem parcialmente durante o desenvolvimento para também formar a bainha e o palpo do ferrão. É na extremidade ligada ao corpo desse par de discos que surgem as glândulas de veneno e de Dufour, a primeira mais dorsalmente e a segunda mais ventralmente.

Na transição do final do 5º estágio e início da fase de pré-pupa, a glândula de veneno surge, então, como uma primeira invaginação, dorsal, associada à parte interna das porções dos discos que originarão a bainha. Essa invaginação é o resultado de um dos vários dobramentos teciduais que o disco sofre durante a metamorfose. Primeiramente, essa invaginação apresenta uma camada única de células indiferenciadas. Com o decorrer da metamorfose a invaginação cresce e, no final da fase de pré-pupa, já é possível reconhecer uma porção mais dilatada, que será o reservatório e o início de um filamento. Durante a pupação, o epitélio do filamento diferencia-se em duas camadas celulares distintas. Uma dessas camadas é composta por células cilíndricas, com núcleos grandes e basais, que

serão responsáveis pela secreção do veneno; a outra camada é representada pelas células formadoras dos canalículos, que são achatadas, com núcleos elípticos, que se interpõem entre as células secretoras e a luz. A presença de ambos os tipos celulares enquadram a glândula na classe III de NOIROT & QUENNEDEY (1991).

Logo após o surgimento da primeira invaginação, que dá origem à glândula de veneno, surge, mais ventralmente, uma segunda invaginação que origina a glândula de Dufour. Suas células, no início, são, também, indiferenciadas e a invaginação não apresenta um crescimento tão proeminente quanto ao da glândula de veneno. No final da metamorfose, no entanto, já é possível identificar a glândula de Dufour por sua forma externa característica, que não exibe uma luz visível, e não mostra, ainda, os padrões de dobramento do epitélio, típicos dessa glândula.

Portanto, nessa fase de transição da vida larval para a pupal, a morfogênese dos discos imaginais leva a formação de órgãos internos como a glândula de veneno e de Dufour, e externos, como as partes do ferrão, que crescem e se moldam no interior da bolsa peripodial. Essas transformações são muito rápidas, tanto que, quando o estágio de pupa de olho branco é alcançado, o ferrão, a glândula de Dufour e a glândula de veneno já estão formadas, exibindo a forma apresentada no adulto, porém menos desenvolvidas, conforme pode ser observado anatômica e histologicamente. Tais resultados estão de acordo com MYSER (1954), que verificou que o ferrão de *Apis mellifera* atinge a forma do adulto já no final do período de pré-pupa.

A morfogênese é muito rápida porque vem sendo preparada durante toda a fase larval, através da lenta diferenciação celular que ocorre nos discos. No fim da fase larval, as células presuntivas das várias estruturas já estão determinadas, restando apenas a expressão do caráter. Atingido o estágio de pupa, as mudanças continuam a acontecer, mas em uma taxa bem mais lenta do que durante a transição larva-pupa. SCHOETERS & BILLEN (1998) encontraram um padrão de desenvolvimento das glândulas de veneno e de Dufour, em Formicidae, semelhante aos aqui descritos para *Apis mellifera*.

Uma questão que durante muito tempo tem sido objeto de discussões controversas é a desembocadura da glândula de Dufour. Segundo BILLEN

(1987), somente em Formicidae a glândula de Dufour abre-se junto com a glândula de veneno, na base do ferrão, possuindo em Apidae e Vespidae aberturas independentes. No entanto, em *Apis mellifera*, ainda faltava esclarecer a origem da glândula de veneno e de Dufour, ficando agora comprovado que elas são independentes desde sua formação, bem como a relação anatômica entre a glândula de Dufour e o sistema reprodutor, desde que as funções sugeridas para a glândula de Dufour desta espécie estão relacionadas à reprodução. A glândula de Dufour, conforme já dito, origina-se a partir do par de discos imaginais presentes no 9º segmento. Por outro lado o oviduto comum origina-se, segundo D'ROZÁRIO (1942) como um sulco, com formação semelhante a uma nêurula, em posição anterior ao par de discos do 7º segmento e segue no sentido postero-anterior, bifurcando-se para formar os ovidutos laterais. Estes, posteriormente, continuam-se com a parte do aparelho reprodutor de origem mesodérmica. Com o progresso do desenvolvimento larval há retração do 8º e 9º segmentos sob o 7º, e conseqüente aproximação da glândula de Dufour, formada no 9º segmento, e do oviduto mediano, formado a partir do 7º. Por esta razão, a desembocadura glandular em *Apis mellifera* se faz na câmara genital, que se forma a partir de uma depressão resultante da retração dos segmentos e da placa subgenital, originada pela fusão dos discos do 7º segmento. A retração dos segmentos também permite, segundo D'ROZÁRIO (1942), o correto posicionamento da espermateca e suas glândulas, originadas dos discos imaginais do 8º segmento.

O desenvolvimento pós-embrionário, incluindo o desenvolvimento dos discos imaginais, é controlado pelos níveis de hormônio juvenil circulante. Além disso, esse hormônio é importante nos processos de desenvolvimento e diferenciação larval (RACHINSKY et al., 1990), na diferenciação de castas (RACHINSKY & ENGELS, 1995) e na divisão de trabalho dentro da colônia (ROBINSON, 1992), a qual depende, em parte, da ativação e inativação de glândulas exócrinas.

Apesar de a glândula de veneno estar morfológicamente diferenciada após a metamorfose, ela está fisiologicamente inativa, só produzindo veneno, no final da pupação em rainhas e após a emergência, em operárias, conforme também verificado por ROAT (2001). Tal diferença no início da atividade da glândula, talvez, se deva ao fato de que rainhas e operárias necessitam do produto

glandular em momentos diferentes de suas vidas. As rainhas usam sua glândula de veneno logo após a emergência, na disputa do domínio da colônia com outras possíveis rainhas, enquanto as operárias usam-na quando estão realizando tarefas fora do ninho, o que acontece por volta do 20º dia de vida adulta (OWEN & BRIDGES, 1976). Assim, é natural que as rainhas apresentem degeneração da glândula de veneno logo após seu estabelecimento como dominante e o início da postura, o que pode ser comprovado no presente estudo.

Durante o desenvolvimento normal de *Apis mellifera*, o título de hormônio juvenil é relativamente alto nos primeiros estágios larvais, e diminui no 5º estágio, o que permite a ocorrência da metamorfose. Ocorre um pequeno aumento durante a tecelagem do casulo, para cair novamente durante a pupação (RACHINSKY *et al.*, 1990). Na fase adulta, o título permanece baixo enquanto a operária estiver desempenhando tarefas dentro da colônia, aumentando na época em que ela se torna forrageira (ROBINSON, 1992), período em que a glândula de veneno degenera. Assim, as variações do nível de hormônio durante a vida adulta, principalmente sua variação na transição das atividades internas das operárias para o forrageamento, pode ter grande influência sobre o ciclo secretor e degeneração da glândula de veneno, pois sendo esta glândula necessária, como elemento de defesa às operárias, o forrageamento precoce deve levar, também, à maior rapidez dos processos de atividade e degeneração glandular.

Os nossos resultados confirmam que o ciclo secretor e degeneração das glândulas de veneno de *Apis mellifera* são afetados pelo nível de hormônio juvenil na hemolinfa. Em todas as idades analisadas, as glândulas de veneno de indivíduos, operárias ou larvas, que receberam hormônio juvenil e hexano apresentam ciclo secretor mais acelerado, culminando com a degeneração glandular precoce, sendo o hormônio juvenil mais efetivo na produção desses efeitos do que o hexano puro. Portanto, não se pode atribuir a aceleração do ciclo secretor e degeneração precoce da glândula apenas ao hormônio, uma vez que seu solvente teve efeito semelhante. Outros trabalhos, envolvendo análises histológicas, que utilizaram um grupo controle que recebeu apenas o solvente, também mostram resultados semelhantes para o efeito do hormônio juvenil e seu diluente, seja ele hexano (SALLES 2000) ou acetona (FARINHA *et al.*, 1988 e PAES DE OLIVEIRA & CRUZ-LANDIM, 2001). Sob o ponto de vista fisiológico e

comportamental, SULLIVAN *et al.* (2000) não encontraram diferenças entre os grupos não tratados e aqueles que receberam apenas acetona.

Nas operárias que receberam tanto aplicação de hormônio juvenil como do hexano no momento da emergência, a glândula exibe desenvolvimento menos acelerado do que o promovido pela aplicação às larvas. No caso do hormônio juvenil, pode-se notar que, aos 14 dias as células secretoras já não apresentam vesículas de secreção no citoplasma, e seu epitélio mostra sinais degenerativos. Nesta idade, em condições normais, a glândula de veneno está em plena atividade, exibindo numerosas vesículas citoplasmáticas de secreção. A degeneração celular avança nas outras duas idades estudadas, 21 e 35 dias, continuando mais intensa nas células glandulares tratadas com hormônio juvenil, do que com hexano. Nas glândulas de operárias com 14 e 21 dias, que receberam hormônio juvenil na fase larval, os aspectos degenerativos são bem mais proeminentes em relação às tratadas na emergência. Além disso, aos 35 dias de idade tornou-se impossível a coleta de indivíduos tratados na fase larval, provavelmente, por uma morte precoce dos mesmos.

O fato de o hormônio juvenil ser mais efetivo sobre as glândulas de veneno quando aplicado às larvas em relação às operárias pode ser reflexo de um período maior de atividade hormonal ou de inatividade do mecanismo de degradação hormonal durante a pupação. Segundo DE KORT *et al.* (1977), a meia-vida do hormônio juvenil em larvas de *Apis mellifera* é significativamente maior, da ordem de 5 a 6 horas, do que a encontrada em outros insetos adultos, de 25 a 30 minutos. Os autores testaram a atividade das esterases degradadoras de hormônio juvenil em vários estágios larvais, e só encontraram alguma atividade da esterase do hormônio juvenil III no 5º estágio larval. A baixa atividade de degradação do hormônio juvenil em larvas de *Apis mellifera*, pode torná-las muito vulneráveis às variações nas concentrações desse hormônio, sejam elas fisiológicas, causadas por alterações dos *corpora allata*, ou artificiais, resultantes de aplicação.

Em condições normais, as glândulas de veneno de operárias apresentam um único ciclo secretor, que se inicia pouco antes da emergência e atinge seu máximo por volta do 16º dia de vida adulta (CRUZ-LANDIM *et al.*, 1967; ABREU *et al.*, 2000; NOCELLI *et al.*, 2002), antecedendo a atividade de forrageamento. A

secreção aparece no lúmen glandular em operárias, a partir da emergência e em rainhas, na pupa de olho preto (CRUZ-LANDIM & KITAJIMA, 1966). O veneno é estocado no reservatório e a glândula degenera no final da vida adulta, por volta dos 30 dias de idade durante o verão (AUTRUM & KNIETZ, 1959; CRUZ-LANDIM and KITAJIMA, 1966). Não há sinais de início de produção do veneno antes da emergência, uma vez que não são visualizadas vesículas de secreção nos estágios de pupa de olho marrom e pupa de olho preto, período em que as células secretoras estão finalizando o processo de diferenciação, em nenhum dos grupos analisados.

De um modo geral, tem-se atribuído ao hormônio juvenil, a capacidade de influenciar o desenvolvimento comportamental de operárias de *Apis mellifera* (ROBINSON, 1985; ROBINSON, 1987; ROBINSON *et al.*, 1989; JASSIM *et al.*, 2000; SULLIVAN *et al.*, 2000; ELEKONICH *et al.*, 2001). Os dados apresentados em muitos trabalhos, mostram que a aplicação de doses extras de hormônio juvenil é capaz de induzir as operárias ao forrageamento precoce (JAYCOX *et al.*, 1974; JAYCOX, 1976; ROBINSON, 1985; ROBINSON *et al.*, 1989; PLETTNER *et al.*, 1997), o que significa uma aceleração do desenvolvimento comportamental. Este fenômeno, conforme mostram os dados aqui apresentados, é acompanhado pela aceleração do ciclo secretor e maior precocidade do processo degenerativo da glândula de veneno, como esperado.

Quando a operária emerge, ocorre um pico de hormônio juvenil por volta do 2º dia de vida, com função ainda desconhecida (JASSIM *et al.*, 2000). Após esse pico, as operárias apresentam níveis baixos que vão aumentando conforme aumenta a idade da abelha, até atingir novo pico máximo quando esta se torna forrageira (ROBINSON, 1992). A aplicação realizada, no presente estudo, independente de seu momento, poderia estar antecipando o primeiro pico de hormônio juvenil em aproximadamente 24 horas ou somando-se a ele, criando um pico de nível muito mais elevado. Esse pico mais elevado poderia simular um pico de hormônio juvenil de idade mais avançada, levando a operária a forragear precocemente, acompanhado pela degeneração glandular precoce.

Está, portanto, demonstrado que o hormônio juvenil influencia o desenvolvimento comportamental das operárias adultas (SULLIVAN *et al.*, 2000), mas a presença deste não é necessária para que o desenvolvimento aconteça; o

hormônio juvenil não determina que a abelha passe a forragear, e sim quando isso deve acontecer. Além do hormônio juvenil, a quantidade de octopamina, presente nos lobos antenais, parece, também, envolvida na regulação do sistema comportamental, conforme descrito por SCHULZ *et al.* (2002), mas novos estudos devem focalizar outros fatores que podem estar agindo sobre este sistema, tais como os efeitos do hormônio juvenil sobre o desenvolvimento dos *corpora allata* e seu padrão de secreção e as influências ambientais, dos processos de degradação do hormônio juvenil exógeno aplicado e o período de sensibilidade do órgão estudado ao hormônio.

A aplicação tópica de hormônio juvenil às larvas de 5º estágio parece não influenciar a morfogênese das glândulas de veneno, pois os aspectos histológicos glandulares não se alteram em operárias recém-emergidas tratadas ou não. Seria esperado que o tratamento promovesse atraso do processo morfogenético, porque altas doses hormonais na hemolinfa e que dirigem à muda larva-larva, retardariam a metamorfose, que é o período de formação da glândula de veneno.

Segundo CYMBOROWSKI & STOLARZ (1979), a aplicação de doses extras de hormônio juvenil em *Spodoptera littoralis* durante o 5º estágio, pode resultar em resultados opostos. Se a aplicação é feita no início deste, quando as larvas ainda estão se alimentando, ocorre um atraso na metamorfose. Por outro lado, ocorre uma aceleração do processo quando a aplicação se dá durante o período de defecação, talvez pelo fato da aplicação imitar o pico encontrado durante a tecelagem do casulo (RACHINSKY *et al.*, 1990).

Assim como o período de aplicação, nos estudos sobre a ação do hormônio juvenil devem ser observados e levados em consideração as condições experimentais. O veículo utilizado, a constituição dos grupos, as concentrações não padronizadas podem levar à obtenção de intensidades de resposta e de dados diferentes.

Muitas pesquisas são necessárias, ainda, para o completo entendimento do real papel do hormônio juvenil, aplicado topicamente. Com a aplicação deste método não se pode deixar de considerar o estresse, resultante da manipulação das larvas, um fator importante que pode estar induzindo, nos grupos tratados de operárias, um aumento fisiológico de hormônio juvenil, como já verificado em uma grande variedade de insetos (JANKOVIC-HLADNI, 1991).

Além de importante papel na divisão de trabalho dentro da colônia, o hormônio juvenil pode estar, segundo PEARCE *et al.*, (2001), relacionado com a agressividade das abelhas. Segundo os autores, as abelhas mais agressivas, que atacam e perseguem invasores com maior efetividade, tem uma quantidade maior de hormônio juvenil circulante. Além disso, eles relatam grandes diferenças entre as várias colônias estudadas, sugerindo que o hormônio juvenil estaria agindo sobre um fator genético da determinação do grau de agressividade. Esta característica é mais intensa nas abelhas africanizadas do que nas européias e pode estar associada com aspectos da glândula de veneno, anexas ao aparelho do ferrão.

Isto justifica os resultados aqui apresentados, que mostram que o comprimento da glândula de veneno é maior em operárias da abelha africanizada do que nas subespécies de *Apis mellifera* estudadas, não havendo diferenças significativas entre as diferentes idades das operárias. OWEN (1983) estudando o comprimento das glândulas de veneno das subespécies *A. m. adansonii*, *A. m. ligustica* e *A. m. caucasica* mostrou que a glândula da subespécie africana é maior que das outras subespécies utilizadas, mas não encontrou diferenças entre as idades das abelhas. SNODGRASS (1956) e, posteriormente, KERR e LELLO (1962) não detectaram diferenças nos acessórios do ferrão das subespécies *A. m. ligustica*, *A. m. mellifera* e *A. m. adansonii*. Vários trabalhos relatam, também, uma influência ambiental sobre o tamanho da glândula ácida, como fatores alimentares (LAUTER & VRLA, 1939; REKOS, 1975) e o tamanho populacional da colônia (NOGUEIRA, 1976).

A semelhança entre os dados obtidos com abelhas da subespécie *A. m. adansonii*, uma subespécie africana, e os nossos dados pode ser explicada considerando o caráter comprimento da glândula de veneno como sendo determinado geneticamente, conforme comprovado pelos trabalhos de NOGUEIRA (1976, 1979) e ALVES JR. (1987). Tais autores conseguiram, através de seleção genética, reduzir o comprimento glandular. Os genes, que determinam glândulas maiores, podem ter sido herdados, pelo híbrido, da subespécie trazida da África. Este caráter não tem nenhuma correlação com o comportamento nitidamente mais agressivo da abelha africanizada (NOGUEIRA 1977), que exhibe glândulas de veneno mais desenvolvidas. Segundo STORT (1972) o conjunto de

genes que afeta o comportamento agressivo é independente dos genes que determinam a morfologia da glândula. Entre as rainhas, somente a subespécie *A. m. carnica* apresentou uma glândula significativamente menor em relação ao híbrido africanizado.

Apesar de as glândulas das abelhas africanizadas serem significativamente maiores do que as das subespécies européias, principalmente em relação às subespécies, *A. m. carnica* e *A. m. caucasica*, isso não se reflete em uma maior quantidade total de proteínas, pois as operárias dos híbridos africanizados exibem uma quantidade de proteínas menor do que as subespécies analisadas. Neste aspecto destacam-se as operárias africanizadas com idade de 15 dias em relação às subespécies, período esse que coincide com o pico máximo de produção de veneno, alcançado ao final do ciclo secretor (ABREU, 2000). A diferença quantitativa observada pode ser compensada por variações qualitativas dos componentes do veneno.

Vários estudos tem sido desenvolvidos com o veneno da abelha *Apis mellifera*, principalmente após o processo de africanização, visando identificar seus componentes e as diferenças existentes entre os híbridos resultantes desse processo e as diversas subespécies existentes. Em 1939, LAUTER & VRLA verificaram que a quantidade de veneno presente no reservatório de veneno da subespécie *A. m. ligustica* variava com a idade. FIRSOV (1976), relacionando seu trabalho com o de MELCHINENCO (1970), observou que nas abelhas européias que estudava, provenientes da Rússia Central e do Cáucaso, havia uma relação comprimento glandular x quantidade de veneno que, segundo este estudo, não se confirma nas abelhas africanizadas. Em 1990, SCHUMACHER *et al.* obtiveram resultados semelhantes aos aqui apresentados, em um trabalho que avaliava a quantidade de veneno nos reservatórios glandulares da abelha africanizada em relação ao das européias. Apesar de uma quantidade significativamente menor de veneno, SCHUMACHER *et al.* (1992) encontraram uma quantidade maior de fosfolipase A₂, que ataca os fosfolídeos estruturais.

Entre as rainhas fecundadas, as subespécies apresentam quase o dobro da quantidade de proteínas encontrada na abelha africanizada, justamente onde aparecem as maiores glândulas. Uma diferença tão grande na quantidade de veneno, entre rainhas fecundadas africanizadas e as subespécies, poderia indicar

um processo de requisição das proteínas do veneno, nas africanizadas, já sem utilidade, para a produção de ovos, contribuindo para o sucesso reprodutivo do híbrido, como também foi sugerido por OWEN & BRIDGES (1976).

Portanto, além da quantidade total de veneno, as frações protéicas são de grande interesse para análise do veneno da abelha africanizada. Os dados obtidos nesse estudo mostram diferenças qualitativas entre as operárias recém-emergidas, onde a subespécie *A. m. caucasica* não apresenta a banda com peso molecular de 105,4 kDa, e entre as rainhas fecundadas, em que a subespécie *A. m. ligustica* não apresenta a banda com peso molecular de 161,3 kDa. Essa variação pode ser causada, realmente, por uma produção diferenciada de veneno, uma vez que se procurou eliminar os fatores externos que poderiam alterar a análise, como coletas em diferentes estações do ano e longo tempo de estocagem das amostras.

A associação de uma menor quantidade de veneno e de diferenças qualitativas em africanizadas poderia resultar de uma maior concentração do mesmo, o que aumentaria sua eficiência e, ao mesmo tempo, diminuiria o peso da operária, contribuindo para uma atividade de forrageamento mais eficiente. MELLO (1970) estudou, comparativamente, as frações protéicas do veneno de *A. m. ligustica* e *A. m. adansonii* e não encontrou diferenças entre elas. No entanto, SHIPMAN (1975), utilizando colunas de Sephadex, encontrou diferenças na quantidade de melitina e no número de frações protéicas existentes entre uma abelha africanizada originária do Brasil, e a subespécie *A. m. ligustica*. PALMA & BROCHETTO-BRAGA (1993), também utilizando colunas de Sephadex, e trabalhando com a abelha africanizada e as subespécies *A. m. adansonii* e *A. m. ligustica*, encontraram diferenças quantitativas e qualitativas entre seus venenos. Estas diferenças, segundo PALMA *et al.* (1995), podem vir a ser uma ferramenta para a identificação das populações híbridas de *Apis mellifera*, uma vez que estas apresentam, quando analisadas por cromatografia, picos pertencentes às subespécies parentais e picos característicos resultantes da miscigenação.

A glândula de Dufour, apesar de estar ligada ao ferrão, não desemboca no mesmo, despejando sua secreção no canal da vagina da abelha. Ela possui uma forma alongada, e tem uma posição mais ventral em relação à glândula de veneno. As análises das medidas do comprimento da glândula de Dufour de

operárias de *Apis mellifera* africanizada e das subespécies estudadas, não evidenciaram diferenças significativas, dentro de um mesmo grupo, em operárias recém-emergidas, 15 e 30 dias de idade. Ocorre um aumento do comprimento glandular com o desenvolvimento da abelha, o que também foi comprovado por ABDALLA (1999) em seus estudos com a abelha africanizada. As diferenças encontradas, entre a africanizada e as subespécies, aparecem justamente entre as recém-emergidas e entre as operárias com 30 dias de idade, que estão, provavelmente, desempenhando o trabalho de campeiras. Estes resultados confirmam aqueles obtidos por ABDALLA (1999) em africanizadas. As rainhas estudadas apresentam um comprimento glandular maior que o das operárias, o que foi confirmado pelos dados de KERR e LELLO (1962) e ABDALLA (1999), reforçando a idéia de que sua secreção estaria mais ligada á reprodução. Não foram encontradas, no entanto, diferenças significativas entre rainhas virgens e fecundadas dentro do grupo das africanizadas, conforme relatado pelos mesmos autores, e dentro de cada grupo das subespécies. As diferenças significativas entre as rainhas fecundadas das subespécies analisadas e a africanizada podem estar relacionadas ao sucesso reprodutivo do híbrido.

6. CONCLUSOES

Os estudos realizados com as glândulas de veneno e de Dufour do híbrido africanizado de *Apis mellifera* e das subespécies *A. m. ligustica*, *A. m. carnica* e *A. m. caucasica* permitem concluir que:

1 – Existem três pares de discos imaginais genitais, distribuídos no 7º, 8º e 9º segmentos abdominais, visíveis a partir do 2º estágio larval. Esses discos aumentam de tamanho até a metamorfose, quando ocorre a morfogênese.

2 – As análises histológicas do desenvolvimento pós-embrionário dos discos imaginais genitais de *Apis mellifera* mostram que as glândulas de veneno e de Dufour originam-se, durante a metamorfose, a partir de invaginações que surgem na base interna do par de discos presente no 9º segmento abdominal, que forma, também, a bainha e os palpos do ferrão. O par presente no 8º segmento dá origem às lancetas e o do 7º não teve seu desenvolvimento acompanhado por não participar da formação do ferrão e suas glândulas anexas.

3 - As invaginações que dão origem às glândulas de veneno e de Dufour surgem em momentos diferentes da metamorfose e são independentes. Em primeiro lugar forma-se, em posição dorsal, aquela que originará a glândula de veneno e, posteriormente, mais ventralmente, a que originará a glândula de Dufour, por esta razão, tem desembocaduras independentes. A glândula de veneno desemboca no ferrão e a glândula de Dufour, cujo posicionamento correto em relação ao parêlo reprodutor, ocorre, ainda durante a metamorfose, pela retração dos segmentos 8º e 9º sob o 7º, desemboca no canal vaginal.

4 – Os aspectos histológicos do desenvolvimento das glândulas de veneno e de Dufour não diferem entre operárias e rainhas.

5 – A aplicação tópica do hormônio juvenil, bem como de seu solvente, hexano, no período larval não altera a morfogênese da glândula de veneno mas, da mesma forma que a aplicação na emergência, promove uma aceleração no ciclo secretor e degeneração glandular precoce nas operárias. Os efeitos do hexano, no entanto, não são inócuos, porém menos efetivos do que os do hormônio

juvenil. Assim, embora potencializado pela ação do solvente, o hormônio juvenil está envolvido no controle do ciclo secretor da glândula de veneno de *Apis mellifera*.

6 – Em rainhas virgens, a glândula apresenta-se bem desenvolvida e em plena atividade secretora, mas degenera logo após o acasalamento e início da atividade de postura.

7 – O comprimento da glândula de veneno não aumenta com o avanço da idade das operárias, mantendo-se praticamente o mesmo da emergência aos 30 dias, tanto na africanizada, quanto em *A. m. ligustica*, *A. m. carnica* e *A. m. caucasica*.

8 – Não existe relação entre o comprimento glandular e a quantidade total de proteínas. As abelhas africanizadas possuem glândulas de veneno maiores que as das subespécies européias, porém, uma menor quantidade de proteínas totais.

9 – O padrão eletroforético protéico é muito similar entre as subespécies analisadas e o híbrido africanizado, sendo registradas variações em apenas uma banda entre as operárias e uma entre as rainhas.

10 – Nas abelhas de origem européia não há variações no comprimento das glândulas de Dufour que, no entanto, tornam-se gradativamente maiores com a idade nas africanizadas, o que promove diferenças de tamanho entre as diferentes idades da africanizada com as européias.

11 – As glândulas de rainhas virgens não diferem quanto ao comprimento entre a abelha africanizada e as subespécies, mas entre as fecundadas, o híbrido apresenta glândulas maiores.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLA, F.C. **Estudo comparativo da glândula de Dufour de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) nas castas.** 1999. 180f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – área de biologia Celular e Molecular) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, 1999.

ABDALLA, F.C. **Ultra-estrutura e composição química da glândula de Dufour de rainhas de *Melipona bicolor* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera, Meliponini) e padrão dos hidrocarbonetos cuticulares da espécie.** 2003. 213f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Área de Biologia Celular e Molecular), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, 2003.

ABDALLA, F.C.; CRUZ-LANDIM, C. Dufour glands in the Hymenopterans (Apidae, Formicidae, Vespidae): A review. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, RJ: Academia Brasileira de Ciência, v. 61, n. 1, p. 95-106, 2001a.

ABDALLA, F.C.; CRUZ-LANDIM, C. Size differences in the Dufour gland of *Apis mellifera* Linnaeus (Hymenoptera, Apidae) between and within the female castes. **Revista Brasileira de Zoologia**, São Paulo, SP: Sociedade Brasileira de Zoologia, v. 18, supl.1, p. 119-123, 2001b.

ABDALLA, F.C.; CRUZ-LANDIM, C. (2001c) Changes in the morphology of the Dufour gland of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae) during the life stages of the female castes. **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, SP: Sociedade Brasileira de Entomologia, v. 45, n. 2, p. 123-129.

ABDALLA, F.C.; GRACIOLI, L.F.; SALLES, H.C.; CRUZ-LANDIM, C.; SILVA DE MORAES, R.L.M. (2001) Effect of the topical application of juvenile hormone (JH) in honeybee worker larvae on the development of the Dufour's and Koschewnikow's glands. **Sociobiology**, Chico, Calif., US: Califórnia State University, v. 37, n. 1, p. 185-191.

ABREU, R. M. M. **Efeito de choques elétricos no comportamento das glândulas de veneno de operárias de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae).** 1996. 102f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Área de

biologia Celular e Molecular). Instituto de Biociências – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP. 1996.

ABREU, R.M.M. **Padrões citoquímicos do desenvolvimento das glândulas de veneno de operárias de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae)**. 2000. 176 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Área de Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, 2000.

ABREU, R.M.M.; SILVA DE MORAES, R.L.M.; MALASPINA, O. Histological aspects and protein content of the venom gland of *Apis mellifera* L. Workers: effect of electrical shocks in summer and winter. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, Botucatu, SP, v. 6, p. 87-98, 2000.

AKAMATSU, Y.; DUNN, P.E.; KEZDY, F.J.; KRAMER, K.J.; LAW, J.H.; RUBSTEIN, D.; SANBURG, L.L. Biochemical aspects of juvenile hormone action in insects. In: MEINTS, R.; DAVIES, E. **Control mechanisms in development**. New York: Plenum Publishing Corporation, 1975. p. 123-149.

ALVES JÚNIOR, V.V. **Estudo do tamanho da glândula ácida em operárias de *Apis mellifera* (L.) descendentes de rainhas cruzadas com um zangão**. 1987. 99f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Área de Zoologia), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, 1987.

ALVES JÚNIOR, V.V. **Estudo da herança do caráter comprimento da glândula ácida em operárias de abelhas africanizadas (*Apis mellifera*) (Hymenoptera, Apidae)**. 1992. 145f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Área de Zoologia), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, 1992.

ARIAS, M.C.; SHEPPARD, W.S. Molecular phylogenetics of honey bee subspecies (*Apis mellifera* L.) inferred from mitochondrial DNA sequence. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, Fla., US: Pergamon Press, v. 5, n. 3, p. 557-566, 1996.

ASENCOT, M.; LENSKY, Y. The effect of sugars and juvenile hormone on the differentiation of the female honeybee larvae (*Apis mellifera*) to queens. **Science**, Washington, DC., Us: HighWire Press, v. 18, p. 693-699, 1977.

AUTRUM, H.; KNEITZ, H. Die giftsekretion in der giftdruse der honigbiene in abhangingkeit von lebensalter. **Biol. ZBL.**, v. 78, n. 4, p. 598-602, 1959.

BANKS, B.E.L.; SHIPOLINI, R.A. Chemistry and pharmacology of honey bee venom. In: PIEK, T. (Ed.). **Venoms of the Hymenoptera**. London: Academic Press, 1986. chapter 7, p. 330-403.

BARBALHO, S.M.; PENTEADO-DIAS, A.M. Análise morfológica do aparelho de veneno nos Braconidae *Cyclostome* (Hymenoptera). **Revista Brasileira de Zoologia**, São Paulo, SP: Spciiedade Brasileira de Zoologia,14(1): 65-71, 1997.

BEIGUELMAN, B. **Curso prático de bioestatística**. 5ª Edição Revisada. Fundação de Pesquisas Científicas de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto, SP. 274p, 2002.

BERGSTRÖM, G.; TENGÖ, J. Farnesyl, geranyl esters as main volatile constituents of secretion from Dufour's gland in six species of *Andrena* (Hymenoptera, Apidae). **Chemica Scripta**, Stockholm, SE: Almqvis & Wiksell, v. 5, p. 28-38, 1974.

BILLEN, J.P.J. New structural aspects of the Dufour's gland and venom gland in social insects. **Naturwissenschaften**, Belfast, Irlanda, IE: Springer Verlag, v. 74, p. 340-341, 1987.

BLUM, M.S.; HERMANN, H.R. The Hymenopterous poison gland: probable function of the main glandular elements. **Journal of Entomological Society**, Victoria, Canadá, CA: Entomological Society, v. 4, n. 1, p. 23-27, 1969.

BONETTI, A.M. **Genética da determinação de casta em *Melípona*. Ação do hormônio juvenil sobre esterases e corpora allata durante o desenvolvimento pós-embrionário**. 1990. 165f. Tese (Doutorado em Genética), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP. Ribeirão Preto, SP. 1990.

BONETTI, A.M.; CRUZ-LANDIM, C.; KERR, W.E. Sex determination in bees XXX. Effects of juvenile hormone on the development of tergal glands in *Melipona*. **Journal of Apicultural Research**, London, GB: International Bee Research Association, v. 33, n. 1, p. 11-14, 1994.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, US: Academic Press, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRIDGES, A.R.; OWEN, M.D. The morphology of the honey bee (*Apis mellifera* L.) venom gland and reservoir. **Journal of Morphology**, New York, US: Alan R. Liss, v.181, p. 69-86, 1984.

BUENO, O.C. **Estudo do sistema neuroendócrino de *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1807) durante o desenvolvimento pós-embrionário (Hymenoptera: Apidae)**. 1977. 96f. Dissertação (Mestrado em Zoologia), Instituto de Biociências, USP, São Paulo, SP, 1977.

CAMARGO, J.M.F.; STORT, A.C. **A abelha *Apis mellifera* Linnaeus**. 2. ed. rev. São Paulo: EDART, 1973. 79 p.

COSENZA, G.W. Comportamento e produtividade da abelha africana e suas híbridas. **Serviço de Pesquisa e Extensão de Sete Lagoas**, Sete Lagoas, MG, v. 19, p. 1-8, 1972.

CRUZ-LANDIM, C.; KITAJIMA, E.W. Ultraestrutura do aparelho venenífero de *Apis* (Hymenoptera, Apidae). **Memórias do Instituto Butantan. Simpósio Internacional**, São Paulo, SP: Instituto Butantan, v. 33, n. 3, p. 701-710, 1966.

CRUZ-LANDIM, C.; BALDISSERA, S. Diferenças entre as glândulas veneníferas da rainha e das operárias de *Apis mellifera* Linné. **Ciência e Cultura**, São Paulo, SP: Sociedade Brasileira para o Progresso DA Ciência, v. 19, n. 3, p. 556-561, 1967.

CRUZ-LANDIM, C.; BALDISSERA, S.; BEIG, D. Degeneração da glândula de veneno em operárias de *Apis* durante o verão e inverno. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, RJ: Academia Brasileira de Ciência, v. 27, n. 4, p.355-361, 1967

CYMBOROWSKY, B.; STOLARZ, G. The role of juvenile hormone during larval-pupal transformation of *Spodoptera littoralis*: switchover in the sensitivity of the prothoracic gland to juvenile hormone. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, Inglaterra, GB: Pergamon Press, v. 25, p. 939-942, 1979.

DE JONG, D. Current knowledge and open questions concerning reproduction in the honeybee mite *Varroa jacobsoni*. In: Engels, W. (Editor) **Advances in Invertebrate Reproduction**. 3ed. Elsevier, Amsterdam, 1984. p. 547-552.

DE KORT, C.A.D.; WIETEN, M.; KRAMER, S.J.; GOEWIE, E. Juvenile hormone degradation and carrier proteins in honey bee larvae. **Proceedings of the Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen**, Amsterdam, HO, v. 80C, p. 297-301, 1977.

DOOLITTLE, G.M.N.G.M. Doolittle's queen rearing methods. **American Bee Journal**, Hamilton, Ill., US: Dadant & Sons, v. 39, n. 28, p. 435-436, 1899.

D'ROZÁRIO, A.M. On the development and homologies of the genitalia and their ducts in Hymenoptera. **Transactions of the Royal Entomological Society of London**, London, GB: Royal Entomological Society, v. 92, n. 2, p. 363-415, 1942.

DUFOUR, L. **Reserches anatomiques et physiologiques sur les orthoptères, les hyménoptères et les névroptères, 1835**. Mémoires Presentes par Divers Savants a l'Académie Royale de Sciences de l'Institut de France. Paris, 647p. 1941.

ELEKONICH, M.M.; SCHULZ, D.J.; BLOCH, G.; ROBINSON, G.E. Juvenile hormone levels in honey bee (*Apis mellifera* L.) foragers: foraging experience and diurnal variation. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, Inglaterra, GB: Pergamon Press, v. 47, p. 1119-1125, 2001.

FARINHA, E.K.; TORNEIROS, L.M.; SILVA DE MORAES, R.L.M.; CRUZ-LANDIM, C. Influência hormonal sobre o conteúdo de DNA nas células da glândula salivar larval de *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. (Apidae, Meliponinae). I. Hormônio Juvenil. **Naturalia**, São Paulo, SP: Universidade Estadual Paulista, v. 13, p. 75-83, 1988.

FERREIRA, A.; CAMARGO, J.M.F. Notas sobre o ferrão, suas glândulas e estruturas anexas em *Oxaea flavencens* Klug (Hymenoptera, Apoidea). **Boletim do Instituto de Angola**, Luanda, AO: Instituto de Angola, v. 21/23, p. 1-13, 1965.

FIRSOV, V.S. Genetica, selection y reproduccion de la abeja. **Simpósio de Biología Apícola**, Moscou (URSS). Editorial Apimondia, Bucarest, 1976.

FLURI, P.; LÜSCHER, M.; WILLW, H.; GERIG, L. Changes in weight of the pharyngeal gland and haemolymph titres of juvenile hormone, protein and vitellogenin in workers honey bees. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, Inglaterra, GB: Pergamon Press, v. 28, p. 61-68, 1982.

FRISTROM, D.K.; FRISTROM, J.W. The metamorphic development of the adults epidermis. In: BATE, A.; ARIAS, M. (eds) **The development of *Drosophila melanogaster***. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 1993, p. 843-898.

GEHRING, W.J.; NÖTHIGER, R. The imaginal disc of *Drosophila*. In: COUNCE, S.J. & WADDINGTON, C.H. **Developmental systems: Insects**. Academic Press, London, 1973, p. 21-289.

GRACIOLI, L.F. **Efeito do hormônio juvenil sobre o desenvolvimento de algumas glândulas exócrinas de *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae)**. 1998. 125p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Área de Biologia Celular e Molecular), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, 1998.

HABERMANN, E. Bee and wasps venoms: the biochemistry and pharmacology of their peptides and enzymes are reviewed. **Science**, Washington, DC, US: HighWire Press, v. 177, p. 314-322, 1972.

HAMES, B.D.; RICKWOOD, D. Gel eletrophoresis of proteins: a practical approach. **IRL. Press**, p. 119:122, 1990.

HARTFELDER, K. Hormônios morfogenéticos em insetos: Fatores chaves em plasticidade de desenvolvimento e adaptação nos ciclos de vida. In: BAUER, M.E.; JECKEL-NETO, E.A. (Eds.) **Avanços em Biologia Celular**. Porto Alegre, RS. p. 79-83, 2002.

HARTFELDER, K.; ENGELS, W. Social insect polymorphism: hormonal regulation of plasticity in development and reproduction in honeybees. **Current Topics in Developmental Biology**, New York, US: Academic Press, v. 40, p. 45-77, 1998.

HEFETZ, A. The role of Dufour's gland secretion in bees. **Physiological Entomology**, Oxford, Inglaterra, GB: Blackwell Scientific Publications, v. 12, p. 243-253, 1987.

HEFETZ, A. Individual badges and specific messages in multicomponent pheromones of bees (Hymenoptera, Apidae). **Entomology General**, v. 15, p. 103-13, 1990.

HEFETZ, A.; EICKWORT, G.C.; BLUM, M.S.; CANE, J.; BOHART, G.E. A comparative study of the exocrine products of cleptoparasitic bees (*Holcoparasities*) and their hosts (*Calliopsis*) (Hymenoptera: Anthophoridae, Adrenidae). **Journal of Chemical Ecology**, New York, US: Plenum Press, Kluwer Academic Publishers, v. 8, p. 1389-1397, 1982.

HEFETZ, A.; TENGÖ, J.; LÜBKE, G.; FRANCKE, W. Inter-colonial and intra-colonial variation in Dufour's gland secretion in the Bumble bee species *Bombus hypnorum* (Hymenoptera, Apidae). In: WIESE, K. **Advances in life science: Sensory system of Arthropods**, 1993, v. 1, p. 469-480.

HERMANN, H.R.; BLUM, M.S. Defensive mechanisms in the social Hymenoptera. In: Hermann, H.R. (Ed) **Social Insects**. New York: Academic Press, 1981, v.2, p. 77-197.

JANKOVIC-HLADNI, M. Hormones and metabolism in insect stress (historical survey). In: IVANOVIC, J. & JANKOVIC-HLADNI, M. (Eds) **Hormones and metabolism in insect stress**. CRC Press, Boca Raton, Fl., 1991. p.5-26.

JASSIM, O.; HUANG, Z.Y.; ROBINSON. G.E. Juvenile hormone profiles of workers honey bees, *Apis mellifera*, during normal and accelerated behavioral development. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, Inglaterra, GB: Pergamon Press, v. 46, p. 243-249, 2000.

JAYCOX, E.R. Behavioral changes in workers honey bees (*Apis mellifera* L.) after injection with synthetic juvenile hormone (Hymenoptera, Apidae). **Journal of the Kansas Entomological Society**, Manhattan, Kan., US: Kansas Entomological Society, v. 49, p. 165-170, 1976.

JAYCOX, E.R.; SKOWRONEK, W.; GUYNN, C. Behavioral changes in workers honeybees (*Apis mellifera* L.) induced by injection of a juvenile hormone mimic. **Annals of Entomological Society of America**, College Park, Md., US: Entomological Society of America, v. 67, n. 4, p. 529-533, 1974.

KATZAV-GOZANSKY, T.; SOROKER, V.; HEFETZ, A.; COJOCARU, M.; ERDMANN, D.H.; FRANCKE, W. Plasticity of caste-specific Dufour's gland secretion in the honey bee (*Apis mellifera* L.). **Naturwissenschaften**, Belfast, Irlanda, IE: Springer Verlag, v. 84, p. 238-241, 1997.

KERR, W.E. The history of the introduction of African Bees in Brazil. **South Africa Bee Journal**, v. 39, p. 3-5, 1967.

KERR, W. E.; LELLO, Edy. Sting glands in stingless bees: A vestigial character (Hymenoptera: Apidae). **Journal of the New York Entomological Society**, New York, US: Allen Press, v. 70, p. 190-214, 1962.

KERR, W.E. et al. Biologia comparada de abelhas italianas (*Apis mellifera ligustica*), africanas (*Apis mellifera adansonii*) e suas híbridas. **In: Anais do Congresso Brasileiro de Apicultura**, v. 1, p. 151-185, Florianópolis – SC, 1970.

LAERE, O.V. Physiology of the honey bee corpora allata: 1. Studies on queens, drones and workers kept in natural conditions. **Journal of Apicultural Research**, London, GB: International Bee Research Association, v. 10, p. 119-124, 1971.

LAUTER, W.M.; VRLA, V.L. Factors influencing the formation of the venom of the honeybee. **Journal of Economic Entomology**, College Park, Md., US: Entomological Society of América, v. 32, p. 806-807, 1939.

LELLO, E. **Glândulas anexas do aparelho de ferrão das abelhas (Hymenoptera, Apoidea)**. 1968. 76f. Tese (Doutorado em Zoologia), Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Rio Claro. Rio Claro, SP.

MALASPINA, O.; STORT, A.C. Sucrose syrup-collecting behavior in Africanized and Caucasian bees and in the descendants of their crossings. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética, v. 10, n. 3, p. 459-469, 1987.

MARZ, R.; MOLLAY, C.; KREIL, G. Queen bee venom contains much less phospholipase than worker bee venom. **Insect Biochemistry**, Elmsford, NY., US: Pergamon Press, v. 1, n. 6, p. 685-690, 1981.

MASCHWITZ, U.W.; KLOFT, W. Morphology and function of the venom apparatus of insect – bees, wasps, ants and caterpillars **In: BUCHELLY, W.; BUCHELLY, E. (eds.) Venomous animals and their venoms**. New York: Academic Press, V. 3 (Chapter 44), 1971.

MATSUDA, R. **Morphology and evolution of the insect abdomen**. Oxford: Pergamon Press., 1976. 534p.

MELLO, M.L.S. A qualitative analysis of the proteins in venoms from *Apis mellifera* (including *A. m. adansonii*) and *Bombus atratus*. **Journal of Apicultural**

Research, London, GB: International Bee Research Association, v. 9, n. 3, p. 113-120, 1970.

MOREIRA, D.D.O.; DELLA LUCIA, T.M.C. The morphology of the venom gland of *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (Hymenoptera, Formicidae). **Naturalia**, São Paulo, SP: Universidade Estadual Paulista, v. 18, p. 117-121, 1993.

MORETTO, G. Possível influência genética e resistência ao ácaro *Varroa jacobsoni* em colônias de *Apis mellifera* italianas puras e africanizadas. **Anais do Encontro de Biologia de Abelhas e Outros Insetos Sociais**. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, 1993.

MYSER, W. C. The larval and pupal development of the honey bee *Apis mellifera* Linnaeus. **Annals Entomological Society of America**, College Park, Md., US: Entomological Society of America, v. 47, p. 683-711, 1954.

NABERT, A. Die corpora allata der Insekten. **Z. Wiss. Zool.**, v. 104, p. 181-358, 1913.

NELSON, D.A.; O'CONNOR, R. The venom of the honey bee (*Apis mellifera*); free amino acids and peptides. **Canadian Journal of Biochemistry**, Ottawa, CA: National Research Council of Canadá, v. 46, p. 1221-1226, 1968.

NEVES, N. A. **Desenvolvimento dos discos imaginais de operárias de *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera, Apidae) durante a fase larval**. 1984. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Área de Zoologia). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP. 1984

NIJHOUT, H.F.; WHEELER, D.E. Juvenile hormone and the physiological basis of insect polymorphism. **The Quaterly Review of Biology**, New York, US: Stony Brook Fundation, v. 57, p. 109-133, 1982.

NOCELLI, R.C.F.; ROAT, T.C.; SILVA de MORAES, R.L.M. Alterations induced by juvenile hormone in glandular cells of the *Apis mellifera* venom gland. I - Application on the larvae. **Sociobiology**, Chico, Calif., US: Califórnia State University, v. 40, n. 2, p. 457-464, 2002.

NOGUEIRA, R.H.F. **Estudo e seleção para a redução do tamanho da glândula ácida de *Apis mellifera* (abelhas africanizadas) (Hymenoptera, Apidae).** 1976. 104f. Dissertação (Mestrado em Genética), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP. Ribeirão Preto, SP, 1976.

NOGUEIRA, R.H.F. Correlação entre a agressividade e o tamanho e o tipo de glândula de veneno de *Apis mellifera*. **Ciência e Cultura**, São Paulo, SP: Sociedade para o Progresso da Ciência, v. 29, n. 7, p. 735-736, 1977.

NOGUEIRA, R.H.F. **Estudo da glândula ácida de rainhas e operárias de *Apis mellifera*.** 1979. 111f. Tese (Doutorado em Genética), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP. Ribeirão Preto, SP, 1979.

NOIROT, C.; QUENNEDEY, A. Fine structure of insect epidermal glands. **Annual Review of Entomology**, Stanford, Conn., US: Annual Reviews, v. 19, p. 61-80, 1974.

NOIROT, C.; QUENNEDEY, A. Glands, glands cells, glandular units: some comments on terminoly and classification. **Annales de La Societé Entomologique de France**, Paris, Fr: Societé Entomologique de France, v. 27, n. 2, p. 123-128, 1991.

NUÑEZ, J.A. Estudio cuantitativo del comportamiento de *Apis mellifera ligustica* Spinola, y *Apis mellifera adansonii* Latreille. Factors energeticos y informacionales condicionantes y estrategia del trabajo recolector. **Ciencia e Cultura**, São Paulo, SP: Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, v. 26, n. 8, p. 786-797, 1974.

OBERLANDER, H. The imaginal discs In: KERKUT, G.A; GILBERT, L.I. (eds.) **Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology.** Pergamon Press, Oxford, 1985, vol. 2, pp. 151-182.

O'BRIEN, D.M.; SHUEL, R.W. Influence of diet upon the development of prothoracic glands and oenocytes in females honeybee larvae. **Journal of**

Apicultural Research, London, GB: International Bee Research Association, v. 11, n. 1, p. 13-21, 1972.

OWEN, M.D. Venom replenishment, as indicated by histamine, in honey bee (*Apis mellifera*) venom. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, Inglaterra, GB: Pergamon Press, v. 24, p. 433-437, 1978.

OWEN, MD. The venom system and venom hyaluronidase of the African honey bee (*Apis mellifera adansonii*). **Toxicon**, Elmsford, NY., US: Pergamon Press, v. 21, n. 1, p. 171-174, 1983.

OWEN, M.D.; BRIDGES, A.R. Aging in the venom glands of queen and worker bees (*Apis mellifera* L.). Some morphological and chemical observations. **Toxicon**, Elmsford, NY., US: Pergamon Press, v. 14, p. 1-5, 1976.

OWEN, M.D.; BRAIDWOOD, J.L.; BRIDGES, A.R. Age-dependent changes in histamine content of venom of queen and worker bees. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, Inglaterra, GB: Pergamon Press, v. 23, p. 1031-1036, 1977.

PAES DE OLIVEIRA, V.T.; CRUZ-LANDIM, C. Experimental control of the effect of extra doses of juvenile hormone on bee development: the case of the wax glands of *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). **Sociobiology**, Chico, Calif., US: California State University, v. 38, n. 3A, p. 513-521, 2000.

PAGE, R.E.; PENG, C.Y-S. Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee *Apis mellifera*. **Experimental Gerontology**, Elmsford, NY., US: Pergamon Press, v. 36, n. 4-6, p. 695-711, 2001.

PALMA, M.S.; BROCHETTO-BRAGA, M.R. Biochemical variability between venoms from different honey-bee (*Apis mellifera*) races. **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, US: Pergamon Press, v. 106C, n. 2, p. 423-427, 1993.

PALMA, M.S.; BROCHETTO-BRAGA, M.R. Venenos de Hymenoptera sociais: coleta, composição, bioquímica e mecanismos de ação. In: BARRAVIEIRA, B.

(org.) **Venenos Animais**. Publicações Científicas, Rio de Janeiro, R.J., 1994. Capítulo 18, p. 251-258.

PALMA, M.S.; BROCHETTO-BRAGA, M.R.; CHAUD-NETTO, J.; MALASPINA, O.; OLIVEIRA, M.R. Molecular exclusion chromatography of crude venom as an auxiliary tool to identify hybrid honeybee populations. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, Botucatu, SP, v. 1, n. 1, p., 1995.

PATRICIO, E.F.L.R.A. **Glândulas de Dufour em abelhas sem ferrão**. 1994. 165 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Área de Zoologia), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, 1994.

PAWLOWSKY, E. Dês types principaux de glandes venimeuses chez lês Hymènoptères. **Reunion Biologique de Saint-Pétersbourg**, v. 1, p. 351-354, 1927.

PEARCE, A.N.; HUANG, Z.Y.; BREED, M.D. Juvenile hormone and aggression in honey bees. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, Inglaterra, GB: Pergamon Press, v. 47, p. 1243-1247, 2001.

PLETTNER, E.; OTIS, G.W.; WIMALARATNE, P.D.C.; WINSTON, M.L.; SLESSOR, K.N.; PANKIN, T.; PUNCHIHEWA, P.W.K. Species and caste-determined mandibular gland signals in honeybees (*Apis*). **Journal of Chemical Ecology**, New York, US: Plenum Press, Kluwer Academic Publishers, v. 23, n. 2, p. 363-377, 1977.

RACHINSKY, A., HARTFELDER, K. Corpora allata activity, a prime regulating element for caste-specific juvenile hormone titer in honey bee larvae (*Apis mellifera carnica*). **Journal of Insect Physiology**, Oxford, Inglaterra, GB: Pergamon Press, v. 36, n. 3, p. 189-194, 1990.

RACHINSKY, A.; STRAMBI, C.; STRAMBI, A.; HARTFELDER, K. Caste and metamorphosis: haemolymph titers of juvenile hormone and ecdysteroids in last instar honey bee larvae. **General Comparative Endocrinology**, San Diego, Calif., US: Academic Press, v. 79, p. 31-38, 1990.

RACHINSKY, A.; ENGELS, W. Caste development in honeybees (*Apis mellifera*): Juvenile hormone turns on ecdysteroids. **Naturwissenschaften**, Belfast, Irlanda, IE: Springer Verlag, v. 82, p. 378-379, 1995.

REKOS, J. Contribution to the study of the length of the venom gland of the worker honeybee. **Pol'nohospodarstvo**, v. 21, n. 7, p. 574-578, 1975.

REMBOLD, H. The role determination in the honey bee. In: LÜSCHER, M. **Phase and caste determination in insects: endocrine aspects**. Oxford: Pergamon Press, 1976. p. 21-34.

REMBOLD, H.; CZOPPELT, C.; RAO, P.J. Effect of juvenile hormone treatment on caste differentiation in the honeybee, *Apis mellifera*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, Inglaterra, GB: Pergamon Press, v. 20, p. 1193-1202, 1974.

ROAT, T.C. **Efeito do hormônio juvenil na expressão gênica: Análise do padrão eletroforético protéico das glândulas de veneno de *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) durante o desenvolvimento e ciclo secretor**. 2001. 40f. Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências Biológicas), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, 2001.

ROBERTSON, P.L. A morphological and functional study of the venom apparatus in representatives of some major groups of Hymenoptera. **Australian Journal of Zoology**, Victoria, AU: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, v. 1, p. 133-166, 1968.

ROBINSON, G.E. Effects of juvenile hormone analogue on honey bee foraging behavior and alarm pheromone production. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, Inglaterra, GB: Pergamon Press, v. 31, p. 277-282, 1985.

ROBINSON, G.E. Regulation of honey bee age polyetism by juvenile hormone. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, New York, US: Springer Verlag, v. 20, p. 329-338, 1987.

ROBINSON, G.E. Regulation of division of labor in insects societies. **Annual Review of Entomology**, Stanford, Conn., US: Annual Reviews, v. 37, p. 637-665, 1992.

ROBINSON, G.E.; RATNIEKS, F.L.W. Induction of premature honey bee (Hymenoptera; Apidae) flight by juvenile hormone analogs administered orally or topically. **Journal of Economic Entomology**, Colege Park, Md., US: Entomological Society of America, v. 80, p. 784-787, 1987.

ROBINSON, G.E.; PAGE, R.E.; STRAMBI, C.; STRAMBI, A. Hormonal regulation of behavioral integration in the honey bee colonies. **Science**, Washington, DC, US: HighWire Press, v. 246, p. 109-112, 1989.

ROBINSON, G.E.; STRAMBI, C.; STRAMBI, A.; HUANG, Z.Y. Reproduction in worker honey bee is associated with low juvenile hormone titres and rates of biosynthesis. **General Comparative Endocrinology**, San Diego, Calif., US: Academic Press, v. 87, p. 471-480, 1992.

RUTTNER, F. **Biogeography and taxonomy of honeybees**. Springer-Verlag, Berlim, Alemanha. 1988. 284 p.

RUTZ, W.; GERIG, L.; WILLIE, H.; LÜSCHER, M. The function of juvenile hormone in adult worker honey bees, *Apis mellifera*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, Inglaterra, GB: Pergamon Press, v. 22, p. 1485-1491, 1976.

SALLES, H.C. **Desenvolvimento da glândula mandibular durante a pupação de operárias de *Apis mellifera* L. 1758 (Hymenoptera, Apidae) e influência do hormônio juvenil**. 2000. 94f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Área de Biologia Celular e Molecular). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, 2000.

SCHOETERS, E.; BILLEN, J. Morphology and ultrastructure of a secretory region enclosed by the venom reservoir in social wasps (Insect, Hymenoptera). **Zoomorphology**, Berlin, DE: Springer Verlag, v. 115, p. 63-71, 1995.

SCHOETERS, E.; BILLEN, J. Venom gland ontogeny in Formicinae, with special reference to the pulvinate convoluted gland (Hymenoptera, Formicidae). **Zoomorphology**, Berlin, DE: Springer Verlag, v. 118, p. 245-253, 1998.

SCHULZ, D.J.; ROBINSON, G.E. Biogenic amines and division of labor in honey bee colonies: Behaviorally related changes in the antennal lobes and age-related changes in the mushroom bodies. **Journal of Comparative Physiology**, Berlin, DE: Springer Verlag, v. A184, p. 481-488, 1999.

SCHULZ, D.J.; SULLIVAN, J.P.; ROBINSON, G.E. Juvenile hormone and octopamine in the regulation of division of labor in honey bee colonies. **Hormones and Behavior**, San Diego, Calif., US: Academic Press, v. 42, p. 222-231, 2002.

SCHUMACHER, M.J.; SCHMIDT, J.O.; EGEN, N.B.; DILLON, K.A. Biochemical variability of venoms from individual European and Africanized honeybees (*Apis mellifera*). **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, Saint Louis, Mo., US: CV Mosby, v. 90, n. 1, p. 59-65, 1992.

SHIPMAN, W.H. Separation of the components of Brazilian Bee venom: a preliminary report. **American Bee Journal**, Hamilton, Ill., US: Dadant & Sons, v. 15, n. 2, p. 56-59, 1975.

SILVEIRA, O.T.; CAETANO, F.H. A morphometric study of sting glands in vespid wasps (Hymenoptera, Vespidae). **Sociobiology**, Chico, Calif., US: California State University, v. 23, n. 1, p. 45-62, 1993.

SMITH, B.H.; GARLSON, R.G.; FRAZIER, J. Identification and bioassay of macrocyclic lactone sex pheromone of the halictine bee *Lasioglossum zephyrum*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, US: Plenum Press, Kluwer Academic Publishers, v. 11, p. 1147-1456, 1985.

SNODGRASS, R.E. **Anatomy of the honey bee**. Condtock Publishing Associate. New York, 1956. 334p.

STORT, A.C. **Estudo genético da agressividade de *Apis mellifera***. 1971. Tese (Doutorado em Genética). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Araraquara, SP, 1971

STORT, A.C. Relações entre caracteres do comportamento agressivo e caracteres morfológicos de abelhas do gênero *Apis*. **Homenagem à Warwick E. Kerr**. Rio Claro, SP, 1972. p. 275-283.

SULLIVAN, J.P.; JASSIM, O.; FAHRBACH, S.E.; ROBINSON, G.E. Juvenile hormone paces behavioral development in the adult worker honey bee. **Hormones and Behavior**, San Diego, Calif., US: Academic Press, v. 37, p. 1-14, 2000.

SVÁCHA, P. What are and what are not imaginal discs: reevaluation of some concepts (Insect, Holometabola). **Developmental Biology**, New York, US: Academic Press, v. 154, p. 101-117, 1992.

USUI, K.; SIMPSON, P. Cellular basis of the dynamic behavior of the imaginal thoracic discs during *Drosophila* metamorphosis. **Developmental Biology**, New York, US: Academic Press, v. 225, p. 13-25, 2000.

VINSON, S.B.; FRANKIE, G.W.; BLUM, M.S.; WHEELER, J.W. Isolation, identification and function of the Dufour's gland secretion of *Xylocopa virginica texana* (Hymenoptera: Anthophoridae). **Journal of Chemical Ecology**, New York, US: Plenum Press, Kluwer Academic Publishers, v. 4, p. 315-323, 1978.

WAGENER-HULME, C.; KUHEN, J.C.; SCHULZ, D.J.; ROBINSON, G.E. Biogenic amines and division of labor in honey bee colonies. **Journal of Comparative Physiology**, Berlin, DE: Springer Verlag, v. A184, p. 471-479, 1999.

WIGGLESWORTH, V.B. Juvenile hormone and pattern formation. In: KERKUT, G.A and GILBERT, L.I. (eds) **Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology**. Pergamon Press, Oxford, 1985. vol. 2, p. 187-202.

WIRTZ, P. Differentiation in the honey bee larvae. **Commun. Agric. Univ. Wageningen**, v. 73, n. 5, p. 1-155, 1973.

WIRTZ, P.; BEETSMA, J. Induction of caste differentiation in the honeybee (*Apis mellifera* L.) by juvenile hormone. **Entomology Experimental et Applied**, v. 15, p. 517-520, 1972.

8. RESUMO

Neste estudo foram analisados, histologicamente, o desenvolvimento pós-embriônico das glândulas de veneno e de Dufour, bem como os efeitos da aplicação tópica de hormônio juvenil, sobre a glândula de veneno do híbrido de *Apis mellifera* L., conhecido como abelha africanizada. Análises morfométricas comparativas das glândulas de veneno e de Dufour e bioquímicas da glândula de veneno da abelha africanizada e de três subespécies, *A. m. ligustica*, *A. m. carnica* e *A. m. caucasica*, foram, também, realizadas.

As análises histológicas do desenvolvimento pós-embriônico mostraram que existem três pares de discos imaginiais presentes no 7º, 8º e 9º segmentos larvais. Durante a metamorfose o par de discos do 7º segmento forma a placa subgenital, aquele do 8º origina as lancetas do ferrão e o par presente no 9º segmento origina as glândulas de veneno e de Dufour, além dos palpos do ferrão e bainha.

Conforme mostrado histologicamente, as transformações glandulares que ocorrem durante a metamorfose, não foram influenciadas pelo hormônio juvenil exógeno, mas houve aceleração do ciclo secretor glandular em relação ao controle, em todas as idades analisadas nas glândulas de operárias que receberam aplicação de hormônio juvenil diluído em hexano e de hexano puro, durante o 5º estágio e na emergência. Estes dados indicam que o hormônio juvenil atua sobre a glândula de veneno e que esta atuação pode estar sendo potencializada pelo solvente utilizado.

As análises morfométricas e bioquímicas comparativas da glândula de veneno mostraram que, as glândulas de abelhas africanizadas, tanto de operárias quanto de rainhas, apesar de maiores do que as das subespécies, possuem menor teor de proteína total. O perfil eletroforético protéico de tais glândulas revelaram que a única diferença entre as operárias ocorreu nas recém-emergidas de *A. m. caucasica* que não apresentaram a banda com peso molecular de 105,4 kDa. Entre as rainhas, somente uma banda, a de 161,3 kDa, não foi encontrada em rainhas de *A. m. ligustica*.

De acordo com as análises morfométricas da glândula de Dufour houve, nas abelhas africanizadas, um aumento gradativo no comprimento, de recém-

emergida para campeira, indicando que a glândula encontra-se mais desenvolvida nestas operárias, e de rainhas virgens para fecundadas.

9. SUMMARY

The present histological investigation analyzed the post-embryony development of the Dufour and venom glands, as well as the juvenile hormone effect on the venom gland in *Apis mellifera* hybrids, which are also known as Africanized bees. Comparative morphometric and biochemical analyses of the venom gland in Africanized bee and in three subspecies, *A. m. ligustica*, *A. m. carnica* and *A. m. caucasica*, were also done.

The histological post-embryony development results showed three pair of imaginal discs present in segments 7th, 8th and 9th. During the metamorphosis, the pair of imaginal discs of segment 7th originates the subgenital plate, those of segment 8th originates the sting lancets and the pair of segment 9th originates the Dufour and venom glands, besides originates the oblong plates and sheath lobes of the sting.

As shown by the histology, the glandular changes that occur in the venom gland during metamorphosis of workers treated with diluted juvenile hormone and pure hexane during 5th instars and emergence are not influenced by the exogenous juvenile hormone, but there was an increasing of the glandular cycle in relationship to the control. These data suggest that the juvenile hormone actuate on the venom gland and the solvent used may enhance such juvenile hormone action.

The comparative morphometric and biochemical analyses of the venom gland showed that although the Africanized bee glands are larger than the subspecies, both workers and queens presented less amount of total protein. The eletrophoretic profile of the venom glands showed that, among workers, only *A. m. caucasia* does not present the 105.4 kDa band. Among queens, only *A. m. ligustica* does not present the 161.3 kDa band.

The morphometric analyses showed a gradual increasing of the Dufour's gland length from newly emerged to forager workers, and from virgin to fecundated queens, indicating that the venom gland is more developed in forager workers and in fecundated queens.