

EDMILSON AMARAL DE SOUZA

**HISTOLOGIA E HISTOQUÍMICA DO APARELHO REPRODUTOR DE
Melipona quadrifasciata anthidioides (HYMENOPTERA, APIDAE) EM
RAINHAS
VIRGENS E COPULADAS**

Dissertação apresentada
à Universidade Federal de
Viçosa, como parte das
exigências do Programa de
Pós-graduação em Biologia
Celular e Estrutural, para
obtenção do título de “Magister
Scientiae”.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2006**

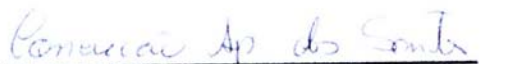
EDMILSON AMARAL DE SOUZA

HISTOLOGIA E HISTOQUÍMICA DO APARELHO REPRODUTOR DE *Melipona*
quadrifasciata anthidioides (HYMENOPTERA, APIDAE) EM RAINHAS
VIRGENS E COPULADAS

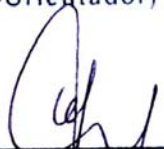
Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-graduação em
Biologia Celular e Estrutural, para
obtenção do título de "Magister
Scientiae".

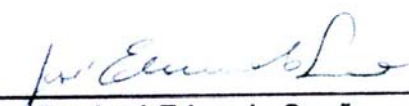
APROVADA: 24 de julho de 2006


Dr. Clóvis Andrade Neves
(Co-Orientador)


Dr. Conceição Aparecida dos Santos


Dr. Lucio Antonio de Oliveira Campos
(Co-Orientador)


Dr. Dejarir Message


Dr. José Eduardo Serrão
(Orientador)

Dedico à minha amada família.
Meus pais José Luiz e Eunice e aos
meus irmãos, Rodrigo e Patrícia.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me conceder estes anos inesquecíveis em Viçosa, não só pelo título, mas principalmente pelas amizades sinceras que fiz e que ficarão para sempre.

À minha família pelo amor, carinho e compreensão.

Ao meu orientador José Eduardo Serrão pelos ensinamentos, incentivo, paciência, confiança e principalmente, pela amizade.

Aos meus conselheiros Prof^o Clóvis Andrade Neves e Prof^o Lúcio Antonio de Oliveira Campos pela disponibilidade, paciência e pelas valiosas sugestões.

À minha namorada Luciane por estar sempre ao meu lado com seu carinho, compreensão e incentivo.

Ao meu amigo Max pelos conselhos e por estar sempre disposto a ajudar.

Aos meus amigos da graduação, em especial a Nawana, Ivan, Gustavo, Camilah e Davison que apesar da distância estão sempre presentes em minha vida.

Aos amigos do laboratório de biologia celular e biofísica: Acácia, Ana Lúcia, Carolina, Cirlei, Conceição, Dihego, Letícia, Madu, Maria Ignez, Milton, Simone, Solange, Rayane, Taiane pelo convívio agradável.

Ao laboratório de Biologia Estrutural: aos prof^o Lino, Izabel, Adilson e Sérgio e aos amigos Vinícius, Jaqueline, Marcos, Edson, Sirlene, Rejane, Claudinha, Frederico e Denilce pelo apoio.

Aos amigos da pós-graduação da Entomologia, especialmente ao João Clóvis e Anna Frida pela força.

À minha amiga Roberta pelos momentos agradáveis e divertidos.

Às secretárias do Departamento de Biologia Geral: Rosemary, Salvadora e Diana que sempre me atenderam com a maior boa vontade.

Aos técnicos dos laboratórios de biologia celular, biologia estrutural e apiário: José Luiz Monteiro, Alex, Íris e Geraldo pela disponibilidade.

Agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa pelo ensino de qualidade.

À Capes pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1 – Introdução Geral	1
2 – Referências Bibliográficas	7
3 – Artigos	12
3.1 - Influência da cópula na fertilidade de rainhas de <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i> (Hymenoptera: Apidae)	13
3.2 – Efeito da cópula no desenvolvimento da espermateca de rainhas de <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i> (Hymenoptera, Apidae)	35
4 – Conclusão Geral	54

RESUMO

SOUZA, Edmilson Amaral, M.S., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2006. **Histologia e Histoquímica do Aparelho Reprodutor de *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera, Apidae) em Rainhas Virgens e Copuladas.** Orientador: José Eduardo Serrão. Co-Orientadores: Clóvis Andrade Neves e Lucio Antonio de Oliveira Campos

Dada a importância ecológica, econômica e do risco de extinção que os Meliponini vem sofrendo, muitos trabalhos foram desenvolvidos em busca do entendimento da biologia reprodutiva desse grupo. A importância da cópula para o desenvolvimento dos ovários e maturação dos ovócitos nos insetos tem sido investigada, mas há poucos trabalhos enfatizando as conseqüências da ausência da cópula no aparelho reprodutor destes. Nesta dissertação, descrevemos as alterações provocadas pela ausência da cópula e suas conseqüências através da histologia e teste histoquímicos no aparelho reprodutor de rainhas de *Melipona quadrifasciata anthidioides*. Os resultados contribuíram para o conhecimento da biologia reprodutiva desta espécie, como o tempo máximo que uma rainha pode permanecer virgem com seus ovários viáveis e a importância da cópula para o desenvolvimento da espermateca. Os ovários das rainhas virgens de *M. quadrifasciata anthidioides* permanecem no estado pré vitelogênico e estas a partir de 15 dias de idade apresentam sinais de degeneração ovariana. Entretanto, seus ovários permanecem viáveis se copuladas com até 25 dias de idade. O desenvolvimento da espermateca e a atividade secretora das suas glândulas também são influenciadas pela ausência de cópula. Espermatecas de rainhas fisogástricas apresentam epitélio mais espesso e maior volume do que nas rainhas virgens. Nas glândulas, grânulos contendo proteínas e polissacarídeos são identificados em rainhas fisogástricas, enquanto que em rainhas virgens os grânulos protéicos não são encontrados e os grânulos de polissacarídeos tornam-se escassos com o avançar da idade.

ABSTRACT

SOUZA, Edmilson Amaral, M.S., Universidade Federal de Viçosa, July, 2006.
Histology and Histochemistry of the Reproductive Tract of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera, Apidae) in Virgin and Physogastric Queens. Adviser: José Eduardo Serrão. Co-Advisers: Clóvis Andrade Neves and Lucio Antonio de Oliveira Campos

Due to the economic and ecological importance, and the extinction risk that Meliponini is experiencing, many works were developed in search of understanding of reproductive biology of these bees. The importance of the mating for ovaries development and oocytes maturation in insects has been investigated, but there are few research concerning the consequences of the mating delay in the reproductive tract morphology. Here the morphological alterations caused for the mating delay in the reproductive tract of the *Melipona quadrifasciata anthidioides* queens were described. The ovaries of the *M. quadrifasciata anthidioides* virgin queens remain in previtellogenic phase and from 15 days old they show degeneration signs. However, their ovaries are viable if the queen mates until 25 days old. The spermathecae of the physogastric queen has an well-developed epithelium other than virgin queens. In spermathecal glands, granules containing proteins and polysaccharides are identified in physogastric queens while in virgin queens the protein granules are lacking and the polysaccharide granules become fair as the time goes on.

1 - Introdução Geral

As abelhas apresentam vários padrões com relação à sociabilidade. Existem espécies de abelhas que vão desde solitárias até o mais complexo nível de organização social.

Michener (1974) descreve os níveis de sociabilidade, levando em consideração características fundamentais que indicam a ocorrência de comportamento social entre os indivíduos do grupo, como: divisão de tarefas (que pode ser somente comportamental ou chegar a ser morfológica e fisiológica); sobreposição de gerações, onde a fêmea convive com a sua prole; e, a capacidade de coletar e guardar provisões dentro dos ninhos. As abelhas solitárias, não formam colônias. A fêmea fecundada constrói sozinha as células de cria, aprovisiona e deposita nelas seus ovos. Não existe entre esta fêmea e sua prole qualquer contato. A maioria das espécies de abelhas solitárias possui somente uma geração por ano. As abelhas parassociais apresentam colônias pequenas com abelhas adultas de uma única geração, de indivíduos adultos. A relação entre indivíduos de colônias parassociais é simples, mas algumas espécies apresentam atividade cooperativa e divisão de trabalho entre as fêmeas adultas. Algumas vezes mais de uma delas se reproduz no mesmo período, sendo todas férteis. As abelhas subsociais consistem de grupos com uma fêmea adulta que cuida e alimenta a prole imatura. Neste caso, não há divisão de trabalho entre adultos e a fêmea (mãe) morre antes ou durante o tempo em que a cria alcança a maturidade. Porém, diferente das abelhas solitárias, a mãe mantém contato com a cria, embora este contato seja restrito à fase imatura. As abelhas eussociais possuem um nível de organização mais elevado, geralmente apresentando uma rainha com função reprodutiva e o restante da colônia de operárias, com as demais funções da colônia; duas gerações de indivíduos adultos, do mesmo sexo.

O grupo eussocial pode ser dividido em primitivamente e altamente eussocial. As castas de espécies primitivamente eussociais são muito semelhantes em sua morfologia externa com exceção à alometria macrocefálica de rainhas de poucas espécies (Quénu, 1957; Sakagami & Fukushima, 1961; Sakagami & Hayashida, 1968; Sakagami & Moure, 1965; Sakagami & Wain, 1966). Geralmente, mas nem sempre, as castas diferem no seu tamanho médio. Para a maioria das espécies, as castas diferem no desenvolvimento ovariano e atributos comportamentais. Em

Lasioglossum zephyrum, não há divisão de castas, mas há uma variação contínua no comportamento e fisiologia. Nas espécies do gênero *Bombus*, as rainhas da maioria das espécies são maiores e em algumas espécies possuem coloração divergente das operárias. As rainhas de abelhas primitivamente eussociais são equipadas na morfologia e no comportamento para viverem sozinhas e estabelecer uma nova colônia. Depois do estabelecimento da nova colônia a divisão de tarefas se estabelece. O alimento, geralmente, é armazenado nas células de cria para o crescimento das larvas.

De acordo com Michener (2000), as abelhas altamente eussociais estão divididas em dois grupos: as abelhas sem ferrão (tribo Meliponini) e as abelhas melíferas (tribo Apini, gênero *Apis*).

Nas colônias de espécies altamente eussociais, a integração é complexa e envolve uma variedade de padrões comportamentais, feromônios, e adaptações fisiológicas. As colônias sobrevivem por muito tempo através de armazenamento de alimento no ninho, mas não nas células de cria como acontece com as espécies primitivamente eussociais. A sobreposição de gerações e divisão de trabalho também são características marcantes das abelhas altamente eussociais.

As castas das abelhas altamente eussociais são extremamente diferentes umas das outras, não só no comportamento, na fisiologia, e usualmente no tamanho do corpo, mas também em estruturas externas. As rainhas não possuem estruturas para a coleta e manipulação de pólen e nem o comportamento de forrageamento. São incapazes de sobreviver por um longo período fora da colônia e também não apresentam comportamento de defesa contra inimigos, e apresentam ovários desenvolvidos. As operárias apresentam estruturas para coleta e manipulação de pólen, comportamento de forrageamento e de defesa na presença de inimigos. Os ovários das operárias geralmente são delgados e podem em algumas circunstâncias se desenvolver, produzindo ovos tróficos que irão alimentar a rainha ou ovos que darão origem a machos.

As operárias de *Apis mellifera* podem desenvolver seus ovários em colméia órfã ou quando a população está muito grande (Groot & Voogd, 1954). Nos Meliponini, várias espécies apresentam ovários desenvolvidos mesmo em colméia com rainha (Sakagami *et al.*, 1963).

Em algumas espécies dois tipos de ovos são produzidos pelas operárias (Staurengo da Cunha, 1978; Cruz-landim, 2000). Entretanto, algumas espécies

produzem somente ovos que dão origem a machos, como é o caso em *Friesella schrottkyi* (Camillo-Atique, 1977). Enquanto operárias de algumas espécies (aparentemente todas as espécies do gênero *Friesemelitta* e *Duckeola ghiliani*) nunca desenvolvem ovários (Sakagami *et al.*, 1963; Sakagami & Zucchi, 1968).

Em *A. mellifera*, o controle do desenvolvimento do ovário é determinado pela quantidade e qualidade de alimento, sendo que as operárias sofrem uma castração alimentar (Michener, 1974). Por outro lado, nos Meliponini, o mecanismo para determinação de castas parece ser uma indução no desenvolvimento dos ovários nas larvas que recebem uma quantidade extra de alimento, principalmente nas espécies com determinação de castas trófica (Cruz-Landim, 2000).

A determinação de castas nos Apidae pode ser de origem trófica ou trofogenética. As diferenças entre as castas decorrentes das diferenças alimentares, ou seja, na quantidade ou na qualidade do alimento ingerido ou ambas é conhecida como determinação trófica (Camargo, 1972; Campos, 1975; Campos & Coelho, 1993; Buschini & Campos, 1995).

Na determinação trofogenética, os ovos que originam operárias e rainhas trazem informações genéticas diferentes, e sua expressão é influenciada pela quantidade de alimento ingerida pela larva. Em espécies do gênero *Melipona*, onde as células de cria são todas do mesmo tipo e volume, sem a ocorrência de células reais, a determinação ocorre desta maneira. Isto se deve ao fato de que a determinação de castas em *Melipona* ocorre através de uma interação genética e ambiental, e a quantidade de alimento necessária à produção de rainha difere muito pouco daquela em que se produz operárias (Kerr, 1950; Kerr *et al.*, 1966; Camargo, 1973). As rainhas resultam de larvas duplo heterozigotas, adequadamente alimentadas, ao passo que as operárias resultam de larvas homozigotas ou heterozigotas subalimentadas (Kerr, 1973).

O sistema reprodutor feminino das abelhas é constituído por um par de ovários conectados por dois ovidutos laterais e estes a um oviduto comum, e uma espermateca (Snodgrass, 1956).

Os ovários dos insetos são formados por várias unidades funcionais denominadas ovaríolos, sendo que o número destes por ovário varia em relação ao tamanho e estilo de vida, bem como sua posição taxonômica (Snodgrass, 1935, 1956; Chapman, 1998).

Os ovariolos são divididos em duas categorias: panoístico, quando não existem células nutridoras; e meroístico, quando células nutridoras ou trofócitos estão presentes (Snodgrass, 1935). Ovariolos meroísticos podem ainda ser divididos em dois grupos: telotrófico, quando as células nutridoras permanecem no germário, e politrófico, quando as células nutridoras estão associadas a cada ovócito (Snodgrass, 1956; Chapman, 1998).

Os Hymenoptera juntamente com outros insetos holometábolos apresentam ovariolos meroísticos politróficos. A maioria das espécies dos gêneros Coleoptera e Siphonatera, apesar de serem holometábolos, não apresentam ovariolos meroísticos politróficos.

Basicamente, os ovariolos funcionais podem ser divididos nas seguintes porções: filamento terminal, formado pelas membranas peritoneais e por tecido conectivo, oriundo de cada porção distal dos ovariolos; germário, porção do ovariolo onde se encontram as células primordiais ou ovogônias e onde se inicia a diferenciação entre as células trofocitárias e ovócito; e vitelário, porção do ovariolo relativamente extensa, cujo tamanho depende da atividade da produção de ovócitos e que se caracteriza pela presença de folículos formados pela câmara trofocitária e câmara ovocítica recobertas por células foliculares, sendo que nesta região ocorre o amadurecimento do óvoco, deposição de vitelo (vitelogênese) e formação do cório ou casca (coriogênese) (Snodgrass 1956; Zacaro, 1996; Chapman, 1998).

Existe variação entre o número de ovariolos nas abelhas. Durante a evolução das abelhas sociais, essa diferença surgiu entre as castas, rainhas e operárias. Em *A. mellifera*, rainhas possuem mais de 100 ovariolos por ovário (Cruz-Landim *et al.*, 1998). Snodgrass (1956) relatou 160 a 180 ovariolos em cada ovário de *A. mellifera*, enquanto o número de ovariolos em operárias raramente alcança o número de 20. Não somente o número de ovariolos é maior em rainhas, como também seu comprimento em relação aos das operárias. Além disso, são funcionais, enquanto nas operárias eles estão inativos na presença da rainha (Cruz-Landim *et al.*, 1998).

Enquanto em *A. mellifera* o sucesso reprodutivo é alcançado através do aumento do número e comprimento dos ovariolos (Morini & Bueno, 1995), em Meliponini ele é alcançado principalmente, pelo maior comprimento dos ovários, pois estas abelhas apresentam diferenças no desenvolvimento dos ovários entre rainhas e operárias, mas a diferença numérica dos ovariolos não é grande. A

diferença está mais relacionada com o comprimento dos ovaríolos do que com o seu número (Cruz-Landim *et al.*, 1998).

Melipona quadrifasciata anthidioides apresenta quatro ovaríolos por ovário, tanto em operárias quanto em rainhas. A diferença encontrada foi somente no maior comprimento dos ovaríolos das rainhas (Cruz-landim *et al.*, 1998; Martins & Serrão, 2004).

A espermateca, órgão de origem ectodérmica, consiste de uma bolsa formada por um epitélio de camada única de células associada a um ducto muscular. Este órgão é responsável por armazenar espermatozóides do tempo em que a fêmea foi inseminada até os ovócitos serem fertilizados. Associada à espermateca existe um par de glândulas (Snodgrass, 1956). Em *Apis mellifera*, essas glândulas são constituídas de dois túbulos que se unem e desembocam no ducto que liga a espermateca à vagina (Dallai, 1975). Sua secreção pode estar envolvida na ativação ou nutrição dos espermatozóides (Flanders, 1939; Snodgrass, 1933) ou servir simplesmente para lubrificar o ducto da espermateca (Van Wick, 1952).

Dada a importância ecológica, econômica e do risco de extinção que os Meliponini vem sofrendo, a biologia reprodutiva desse grupo tem sido investigada. Em *Melipona quadrifasciata*, a biologia reprodutiva foi investigada por vários autores (Camargo, 1976; Kerr & Krause, 1950; Kerr *et al.*, 1962; Silva *et al.*, 1972; Melo *et al.*, 2001; Martins & Serrão, 2004).

Em uma colméia de *M. quadrifasciata anthidioides* onde existe rainha fisogástrica, todas as rainhas que nascem são mortas pelas operárias, enquanto que em uma colméia órfã, uma rainha sobrevive e realiza o vôo nupcial e as demais são mortas (Silva *et al.*, 1972). Para acontecer a cópula, os machos devem atingir o estado de maturidade sexual, que para esta espécie ocorre a partir dos nove dias de idade, quando os espermatozóides já migraram para a vesícula seminal. Nas rainhas, a idade ideal para o acasalamento está em torno de dois a seis dias de idade (CAMARGO, 1976).

A cópula em *M. quadrifasciata anthidioides* ocorre de forma semelhante à de *A. mellifera*, onde o macho fica sobre a rainha (Herrod-Hempsall, 1937; Gary, 1963). Com as patas posteriores o macho prende suas garras no VII tergo abdominal da rainha, puxa-o para cima e introduz a cápsula genital na câmara genital da rainha. Em seguida, o macho se locomove para frente e deixa toda a cápsula genital

juntamente com as vesículas seminais na câmara genital da fêmea (Camargo, 1976).

Após o vôo nupcial, as rainhas de *M. quadrifasciata anthidioides* retornam com a genitália masculina em sua câmara genital (Kerr & Krause, 1950), e estas só copulam com um único macho (Kerr *et al.*, 1962; Kerr, 1973).

Após a cópula, os ovaríolos das rainhas de *M. quadrifasciata anthidioides* são ativados e o processo de ovogênese é concluído. Alterações na espermateca também são observadas, sendo que o epitélio da parede apresenta-se mais espesso em rainhas copuladas do que em rainhas virgens. Entretanto, os ovaríolos das rainhas virgens não completam o processo de ovogênese, sendo interrompido antes do início do processo da vitelogênese (Martins & Serrão, 2004).

O atraso na cópula provoca alterações nos ovaríolos de *M. quadrifasciata anthidioides*, quando rainhas virgens com quinze dias de idade começam a apresentar reabsorção de ovócitos e células nutridoras (Martins & Serrão, 2004). Entretanto não há dados sobre se essa reabsorção dos folículos pode causar esterilidade em rainhas com mais de 15 dias de idade. Desta maneira, este trabalho avaliou modificações nos ovários e espermatecas de rainhas virgens com até 30 dias de idade para testar a hipótese de que a ausência de cópula pode causar esterilidade nestas rainhas.

2 – Referências Bibliográficas

Buschini, M.L.T. & Campos, L.A.O. 1995. Caste determination in *Trigona spinipes* (Hymenoptera, Apidae): Influence of the available food and juvenile hormone. **Rev. Bras. Biol.** 55: 121-129.

Camargo, C. A. 1972. Determinação de castas em *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera, Apidae). **Rev. Bras. Biol.** 32: 133-138.

Camargo, C.A. 1973. Aspectos da reprodução dos apídeos sociais. Ribeirão Preto, USP, Faculdade de Medicina. 63p. **Dissertação de mestrado.**

Camargo, C.A. 1976. Determinação do sexo e controle de reprodução em *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera, Apidae). Ribeirão Preto, USP, Faculdade de Medicina. 140p. **Tese de Doutorado.**

Camillo-Atique. 1977. Estudo da variabilidade etológica de *Friesella* incluindo a caracterização de espécies crípticas. FMRP-USP. 203p. **Tese de doutorado.**

Campos, L.A.O. 1975. Determinação de casta no gênero *Melipona* (Hymenoptera, Apidae): Papel do hormônio Juvenil. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 48p. **Dissertação de Mestrado.**

Campos, L.A.O. & Coelho, C.D.P. 1993. Determinação de sexo em abelhas. XXX. Determinação de castas em *Partamona cupira helleri* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Rev. Bras. Zool.** 10: 449-452.

Chapman. R.F. 1998 **The Insects: Structure and Function.** American Elsevier Publishing Company, New York. 770p.

Cruz-Landim, C. (2000). Ovarian development in meliponinae bees (Hymenoptera: Apidae): the effect of queen presence and food on worker ovary development and egg production. **Genet. Mol. Biol.** 23:83-88.

Cruz-Landim, C.; Reginato, R.D. & Impertariz-Fonseca, V.L. 1998. Variation on ovariole number in Meliponinae (Hymenoptera, Apidae) queen's ovaries, with comments on ovary development and caste differentiation. **Pap. Avul. Zool**, 40:289-296.

Dallai, R. 1975. Fine structure of the spermatheca of *Apis mellifera*. **J. Insect Physiol.** 21: 89-109.

Flanders, S.E. 1939. Environmental control of sex in hymenopterous insects. **Ann. Entomol. Soc. Amer.** 32: 11-26.

Gary, N.E. 1963. Observations of mating behavior in the honey bee. **Science** 133: 773-774.

Groot, A.P. & Voogd, S. 1954. On the ovary development in queenless worker bees (*Apis mellifera* L.). **Experientia** 10: 384-385

Herrod-Hempsall, W. 1937. Bee-keeping new and old. **Br. Bee J.** 2: 1615-1640.

Kerr, W.E. 1950. Genetic determination of castes in the genus *Melipona*. **Genetics** 35: 143-152.

Kerr, W.E. 1973. Genética e biologia das abelhas. **Ciênc. Cult.** 25: 927-934.

Kerr, W.E. & Krause, W. 1950. Contribuição para o conhecimento da bionomia dos Meliponini. Fecundação da rainha em *Melipona quadria fasciata* Lep. (Hymenop. Apoidea). **Dusenias**. 1: 275-282.

Kerr, W.E.; Stort, A.C.; Montenegro, M.J. 1966. Importância de alguns fatores ambientais na determinação das castas no gênero *Melipona*. **Anais Acad. Bras. Ciênc.** 38: 149-168.

Kerr, W.E.; Zucchi, R.; Nakadaira, J.T.; Butolo, J.E. 1962. Reproduction in the social bees (Hymenoptera: Apidae). **J. New York Entomol. Soc.** 70: 265-276.

Martins, G.F. & Serrão, J.E. 2004. Changes in the reproductive tract of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera: Apidae, Meliponini) queen after mating. **Sociobiology** 44: 241-254.

Martins, G.F. & Serrão, J.E.; 2004. A comparative study of the ovaries in some Brazilian bees (Hymenoptera; Apoidea). **Pap. Avul. Zool.** 44(3): 45-53.

Melo, G.A.R.; Buschini, M.L.T.; Campos, L.A.O. 2001. Ovarian activation in *Melipona quadrifasciata* queens triggered by mating plug stimulation (Hymenoptera, Apidae). **Apidologie** 32: 355-361.

Michener, C.D. 1974. **The social behavior of the bees. Comparative study by Charles Michener.** The Belkman Press of Harvard University Press. Cambridge Massachusetts. 404p.

Morini, M.S.C. & Bueno, O.C. 1995. Análise quantitativa dos ovários de rainhas de *Apis mellifera caucásica* (Polm., 1889) (Hymenoptera, Apoidea). **Rev. Bras. Entomol.** 39: 403-407.

Quénu, C. 1957. Sur les femelles d'été de *Halictus scabiosae* (Rossi). **Compt. Rend. Acad. Sci.** 244: 1073-1076.

Sakagami, S.F.; Beig, D.; Zucchi, R.; Akahira, Y. 1963. Occurrence of ovary-developed workers in queenright colonies of stingless bees. **Rev. Bras. Biol.** 23: 115-129.

Sakagami, S.F. & Fukushima, K. 1961. Female dimorphism in a social halictine bee, *Halictus (Seladonia) aerarius* (Smith). **Jap. J. Ecol.** 11:118-124.

Sakagami, S. F. & Hayashida, K. 1968. Bionomics and sociology of the summer matrilineal phase in the social halictine bee, *Lasioglossum duplex*. **J. Fac. Sci., Hokkaido Univ.** 16: 413-513.

Sakagami, S.F. & Moure, J.S. 1965. Cephalic polymorphism in some neotropical halictine bees. **An. Acad. Bras. Cienc.** 37: 303-313.

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

Sakagami, S.F. & Wain, F.L. 1966. *Halictus latisignatus* Cameron: a polymorphic Indian halictine bee with caste differentiation. **J. Bombay Natur. Hist. Soc.** 63: 57-73.

Silva, D.L.N; Zucchi, R.; Kerr, W.E. 1972. Biological and behavioural aspects of the reproduction in some species of *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae), **Anim. Behav.** 20: 123-132.

Snodgrass, R.E. 1933. Morphology of the insect abdomen, Pt. II. The genitals ducts and the ovipositor. **Smith Misc. Coll.** 89: 1-148.

Snodgrass, R.F. 1935. **Principles of insect morphology.** New York: McGraw-Hill Book.

Snodgrass, R.E. 1956. **Anatomy of honey bee.** Ithaca, USA: Comstock Publish Co., 334pp.

Starengo da Cunha, M.A. 1978. Desenvolvimento ovariano em operárias adultas de *Scaptotrigona postica* Latreille. III. Aspectos histológicos e histoquímicos. **Pap. Avul. Zool.** 32: 71-86.

Van Wick, L.E. 1952. The morphology and histology of the genital organs of *Leucophera maderae* (Fabr.) (Blattidae, Orthoptera). **J. Ent. Soc. S. Afr.** 15: 3-62.

Zacaro, A.A. & Cruz-Landim, C. 1996. Ovígenese previtelogênica e diferenciação dos ovários pré-postura: considerações ultra-estruturais em *Apis mellifera*. **In:**

Encontro sobre abelhas, 2. *Anais.* Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, p. 94-104.

3 - Artigos

3.1 - Influência da cópula na fertilidade de rainhas de *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera: Apidae)

Resumo. O efeito do atraso na cópula na fertilidade das rainhas de *Melipona quadrifasciata anthidioides* foi investigado. Rainhas virgens com 15, 20, 25 e 30 dias de idade foram dissecadas para verificar se o atraso na cópula induz de degeneração em seus ovários. Para verificar se a degeneração provocaria esterilidade permanente, rainhas virgens com as mesmas idades (15, 20, 25 e 30 dias) foram copuladas e acompanhadas por, no mínimo 14 dias para verificar se houve fisogastria e, posteriormente foram dissecadas. Os ovários foram analisados através da histologia, testes histoquímicos e TUNEL para verificar morte celular programada. Os resultados indicam que a ausência de cópula interrompe a ovogênese impedindo que a vitelogênese ocorra. A ausência de cópula promove degeneração ovariana e essa é amplificada conforme o avanço da idade. Entretanto, mesmo ocorrendo degeneração nos ovaríolos, rainhas virgens com até 25 dias de idade, após cópula, apresentam ativação dos mesmos normalmente.

Palavras-chave: Degeneração ovariana; rainha virgem; cópula; reabsorção de ovócitos.

Abstract. The effect of mating delay on the ovary structure of virgin queens of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera: Apidae) was investigated. Virgin queens 15, 20, 25 and 30 days old were dissected to analyze their degree of ovary degeneration. To verify whether the degeneration would cause permanent sterility, virgin queens of the same ages (15, 20, 25 and 30 days) were mated and accompanied for at least 14 days to verify whether there was physogastry and then dissected. The ovaries were analyzed by histology, histochemical tests and TUNEL to verify programmed cell death. The results showed that mating delay interrupted oogenesis preventing vitellogenesis. Mating delay results in ovary degeneration which increased with queen age. However, even when there was ovariole degeneration, 25-day-old virgin queens after mating presented normal ovariole activation.

Keywords: Ovary degeneration; Virgin queen; Mating; Oosorption

Introdução

As abelhas apresentam ovaríolos do tipo meroístico politrófico (Snodgrass, 1935; Chapman 1988, Büning, 1994). Assim, a ovogênese nas abelhas, como em outros insetos com ovaríolos meroísticos politróficos, pode ser dividida em várias fases. A primeira fase é caracterizada pelo início de proliferação da ovogônia B ou citoblasto até atingir o número de células típico para os cistos de cada espécie. Posteriormente, ocorre a diferenciação do ovócito dos demais cistócitos, onde o mesmo apresenta-se maior. Na próxima fase os folículos já apresentam uma certa organização com divisão de câmaras ovocíticas e trofocitárias delimitadas por células foliculares. Na seqüência ocorre o crescimento do ovócito e a poliploidização das células nutridoras. Nesta fase, o crescimento do ovócito dá-se exclusivamente através de material transferido pelas células nutridoras (Ries, 1932; Büning, 1994; Zacaro, 1999; Simiczjew, 2003; Cruz-Landim, 2004).

O início de deposição de vitelo no ovócito caracteriza a vitelogênese. Essa deposição ocorre inicialmente na periferia sob a forma de pequenos grânulos basófilos. A transferência do material da hemolinfa para o ovócito pode ocorrer por espaços intercelulares ou por via transcelular nas células foliculares (Fleig, 1995). Segundo Fill (1978), Chapman (1998) e Fleig (1995) as células foliculares também podem contribuir para produção do vitelo.

A deposição de vitelo avança e grânulos de vitelo de vários tamanhos começam a ocupar praticamente todo o citoplasma do ovócito. A membrana vitelina também é produzida nessa fase e a mesma não impede a deposição de vitelo. A última fase é caracterizada pelo desaparecimento da câmara nutridora ou trofocitária e pela síntese do córion (Ries, 1932; Chapman, 1998; Zacaro, 1999; Cruz-Landim, 2004).

A cópula é um dos principais estímulos para o processo de ovogênese sendo o fator responsável pelo início de maturação dos ovos nos insetos (Davis, 1964; Watson, 1964; Engelmann, 1970; Wheeler, 1996).

O acasalamento pode desencadear a ativação da vitelogênese nos insetos tanto quimicamente pelas substâncias introduzidas juntamente com o sêmen (Chen *et al.*, 1988; Coleman *et al.*, 1995; Wolfner, M.F. 1997), quanto por estímulos nas terminações nervosas do trato genital (Bell & Bohm, 1975; Melo *et al.*, 2001), onde

este estímulo poderia induzir a produção de hormônio juvenil pelos *corpora allata* e conseqüentemente o início da vitelogênese (Wheeler, 1996).

A ativação da vitelogênese é um processo que não está totalmente esclarecido, apesar da influência hormonal, em condições normais, ser fato incontestável, pois o hormônio juvenil e os ecdisteróides têm efeito sobre a vitelogênese (Bownes, 1989; Hartfelder *et al.*, 2002).

Como a cópula acelera o processo de ovogênese nas abelhas, sua ausência pode provocar várias modificações no trato reprodutivo do inseto, dentre elas a reabsorção de ovócitos (Bell & Bohn, 1975), de células nutridoras e foliculares (Patrício & Cruz-Landim, 2002; Martins & Serrão, 2004).

Rainhas virgens de *Apis mellifera* com 12-16 dias de idade apresentaram os ovariolos desestruturados (Patrício & Cruz-Landim, 2002). Entretanto, rainhas não acasaladas com 30 dias de idade podem ser fecundadas e produzirem ovos normalmente (Chaud Netto & Stort, 1980).

Segundo Martins & Serrão (2004), a ausência da cópula afeta drasticamente os ovários de *Melipona quadrifasciata anthidioides*, mas permanece desconhecido se esta degeneração causa esterilidade permanente. Diante a esta dúvida, este trabalho teve por objetivo acompanhar a desorganização ovariana em rainhas virgens de *M. quadrifasciata anthidioides* e verificar se esta desorganização impede que a ovogênese se complete nas mesmas após cópula.

Material e Métodos

Rainhas e operárias de *Melipona quadrifasciata anthidioides* foram obtidas de colônias do Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. As rainhas foram obtidas de favos de cria removidos das colônias, mantidos a $29 \pm 1^\circ\text{C}$, em estufa B.O.D., e observados diariamente para detecção de rainhas recém-emergidas. As rainhas recém-emergidas foram separadas em placas de Petri (12 cm) contendo dez operárias e recebendo pólen e mel nos cinco primeiros dias de vida adulta. Cinco dias após a emergência, as rainhas foram transferidas para caixas de madeira (15 x 7,5 x 15 cm) cobertas com vidro, recebendo pólen, mel *ad lib.* e cerume. Diariamente, operárias nutridoras foram acrescentadas nas caixas.

Os machos foram obtidos através da separação dos recém-emergidos e sua criação até atingir a idade para a reprodução (cerca de 12 dias de idade segundo Camargo, 1976) ou coletados na natureza.

Para acompanhar a degeneração ovariana, um total de quinze rainhas foi estudado, sendo três rainhas para cada idade. Rainhas recém emergidas e rainhas virgens com 15, 20, 25 e 30 dias de idades foram dissecadas para retirada e análise dos seus ovários.

Para verificar como a ausência de cópula influenciaria na fertilidade das rainhas, um total de oito rainhas foi estudado, sendo duas rainhas virgens de cada idade (15, 20, 25 e 30 dias). Estas foram retiradas das caixas e colocadas na presença de machos em uma placa de Petri (12 cm) para a cópula. Após a cópula, houve a reintrodução das rainhas nas caixas e observação das mesmas por um período de, no mínimo, quatorze dias para verificar a ocorrência de fisogastria seguindo-se dissecação dos ovários.

O trato reprodutivo das rainhas foi dissecado em solução salina para insetos e fixado em solução de Zamboni (Stefanini, 1967), posteriormente, desidratado em uma série crescente de concentração alcoólica, embebido em historesina Leica JB4, seccionados em cortes de 5 μ m de espessura e corado com hematoxilina e eosina.

Algumas secções foram submetidas aos testes histoquímicos de PAS para evidenciação de polissacarídeos e glico-conjugados neutros e ao teste de Mercúrio-bromofenol para evidenciação de proteínas (Pearse, 1985).

Para verificar o processo de morte celular programada o trato reprodutivo de rainhas nas idades citadas anteriormente, fixados em Zamboni, foram desidratados em série alcoólica crescente, embebido em parafina, seccionado à 7 μ m de espessura e submetido ao teste de TUNEL (Roche) segundo instruções do fabricante.

O controle negativo foi realizado pela omissão da solução enzimática associada à solução marcadora e o controle positivo com o material submetido a DNase em tampão Tris-HCl por 10 minutos a 15-25° C antes do procedimento.

Após os testes, as lâminas foram cobertas com lamínulas, observadas ao microscópio de luz e fotografadas com câmera digital Nikon Coolpix 4500.

Resultados

Os ovaríolos de rainhas recém-emergidas são longos e apresentam diferenciação entre germário e vitelário. Porém, os folículos apresentam-se no estado pré-vitelogênico e as células tanto do germário quanto do vitelário não apresentam indícios de morte (figura 1).

Alterações morfológicas são observadas em rainhas com 15 dias de idade. Nestas, os ovaríolos apresentam alterações na região do vitelário, com os ovócitos apresentando grandes vacúolos (figura 2). Células nutridoras apresentam morfologia atípica com grandes vacúolos em seu citoplasma e núcleos picnóticos (figura 3). Mesmo com sinais de degeneração, a estrutura geral do ovaríolo permanece mantida, com células foliculares pavimentosas circundando a câmara trofocitária e células foliculares cúbicas ou colunares circundando a câmara ovocítica. A região do germário não apresenta sinais de degeneração (figura 4).

Nos ovários das rainhas virgens com 20 dias de idade, o vitelário demonstra avançado estágio de degeneração. Nessa região, a túnica própria apresenta-se espessa (figura 5). Diferente do que acontece em rainhas com 15 dias de idade, a desorganização no germário já é identificada iniciando-se, aparentemente, na periferia do mesmo (figura 6). Essa desorganização é caracterizada pela presença de material amorfo na periferia. A partir de 20 dias de idade, as células foliculares da câmara trofocitária não são identificadas com facilidade.

Em rainhas virgens com 25 dias de idade, a degeneração do ovário apresenta-se em estágio mais avançado. Várias células nutridoras exibem núcleos picnóticos (figura 7). No germário, regiões com material amorfo na periferia do mesmo são encontradas associadas às células indiferenciadas (figura 8).

Nas rainhas virgens com 30 dias de idade o vitelário quase não é identificado. Nesse estágio, os ovaríolos constituem-se predominantemente de regiões de germário envolvida por uma túnica própria espessa, membrana peritoneal e ramificações traqueais (figura 9).

Em todas as rainhas analisadas, células foliculares e nutridoras apresentaram-se positivas ao teste de TUNEL (figuras 10 e 11) e também não foi verificado o processo de vitelogênese.

Folículos atrésicos são encontrados em rainhas a partir de 15 dias de idade. Estes são caracterizados por grande quantidade de células foliculares envolvidos

por uma espessa túnica própria. Em rainhas de 30 dias de idade, a quantidade de células foliculares é reduzida (figura 12).

Análises das secções submetidas ao teste de mercúrio-bromofenol demonstraram reações positivas na túnica própria (figura 13) e células musculares da membrana peritoneal (figura 14). A túnica própria apresentou espessura variável dependendo da fase que o ovário se encontrava, sendo espessa em regiões onde está ocorrendo reabsorção celular e delgada em regiões não afetadas.

Nas secções submetidas ao teste de PAS foi possível identificar positividade na região do germário em rainhas virgens com até 25 dias de idade (figura 15), e em regiões do vitelário com estágio avançado de reabsorção ovocítica e túnica própria (figura 16).

Rainhas mantidas virgens com 15, 20 e 25 dias de idade apresentaram fisogastría após a cópula. Nestas, as células nutridoras apresentam forma irregular com núcleos grandes e cromatina descondensada indicando alta atividade sintética (figura 17). Células foliculares apresentam morfologia típica, sendo pavimentosas na câmara trofocitária e cúbicas ou colunares na câmara ovocítica (figura 18). Grânulos de vitelo (figura 19) são identificados nos ovócitos pelo teste de mercúrio-bromofenol, indicando que o processo de vitelogênese está ocorrendo. Pequenos grânulos de vitelo localizam-se nas proximidades das células foliculares e grânulos maiores são vistos nas regiões centrais do ovócito.

A túnica própria, germário, células nutridoras e ovócitos são PAS-positivos (figuras 20, 21, 17 e 22).

Rainhas mantidas virgens por 30 dias realizaram cópula, contudo, não houve ativação ovariana e poucos dias após a cópula, estas morreram.

Discussão

O crescimento dos ovócitos nos insetos depende de fatores nutricionais, hormonais, cópula e idade (Telfer, 1965; Engelmann, 1970; Bell & Bohm, 1975; Wheeler, 1996), mas a oviposição requer desenvolvimento do ovário e cópula (Hatakoshi, 1992).

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que o atraso de cópula em *M. quadrifasciata anthidioides* provoca uma desorganização nos ovaríolos. Rainhas virgens a partir de 15 dias de idade apresentam células com indícios de

morte, caracterizadas por citoplasma vacuolizado e núcleos picnóticos, uma vez que em rainhas virgens mais novas estas características não estão presentes (Martins & Serrão, 2004). Em *M. quadrifasciata anthidioides*, a ovogênese é interrompida, não ocorrendo o processo de vitelogênese, confirmando os resultados de Martins & Serrão (2004).

A idade associada ao atraso da cópula agrava ainda mais o processo de degeneração ovariolar. Em ovariolos de rainhas virgens com 30 dias de idade, regiões de vitelário são praticamente inexistentes devido ao processo avançado de degeneração do ovaríolo. A idade juntamente com o atraso de cópula na degeneração dos ovariolos também foi verificada em rainhas de *Apis mellifera* (Patrício & Cruz-Landim, 2002).

Apesar da cópula não estar relacionada ao desenvolvimento dos ovários nas operárias, seus ovários regridem com o envelhecimento (Cruz-Landim & Silva de Moraes, 2000; Santos & Cruz-Landim, 2002).

Além da morte celular das células nutridoras, os fatores ausência de cópula e idade provocam reabsorção de ovócitos. Rainhas com 15 dias de virgindade apresentam sinais de reabsorção de ovócitos (Martins & Serrão, 2004) e quanto mais velhas, mais intensa é a reabsorção, sendo que em rainhas com 30 dias de idade nenhum ovócito foi encontrado. A absorção de ovócitos é uma estratégia reprodutiva pela qual os ovócitos degeneram para conservar energia em resposta a fatores comportamentais, ecológicos ou fisiológicos através da interrupção da deposição de vitelo (Bell & Bohm, 1975). A maior causa da absorção de ovócitos é a deficiência nutricional, mas outros fatores tais como sazonais, ligados ao parasitismo, idade, pressão social (dominância reprodutiva de um outro indivíduo) e ausência de cópula estão intimamente relacionados a este processo (Bell & Bohm, 1975). A reabsorção de ovócitos pode ocorrer em qualquer estágio de ovogênese e durante a atresia folicular o epitélio folicular permanece intacto (Huebner, 1981). Nossos resultados demonstram que regiões de atresia folicular avançada são caracterizadas por um grande número de células foliculares envolvidas por uma espessa túnica própria, sendo que aparentemente o número de células foliculares decresce em rainhas mais velhas.

A reabsorção de ovócitos em rainhas virgens de *M. quadrifasciata anthidioides* ocorreu antes do início do processo de vitelogênese. Isso confirma a importância da cópula como estímulo para o início da maturação dos ovócitos nessa espécie como

observado em outros insetos (Davis, 1964; Watson, 1964; Engelmann, 1970; Wheeler, 1996).

A túnica própria é uma lâmina basal elástica com função de suporte para os ovários mantendo a forma do mesmo e barreira física seletiva para macromoléculas atuando no acesso de hormônios durante o período pré-vitelogênico (Chapman, 1998; Bunning, 1994). Ela pode variar no seu aspecto e espessura conforme a fase que se encontra o ovário, sendo mais espessa em estágios iniciais da ovogênese e delgada em estágios finais (Chapman, 1988). Em rainhas velhas de *Apis mellifera*, locais de desagregação celular do filamento terminal apresentam a túnica própria bem espessa (Cruz-Landim, 2004) de maneira similar ao encontrado em *M. quadrifasciata anthidioides*, onde regiões em degeneração apresentaram a túnica espessada, enquanto locais aparentemente normais apresentam a túnica delgada. Como a vitelogênese é inibida em rainhas virgens, a espessura da túnica tende a aumentar devido a sua retração por causa da reabsorção folicular e conseqüentemente à redução do volume do ovário.

Segundo Neves *et al.* (2003), sinais de espessamento da membrana basal também foram encontrados na transição de larva para pupa no intestino de *M. quadrifasciata anthidioides*, onde o epitélio intestinal larval é perdido e posteriormente substituído por outro com origem das células regenerativas. Com a perda do epitélio larval, o volume do intestino é reduzido e conseqüentemente há uma retração da membrana basal formando dobras (Neves *et al.*, 2003). O espessamento da túnica própria nos ovários de *M. quadrifasciata* deve ocorrer da mesma forma que ocorre a retração da membrana basal do intestino com a formação de dobras na parede do ovário.

Operárias de algumas espécies de abelhas apresentam plasticidade dos ovários. Em *Apis mellifera*, morte celular é encontrada nos ovários de operárias a partir do 3º instar larval (Reginato & Cruz-Landim, 2001) e essas têm, quando adultas, a ativação dos seus ovários suprimida pelos feromônios da rainha (Groot & Voogd, 1954; Winston & Slessor, 1992). Entretanto, algumas operárias podem ovipositar mesmo na presença da rainha, mas numa frequência muito baixa (Page & Erickson, 1988; Visscher, 1989). Na ausência da rainha, as operárias podem ter seus ovários ativados e ovipositar um considerável número de ovos não fertilizados (Groot & Voogd, 1954).

Nos meliponíneos, mesmo ocorrendo morte celular nos ovários das operárias, estes podem se desenvolver e a postura ocorrer na presença da rainha, mas algumas espécies (*Frieseomelitta varia*, *Frieseomelitta silvestri* e *Duckeola ghiliani*) nunca desenvolvem seus ovários (Sakagami *et al.*, 1963; Sakagami & Zucchi, 1968). Boleli *et al.* (1999) demonstraram que em *Frieseomelitta varia*, a morte celular nos ovários causa esterilidade permanente.

Rainhas virgens não produzem ovos, enquanto as operárias conseguem ovipositar, mesmo não efetuando a cópula. Vários estudos têm mostrado a influência hormonal com relação à diferenciação de castas nos Apini e Meliponini (Campos *et al.*, 1975; Campos, 1978, 1979; Buschini & Campos, 1994; Rembold *et al.*, 1974). Não somente a diferenciação está sob controle hormonal, mas também, o processo reprodutivo das castas, onde a síntese de vitelogenina deve ser ativada (Robinson *et al.*, 1992; Hartfelder & Engels, 1998). Provavelmente, o estímulo da produção de hormônio, em rainhas, seja dependente de cópula, enquanto ativação da vitelogênese nas operárias dependente de uma dieta adequada (Bitondi & Paulino-Simões, 1996).

Apesar de verificarmos que a degeneração nos ovários nas rainhas de *M. quadrifasciata anthidioides* progride conforme a idade, essa degeneração não provocou esterilidade permanente em rainhas de até 25 dias de idade, pois, a vitelogênese, que não ocorria em rainhas virgens, ocorreu de forma normal após a cópula das mesmas.

Em rainhas de *Apis mellifera*, os ovários entram em degeneração a partir de 12 dias de virgindade (Patrício & Cruz-Landim, 2002), porém, as rainhas com 30 dias de virgindade podem ser fecundadas e entrar em postura normalmente (Chaud Netto & Stort, 1980). Esses resultados indicam que células indiferenciadas, tanto ovogônias quanto células pré-foliculares localizadas no germário podem permanecer nesses ovários e a cópula ativar a vitelogênese nos mesmos, já que os estágios iniciais da ovogênese não é estímulo-dependente (Patrício & Cruz-Landim, 2002; Tanaka & Hartfelder, 2004; Berger & Abdalla, 2005).

O vitelo é constituído predominantemente por proteínas, mas lipídeos e glicogênio podem estar presentes, localizados entre os glóbulos protéicos (Cruz-Landim & Cruz-Höfling, 1971). Tanto no citoplasma quanto no interior dos próprios grânulos pode ser encontrado glicogênio. Essa afirmação sustenta que a ativação dos ovários de rainhas com 25 dias de idade após cópula ocorreu de forma

normal, pois, grande quantidade de proteínas foi verificada nos ovócitos através do teste de mercúrio-bromofenol e grânulos PAS positivos, provavelmente glicogênio, foram evidenciados. Outra característica do processo de vitelogênese é a presença de pequenos grânulos na periferia do ovócito e posterior acúmulo de grânulos de vários tamanhos por todo o ovócito (Cruz-Lanim & Cruz-Höfling, 1971; Cruz-Landim & Caetano, 1981; Fleig, 1995), o que foi observado nas rainhas fecundadas até 25 dias de virgindade.

Apesar da degeneração progredir de acordo com o tempo, nos ovários das rainhas virgens de *M. quadrifasciata anthidioides*, essa degeneração causa esterilidade permanente em rainhas a partir de 30 dias de idade.

Referências Bibliográficas

- Bell, W. J. & Bohm, M. K. 1975. Oosorption in insects. **Biol. Rev.** 50: 373-396.
- Berger, B. & Abdalla, F. C. 2005. Programmed cell death during ovarian differentiation in queens of *Apis mellifera* Linné, 1758 (Hymenoptera, Apini). **Braz. J. Morphol Sci.** 22: 1-4.
- Bitondi, M.M.G. & Paulino-Simões, Z.L. 1996. The relationship between level of pollen in the diet, vitellogenin and juvenile hormone titres in Africanized *Apis mellifera* workers. **J. Apic. Res.** 35: 27-36.
- Boleli, I. C.; Paulino-Simões, Z.L.; Bitondi, M.M.G. 1999. Cell death in ovarioles causes permanent sterility in *Frieseomelitta varia* workers bees. **J. Morphol.** 242: 271-282.
- Bownes, M. 1989. The roles of juvenile hormone, ecdysone and the ovary in the control of *Drosophila* vitellogenesis. **J. Insect Physiol.** 35: 409-413.
- Büning, J. 1994. **The insect ovary. Ultrastructure, previtellogenic growth and evolution.** Chapman & Hall, London. 400p.
- Buschini, M.L.T. & Campos, L.A.O. 1995. Caste determination in *Trigona spinipes* (Hymenoptera: Apidae): influence of the available food and the juvenile hormone. **Rev. Bras. Biol.** 55 (Supl. 1), 121-129.
- Camargo, C. A. 1976. Determinação do sexo e controle de reprodução em *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera, Apidae). Ribeirão Preto, USP, Faculdade de Medicina. 140p. **Tese de Doutorado.**
- Campos, L.A.O.; Velthuis, H.H.W.; Velthuis-Kluppell, F.M. 1975. Juvenile hormone and caste determination in a Stingless Bee. **Naturwissenschaften** 62: 98-99.

Campos, L. A. O. 1978 Alguns Efeitos do Tratamento de Abelhas Com Hormonio Juvenil e Seus Analogos.. In: **Anais do Simposio Internacional da Apimondia Sobre Apicultura em Clima Quente**, Florianópolis - SC.

Campos, L.A.O. 1979. Determinação do sexo nas abelhas. XIV. Papel do hormônio juvenil na diferenciação das castas na subfamília Meliponinae (Hymenoptera, Apidae). **Rev. Bras. Biol.** 39: 965-971.

Chapman. R.F. 1998 **The Insects: Structure and Function**. American Elsevier Publishing Company, New York. 770p.

Chaud-Netto, J. & Stort, A.C. 1980. Successful mating of chatreuse-eyed queens of *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). **Ciênc. Cult.** 32: 1542-1543.

Chen, P.S.; Stumm-Xollinger, E.; Aigaki, T.; Balmer, J.; Bienz, M.; Bohlen, P. 1988. A male accessory gland peptide that regulates reproductive behavior of female *Drosophila melanogaster*. **Cell** 54: 291-298.

Coleman, S.; Drähn, B.; Petersen, G.; Stoloron, J.; Draus, K. 1995. A *Drosophila* male accessory gland protein that us a member of the sepin superfamily of proteinase inhibitors is transferred to female during mating. **Insect Molec. Biol.** 25: 203-207.

Cruz-Landim, C. & Cruz-Höfling, M.A. 1971. Cytochemical ultrastructural studies on eggs from workers and queens of *Trigona (Scaptotrigona) postica*. **Rev. Bras. Pesq. Méd. Biol.** 4: 19-25.

Cruz-Landim, C. & Caetano, F.H. 1981. The histochemistry and fine structure of the vitellarium in *Atta* (Formicidae, Myrmicinae). **Rev. Bras. Biol.** 41:363-370.

Cruz-Landim, C. & Silva de Moraes, R.L.M. 2000. **Morte celular programada em abelhas como uma forma de redirecionar a morfologia e a fisiologia adaptativa**. 1 ed. Rio Claro: Editora e Tipografia Costa, 48p.

Cruz-Landim, C. **Biologia do desenvolvimento das abelhas**. Depto Biologia, Instituto de Biociências, UNESP/Rio Claro, 2004. Disponível em <http://www.rc.unesp.br/ib/biologia/carminda.html>. Acesso em: 09/03/2005

Davis, N.T. 1964. Studies of the reproductive physiology of Cimidae (Hemiptera). I. Fecundation and egg maturation. **J. Insect Physiol.** 10: 947-64.

Engelmann, F. 1970. **The Physiology of Insect Reproduction**. Pergamon Press, New York. 307p.

Fleig, R. 1995. Role of follicle cells for yolk uptake in ovarian follicles of the honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae). **Int. J. Insect Morphol. & Embryol.** 24: 427-433.

Fill, A. 1978. Follicle cell bridges in the mosquito ovary: Syncytia formation and bridge morphology. **J. Cell Sci.** 31: 137-143.

Groot, A.P. & Voogd, S. 1954. On the ovary development in queenless worker bees (*Apis mellifera* L.). **Experientia** 10: 384-385

Hartfelder, K. & Engels, W. 1998. Social insect polymorphism: hormonal regulation of plasticity in development and reproduction in the honeybee. **Curr. Topics Devel. Biol.** 40: 45-77.

Hatakoshi, M. 1992. An inhibitory mechanism over oviposition in the tobacco cutworm, *Spodoptera litura* by juvenile hormone analogue pyriproxyfen. **J. Insect Physiol.** 38: 793-801.

Huebner, E. 1981. Oocyte-follicle cell interaction during normal oogenesis and atresia in an insect. **J. Ultrastr. Res.** 74: 95-104

Martins, G.F. & Serrão, J.E. 2004. Changes in the reproductive tract of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera: Apidae, Meliponini) queen after mating. **Sociobiology** 44: 241-254.

Melo, G.A.R.; Buschini, M.L.T.; Campos, L.A.O. 2001. Ovarian activation in *Melipona quadrifasciata anthidioides* queens triggered by mating plug stimulation (Hymenoptera, Apidae). **Apidologie** 32: 355-361.

Neves, C.A.; Serrão, J.E.; Gitirana, L.B. 2003. Ultrastructural study of the metamorphosis in the midgut of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Apidae, Meliponini) worker. **Sociobiology** 41: 443-459.

Page, R.E. & Erickson, E.H. 1988. Reproduction by worker honey bees (*Apis mellifera* L.). **Behav. Ecol. Sociobiol.** 23, 117–126.

Patricio, K. & Cruz-Landim, C. 2002. Mating influence in the ovary differentiation in adult queens of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae). **Braz. J. Biol.** 62: 641-649.

Pearse, A.G.E. 1985. **Histochemistry: Theoretical and Applied**. Churchill, London.

Reginato, R.D. & Cruz-Landim, C. 2001. Differentiation of the worker's ovary in *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae) during life of the larvae. **Invert. Reprod. Develop.**, 39: 127-134.

Rembold, H.; Czoppelt, C.; Rao, P.J. 1974a. Effect of juvenile hormone on caste differentiation in the honey bee, *Apis mellifera*. **J. Insect Physiol.** 20: 1193-1202.

Ries, E. 1932. Die prozesse der eibildung und des eiwachstums bei pediculiden und mallophagen. **Z. Zellforschung und Microscopische**, 16: 314-388.

Robinson, G. E.; Strambi, C.; Strambi, A.; Huang, Z. 1992. Reproduction in worker honey bees is associated with Low juvenile hormone titers and rates of biosynthesis. **Gen. Comp. Endocrinol.** 87: 471-480.

Santos, T.C.A. & Cruz-Landim, C. 2002. Determinação das castas em *Scaptotrigona postica* (Latreille) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): diferenciação do ovário. **Rev. Bras. Zool.** 19: 703-714.

Sakagami, S.F.; Beig, D.; Zucchi, R.; Akahira, Y. 1963. Occurrence of ovary-developed workers in queenright colonies of stingless bees. **Rev. Bras. Biol.** 23: 115-192.

Sakagami, S.F. & Zucchi, R. 1968. Oviposition behavior of an Amazonic stingless bee, *Trigona (Duckeola) Ghilianii*. **J. Fac. Sci. Hokkaido Univ. Ser. VI Zool.** 16: 564-581.

Simiczjew, B. 2003. Germ cell cluster differentiation in polytrophic ovarioles of haging-flies (Mecoptera: Bittacidae). **Zool. Pol.** 48: 71-79.

Snodgrass, R.F. 1935. **Principles of insect morphology**. New York: McGraw-Hill Book.

Stefanini, M.; Demartino, C.; Zamboni, L. 1967. Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. **Nature** 216: 173-174.

Tanaka, E.D. & Hartfelder, K. 2004. The initial stages of oogenesis and their relation to differential fertility in the honey bee (*Apis mellifera*) castes. **Art. Struct. Devel.** 33: 431-442.

Telfer, W.H. 1965. The mechanism and control of yolk formation. **Annu. Rev. Entomol.** 10: 161-184.

Visscher, P.K. 1989. A quantitative study of worker reproduction in honey bee colonies. **Behav. Ecol. Sociobiol.** 25: 247-254.

Watson, J.A.L. 1964. Moulting and reproduction in the adult firebrat *Thermobia domestica* P. (Thysanura, Lepismatidae). II. The reproductive cycles. **J. Insect Physiol.** 10: 399-408.

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

Winston, M.L. & Slessor, K.N. 1992. The essence of royalty: The honey bee queen pheromone. **Am. Sci.** 80: 374-385.

Wolfner, M.F. 1997. Tokens of love: functions and regulation of *Drosophila* male accessory gland products. **Insect Biochem. Mol. Biol.** 27: 179-192.

Zacaro, A.A. 1999. Estudo ultra-estrutural da gametogênese (espermatogênese e ovogênese) e análise citogenética de *Pediculus humanus* L. (Phthiraptera: Pediculidae). **Tese de doutorado**, IBRC-Unesp, 180 pp.

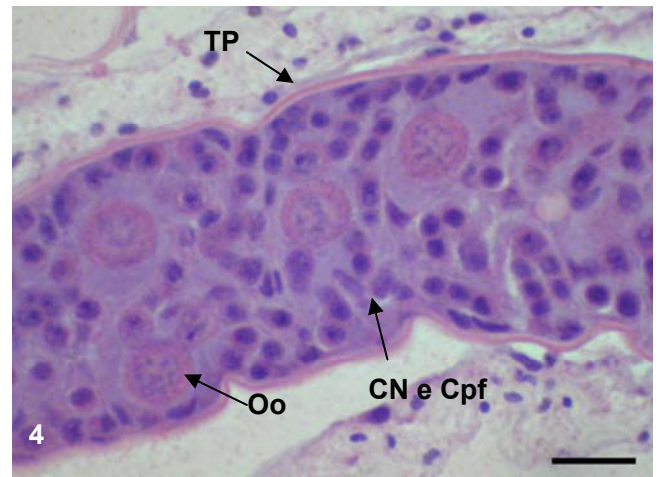
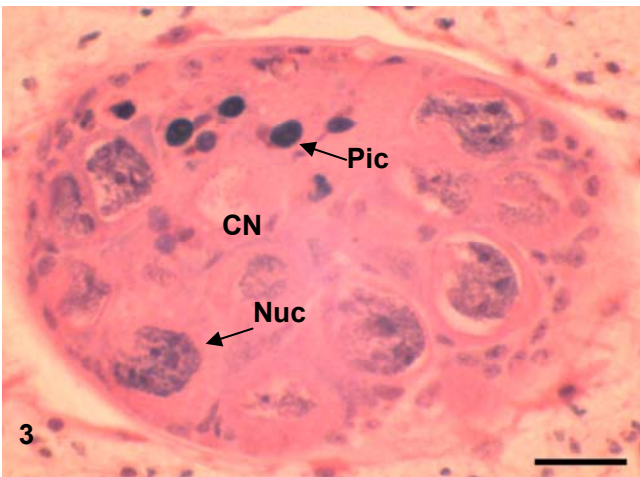
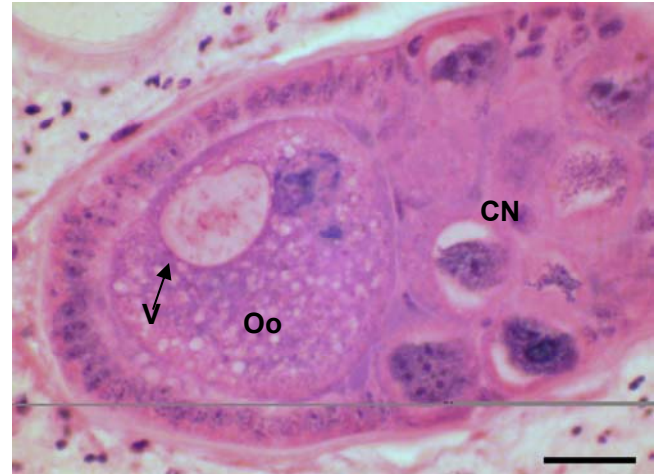
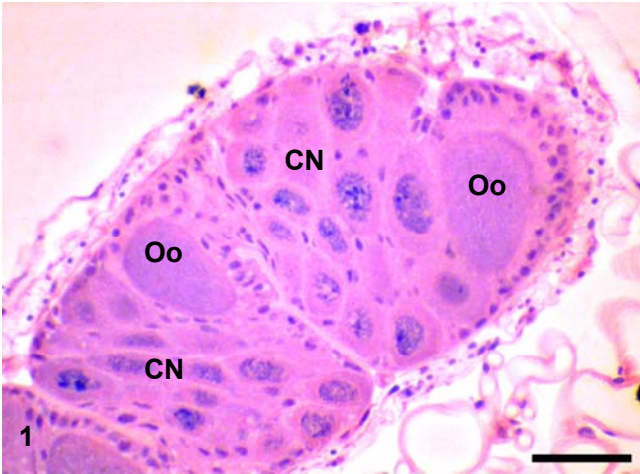


Fig. 1. Secção histológica do ovário da rainha recém-emergida no estágio pré-vitelogênico com distinção da câmara trofocitária (CT) e ovócito (Oo). Barra: 50 μ m. **Fig. 2.** Secção histológica do ovário de rainha virgem com 15 dias de idade em fase inicial de degeneração. O ovócito (Oo) e células nutritoras (CN) com grandes vacúolos (V). Barra: 20 μ m. **Fig. 3.** Secção histológica da câmara trofocitária (CT) com células nutritoras, apresentando núcleos picnóticos (Pic) em ovário de rainha virgem com 15 dias de idade. Barra: 20 μ m. **Fig. 4.** Secção histológica do ovário da rainha virgem com 15 dias de idade, mostrando a região do germário, com células em diferenciação sem sinais de morte. Barra: 20 μ m. Nu, núcleo; Oo, ovócito; CN, células nutritoras; Cpf, células pré-foliculares e TP, túnica própria.

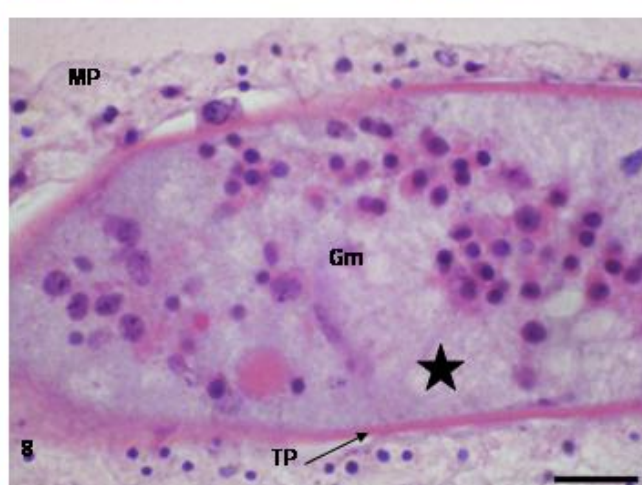
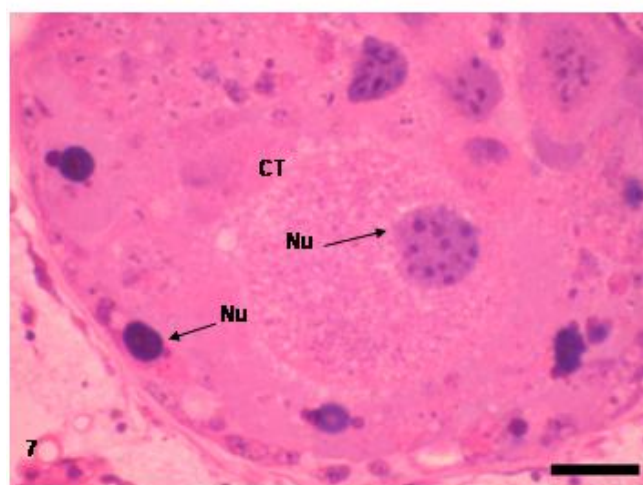
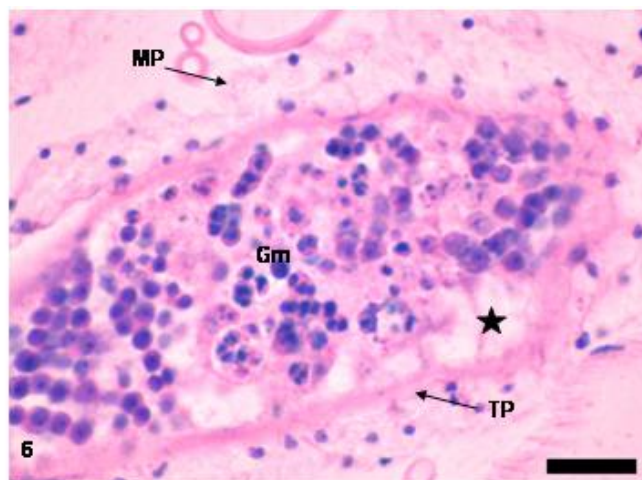
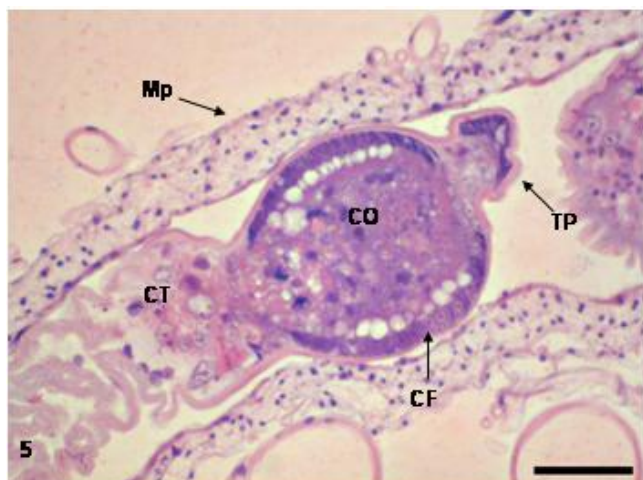


Fig. 5. Secção histológica do ovário, mostrando um folículo em estágio avançado de degeneração em rainha virgem com 20 dias de idade. Barra: 50 μ m. **Fig. 6.** Secção histológica do ovário, mostrando o germário (Gm) com indícios de degeneração em sua periferia (estrela) em rainha virgem com 20 dias de idade. Barra: 20 μ m. **Fig. 7.** Secção histológica do ovário, mostrando a câmara trofocitária (CT) com células nutritoras apresentando núcleos (Nu) picnóticos. Barra: 20 μ m. **Fig. 8.** Secção histológica do ovário, mostrando o germário (Gm) em rainha virgem com 25 dias de idade em degeneração apresentando material amorfo (estrela) associado às células indiferenciadas. Barra: 20 μ m. CO, câmara ovocítica; CF, células foliculares; TP, túnica própria; e MP, membrana peritoneal.

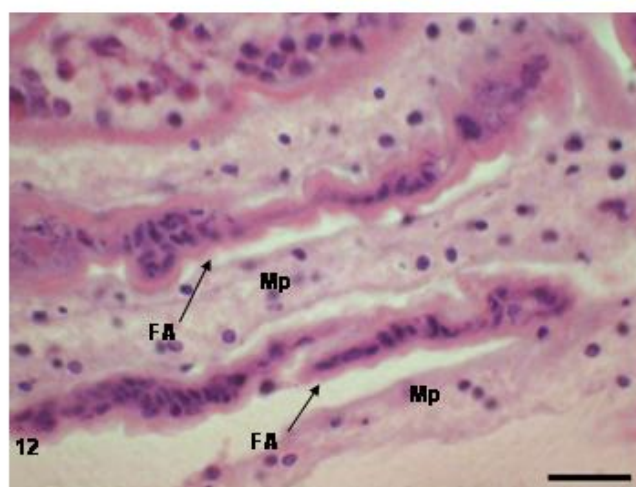
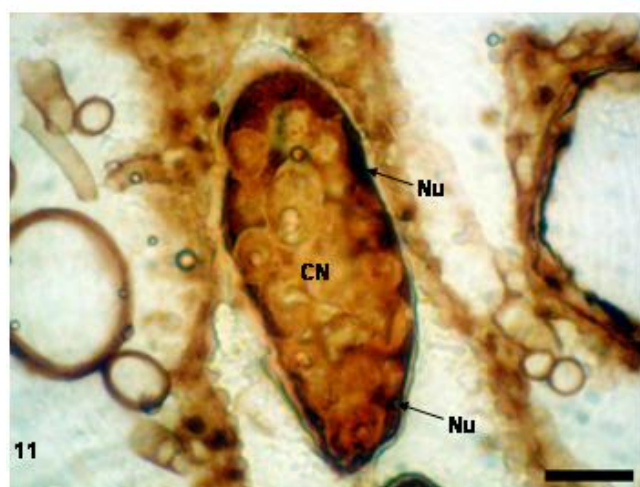
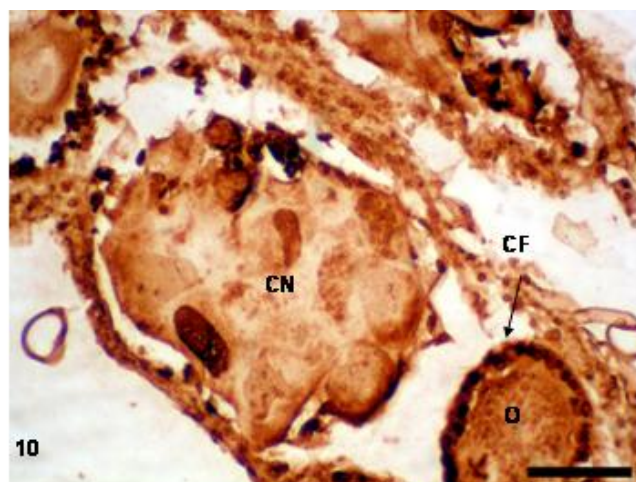
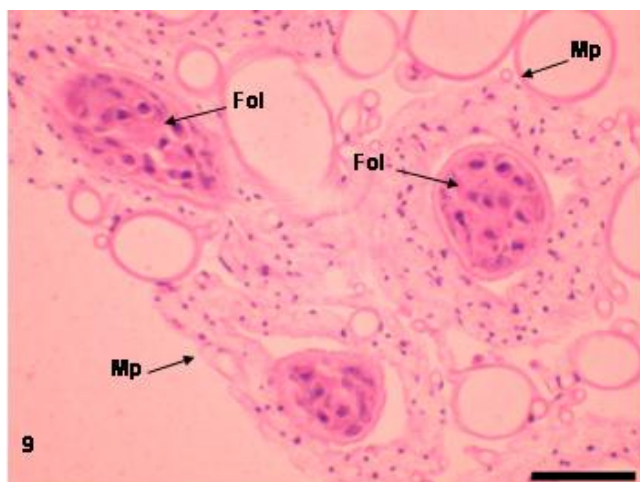


Fig. 9. Ovário de rainha virgem com 30 dias de idade: secção histológica mostrando três folículos (Fol) envolvidos por uma espessa membrana peritoneal (Mp). Barra: 50 μ m. **Fig. 10-11.** Secção histológica dos ovários de rainhas virgens com 30 dias de idade, submetidos ao teste de morte celular programada (TUNEL) com células nutritoras (CN) e foliculares (CF) com núcleos (Nu) positivos. Barra: 50 μ m e 20 μ m. **Fig. 12.** Secção histológica dos ovários, mostrando folículos atresícos (FA) em rainha virgem com 30 dias de idade, contendo poucas células foliculares. Barra: 20 μ m.

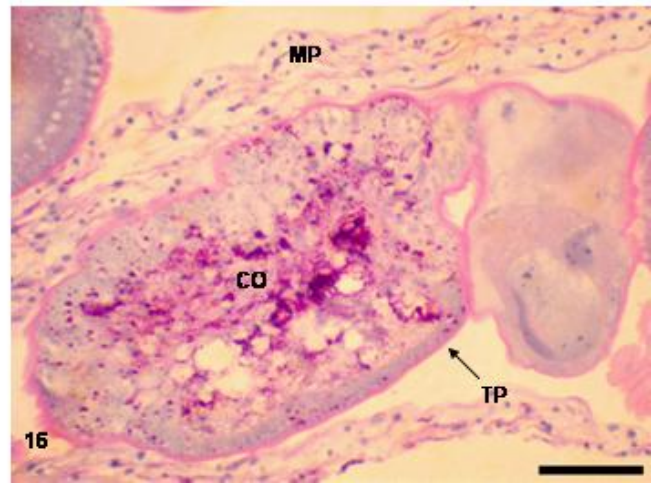
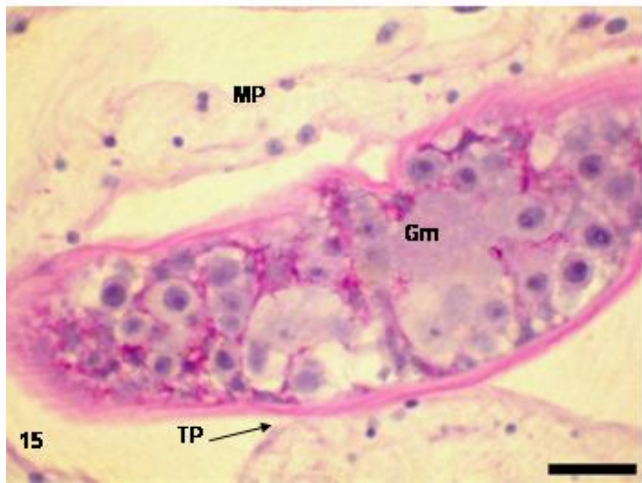
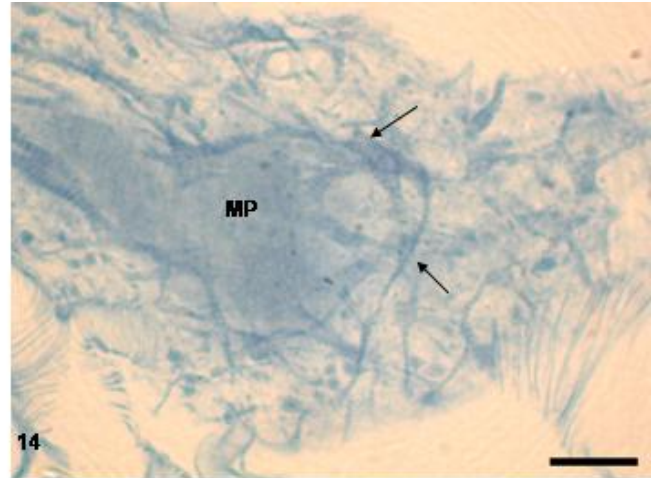
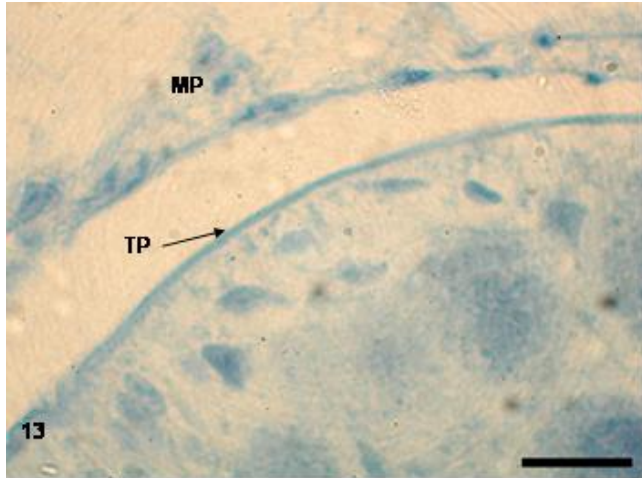


Fig. 13. Secção histológica do ovário, com túnica própria (TP) positiva ao teste de mercúrio-bromofenol, germário (Gm) e membrana peritoneal (MP). Barra: 10 μ m. **Fig. 14.** Secção histológica do ovário submetido ao teste de mercúrio-bromofenol mostrando a membrana peritoneal (MP) com células musculares positivas (setas). Barra: 20 μ m. **Fig. 15.** Secção histológica do ovário, mostrando o germário (Gm) positivo ao teste de PAS em rainha virgem com 25 dias de idade. Barra: 20 μ m. **Fig. 16.** Secção histológica do ovário, mostrando a câmara ovocítica (CO) positiva ao teste de PAS em rainha virgem com 25 dias de idade. Barra: 20 μ m. TP, túnica própria.

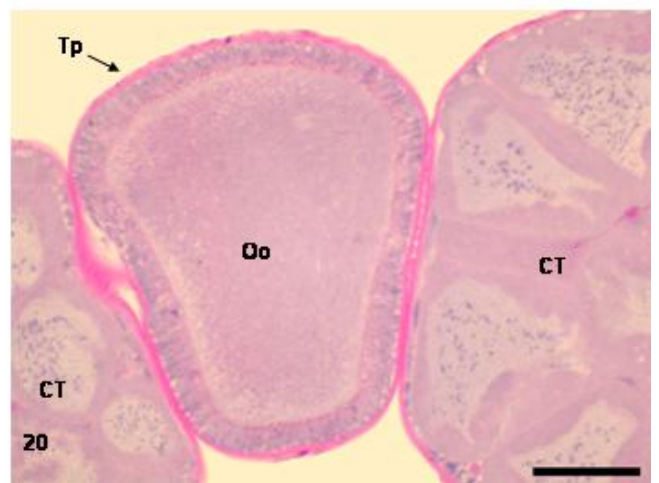
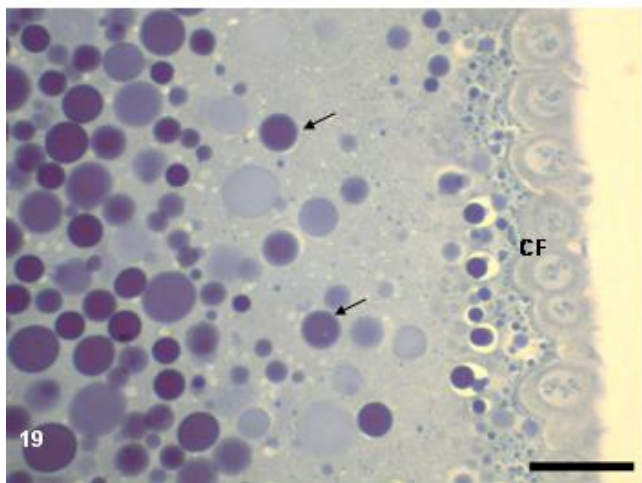
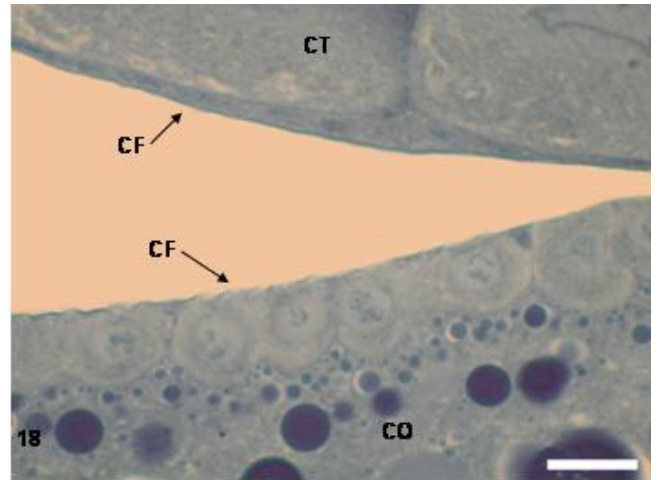
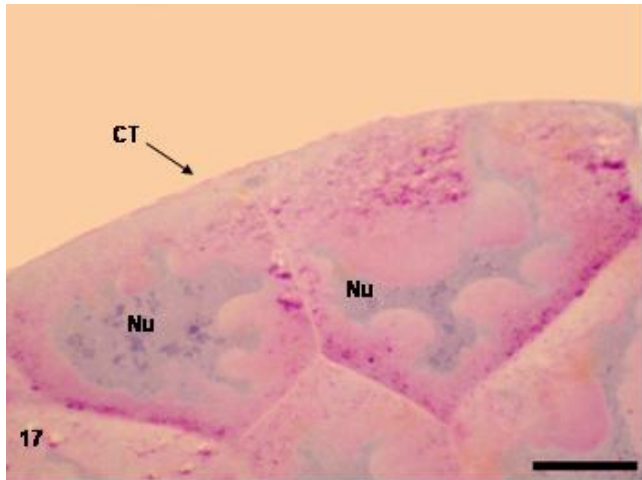


Fig. 17. Secção histológica do ovário, mostrando a câmara trofocitária (CT) com células nutritoras com núcleos (Nu) volumosos com cromatina descondensada e citoplasma PAS positivo em rainha copulada com 25 dias de idade. Barra: 50µm. **Fig. 18.** Secção histológica do ovário, mostrando diferenças na morfologia das células foliculares (CF) da câmara ovocítica (CO) que são cúbicas e trofocitária (CT) que são pavimentosas. Barra: 20µm. **Fig. 19.** Secção histológica do ovário, mostrando a câmara ovocítica submetida ao teste de mercúrio-bromofenol, mostrando vários grânulos de vitelo positivos (setas) em rainha copulada com 25 dias de idade. Barra: 50µm. **Fig. 20.** Secção histológica do ovário, mostrando a câmara ovocítica (CO) e a câmara trofocitária (CT) submetida ao teste de PAS com túnica própria (Tp) positiva. Barra: 50µm. Oo, ovócito; CF, células foliculares.

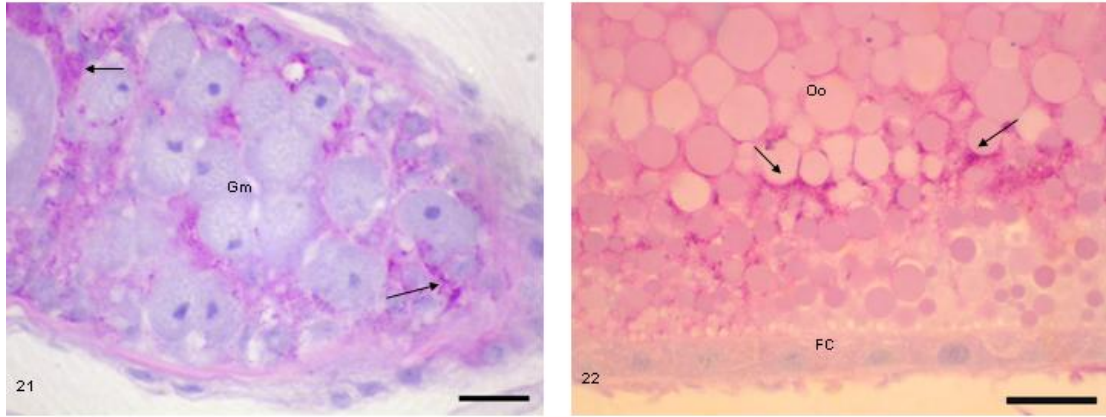


Fig. 21. Secção histológica do ovário, mostrando a região do germário (Gm) positivo ao teste de PAS (setas) em rainha copulada com 25 dias de idade. Barra: 20 μ m. **Fig. 22.** Secção histológica do ovário, mostrando o ovócito (Oo) positivo ao teste de PAS (setas) em rainha copulada com 25 dias de idade. Barra: 50 μ m. FC, células foliculares.

3.2 - Efeito da cópula no desenvolvimento da espermateca de rainhas de *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera, Apidae)

Resumo. O efeito da cópula no desenvolvimento da espermateca de rainhas de *Melipona quadrifasciata anthidioides* foi investigado. Rainhas virgens recém-emergidas e com 15, 20, 30 dias de vida adulta e fisogástricas tiveram suas espermatecas dissecadas. As espermatecas foram analisadas por meio de técnicas histológicas e histoquímicas. Para testar se houve diferença no desenvolvimento da espermateca entre rainhas virgens com diferentes idades e entre rainhas virgens e fisogástricas, medidas da espessura do epitélio e volume da espermateca foram submetidas à análise de variância. Os resultados demonstram que não há diferenças significativas na espessura do epitélio da parede e no volume do receptáculo da espermateca nas rainhas virgens. Entretanto, rainhas fisogástricas apresentam espermatecas mais volumosas e epitélio mais espesso que as virgens. As glândulas da espermateca também são afetadas pela cópula, pois em rainhas recém-emergidas as glândulas são PAS positivas enquanto em rainhas virgens com 30 dias apresentam poucos polissacarídeos. Rainhas fisogástricas apresentaram as glândulas PAS positivas. O teste de mercúrio-bromofenol foi positivo no epitélio das espermatecas de rainhas virgens e fisogástricas. Nas glândulas, as rainhas fisogástricas apresentam grânulos contendo proteínas.

Palavras-chave: Espermateca; cópula; rainha virgem

Abstract: The effect of mating in the spermathecal development of the virgin queens in *Melipona quadrifasciata anthidioides* was investigated. Newly emerged virgin queens with 15, 20, 30 days old of adult life and physogastric queens had their spermathecae dissected. The spermathecae were analyzed by means of histology and histochemical tests. To verify differences in the spermathecal development among virgin queens with different ages and among virgin queens and physogastric ones, measurements of the epithelial thickness and spermathecal volume were carried out. The results showed that there are no significant differences in the spermathecal epithelium thickness and receptacle volumen between virgin and physogastric queens. However, physogastric queens have spermathecae more voluminous and the epithelium thicker than virgin queens. The spermathecal glands are also affected by the mating delay, because in newly emerged queens the glands are PAS-positive

while virgin queens 30 days old show few polysaccharide. Spermathecal glands of physogastric queens were PAS-positive. Virgin and physogastric queens have positive mercury-bromophenol spermathecal epithelium, while only physogastric ones have protein granules in the cell glands.

Keywords: bees, mating, spermatheca, virgin queen

Introdução

O processo reprodutivo em abelhas sociais é longo. Durante todo este período, os espermatozóides precisam ser mantidos dentro das fêmeas. A manutenção da viabilidade dos espermatozóides é um aspecto crítico do sucesso reprodutivo das rainhas (Hitchcock, 1956). A espermateca, estrutura especializada encontrada no aparelho reprodutor das fêmeas exerce essa função (Snodgrass, 1935, 1956).

O desenvolvimento de um órgão especializado para a estocagem afastou a necessidade de acasalamento antes de cada oviposição e permitiu o uso dos espermatozóides armazenados de acordo com a necessidade, dispensando assim, da procura por subseqüentes acasalamentos pela fêmea e do risco de ser predada (Thornhill & Alcock, 1983).

Em abelhas, a espermateca é uma bolsa esférica com a parede constituída por uma camada única de células altas com um revestimento cuticular na face luminal e, na sua face externa uma lâmina basal e extensa rede traqueolar, sendo conectada na transição do oviduto comum para a vagina por um ducto curto (Camargo & Mello, 1970; Dallai, 1975; Pabalan *et al.*, 1996; Martins & Serrão, 2002).

O epitélio da espermateca promove proteção para os espermatozóides e constitui uma barreira para que a viabilidade destes não seja afetada (Taber & Blum, 1960). A espermateca apresenta também a função de controle de saída de espermatozóides, controle de pH do meio onde os espermatozóides se encontram e trocas gasosas (Snodgrass, 1956; Lensky & Schindler, 1967; Poole, 1970). Em rainhas recém-emergidas, ela não está totalmente desenvolvida e pode necessitar de maturação antes da cópula (Poole, 1970).

Associada à espermateca encontra-se um par de glândulas. Em *Apis mellifera*, essas glândulas são constituídas de dois túbulos que se unem e desembocam no ducto que liga a espermateca à vagina (Dallai, 1975). Em *Melipona bicolor*, as glândulas da espermateca são reduzidas e os ductos glandulares desembocam diretamente na espermateca (Cruz-Landim & Serrão, 2002).

A função das glândulas da espermateca ainda é discutida. Sua secreção pode estar envolvida na ativação ou nutrição dos espermatozóides (Flanders, 1939; Snodgrass, 1933) ou servir simplesmente para lubrificar o ducto da espermateca (Van Wick, 1952). Em algumas espécies do gênero *Bombus*, além da secreção

produzida pelas glândulas da espermateca, polissacarídeos são secretado pelas células do ducto da espermateca como uma fonte de energia para os espermatozóides antes da fertilização dos ovócitos (Schoeters & Billen, 2000).

Segundo Fyg (1960), os espermatozóides permanecem na espermateca em um estado metabólico baixo. A não motilidade dos espermatozóides na espermateca se deve principalmente ao pH básico interno desta, à alta viscosidade do fluido espermático; à parcial desidratação dos espermatozóides (devido à hipertonidade deste fluido); à presença de um inibidor da atividade dos espermatozóides e à deficiência de oxigênio dentro da espermateca, promovendo um estado de latência das células espermáticas (Lensky & Schindler, 1967). Os espermatozóides permanecendo imóveis proporcionam um aumento de sua longevidade diminuindo o metabolismo e consumo de oxigênio, e diminuindo a secreção de resíduos de reações químicas no meio (Aidar, 1996).

Visto que a espermateca apresenta a função de armazenar e manter a viabilidade dos espermatozóides e que rainhas recém-emergidas não apresentam espermatecas totalmente desenvolvidas, esse trabalho tem por objetivo analisar se a cópula influencia no desenvolvimento da espermateca e na atividade das suas glândulas em rainhas de *Melipona quadrifasciata anthidioides*.

Material e Métodos

Rainhas e operárias de *Melipona quadrifasciata anthidioides* foram obtidas diretamente de colônias do Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. As rainhas foram obtidas de favos de cria removidos das colônias, mantidos a $29 \pm 1^\circ\text{C}$, em estufa B.O.D., e observados diariamente para detecção de rainhas recém-emergidas. As rainhas recém-emergidas foram separadas em placas de Petri (12 cm) contendo dez operárias e recebendo pólen e mel nos cinco primeiros dias de vida adulta. Cinco dias após a emergência, as rainhas foram transferidas para caixas de madeira (15 x 7,5 x 15 cm) cobertas com vidro, recebendo pólen, mel *ad lib.* e cerume. Diariamente, operárias foram acrescentadas às caixas.

Para verificar se há alterações nas espermatecas e nas glândulas da espermateca, um total de doze rainhas foram estudadas, sendo três rainhas em cada uma das seguintes idades: recém-emergidas, 15, 20 e 30 dias.

Para verificar se a cópula influencia a morfologia da espermateca das rainhas, rainhas fisogástricas também foram analisadas.

O trato reprodutivo foi dissecado em solução salina para insetos e transferido para a solução fixadora de Zamboni (Stefanini, 1967), posteriormente, desidratado em série crescente de concentração alcoólica, embebido em historesina JB4, seccionados serialmente em cortes de 5 µm de espessura e corado com hematoxilina e eosina.

Algumas secções foram submetidas aos testes histoquímicos de PAS para evidenciar polissacarídeos e glico-conjugados neutros e ao teste de Mercúrio-bromofenol para evidenciação de proteínas (Pearse, 1985).

Depois de coradas, as lâminas foram cobertas com lamínulas, observadas ao microscópio de luz e fotografadas com a câmera digital Nikon Coolpix 4500.

As secções seriadas foram utilizadas para determinar a espessura do epitélio e o volume do receptáculo das espermatecas pelo método de Cavalieri (Coggeshall, 1992). As medidas foram feitas com o auxílio do software Image Pro Plus®, 4.0 versão para Windows (Media Cybernetics). Para testar se houve diferença no desenvolvimento da espermateca entre rainhas virgens com diferentes idades as medidas foram submetidas à análise de variância (ANOVA). O mesmo teste foi realizado para testar se há diferença no desenvolvimento da espermateca (eixo Y) entre rainhas virgens e copuladas (eixo X). O teste foi realizado com auxílio do aplicativo XLSTAT 2006 versão para Windows.

Resultados

A espermateca das rainhas de *M. quadrifasciata anthidioides* é uma bolsa esférica ligada ao oviduto comum pelo ducto da espermateca (figura 1). Sua parede é constituída por um epitélio simples apresentando uma cutícula na face luminal e na face externa uma lâmina basal (figura 2).

Tanto em rainhas virgens quanto em fisogástricas, a parede da espermateca apresenta células colunares com núcleos centrais. Estas células apresentam citoplasma predominantemente basófilo com material disperso em forma de

filamentos na base e de forma homogênea no ápice em rainhas virgens e citoplasma homogêneo em rainhas fisogástricas (figura 3 e 4).

Nas rainhas virgens, a parede da espermateca apresentou positividade ao teste de PAS somente na lâmina basal e cutícula. O mesmo aconteceu em rainhas fisogástricas, acrescido de uma leve positividade em seu citoplasma (figura 5).

O epitélio da espermateca apresentou regiões positivas ao mercúrio-bromofenol. A região apical apresentou-se homoganeamente positiva em todas as rainhas analisadas, tanto virgens quanto fisogástricas, enquanto que na região basal, as reações positivas ao mercúrio-bromofenol foram escassas. No espaço subcuticular, as células apresentaram forte reação positiva para proteínas (figura 6). Núcleos volumosos com nucléolos evidentes foram identificados no epitélio da espermateca (figura 7).

Em rainhas virgens não foram encontradas alterações significativas no volume da espermateca ($F = 2,34$; $P > 0,05$) e na espessura do epitélio ($F = 2,42$; $P > 0,05$). Tanto as células epiteliais da espermateca quanto das glândulas da espermateca não demonstraram características de morte ou de divisão celular.

Rainhas fisogástricas apresentam o receptáculo mais volumoso ($64,36 \times 10^6 \pm 42 \times 10^6 \mu\text{m}^3$) do que rainhas virgens ($13,71 \times 10^6 \pm 6 \times 10^6 \mu\text{m}^3$; $F = 19,32$; $P < 0,05$; figura 8). A espessura do epitélio das rainhas copuladas ($50,29 \pm 4,46 \mu\text{m}$) também foi maior do que em rainhas virgens ($34,26 \pm 6,1 \mu\text{m}$; ; $p < 0,05$; figura 9).

O ducto da espermateca é constituído por um epitélio simples de células achatadas revestidas por cutícula. Externamente, há uma camada muscular que se mostra bem desenvolvida na junção com o receptáculo da espermateca.

As glândulas da espermateca são constituídas por duas camadas de células: uma interna não secretora recoberta pela cutícula na face luminal formando a íntima e uma camada externa secretora (figura 10). As células da camada secretora são esféricas, providas de um canal que as ligam a um poro na cutícula por onde a secreção é descarregada denominado canal coletor. A secreção da glândula é descarregada diretamente no receptáculo da espermateca.

As glândulas da espermateca de rainhas virgens apresentaram-se positivas ao teste de PAS. Com o avançar da idade, a positividade foi reduzida, já que em rainhas virgens com 30 dias de idade poucos pontos positivos foram encontrados (figuras 11 e 12). O ducto da espermateca, quando submetido ao teste de PAS, demonstrou células musculares positivas em rainhas com até 15 dias de

idade. Quanto ao teste de mercúrio-bromofenol, tanto as glândulas da espermateca quanto o ducto da espermateca mostraram-se positivas em rainhas virgens.

As células glandulares e o ducto da espermateca de rainhas fisogástricas são positivas ao teste de PAS (figura 13). No teste para proteínas, as células glandulares apresentaram o citoplasma e grânulos fortemente positivos (figura 14).

Discussão

A espermateca de *M. quadrifasciata anthidioides* apresenta morfologia muito semelhante ao de outras espécies de abelhas (Camargo & Mello, 1970; Dallai, 1975; Pabalan *et al.*, 1996; Martins & Serrão, 2002).

A espessura do epitélio da parede da espermateca de *A. mellifera* pode variar de acordo com a idade, sendo cúbicas em rainhas virgens e colunares em rainhas velhas (fisogástricas), pois a espermateca de rainhas-recém emergidas não está completamente desenvolvida e pode requerer diferenciação e maturação antes da cópula, sendo que, o desenvolvimento da espermateca depende mais da idade do que da cópula (Poole, 1970). Por outro lado, nossos resultados mostram que em rainhas virgens de *M. quadrifasciata anthidioides* com diferentes idades não foram encontradas alterações significativas na espessura do epitélio da espermateca e no volume destas. Entretanto, rainhas fisogástricas apresentaram volume e espessura do epitélio maior que o das rainhas virgens, sugerindo que o desenvolvimento do epitélio da espermateca em *M. quadrifasciata anthidioides* é dependente, não somente da idade, mas também da cópula.

O aumento do volume provavelmente ocorreu por causa da quantidade de espermatozoides armazenados na espermateca após cópula.

Na análise do epitélio da espermateca, tanto em rainhas virgens quanto em rainhas fisogástricas, não foram verificados sinais de morte nem de divisão celular. Poole (1970) não encontrou divisão celular no epitélio da espermateca de *Apis mellifera*, sendo, portanto o aumento do volume da espermateca nas rainhas decorrente do aumento do tamanho e não no número de células do epitélio, que é corroborado pela maior espessura do epitélio da espermateca em rainhas fisogástricas de *M. quadrifasciata anthidioides*.

Tanto a cutícula quanto a lâmina basal são positivas ao teste de PAS em *M. quadrifasciata anthidioides*, semelhante ao reportado para *A. mellifera* (Poole,

1970). Os componentes primários da lâmina basal são proteínas fibrosas, colágeno, glicoproteínas e glicosaminoglicanas, sendo as duas últimas as responsáveis pela positividade ao teste de PAS. A quitina, constituinte característico da cutícula dos insetos é composta de resíduos de N-acetilglicosamina e outros componentes (Chapman, 1998; Pearse, 1985).

O epitélio da espermateca de rainhas virgens e fisogástricas de *M. quadrifasciata anthidioides* é positiva ao teste de mercúrio-bromofenol. Segundo Camargo & Mello (1970), o epitélio da espermateca desde o estágio pupal a adulto é positivo ao teste de proteínas em *A. mellifera*.

As células epiteliais da espermateca secretam material para dentro do reservatório e poderia estar envolvida na troca de gases entre a espermateca e traquéias e na passagem de materiais da hemolinfa para a espermateca (Laidlaw, 1944). Entretanto, Camargo & Mello (1970), Dallai (1975), Kressin (1996), sugerem que esse epitélio não está envolvido na produção de substâncias em rainhas de *A. mellifera*. Nas células do epitélio da espermateca, o retículo endoplasmático rugoso e o aparelho de Golgi são escassos, mas mitocôndrias são encontradas associadas a invaginações da membrana plasmática na sua região basal, indicando que está ocorrendo transporte de substâncias entre a hemolinfa e a luz da espermateca (Dallai, 1975; Kressin, 1996). Resultados semelhantes foram observados na espermateca de *M. bicolor bicolor*, sendo a nutrição dos espermatozoides feita por absorção de substâncias da hemolinfa com contribuição da secreção produzida pela glândula da espermateca (Cruz-Landim *et.al.*, 2003).

Nossos resultados mostram que o epitélio da espermateca apresenta núcleos com localização central, com cromatina descondensada e nucléolo evidente tanto em rainhas virgens quanto em fisogástricas, características de células com alta atividade de síntese. Tanto as rainhas virgens quanto as fisogástricas apresentam no ápice das células epiteliais da espermateca um material fortemente positivo ao mercúrio-bromofenol, sugerindo que estas células podem secretar este material para o reservatório da espermateca, ou a secreção vista seja a própria cutícula.

As glândulas da espermateca de *M. quadrifasciata anthidioides* apresenta morfologia semelhante à encontrada em *A. mellifera* e *M. bicolor bicolor* (Dallai, 1972; Cruz-Landim & Serrão, 2002). As glândulas possuem duas camadas de células com três tipos de células: as secretoras que apresentam um ducto coletor,

as células que formam o ducto eferente, e as células da íntima cuticular. Noirot & Quenedey (1991) classificaram as células glandulares dos insetos com essa morfologia como células glandulares do tipo III. No caso dessas glândulas, a íntima corresponderia à epiderme.

Estudos histoquímicos demonstraram que a secreção que ocupa o lúmen da espermateca de fêmeas virgens é provavelmente o produto de secreção das glândulas constituído de glicoproteína ou glicosaminoglicanas (Davey & Webster, 1967; Clements & Potter, 1967; Bhatnagar & Musgrave, 1971). Em rainhas de *A. mellifera*, a glândula da espermateca é PAS positiva (Camargo & Mello, 1970; Dallai, 1972). Nós encontramos resultados semelhantes nas glândulas da espermateca de rainhas de *M. quadrifasciata anthidioides* que apresentaram-se positivas ao teste de PAS. Entretanto, quando comparamos rainhas virgens com idades diferentes foi observado que a positividade ao teste de PAS foi reduzida. Rainhas virgens recém-emergidas apresentam alta positividade a esse teste que pode ser explicado pelo fato dos tecidos jovens apresentarem uma reserva energética para o desenvolvimento e início da sua atividade (Cruz-Landim & Serrão, 2002).

As glândulas da espermateca de rainhas fisogástricas de *M. quadrifasciata anthidioides* apresentam positividade ao teste de PAS como verificado em outros insetos, sugerindo que a ausência de positividade em rainhas virgens com 30 dias de idade é devido a ausência da cópula, a qual poderia induzir a produção de secreção pelas glândulas.

Como as glândulas da espermateca desembocam diretamente no receptáculo da espermateca, como acontece em *M. bicolor bicolor* (Cruz-Landim & Serrão, 2002), acreditamos que essa glândula contribua com a nutrição dos espermatozóides.

As células do ducto da espermateca de rainhas de algumas espécies *Bombus* secreta polissacarídeos que podem nutrir os espermatozóides antes da fertilização. Nós verificamos que o ducto da espermateca foi PAS positivo em rainhas virgens com até 15 dias de idade. Em rainhas fisogástricas nas células musculares e não nas células que formam o ducto, sugerindo que o ducto da espermateca não tenha a função de nutrir os espermatozóides.

Os resultados aqui apresentados permitem inferir que a cópula é responsável pelo desenvolvimento da espermateca e atividade secretora das glândulas.

Referências Bibliográficas

Aidar, D.S. 1996. **A mandaçaia: Biologia de abelhas, manejo e multiplicação artificial de colônias de *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae).** Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, 103p.

Bhatnagar, R.D.S. & Musgrave, A.J. 1971. Aspects of histophysiology of the spermathecal gland of *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera). **Can. J. Zool.** 49: 275-277.

Camargo, J.M.F. & Mello, M.L. 1970. Anatomy and histology of the genital tract, spermatheca, spermathecal duct and glands of *Apis mellifera* queens (Hymenoptera: Apidae). **Apidologie** 1: 351-373.

Chapman. R.F. 1998 **The Insects: Structure and Function.** American Elsevier Publishing Company, New York. 770p.

Clements, A.N. & Potter, S.A. 1967. The fine structure of the spermathecae and their ducts in the mosquito *Aedes aegypti*. **J. Insect Physiol.** 13: 1825-1836.

Coggeshall, E.R. 1992. A consideration of neural counting methods. **Trends Neurosci.** 15: 9-13.

Cruz-Landim, C.; Yabuki, A. T.; lamonte, M. 2003. Ultrastructure of the spermatheca of *Melipona bicolor bicolor* Lep. (Hymenoptera, Apinae, Meliponini). **Biosci. J.** 19: 57-64.

Cruz-Landim, C. & Serrão, J.E. 2002. Ultrastructure of the spermathecal gland of *Melipona bicolor* Lep. (Hymenoptera, Apinae, Meliponini). **Braz. J. Morphol. Sci.** 19: 9-16.

Dallai, F. 1972. Fine structure of the spermathecal gland of *Apis mellifera*. **Redia** 53: 413-425.

Dallai, R. 1975. Fine structure of the spermatheca of *Apis mellifera*. **J. Insect Physiol.** 21: 89-109.

Davey, K.G. & Webster, G.F. 1967. The structure and secretion of the spermatheca of *Rhodnius prolixus* Stal: A histochemical study. **Can. J. Zool.** 45: 653-657.

Flanders, S.E. 1939. Environmental control of sex in hymenopterous insects. **Ann. Entomol. Soc. Amer.** 32: 11-26.

Fyg, W. 1960. Über die Ablagerung von amyloid im Samenblasenepithel der Bienenkönigin (*Apis mellifera*). **Z. Angew. Entomol.** 45: 415-420.

Hitchcock, J.D., 1956. Honey bee queens whose eggs all fail to hatch. **J. Econ. Ent.** 49: 11-14.

Kressin, M.; Sommer, U.; Schnorr, B. 1996. The spermathecal epithelium of the queen bee (*Apis mellifera*): Morphology, age-dependent changes and cell contacts. **Anat. Histol. Embryol.** 1: 31-35.

Laidlaw Jr, H.H. 1944. Artificial insemination of the queen bee (*Apis mellifera* L.) Morphological basis and results. **J. Morphol.**, 74: 429-465.

Lensky, Y. & Schindler, H. 1967. Motility and reversible inactivation of honeybee spermatozoa *in vivo* and *in vitro*. **Ann. Abeille.** 10: 5-16.

Martins, G.F. & Serrão, J.E. 2002. A comparative study of the spermatheca in bees (Hymenoptera; Apoidea). **Sociobiology.** 40: 711-720.

Noirot, C. & Quennedey, A. 1991. Glands, gland cell, glandular units: some comments on terminology and classification. **Ann. Soc. Ent. Fr.** 27: 123-128.

Pabalan, N.; Davey, K.G.; Packer, L. 1996. Comparative morphology of spermathecae in solitary and primitively eusocial bees (Hymenoptera; Apoidea). **Can. J. Zool.** 74: 802-808.

Pearse, A.G.E. 1985. **Histochemistry: Theoretical and Applied**. Churchill, London.

Poole, H.K. 1970. The wall structure of the hohey bee spermatheca with comments about its function. **Ann. Entomol. Soc. Amer.** 63: 1625-1628.

Schoeters, E. & Billen, J. 2000. The importance of the spermathecal duct in bumblebees. **J. Insect Physiol.** 46: 1303-1312.

Snodgrass, R.E. 1933. Morphology of the insect abdomen, Pt. II. The genitals ducts and the ovipositor. **Smith Misc. Coll.** 89: 1-148.

Snodgrass, R.E. 1935. **Principles of insect morphology**. New York: McGraw-Hill.

Snodgrass, R.E. 1956. **Anatomy of honey bee**. Ithaca, USA: Comstock Publish Co., 334pp.

Stefanini, M.; Demartino, C. & Zamboni, L. (1967). Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. **Nature** 216: 173-174.

Taber, S. & Blum, M.S. 1960. Preservation of honey bee semen. **Science** 131: 1734-1735.

Thornhill, R. & Alcock, J. 1983. **The Evolution of Insect Mating Systems**. Harvard University Press, Cambridge, Mass. Ande London.

Van Wick, L.E. 1952. The morphology and histology of the genital organs of *Leucophera maderae* (Fabr.) (Blatidae, Orthoptera). **J. Ent. Soc. S. Áfr.** 15: 3-62.

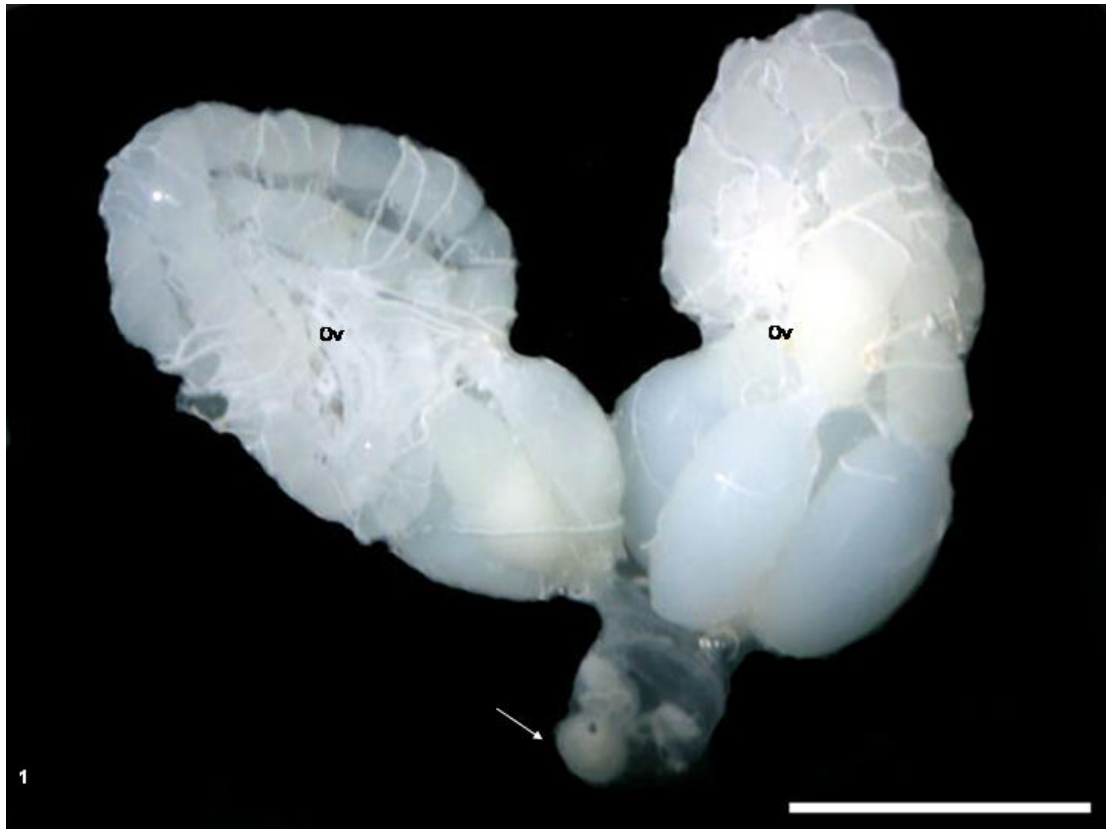


Fig. 1: Anatomia do aparelho reprodutor feminino de rainha de *Melipona quadrifasciata anthidioides*. Ovários constituídos por folículos conectados aos ovidutos laterais. A seta indica a espermateca ligada ao oviduto comum. Barra: 2mm

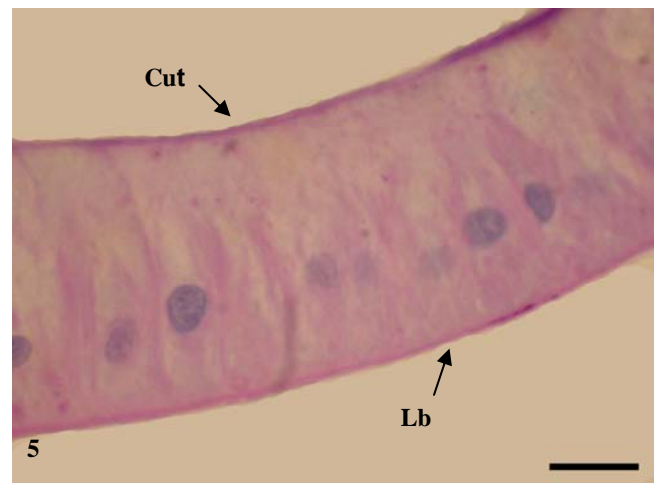
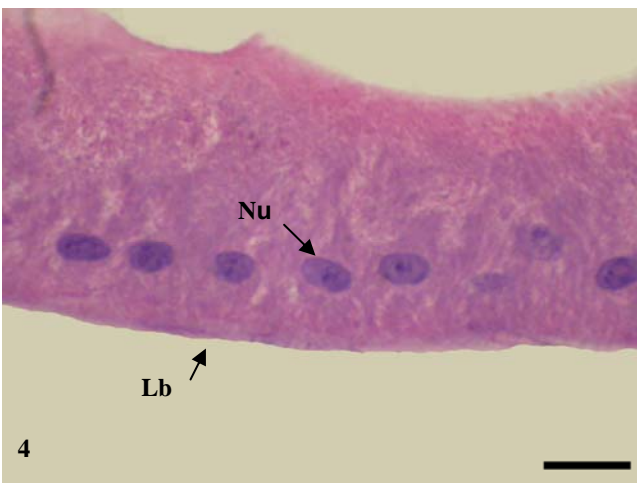
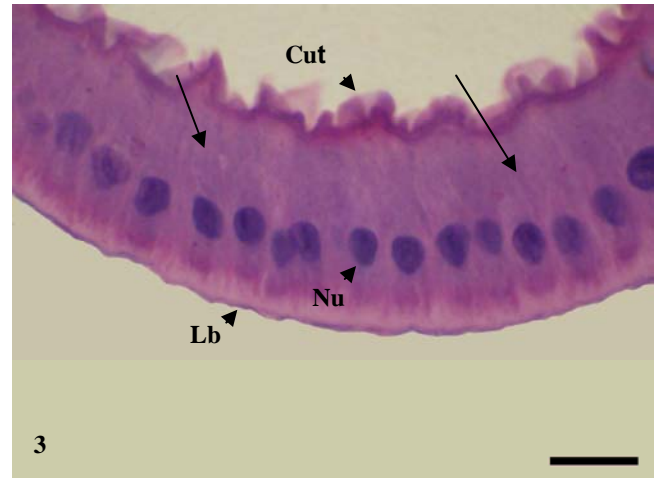
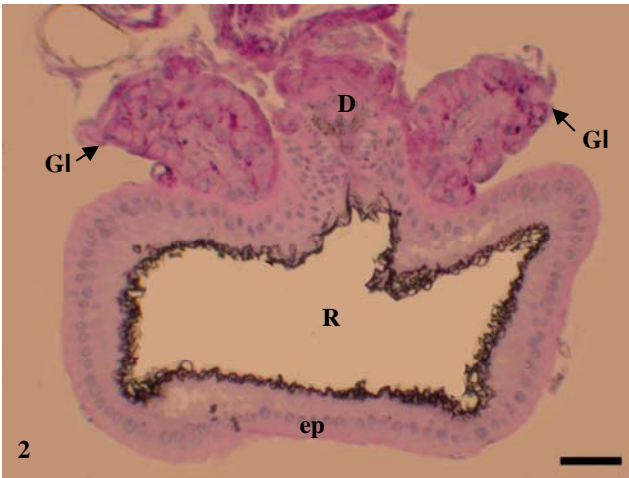


Fig. 2: Secção transversal da espermateca de rainhas de *Melipona quadrifasciata anthidioides* constituída por uma camada única de células (ep), um par de glândulas (Gl) e um ducto (D). R, receptáculo. Barra: 50µm. **Fig. 3:** Secção histológica da espermateca, mostrando o epitélio colunar da espermateca com células com citoplasma predominantemente basófilo (seta) de rainha virgem submetido à coloração convencional (H.E) demonstrando. Barra: 20µm. **Fig. 4:** Secção histológica da espermateca, mostrando o epitélio colunar da espermateca de rainha fisogástrica com citoplasma basófilo. Barra: 20µm. **Fig. 5:** Secção histológica da espermateca, mostrando o epitélio de rainha fisogástrica submetido ao teste de PAS com citoplasma, lâmina basal e cutícula positivos. Barra: 20µm. Lb, lâmina basal; Cut, cutícula; Nu, núcleo.

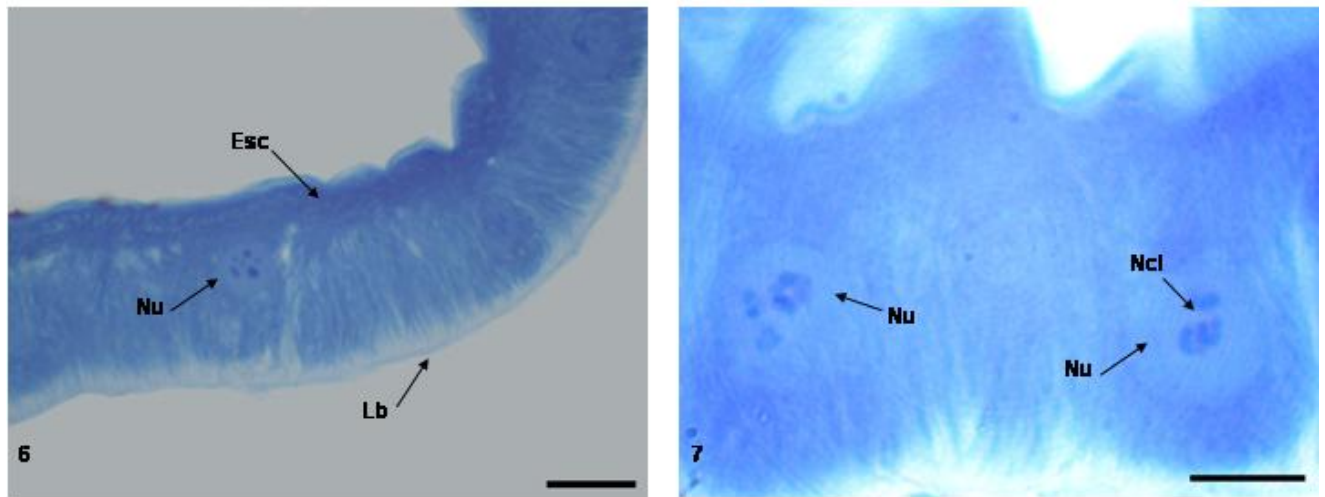


Fig. 6. Secção histológica da espermateca, mostrando o epitélio de rainha fisogástrica submetida ao teste de mercúrio-bromofenol com células com citoplasma positivo, especialmente em seu ápice. Lb, lâmina basal; Nu, núcleo; Esc, espaço subcuticular. Barra: 20 μ m. **Fig 7.** Detalhe do epitélio da espermateca demonstrando os núcleos (Nu) e nucléolos evidentes (Ncl). Barra: 10 μ m.

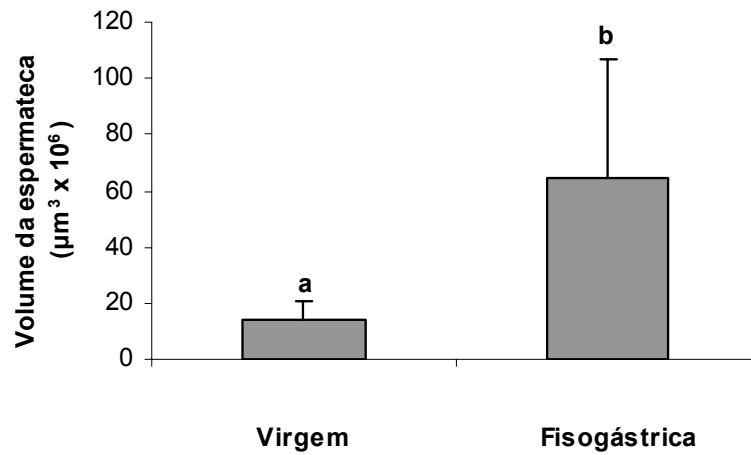


Figura 8: Volume do receptáculo da espermateca em rainhas virgens e fisogástricas de *Melipona quadrifasciata anthidioides*. Letras diferentes sobre as barras indicam diferença pelo teste ANOVA ($p < 0,05$).

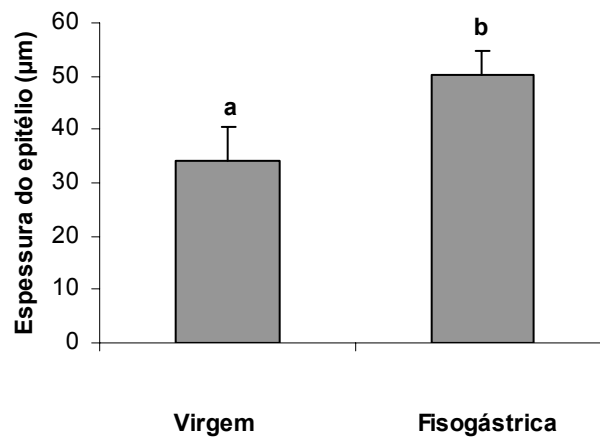


Figura 9: Espessura do epitélio da espermateca de rainhas virgens e copuladas de *Melipona quadrifasciata anthidioides*. Letras diferentes sobre as barras indicam diferença no teste ANOVA ($p < 0,05$).

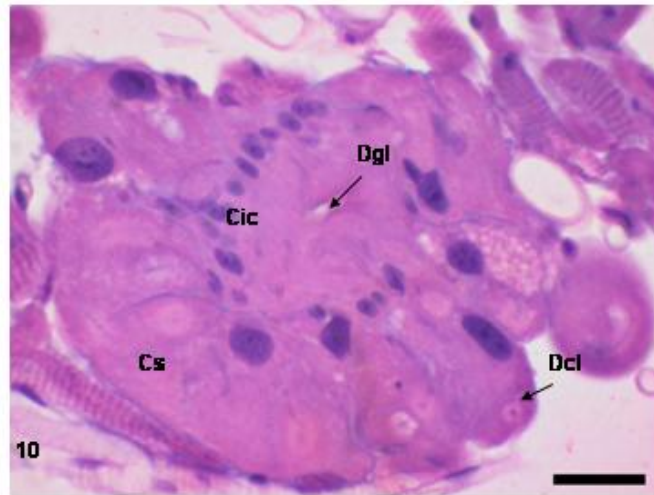


Fig. 10. Secção histológica da glândula da espermateca de *Melipona quadrifasciata anthidioides* submetida à coloração convencional (H.E.) composta por duas camadas de células, uma externa constituída por células secretoras (Cs) e outra interna não secretora com dois tipos de células, as células da íntima cuticular (Cic) e as células que formam o ducto coletor (Dcl). Dgl, ducto da glândula da espermateca. Barra: 20µm

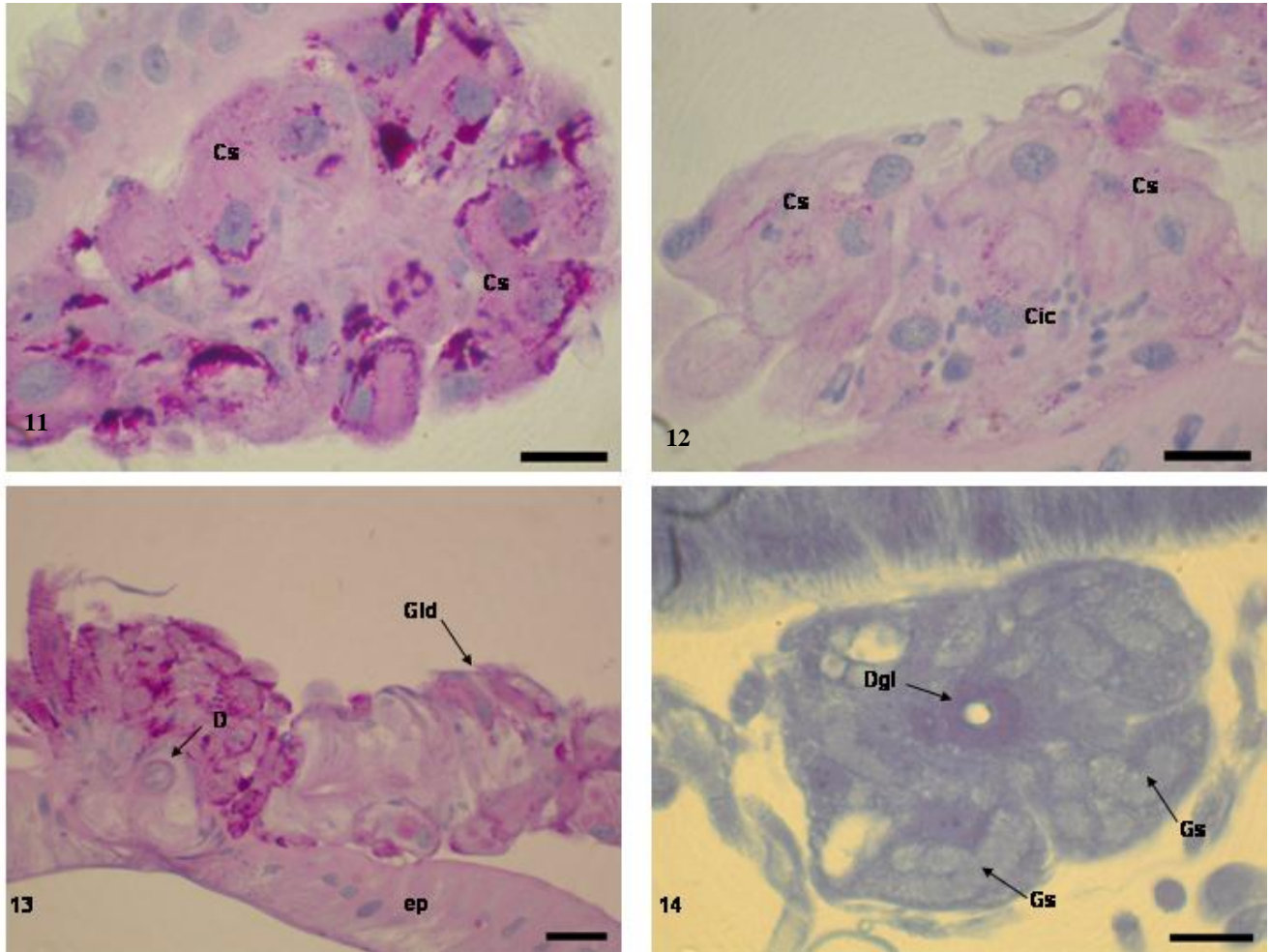


Fig. 11. Secção histológica da glândula da espermateca de rainha recém-emergida de *Melipona quadrifasciata anthidioides* com células secretoras (Cs) PAS-positivas. Barra: 20 μ m. **Fig. 12.** Secção histológica da glândula da espermateca de rainha virgem com 30 dias de idade PAS-negativa. Barra: 20 μ m. **Fig. 13.** Secção histológica da espermateca, mostrando o ducto da espermateca PAS-positivo e glândula da espermateca com alguns pontos PAS-positivos em rainha fisogástrica. Barra: 30 μ m. **Fig. 14.** Secção histológica da glândula da espermateca de rainha fisogástrica submetidas ao teste de mercúrio-bromofenol demonstrando grânulos contendo secreção (Gs). Barra: 15 μ m. Ep., epitélio; Cic, células da íntima cuticular; Gld, glândula da espermateca; Dgl, ducto da glândula da espermateca.

4 - Conclusão geral

Como ocorre em outros insetos, a cópula em *Melipona quadrifasciata anthidioides* é responsável por estimular o início da maturação dos ovócitos. Os ovários destas permanecem em estado pré-vitelogênico até a cópula. Posteriormente à cópula, a vitelogênese é ativada e o ovócito pode continuar seu processo de maturação. Na ausência da cópula, os ovários exibem sinais de degeneração em rainhas com 15 dias de idade, mas estes permanecem viáveis se a rainha for copulada com até 25 dias de idade.

A cópula também interfere no desenvolvimento da espermateca. Rainhas virgens não possuem espermatecas totalmente desenvolvidas, necessitando da cópula para que o desenvolvimento total ocorra. Em rainhas virgens a espermateca apresenta o epitélio com menor espessura e o receptáculo com menor volume do que rainhas fisogástricas. Como não foram verificadas divisões celulares, acreditamos que o aumento do volume da espermateca seja decorrente do aumento do tamanho e não do número de células do epitélio.

As glândulas da espermateca também sofrem interferência da cópula. Grânulos contendo proteínas e polissacarídeos são identificados em rainhas fisogástricas, enquanto em rainhas virgens os grânulos protéicos não são identificados e os grânulos de polissacarídeos tornam-se escassos com o avançar da idade.