

RÍUDO DE PAIVA FERREIRA

O DESENVOLVIMENTO DO APARELHO REPRODUTOR DE  
MACHOS DIPLÓIDES DE *Melipona quadrifasciata* LEPELETIER, 1836  
SOB INFLUÊNCIA DO HORMÔNIO JUVENIL

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  
2011

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

F383d  
2011

Ferreira, Rúdo de Paiva, 1985-

O desenvolvimento do aparelho reprodutor de machos diploídes de *Melipona quadrifasciata* Lepeletier 1836 sob influência do hormônio juvenil / Rúdo de Paiva Ferreira. – Viçosa, MG, 2011.  
vii, 38f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Lúcio Antônio de Oliveira Campos.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f. 32-38

1. Abelhas sem ferrão - Reprodução. 2. Hormônios juvenis.  
3. Espermatogênese. 4. Espermatozóides. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 595.799

RÍUDO DE PAIVA FERREIRA

O DESENVOLVIMENTO DO APARELHO REPRODUTOR DE  
MACHOS DIPLÓIDES DE *Melipona quadrifasciata* LEPELETIER, 1836  
SOB INFLUÊNCIA DO HORMÔNIO JUVENIL

Dissertação apresenta à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para a obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 26 de Julho de 2011

---

Prof. José Eduardo Serrão

---

Prof<sup>a</sup> Luciane Cristina de Oliveira Lisboa

---

Prof. Lúcio Antônio de Oliveira Campos  
(Orientador)

A meus pais que sempre me apoiaram e  
a meu irmão pelas diferenças ...  
Dedico

## AGRADECIMENTOS

À minha família pelo apoio e compreensão.

Ao professor Lúcio Campos pelo ensinamento que foram muito além dos conhecimentos científicos, mas me mostram que tranquilidade e calma são as melhores estratégias para enfrentar os desafios.

À professora Uyrá Zama que me encorajou a buscar novos horizontes e mesmo, nos momentos em que eu queria desistir, me incentivou e confiou em mim mais que eu mesmo.

À amigos de longa data, Iara, Simone Mitre, Daniel e Catão, que mesmo estamos distantes me ajudaram a vencer desafios.

Agradeço especialmente à Talitta, uma criadora doce e de temperamento forte, pela ajuda, principalmente, durante a adaptação nesta terra exótica chamada Viçosa.

À Déboara e Daniele pela amizade simples e o laço forte e perene criado espontaneamente.

Às minhas amigas Bianca, Paula e Lila que sempre me deram conselhos valiosos e divertidas conversar no fim de tarde.

Ao Hugo Werneck e Luiz Fernando pela parceria e companherismo.

À Dodora e Juliana, amigas divertidíssimas de riso natural e espontâneo.

Às minhas amigas de bolsa REUNI: Waléria e Monise que me ajudaram a contornar as saias justas com os alunos do curso de extensão e pelos ensinamento de paciência, organização.

Aos técnicos do Apiário, Cabrito e Íris, Ferreira, Gaiola, Lulu, Osmar, Toninho sempre dispostos a ajudar.

À professora Denilce Lopes por ser mais que uma orientada das atividades REUNI, mas uma amiga de conversas boas, saídas memoráveis e ensinamentos de vida.

À professores Edmilson Amaral e Luciane Lisboa, exemplos de praticidade e paciência.

Ao professores José Eduardo Serrão e José Lino Neto por me acolher no laboratório de Ultraestrutura celular.

Aos amigos do laboratório de Ultraestrutura celular, Douglas, Madu, Dihego Polly, pelo convívio e companherismo.

À Beth por me alertar de prazos e pela simpatia no atendimento quando eu estava desesperado com o plano de estudo.

Ao programa de Pós-graduação em Biologia Celular pela oportunidade profissional e por me fazer encontrar amigos.

À Capes/REUNI pelo apoio financeiro e pelo início de minha experiência didática nos trabalhos com os alunos de graduação no curso de extensão.

À Universidade Federal de Viçosa pela acolhida e pelo ensinamento de qualidade e tradição.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	vi
ABSTRACT .....	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO.....	6
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	7
3.1. Abelhas.....	7
3.2. Produção dos machos diplóides com características de rainha (QLM) .....	8
3.3. Histologia .....	9
3.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	9
3.5. Morfometria dos Testículos.....	10
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	11
4.1. Estrutura dos testículos e maturação sexual:.....	12
4.2. Espermiogênese e Espermatozóide.....	16
4.3. Vesícula seminal.....	20
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32

## RESUMO

FERREIRA, Rúdo de Paiva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2011. **O desenvolvimento do aparelho reprodutor de machos diplóides de *Melipona quadrifasciata* Lepeletier, 1836 sob influência do hormônio juvenil.** Orientador: Lúcio Antônio de Oliveira Campos. Co-orientador: Uyrá dos Santos Zama.

A aplicação tópica de hormônio juvenil (HJ) em larvas de último instar durante a fase de tecelagem do casulo de *Melipona quadrifasciata* induz a diferenciação de larvas de operárias em rainhas, o mesmo efeito foi verificado em machos diplóides desta espécie. Os machos que tiveram suas características morfológicas semelhantes à rainha foram denominados “Queen Like Male” (QLM). O objetivo principal deste estudo foi caracterizar a morfologia dos testículos, vesícula seminal e espermatozóides de machos diplóides de QLM resultante do tratamento com 2 µg/ml de HJ de modo a elucidar o efeito deste hormônio no desenvolvimento das características das estruturas reprodutivas de machos de *M. quadrifasciata*. Foram feitas análise histológica e ultraestrutural dos testículos, vesícula seminal e espermatozóides de 21 QLM recém-emergidos e nas idades de três e com cinco dias de vida adulta. As mesmas estruturas de 21 machos haplóides e 21 diplóides naturais, nas mesmas idades, foram usadas para comparação. Em relação aos machos haplóides e diplóides, os QLM tiveram tempo de sobrevivência menor. Nos QLM, foi observada uma degeneração acelerada dos órgãos internos. Os testículos dos QLM são menores que os dos machos haplóides e diplóides. Espermatozóides de machos haplóides e diplóides são muito semelhantes. Nos QLM os espermatozóides não se formam. A vesícula seminal dos QLM também passa por um processo acelerado de degeneração e porções celulares são observadas na luz do órgão nos machos recém-emergidos. Pelos dados apresentados, o HJ parece abreviar o tempo de vida dos machos QLM.

## ABSTRACT

FERREIRA, Rúdo de Paiva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2011. **The development of the reproductive system of diploid males of *Melipona quadrifasciata* under influence of juvenile hormone.** Adviser: Lúcio Antônio de Oliveira Campos. Co-adviser: Uyrá dos Santos Zama.

Topical application of juvenile hormone (JH) in last instar larvae, during the cocoon spin of *Melipona quadrifasciata* larvae induces differentiation of workers larvae in Queens, the same effect was observed in diploid males of this species. Males that were morphologically similar to the queen were "Like Queen Male" (QLM). The objective of this study was to characterize the morphology of the testes, seminal vesicles and sperm haploid and diploid males of similar to the queen by the treatment with 2 µg / ml HJ in order to elucidate the effect of this hormone in the development of the characteristics of the reproductive structures of males of *M. quadrifasciata*. We made histological and ultrastructural analysis of the testes, seminal vesicles and sperm of 21 newly emerged QLM and the ages of three and five days of adulthood. The same structures of 21 haploid and 21 diploid males natural at the same ages were used for comparison. Haploid and diploid males, the QLM had lower survival time. In the QLM, we observed a rapid degeneration of internal organs. The testes of the QLM are smaller than those of haploid and diploid males. Spermatozoa of haploid and diploid males are very similar, in the QLM the sperm are not formed. The seminal vesicle of the QLM is also undergoing a rapid process of cell degeneration and portions are observed in the light organ in newly emerged males. From the data presented, the HJ seems to shorten the life span of males QLM.

## 1. INTRODUÇÃO

Nas abelhas, assim como nos demais Hymenoptera, dos ovos fertilizados nascem fêmeas diplóides e, de ovos não fertilizados, machos haplóides. Segundo Whiting (1943) a base genética da determinação do sexo nestes organismos segue o modelo de *complementary sex determination* (CSD) que envolve a complementaridade de alelos nos locos sexuais. Revisão extensa e atual deste assunto foi feita por Heimpel e De Boer (2008).

Nos Hymenoptera, várias espécies apresentam machos diplóides. Na maioria dos casos estes têm viabilidade reduzida. Em *Apis mellifera* zangões diplóides possuem baixa viabilidade devido ao canibalismo exercido pelas operárias que atacam as larvas de machos diplóides no início do desenvolvimento (Woyke, 1965,1977). Já em *Melipona* e *Bombus*, os machos diplóides emergem como adultos, mas podem ser mortos pelas operárias (Garófalo 1973, Garófalo *et al.* 1986, Kerr *et al.* 1996). Duchateau e Mariën, (1995) verificaram em *Bombus terrestris* que as larvas de machos diplóides alcançam o estágio adulto e, mais recentemente foi observado que esses indivíduos são férteis e podem gerar uma prole triplóide estéril (Ayabe *et al.* 2004). Em *Melipona quadrifasciata*, os machos diplóides têm viabilidade normal durante o estágio larval, mas sua longevidade máxima é de 17 dias, enquanto que a longevidade máxima de machos haplóides é 30 dias e de operárias, 190 dias (Camargo 1982).

Em *Melipona quadrifasciata* quando as rainhas são acasaladas com seus irmãos, a prole dessa rainha é constituída de 50% de macho diplóide e 50% de operárias (Camargo 1974).

O aparelho reprodutor dos insetos apresenta em geral a seguinte morfologia: os testículos são formados por folículos e de cada um destes parte um ducto eferente, estes se unem formando o ducto deferente comum. Ao longo do ducto deferente existe uma região especializada em armazenar os espermatozóides, a vesícula seminal. As glândulas acessórias geralmente estão anexas ao aparelho reprodutor. Porções pós-vesiculares dos ductos deferentes se unem e abrem diretamente no ducto ejaculatório (Chapman 1998).

Ferreira *et al.* (2004) estudando a anatomia do aparelho reprodutor de 51 espécies de abelhas sugeriram a organização destes em pelo menos quatro padrões nas diferentes famílias de abelhas. Segundo esses autores, o aparelho reprodutor tipo I é caracterizado por três túbulos seminíferos por testículo envolvidos pela membrana escrotal, o tipo II possui os dutos deferentes pós-vesiculares fora da membrana escrotal e possui três ou quatro túbulos seminíferos por testículo, exceto *Apis mellifera* L. que apresenta um número aumentado de túbulos cerca de 250. O tipo III é caracterizado por apresentar os testículos e dutos deferentes pré-vesiculares encapsulados separadamente, em todos os aparelhos reprodutores acima as glândulas acessórias são bem desenvolvidas, já o tipo IV foi considerado típico da tribo Meliponini e apresenta 4 folículos testiculares e as glândulas acessórias estão ausentes nos representantes dessa tribo. Nos Meliponini os ductos deferentes se espessam e assumem uma forma esférica formando a vesícula seminal.

Tavares *et al.* (2003) avaliando pupas de machos diplóides de *M. quadrifasciata* conseguiram diferenciar machos haplóides e diplóides por morfometria dos testículos, pois machos haplóides apresentam testículos longos e afilados enquanto os machos diplóides possuem testículos mais curtos e grossos.

A maturidade sexual dos machos haplóides é alcançada por volta do sétimo dia após a emergência quando a migração dos espermatozóides para a vesícula seminal é completada, já nos machos diplóides a migração de espermatozóides para as vesículas seminais acontece por volta do nono dia de vida (Camargo 1984). Os machos diplóides de *M. quadrifasciata* apresentam uma quantidade menor de espermatozóides na vesícula seminal quando comparados com os espermatozóides de machos haplóides dessa espécie (Camargo 1984).

O comprimento total dos espermatozóides nos Meliponini varia de 80 a 300  $\mu\text{m}$  (Zama *et al.* 2004). Essas células são morfológicamente semelhantes às dos demais Hymenoptera: finas, alongadas e com duas regiões distintas, a cabeça e o flagelo (ou cauda). A região da cabeça compreende o acrossomo e o núcleo. O acrossomo é constituído por uma vesícula acrossomal e por um perforatorium. Considerando exclusivamente os Meliponini, foi descrito para a maioria das espécies, espermatozóides apresentando núcleos homogeneamente compactados observados na microscopia eletrônica de transmissão (Zama *et al.*, 2001, 2004; Araújo *et al.*, 2005), entretanto, Zama *et al.* (2004) relataram a ocorrência de cromatina formando agregados não uniformes em *Melipona marginata* e em *Melipona rufiventris*. O flagelo é formado por um adjunto de centríolo, dois derivados mitocondriais, que nos Meliponini são assimétricos, dois corpos acessórios e o axonema, este com organização microtubular 9 + 9 + 2, sendo nove duplas periféricas, nove pares acessórios e um par central (Zama *et al.*, 2004). A ultra-estrutura dos espermatozóides de machos diplóides ainda é desconhecida.

Em *M. quadrifasciata*, Borges *et al.* (2009) apresentando dados preliminares, avaliaram a expressão de genes associados à regulação de desenvolvimento pós-

embrionário e atividade transportadora de aminoácidos e verificaram que a expressão gênica relativa dos machos diplóides recém-emergidos foi similar à de operárias de mesma idade. Borges *et al.* (dados não publicados) não verificaram, nos machos diplóides, a expressão de genes envolvidos nos processos reprodutivos e de espermatogênese.

O hormônio juvenil (HJ) está envolvido no processo de diferenciação de castas em abelhas. Os experimentos de Wirtz (1973) em *A. mellifera* sugerem a atuação do HJ nos discos imaginais influenciando a determinação de caracteres morfológicos externos típicos de rainha. Esta influência foi verificada em *M. quadrifasciata* (Campos *et al.* 1975; Campos 1978), *Partamona helleri* (Campos e Coelho, 1993) e em outras abelhas da Meliponini (Campos 1977). Nesses casos a aplicação tópica de HJ em larvas de último ínstar, induz a diferenciação de larvas de operárias em rainhas (Campos 1977). Contudo são poucos os trabalhos relacionando HJ ao desenvolvimento de machos.

Zangões de *A. mellifera* apresentam dois picos de biossíntese de HJ no último estágio larval, um durante a fase em que a larva ainda está se alimentando e outro na fase de pré-pupa (Hartfelder *et al.* 1993). Na fase de pupa, o HJ parece controlar o tempo específico de ciclos celulares durante o desenvolvimento dos cistos testiculares de *A. mellifera* (Tozetto 1997, Hartfelder e Engels 1998). Os níveis de HJ, em zangões haplóides adultos de *A. mellifera*, parecem não estar ligados à fisiologia do aparelho reprodutor, visto que os testículos já degeneraram nesta fase da vida (Cruz-Landim, 2009), mas sim a aspectos comportamentais como observado por Tozetto *et al.* (1997) que, ao aplicar de HJ em zangões de *A. mellifera*, observou que os machos tratados com HJ iniciavam precocemente as atividade de vôo.

Camargo (1977) mostrou que larvas pré-defecantes de machos diplóides de *M. quadrifasciata* quando tratados com hormônio juvenil levaram ao desenvolvimento de características morfológicas de rainha, embora a genitália externa ainda tenha características de genitália de macho.

O estudo de indivíduos ginandromorfos permitem entender melhor os padrões de variações naturais entre populações, aspectos da evolução dos mecanismos que regulam a expressão fenotípica, a evolução da diferenciação de castas em insetos sociais, ou ainda, a evolução do parasitismo em abelhas (Wcislo *et al.* 2004, Oliveira e Andrade 2006).

Simões (2011) avaliou a influência do HJ III aplicado nas larvas pré-defecantes de machos diplóides sobre o fenótipo dos indivíduos adultos e verificou que parte destes desenvolviam características semelhantes as da rainha da espécie os quais foram denominados “Queen like male” (QLM). Esses machos apresentaram proporções corporais semelhantes com as rainhas naturais de *M. quadrifasciata* com cabeça e tórax menores, abdome maior e sem as faixas abdominais típicas de machos e operárias dessa espécie.

Até o momento, não se sabe se a aplicação de HJ causa alterações no desenvolvimento dos órgãos reprodutores e na morfologia dos espermatozoides dos QLM. Cruz-Landim (2009) chama a atenção para o pouco que se sabe à cerca dos mecanismos endócrinos envolvidos na espermatogênese dos machos de abelhas.

## **2. OBJETIVO**

Caracterizar o desenvolvimento dos testículos, vesícula seminal e a espermiogênese em machos diplóides e em machos semelhante a rainha em *M. quadrifasciata*.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Abelhas

As abelhas foram obtidas a partir de colônias de *Melipona quadrifasciata* mantidas no Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa-MG.

Rainhas virgens e machos haplóides de mesma colônia foram cruzados (cruzamento irmã-irmão). Estas rainhas depois de fecundadas foram mantidas em placas de Petri forradas com papel de filtro, alimentadas com mel diluído em água (1:1) e pólen postas em placas de petri com operárias nutrizas. As placas foram mantidas em estufa B.O.D. a 28°C por 5 a 10 dias. Após este período, a rainha e as operárias foram transferidas para caixas de madeira 16 X 16 X 13 cm para a criação contendo alimento, cerume e um favo de cria nascente de uma colônia da mesma espécie que continha somente pupas de operárias.

Estas caixas foram acondicionada a 28°C durante cerca de um mês provisionadas com alimento, observadas e limpas diariamente. Nas caixas foram colocadas 5 novas operárias nutrizas por dia. As rainhas, quando se tornaram fisogástricas, foram transferidas para colônias em boas condições, que haviam sido orfanadas imediatamente. Logo que a rainha iniciou a postura foi retirado um favo de cria com indivíduos em estágio larval para a análise citogenética para confirmar a produção de machos diplóides segundo Imai *et al.* ( 1998). As análises citogenéticas foram repetidas após três meses de postura da rainha.

Uma vez detectada a produção de machos diplóides nas colônias, larvas pré-defecantes foram retiradas dos favos para aplicação tópica de 2 $\mu$ l de solução HJ III em acetona. Foi considerado o grupo controle machos haplóides e diploides naturais retirados das colônias.

### **3.2. Produção dos machos diplóides com características de rainha (QLM)**

Para a obtenção dos QLM, os favos contendo larvas de machos diplóides foram retirados dos ninhos e mantidos em placas de Petri. As larvas foram transferidas para uma placa de Petri contendo um papel filtro e receberam topicamente, 2  $\mu\text{L}$  de solução de HJ-III (SIGMA-ALDRICH) em acetona na concentração de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  com o auxílio de um microcapilar Drummond®. Em seguida, as larvas foram transferidas para placas de cultura de fundo chato contendo 24 poços, em cada poço da placa foi colocada uma célula artificial feita com cera de *Apis mellifera* (cúpula).

As placas com as larvas foram identificadas com o número da colônia de origem e mantidas em estufa a 28°C. Diariamente, as larvas foram higienizadas com o auxílio de um pincel e uma pinça para evitar o acúmulo de fezes e seda envolvendo-as. Sempre que necessário as cúpulas foram substituídas por outras.

O indivíduos foram mantidos em estufa B.O.D a 28°C até completarem seu desenvolvimento. Os “Queen-like male”(QLM) diploides foram obtidos a partir do tratamento com JH e indentificados por possuírem genitália externa de machos e características corporais de rainha ( ausência de faixas terçais amarelas, cabeça menor em relação ao comprimento do abdômem).

### **3.3. Histologia**

Foram dissecados 3 indivíduos QLM para cada uma das seguintes idades: recém-emergidos, indivíduos de 3 dias e indivíduos de 5 dias . O mesmo número de machos diplóides e haplóides naturais sem tratamento com HJ , nas mesmas idades, também foram dissecados e usados nas comparações. O material descrito acima foi dissecado em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,6 e transferidos para solução fixadora de Zamboni (Stefanini *et al.*, 1967) durante 4 horas e pós-fixado em tetróxido de ósmio a 1% por 1h. A seguir as amostras foram desidratadas em série crescente de etanol e incluídos em Histo-resina JB-4. Secções semi-finas de 1µm de espessura foram coradas com azul de toluidina .

### **3.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)**

Foram dissecados 4 indivíduos QLM diplóide para cada uma das seguintes idades: recém-emergidos, 3 dias e 5 dias . O mesmo número de indivíduos de machos diplóides e haplóides naturais sem tratamento com HJ nas mesmas idades foram dissecados e usados nas comparações. Os indivíduos foram dissecados e seus órgãos reprodutores retirados e fixados por 24 horas, a 4°C, em solução de glutaraldeído 2,5% e ácido pícrico 0,2% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M e pH 7,2, acrescido de 3% de sacarose. O material foi pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% e ferricianeto de potássio 0,8%, no mesmo tampão cacodilato por 1h. A seguir as amostras foram desidratadas em série crescente de etanol e incluídos em resina Epon 812 e cortes semi-finos foram feitos e corados com azul de toluidina, e os cortes ultra-finos foram contrastados com solução aquosa de acetato de uranila a 2% e citrato de chumbo a 0,2% em solução de hidróxido do sódio 1 N e observados em microscópio eletrônico de

transmissão (Zeiss EM 109), no Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa, MG.

### **3.5. Morfometria dos Testículos**

Os aparelhos reprodutores dos machos QLM diplóide adultos recém emergidos (n=4), machos haplóides (n=4) e diplóides (n=4) não tratados com HJ foram dissecados como nos procedimentos acima, contudo antes de proceder à fixação, o material foi fotografado e os folículos testiculares foram medidos com auxílio do software IMAGEM PROPLUS<sup>®</sup>.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cerca de 80 larvas de machos diplóides de *M. quadrifasciata* foram tratadas com HJ III e aproximadamente 33% dos indivíduos emergiram apresentando características de rainha. As rainhas e operárias *M. quadrifasciata* podem ser distinguidas visualmente pelo tamanho do olho composto (menor nas rainhas) e pelas proporções corporais, rainhas possuem cabeça e tórax menor e abdômen maior em relação às operária. Então os machos diplóides que se aproximavam morfologicamente às rainhas responderam ao HJ e foram denominados “Queen-like male”(QLM).

Nos experimentos realizados por Camargo (1977), cerca de 27% das 45 larvas de machos diplóides *M. quadrifasciata* tratadas com HJ no último instar desenvolveram características de rainha. Segundo a mesma autora, os machos diplóides apresentam homozigose para o locus CSD e heterozigose para os locus determinantes da casta. Recentemente foi verificado por Gempe *et al.* (2009) que a homozigose do locus CSD direciona o desenvolvimento inicial das células linhagem germinativa em abelhas para a formação dos testículos e a ausência do gene *fem* nestes indivíduos mantém a diferenciação da gônada em testículo. Contudo os genes responsáveis pela características morfológicas que define as castas, nos machos diplóides podem estar em heterozigose, e assim quando ativados pelo hormônio juvenil durante as fase de tecelagem do casulo, estes indivíduos podem expressam as características típicas das rainhas virgens de *M. quadrifasciata*. Enquanto que aqueles que não tem heterozigose neste locus mantêm a morfologia de machos e não estão sensíveis ao HJ.

No caso dos machos, somente larvas tratadas com uma dose elevada de HJ III (2 µg) deram origem a indivíduos adultos com características de rainha, no caso de larvas de fêmeas tratadas com doses menores de HJ III originam rainhas. A razão das

diferenças observadas entre machos e fêmeas quanto à sensibilidade ao HJ permanecem desconhecidas.

Os indivíduos QLM diplóides sobreviveram até no máximo cinco dias após a emergência, os QLM haplóides também tiveram seu tempo de vida abreviado para no máximo até treze dias depois de emergidos. Machos haplóides e diplóides não tratados com HJ tiveram uma sobrevida maior cerca de 25 dias para machos haplóides e 18 dias para machos diplóides semelhante à Camargo (1984). A redução do tempo de vidas dos QLM pode ser consequência direta do efeito feminilizante provocado pelo HJ III, já nos machos diplóides pode ser devida as condições de criação em B.O.D.

#### **4.1. Estrutura dos testículos e maturação sexual:**

Os testículos dos QLM assim como os dos machos haplóides e diplóides não tratados são estruturas pareadas e conectadas às vesículas seminais pelos vasos deferentes. Cada testículo é composto por quatro folículos envolvidos por uma cápsula na qual se aderem partes do corpo gorduroso.

Os testículos dos QLM diplóides recém-emergidos medem  $2,50 \pm 0,40$ mm sendo portanto menores que os de machos haplóides ( $3,64 \pm 0,77$ mm) ou diplóides ( $2,80 \pm 0,33$ mm), na mesma fase de desenvolvimento. Diferenças nos comprimentos dos testículos de machos haplóides e diplóides de *M. quadrifasciata* também foi observada por Tavares *et al.* (2003). Em *A. mellifera*, Woyke (1973) justificou as diferenças encontradas nos comprimentos dos folículos testiculares dos machos haplóide e diplóides à existência de poligenes com efeitos aditivos que influenciam no tamanho dos testículos dos machos diplóides. Chaud-Netto e Kerr (1980) testando a teoria levantada por Woyke (1973) não a confirmaram, segundo esses autores a diferença dos testículos de machos diplóides produzidos por diferentes rainhas pode também ser

afetado pelas diferenças nutricionais e não somente por genes como sugerido por Woyke (1973).

Uma explicação para as diferenças no comprimento dos folículos testiculares ainda permanece em aberto, mas o comprimento dos testículos pode ser regulado por fatores intrínsecos ao desenvolvimento durante a determinação da gônada ainda nos estágios embrionário, contudo o HJ parece atuar nesse aspecto, pois os QLM apresentam testículos menores que os machos diplóides.

Nas secções histológicas dos testículos de machos haplóides e diplóides recém-emergidos os cistos contêm espermatozóides completamente formados (Fig. 1 A-B). Em corte longitudinal é possível observar os feixes e distinguir as regiões da cabeça e flagelo (fig. 1B). Os folículos apresentam uma fina camada de células achatadas que envolvem os testículos formando uma bainha peritoneal sendo esta mais delgada nos machos haplóides (fig. 1A) que nos machos diplóides e QLM (fig. 1B, D e E), nos últimos pode ser notada a presença de corpo gorduroso ao redor dos folículos (fig. 1B-E).

O aumento do corpo gorduroso perivisceral observado nos QLM pode ser devido a atuação do JH que estimula este órgão na produção de vitelogenina e lipoproteínas (Hartfelder 2000). Essas proteínas estão envolvidas na fisiologia reprodutivas de fêmeas de insetos, porém já foram identificadas em zangões haplóides de *A. mellifera* sendo que nas glândulas de muco associadas ao sistema reprodutor desses machos existem receptores para essas proteínas, contudo a função delas na fisiologia dos zangões permanece desconhecida (Colonello-Fratini *et al.* 2010).

Nos testículos dos QLM diplóides recém-emergidos, os cistos podem ser facilmente distinguidos e neles as espermatídes estão espaçadas umas das outras e em processo final de alongamento (Fig. 1D,2A).

Em machos QLM diplóides com três dias de vida adulta, os testículos já iniciaram o processo de degeneração com a desorganização dos cistos (fig. 1E). Não sendo mais possível individualizar os cistos que compõem os testículos sendo observadas apenas espermatídes alongadas na região central do órgão (circulo descontínuo, fig. 1E). O processo de “envelhecimento” do órgão vai até o quinto dia após a emergência. Nesta fase não é mais possível individualizar os cistos, nas áreas periféricas do folículo testicular aparecem regiões vacuoladas (fig. 1 F) e no centro uma área mais corada onde se encontram os espermatozóides em processo de absorção (figs 1F, 2J). As espermatídes aparecem unidas por pontes citoplasmáticas (fig. 2E) e restos microtúbulos podem ser visualizados (fig. 2F).

Pela análise das micrografias eletrônica, dos QLM diplóides recém-emergidos verifica-se que as espermatídes, em alguns cistos, estão em processo de alongamento com bastante citoplasma para ser eliminado (fig. 2B) enquanto em outras a cromatina encontra-se em processo de compactação (fig. 2E-F). O núcleo das espermatídes apresenta a cromatina compactada e algumas regiões elétricas lúcidas podem ser visualizadas ( fig. 2B).

A presença de corpos mielínicos (estruturas membranosas concêntricas) foram observada tanto nas espermatídes alongadas no QLM diplóides recém-emergido (fig. 2C) e quanto nos de cinco dias (fig. 2H-I). Regiões de flagelo aparecem envolvidas por membranas evidenciando a reabsorção desta estrutura (fig. 2J) no macho de 5 dias.

Nos QLM diplóides recém-emergidos mostraram um processo acelerado de autólise do tecido testicular nos indivíduos adultos. É possível que o acelerado processo de autólise dos testículos dos QLM, encontradas neste estudo, sejam consequência direta da ação do HJ aplicado nas larvas, pois, em alguns insetos foi observado que o HJ atua como inibidor da espermatogênese como em *Bombyx mori* (Yagi e Fukushima 1975), em *Periplaneta americana* espécie na qual a aplicação de HJ mantém os testículos semelhantes ao testículo de ninfas (Blaine e Dixon 1970 *apud* Shuetz e Furtado 1991) e ainda em *Panstrongylus megistus* onde foi observado que as ninfas tratadas com HJ apresentam um crescimento reduzido dos folículos testiculares e autólise do tecido testicular (Schuetz e Furtado 1991).

Os resultados observados nos testículos dos QLM também pode ser devido ao fato das larvas de machos tratados com HJ sofrerem uma “feminilização”, pois a aparência juvenil dos testículos foi verificada em testículos de machos de gafanhoto transplantado para fêmeas (Yosida 1951). Apesar de se desenvolverem, os testículos nas fêmeas transplantadas apresentaram comprimentos menores que os testículos dos machos do grupo controle e a espermatogênese não era concluída (Yosida 1951). Contudo Tozetto (1997) ao aplicar HJ em larvas machos haplóides de *A. mellifera* verificou que as espermatogônias destas tiveram as primeiras divisões da espermatogênese adiantas em seus testículos. A autores não verificou efeito feminilizante do HJ sobre o fenótipo dos zangões.

## 4.2. Espermio gênese e Espermatozóide

A ultraestrutura dos espermatozoides dos machos diplóides foi muito semelhante àquela observada nos machos haplóides por Zama *et al.* (2004). Em machos machos haplóides os espermatozoides são células alongadas, delgadas e filiformes.

Os espermatozoides, nas regiões da cabeça, apresentam uma vesícula acrossomal côncava com projeções triangulares na região mais proximal ao núcleo como nos demais Meliponini e um perforatorium que se insere na porção anterior do núcleo de forma assimétrica (Zama *et al.* 2001, 2004).

O núcleo é uma estrutura eletrondensa altamente compactada e apresenta um prolongamento cercado por camadas de material de baixa eletrondensidade na região de transição com o flagelo. Nessa região, o adjunto de centríolo se posiciona logo abaixo do prolongamento nuclear paralelamente segue o derivado mitocondrial maior.

Os derivados são ovais e o derivado maior termina primeiro que o menor, eles são assimétricos em comprimento e diâmetro. O axonema tem a configuração característica 9+9+2. Na porção final do flagelo, o axonema gradualmente se desorganiza sendo as duplas de microtúbulos as últimas estruturas visualizadas com nas demais abelhas corbiculadas (Zama *et al.* 2001, Zama *et al.* 2004, Zama *et al.* 2005).

Para descrição dos espermatozoides de QLM diplóide foram utilizados aqueles presentes nos testículo dos machos recém-emergidos e nos machos de três dias, uma vez que durante os experimentos não foram observados espermatozoides na vesícula seminal destes machos. Borges (2011, dados não publicados), verificou a expressão basal ou quase ausente de genes relacionados a reprodução nos machos diplóides, este fato pode estar relacionado às diferenças no tempo de migração de machos haplóides e diplóides.

Tanto nos machos diplóides quanto nos QLM diplóides podem ser visualizadas todas as peças que compõem a estrutura dos espermatozóides. A diferença principal entre os indivíduos desses dois grupos está no aspecto dessas estruturas que nos machos diplóides foram completamente desenvolvidas nos indivíduos recém-emergidos (fig. 3), e nos QLM diplóides, de mesma idade, aparecem ainda em formação (fig. 4).

Na estrutura dos espermatozóides podem ser distinguidas duas regiões, as regiões da cabeça composta pela vesícula acrossomal, perforatorium e núcleo e a região do flagelo.

Em corte longitudinal na região da cabeça a vesícula acrossomal forma uma capa envolvendo todo o perforatorium tanto no macho diplóide quanto no QLM diplóides (fig. 3A, 4C). A vesícula acrossomal possui um formato triangular com os vértices arredondados em corte transversal (fig. 3B, 4A). Entre o *perforatorium* e a vesícula acrossomal existe o espaço subacrossomal, presente tanto nos machos diplóides (fig. 3A seta) quanto nos QLM diplóides (fig. 4C). No interior da vesícula acrossomal encontra-se o *perforatorium* (fig. 3B-C). Em corte longitudinal, o *perforatorium* é um bastão de constituição protéica e se insere na porção inicial do núcleo de forma assimétrica no QLM diplóides (fig. 4C). Em corte transversal, nos machos diplóides o *perforatorium* pode ser visto inserido no núcleo (fig. 3C). Dada ausência de corte longitudinal da região de transição acrossomo/núcleo dos espermatozóides de machos diplóides, não foi possível descrever a forma de inserção do *perforatorium*.

Nos machos diplóides, os núcleos são homogeneamente compactados (fig. 3 D-F), contudo nos machos QLM diplóides, os núcleos, em alguns cistos, apresentam a cromatina densa e parcialmente uniforme apresentando nucleoplasma, pequenas regiões eletrólucida no interior do núcleo (fig. 1B-C, 4B). Em outros cistos de QLM diplóides,

cromatina está condensada em muitos agregados, mas não completamente compactada (fig. 2F, 4D, 4F-G).

Em corte longitudinal, na região núcleo-flagelo dos machos diplóides é possível visualizar uma camada de material de baixa eletrondensidade ao redor da projeção do núcleo ( fig. 3 E-F), no QLM diplóides esta região não é visualizada (fig. 4 E).

A região do flagelo é composta pelo centríolo, o adjunto do centríolo, um axonema e dois derivados mitocondriais.

O centríolo se localiza logo abaixo do núcleo e é responsável pela organização do axonema (fig. 3E), nos cortes de QLM diplóides esta região não foi visualizada.

O adjunto do centríolo é uma estrutura fortemente eletrondensa e está localizada na região de transição entre o núcleo e o flagelo nos machos haplóides e diplóides naturais (fig. 3E,G). O adjunto de centríolo não está completamente formado no QLM diplóides, esta estrutura apresenta pequenas áreas eletronlúcidas (fig. 4E,G-H), destoando do aspecto denso e uniformemente compactado, encontrado nos machos diplóides naturais (figs. 3E -G).

Os derivados mitocondriais acompanham o axonema em todo seu comprimento. O derivado maior inicia-se logo abaixo do núcleo e segue paralelamente ao adjunto de centríolo (fig. 3F). Em sua porção posterior pode ser observada uma região paracristalina (fig. 3G). O derivado menor começa depois do adjunto do centríolo e não foi visualizada a região paracristalina em sua extremidade posterior, nos machos diplóides (fig. 3G-H). Nos QLM diplóide os derivados seguem o mesmo padrão descrito para machos diplóides, contudo a região paracristalina está presente em ambos os derivados sendo menos evidente no derivado menor (fig. 4 H-I). Nos cortes de

testículos de machos diplóides e QLM diplóide microtúbulos de manchete são vistos ao redor das estruturas dos espermatozóides (fig. 3H e 4J).

Nos machos diplóides, lateralmente, entre o axonema e os derivados mitocondriais estão presentes estruturas triangulares, os corpos acessórios (fig. 3G-I). Nos QLM diplóide apenas o corpo acessório que acompanha o derivado menor foi observado (fig.4 J).

Tanto nos machos diplóides quanto nos QLM diplóide é observada configuração característica aos insetos do axonema, com 9 pares de microtúbulos acessórios, 9 pares periféricos e um par central (9+9+2), com material eletrondenso entre os microtúbulos conectando-os ao par central.

Na região terminal do flagelo, o par central termina primeiro seguido das duplas periféricas e dos microtúbulos acessórios (fig. 3 H-I), tanto nos espermatozóide de machos diplóides quanto nos de QLM diplóides.

As espermátides dos QLM diplóides passam pelas modificações características a espermiogênese: como o alongamento nuclear, condensação da cromatina, formação do acrossomo e são acompanhadas pelo desenvolvimento do flagelo, com formação do axonema e dos derivados mitocondriais observadas em abelhas (Conte *et al* 2005, Cruz-Landim 2009 ), contudo nos QLM a espermiogênese estaciona nas fases finais de alinhamento e o tempo de vida reduzidos desses indivíduos não permitem que o processo se complete justificando a ausência de espermatozóides na vesícula seminal.

A infertilidade dos machos diplóides pode estar associada à baixa produção espermática como comenta Camargo (1984). Contudo em relação a aspectos ultraestruturais os espermatozóides dos machos diplóides não apresentam evidências que os incapacite a fecundar o ovócito da fêmea.

### 4.3. Vesícula seminal

Em todos os indivíduos analisados independentemente serem do grupo controle ou experimental, as vesículas seminais apresentam sua forma globular características conectadas aos testículos pelos ductos deferentes.

Sob microscopia de luz, a vesícula seminal é composta por um epitélio simples prismático (ep) apoiado por uma lamina basal delgada e uma camada muscular circular (ms) que envolve o órgão (Fig 5 A-B). Nos machos recém-emergidos não foi observado espermatozóides na luz vesícula em nenhum dos grupos estudados, contudo material granular correspondente a secreção pode ser visualizados na vesícula seminal de machos haplóides recém-emergido (fig. 5 A) e pequenas projeções citoplasmáticas na luz da vesícula foram visualizadas, nos QLM (fig. 5C).

A vesícula seminal aparece cheia de espermatozóides (spz) nos machos haplóides (sem tratamento HJ) de 5 dias após a emergência (Fig 5B).

As células epiteliais dos QLM apresentam um citoplasma rico em mitocôndrias principalmente na porção apical das células do epitélio (fig. 5C). Os núcleos das células epiteliais apresentam cromatina frouxa e núcleo evidente (fig. 5E-F).

Assim como os testículos, a vesícula seminal de QLM apresenta um “envelhecimento” rápido, no 5º dia de vida órgão já se encontra em degeneração. Nos núcleo das células epiteliais a cromatina está em pequenos grãos, indicando apoptose destas células (fig. 5C). É possível observar células epiteliais desprendendo da membrana basal e porções citoplasmáticas na luz do órgão (fig. 5C). Em machos haplóides de 5 dias, a vesícula seminal encontra cheia de espermatozóides, em machos diplóides não foi verificada a presença de espermatozóide no 5º dia de vida.

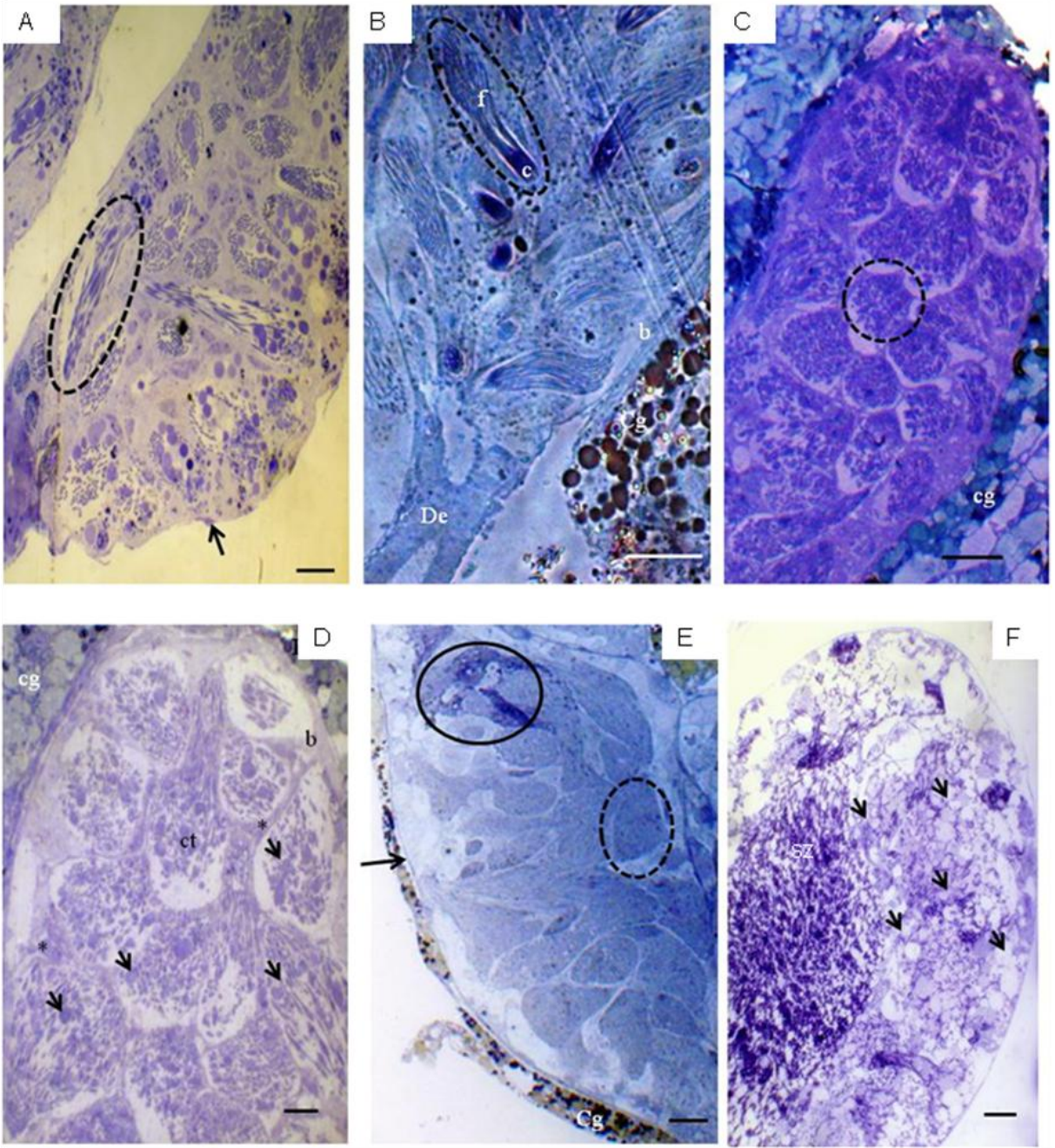
Mudanças na vesícula seminal de abelhas acontecem com o decorrer da idade, inicialmente este órgão se encontra vazio com parede espessa e ausência de secreção no luz do órgão. Durante o processo de maturação sexual e migração dos espermatozóides para a vesícula, o epitélio da parede passa de cilíndrico para cúbico (Araújo *et al.* 2005, Moors *et al.* 2005). As mudanças ocorridas no epitélio da vesícula coincidem com a elevação das taxas de HJ nos machos adultos, sugerido a participação desse hormônio nos processos reprodutivos (Tozetto 1997), no caso do QLM o efeito feminilizante provocado pelo HJ provoca um envelhecimento acentuado da vesícula seminal ainda nos indivíduos recém-emergidos e um retardando a espermatogênese.

No presente trabalho o HJ parece adiantar a atividade secretora da vesícula seminal nos MQL, pois nesses machos recém-emergidos pode ser visualizado na luz da vesícula material celular, caracterizando ao tipo de secreção como apócrina.

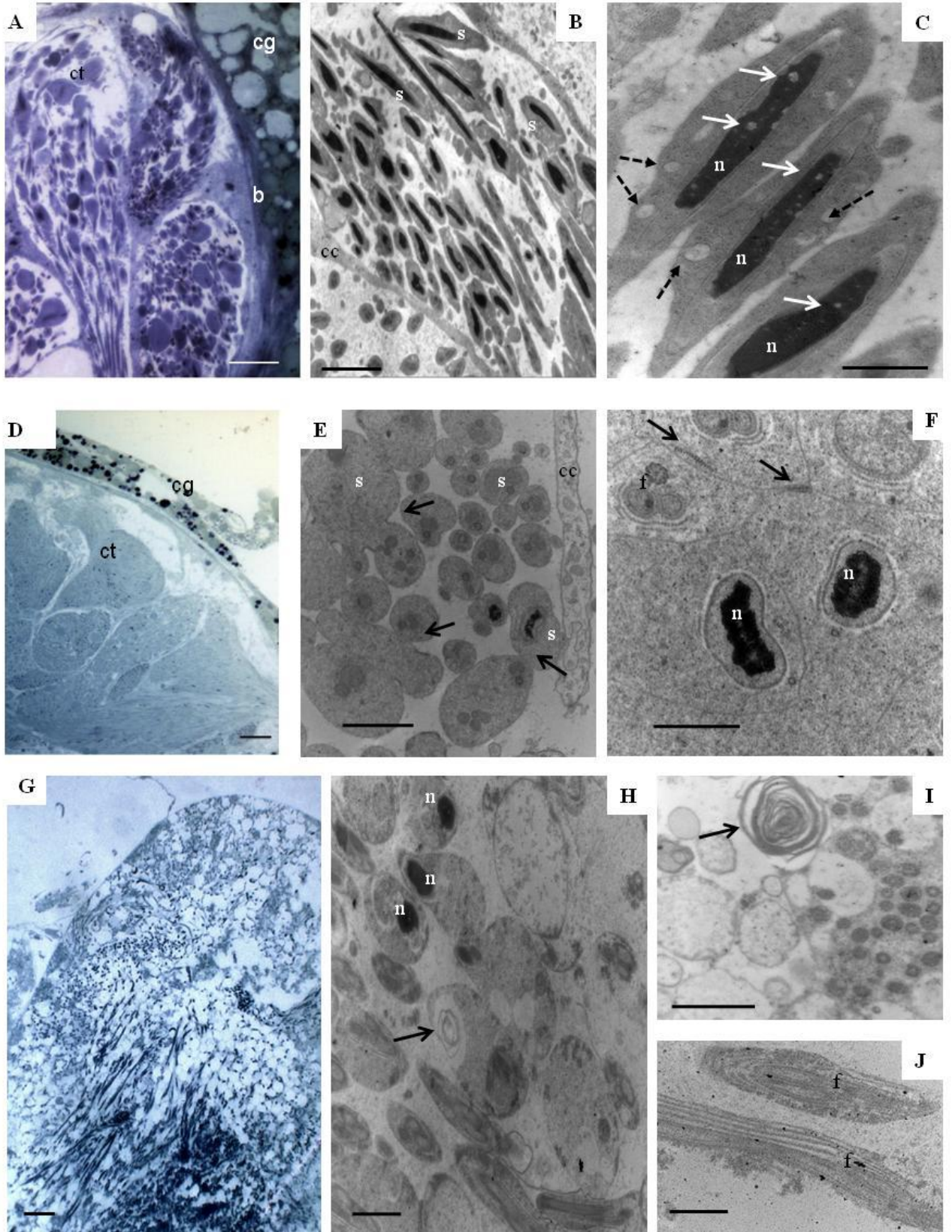
Em machos de *Locusta migratória* adultos (Braun e Wyatt 1995), o HJ estimula as atividades secretoras das glândulas acessórias do aparelho reprodutor.

Nos Meliponini é sugerido que a vesícula seminal, ducto deferentes apresente atividade secretora (Dallacqua e Cruz-landim 2003, Araújo *et al.* 2005). Evidências de atividade secretora neste órgão foram registrada em *Friesella schrottkyi* por Brito *et al.* (2010). Segundo estes autores, a atividade secretora da vesícula seminal inicia-se nos machos com 3 dias após emergidos. Em outros Meliponini, material amorfo pode ser visualizado na luz da vesícula seminal de machos recém emergidos como observado em *Melipona mondury* (Lima *et al.* 2006) e *Melipona bicolor* (Dallacqua e Cruz-landim 2003). A ausência de espermatozóides na luz da vesícula seminal dos QLM diplóide pode ser explicada pela não diferenciação das espermátides nos testículos dos indivíduos QLM.

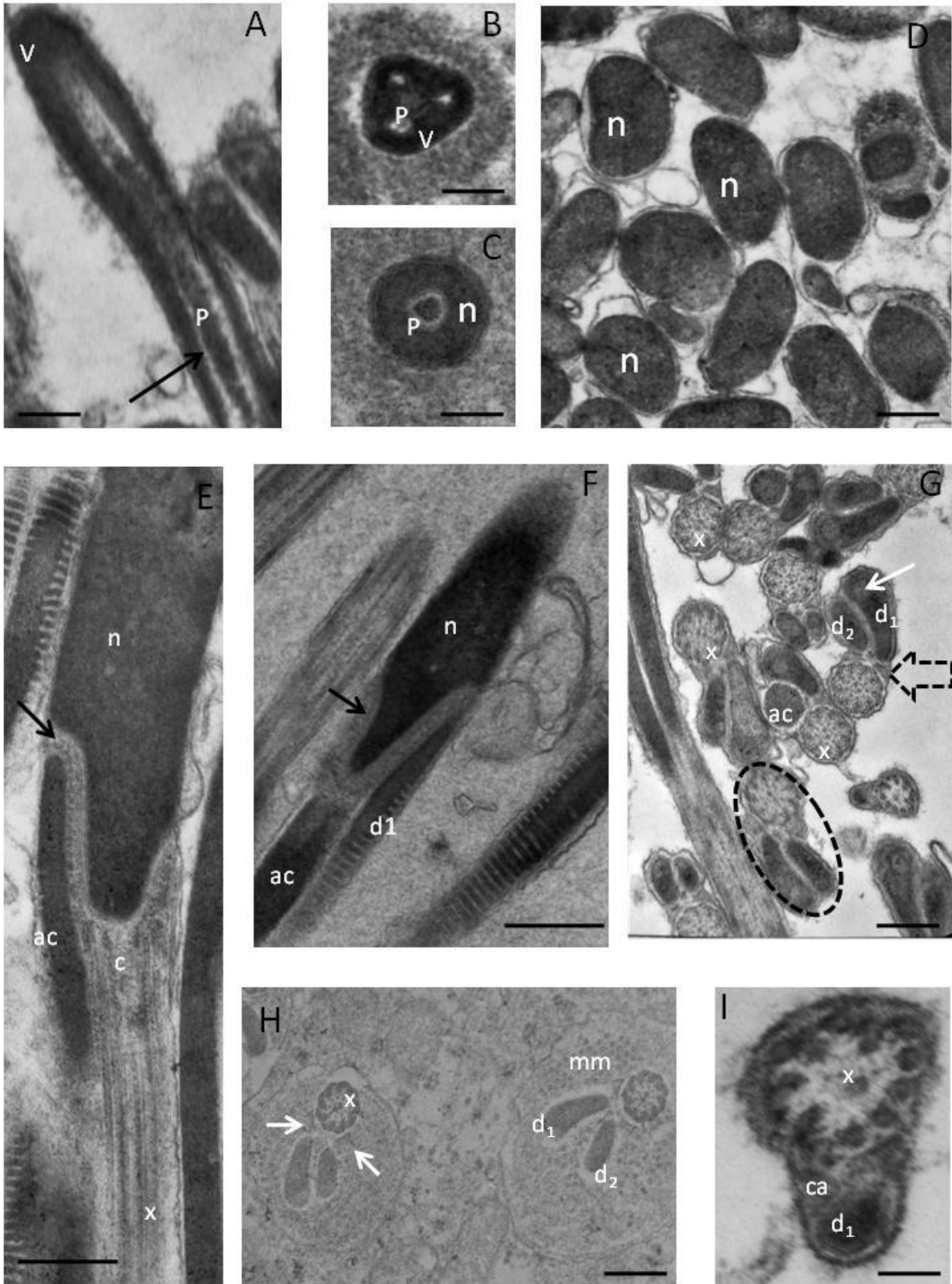
**Figura 1.** Testículos dos machos de *Melipona quadrifasciata* em diferentes idades. **A.** Os macho haplóide recém-emergidos apresentam cistos de espermatozóides maduros (círculos pontilhados) e uma bainha periotneal delgada (seta) envolve o folículo testicular. **B.** Nos macho 2n recém-emergido também são vistos cistos com espermatozóides maduros (círculo pontilhado). A bainha peritoneal (b) é mais espessa que no macho recém-emergido. Nota-se que o ducto eferente (De) e parte do corpo gorduroso (Cg) envolvem o órgão. **C.** Nos folículos testiculares dos “Queen-like male” (QLM) recém-emergido os cisto contendo espermátides alongadas, também é visualizado corpo gorduroso (cg) na periferia do órgão. **D.** Detalhe do testículo do QLM diplóide recém-emergido. As setas apontam espermátides alongadas no interior dos cistos (ct), uma bainha peritoneal (b) espessa está presente envolvendo o folículo e corpo gorduroso (cg) abundante. Os asteriscos (\*) indicam a célula cística envolvendo as espermátides. **E.** No corte de testículo de QLM diplóide com três dias, observa-se uma desorganização dos cistos (círculos pontilhados) dos folículos testiculares e áreas de início de degeneração testicular (círculo contínuo) a bainha peritoneal envolvendo o folículo é indicada pela seta e parte do corpo gorduroso (cg) pode ser visualizado na periferia do folículo. **F.** No testículo de QLM de cinco dias de emergido a degeneração do órgão é mais acentuada principalmente na região periférica (setas) onde são vistas áreas vacuoladas e na região central observa-se grupo de espermatozóides (sptz). Não é possível individualizar os cistos. Escalas: A= 10 µm. B-E= 20 µm.



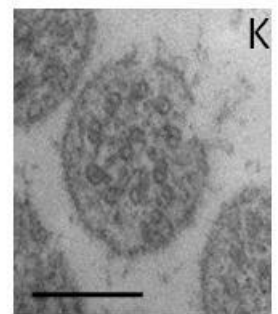
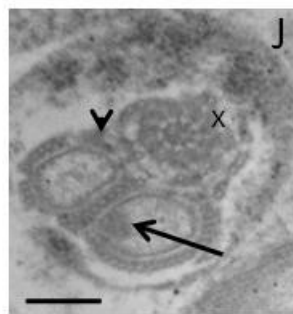
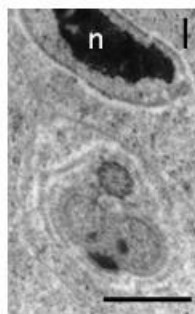
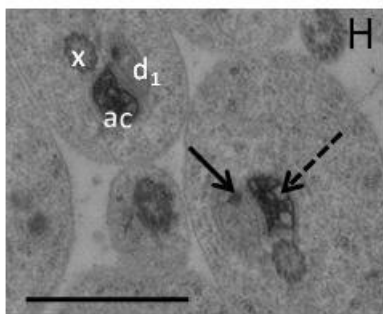
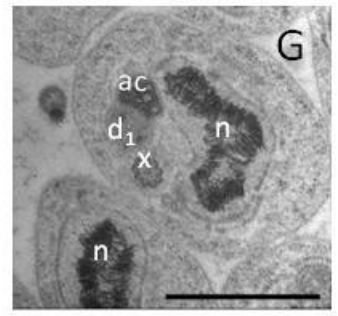
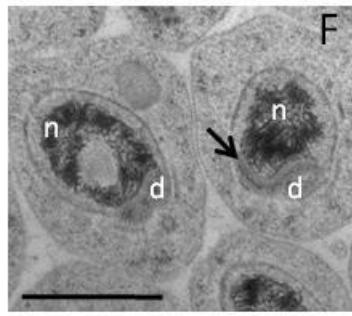
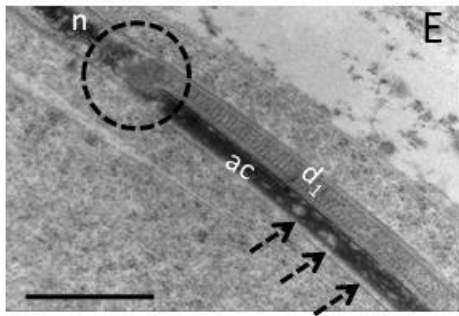
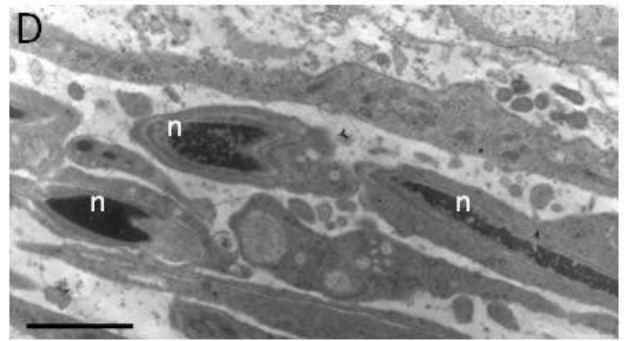
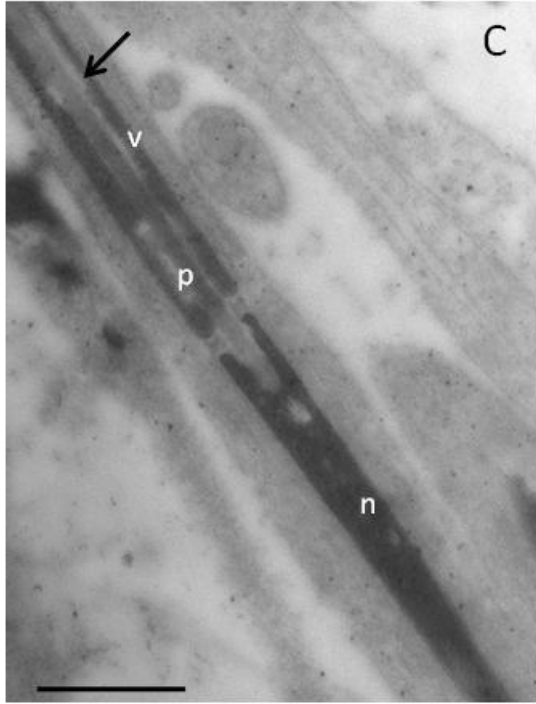
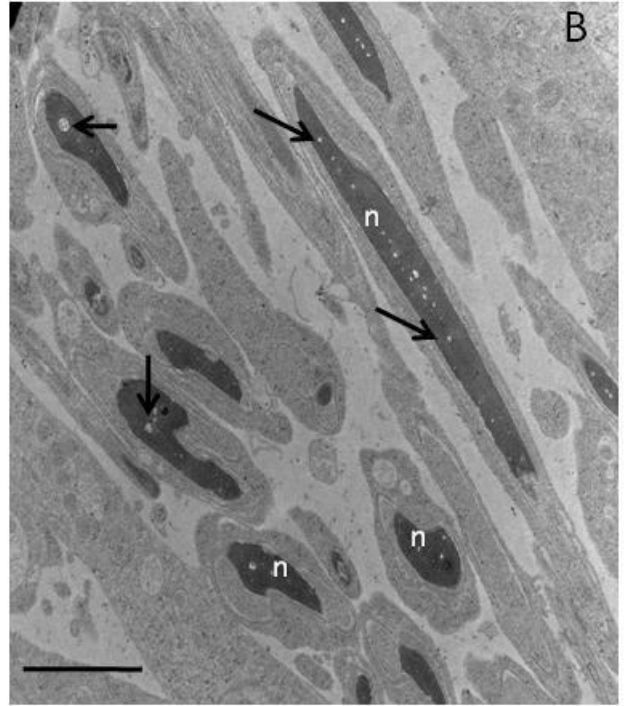
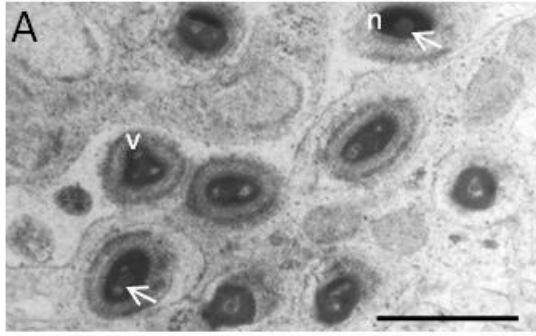
**Figura 2.** Testículos dos QLM diplóide de *Melipona quadrifasciata* em diferentes idades. **A-C.** Recém-emergidos. **A.** Os cistos contêm espermátides alongadas (ct) e uma bainha peritoneal (b) espessa e envolve todo o folículo. **B.** Em MET, os cistos apresentam espermátides alongas (s), mas ainda com bastante citoplasma, nota-se prolongamentos da célula cística (cc) envolve o cisto. **C.** Os núcleos (n) das espermátides apresentam a cromatina bem compactada e algumas regiões elétricas podem ser visualizadas (setas descontínuas) assim como vacúolos são no citoplasma (setas completas) podem ser visto em MET. **D-F.** QLM diplóide de três dias. **D.** Os Cistos (ct) em degeneração testicular. **E.** A análise ultraestrutural indicam pontes citoplasmáticas (setas) que unem as espermátides (s), os prolongamento da célula cística (cc) envolve as espermátides. **F.** As espermátides em processo final de compactação nuclear (n). As peças de compõem o flagelo (f) dos espermatozoides já estão formadas, restos de microtubulos de são visualizados (setas). **G-J.** QLM diplóide de cinco dias. **G.** Aspecto geral do testículo de QLM diplóide de cinco dias de idade. **H.** Pela ultraestrutural dos testículos não é possível mais individualizar os cistos, os núcleos (n) dos esperamtozopdes aparecem homogeneamente compactados, mas em degeneração e figuras mielínicas são indicadas pela seta. **I.** Detalhe de figura mielínica. **J.** A regiões de flagelo(f) envolvidas por membranas indicando degeneração em MET. Escala: A, D, G= 20µm. B, H=5µm. E= 2µm. F, I e J= 1 µm.



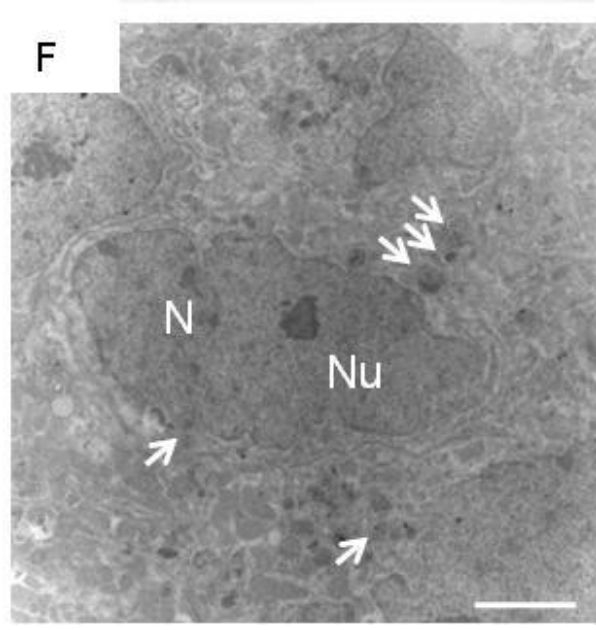
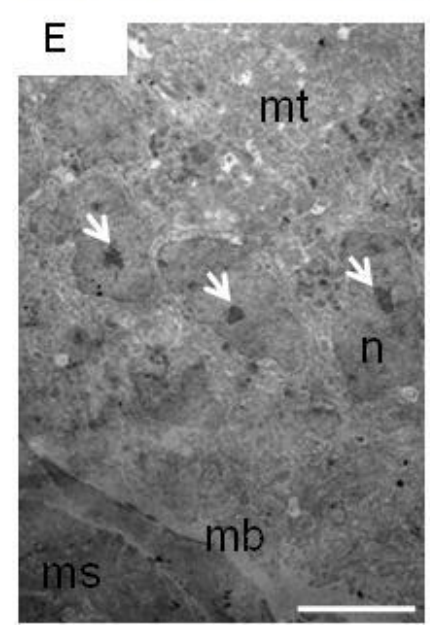
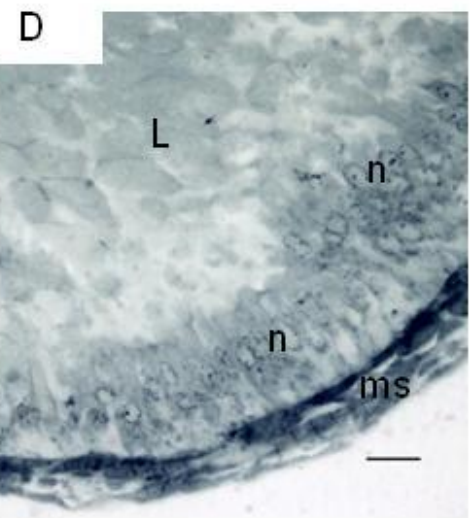
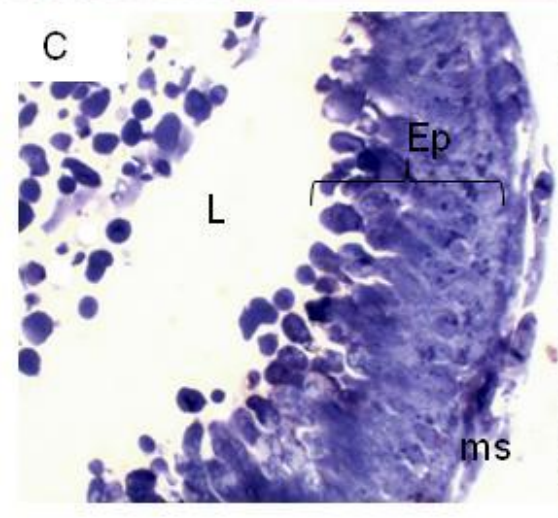
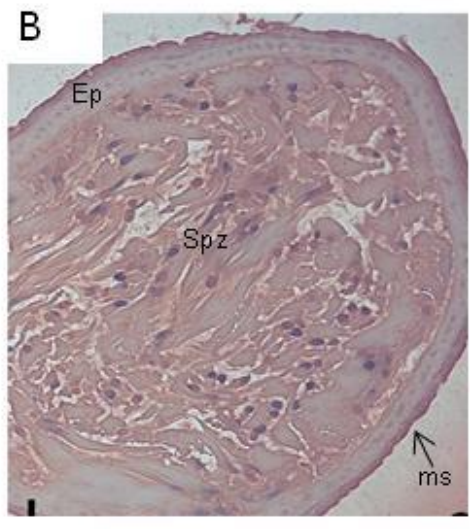
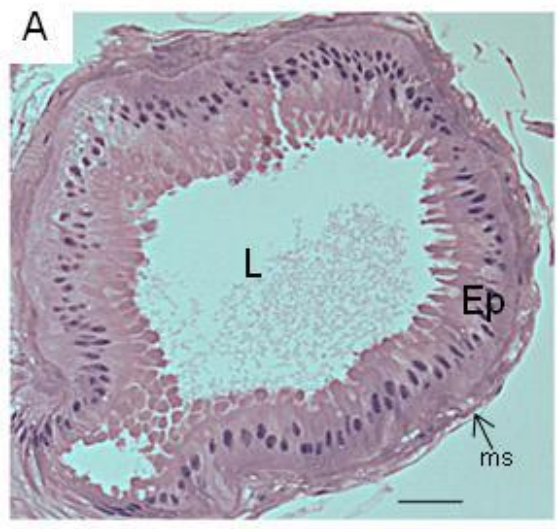
**Figura 3.** Ultraestrutura dos espermatozoides de machos diplóides. **A.** Região do acrossomo em corte transversal apresenta um vesícula acrossomal que envolve o perforatorium (p), entre ele e a vesícula o espaço subacrossomal é indicado pela seta. **B.** Em corte transversal da região do acrossomo pode ser visualizada a vesícula acrossomal (v), o perforatorium (p). **C.** O corte transversal da região núcleo revela que o perforatorium (p) penetra na porção apical do núcleo. **D.** Os núcleos (n) aparecem densos e completamente compactados em secções transversais. **E.** A região de transição núcleo-flagelo está completamente formada, o adjunto de centríolo (ac), centríolo (c), axonema (x) e derivado mitocondrial maior ( $d_1$ ) podem ser diferenciados, uma camada de material de baixa densidade entre o núcleo e o adjunto de centríolo é indicada pela seta. **F.** Em secção transversal da região núcleo-flagelo, uma camada de material de baixa eletrondensidade (seta) é visualizada entre o núcleo (n) e derivado mitocondrial maior (d) e adjunto de centríolo (ac). **G.** Corte transversal da região do flagelo (círculos descontínuos). Adjunto centríolo (ac); axonema (x); derivados mitocondriais maior ( $d_1$ ) e menor ( $d_2$ ); os corpos acessórios estão indicados pelas setas descontínua e a seta contínua aponta para região paracristalina do derivado mitocondrial maior ( $d_1$ ). **H.** Corte transversal da região do flagelo. As setas apontam para os corpos acessórios; derivado mitocondrial maior ( $d_1$ ) e menor ( $d_2$ ); axonema (x) e microtúbulos de manchete (mm). **I.** Detalhe da região terminal do flagelo mostrando a organização do axonema (x); corpos acessórios (ca) e parte terminal do derivado mitocondrial maior ( $d_1$ ). Escalas: A, E=2 $\mu$ m. B=1 $\mu$ m. D, G, H=3 $\mu$ m. C=800 nm. I=700nm.



**Figura 4.** A ultraestrutura das espermátides avançadas de QLM diplóide. **A.** A vesícula acrossomal, em corte transversal, é uma estrutura triangular (v), com vértices arredondados, o núcleo (n) aparece como uma estrutura eletrondensa. **B.** Feixe de espermátides com a cromatina compactada, porém com regiões elétronicas (setas). **C.** A análise do corte longitudinal da região da cabeça dos espermatozoides revela que a vesícula acrossomal (v) se estende até o núcleo(n). No interior da vesícula acrossomal se encontra o perforatorium (p) que se insere de forma assimétrica no núcleo, entre ele e o núcleo nota-se a presença do espaço subacrossomal (seta). **D.** As espermátides ainda em processo de compactação da cromatina. Núcleos (n). **E.** A região de transição núcleo-flagelo (circulo descontínuo) ainda não está completamente formada. Observa-se que o adjunto de centríolo (ac) ainda não está completamente formado e, paralelamente a ele, se encontra o derivado mitocondrial maior ( $d_1$ ). **F.** A cromatina apresenta em grumos nos núcleos (n). O perforatorium (p) se estende até o interior do núcleo, uma camada de material de baixa eletrondensidade (seta) é visualizada entre o núcleo e derivado mitocondrial (d). **G.** Em corte transversal das espermátides é possível visualizar os núcleos (n) com a cromatina em compactação, o derivado mitocondrial maior ( $d_1$ ) ao lado do adjunto do centríolo (ac) e o axonema (x). **H.** As setas apontam para regiões elétronicas do adjunto do centríolo (ac) e a seta contínua para a região paracristalina do derivado mitocondrial maior ( $d_1$ ). **I.** Ambos os derivados mitocondriais apresentam região paracristalina na porção distal. **J.** A seta aponta para a região paracristalina do derivado mitocondrial maior ( $d_1$ ), microtúbulos orientam o posicionamento das estruturas do flagelo (cabeça de seta), o axonema (x) em sua configuração 9+9+2. **k.** Detalhe da região terminal do flagelo mostrando a organização do axonema. Escalas: A=0,5 $\mu$ m. B, D=2 $\mu$ m. C, E-I=1 $\mu$ m. J-K=100 nm.



**Figura 5.** Vesícula seminal de machos hapóides e de QLM 2n de *Melipona quadrifasciata*. **A.** No machos haplóide recém-emergido observa-se uma epitélio colunar e na luz (L) da vesícula acúmulo de uma material que seria uma possível secreção de origem desconhecida. **B.** Machos haplóide de 5 após a emergência com a vesícula cheia de espermatozóides. **C.** No macho recém-emergido, a vesícula seminal é composta por um epitélio simples prismático (Ep) apoiado por uma lâmina basal (LM) delgada e uma camada muscular circular (cm) envolvendo o órgão. Na porção apical do epitélio brotam porções citoplasmáticas (setas) na luz (L) do órgão também são visualizadas estas estruturas. **D.** No QLM de cinco dias, os núcleos (n) basais apresentam mais claros com cromatina granulada. Luz da vesícula (L) e uma camada muscular (cm) envolve o órgão. **E-F.** A região apical das células epiteliais da vesícula seminal dos QLM são ricas em mitocôndrias (mt), os núcleos (n) apresentam nucléolo evidente (setas), também é visualizada uma camada muscular (cm) envolvendo o órgão. **F.** Detalhe da região próxima ao núcleo(N) das células epiteliais mostrando a presença de figuras mielínicas (círculo descontínuo). Os núcleos apresentam nucléolo (Nu) evidente. Escalas: A-D=20µm. E=5µm. F=2µm.



## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Araújo, V.A., Zama, U., Dolder, H. e Lino-Neto, J. (2005) Ultrastructure of *Scaptotrigona xanthotricha* spermatozoa (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). **Braz. J. Morphol. Sci.** 22 (3), 137-141.

Ayabe T. Hoshihara H., Ono M. (2004) Cytological evidence for triploid males and females in the bumblebee, *Bombus terrestris*. **Chromosome Res.** 12, 215–223

Braun, R. P., Waytt, G. R. (1995) Growth of male accessory gland in adult Locust, Roles of juvenile hormone, JH esterases, and JH binding proteins. **Arch. Ins. Biochem. Physiol.** 30, 383-400

Brito, P., Zama U., Dolder H., Lino-Neto J. (2010) New characteristics of the male reproductive system in the Meliponini bee, *Friesella schrottkyi* (Hymenoptera, Apidae), histological and physiological development during sexual maturation. **Apidologie** 41, 203–215.

Borges, A.A; Humann, F.C; Hartfelder, K; Judice, C.C; Campos, L.A.O., e Tavares, M.G. (2009) Quantificação relativa da expressão gênica de rainhas, operárias, machos haplóides e diplóides de *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae). **Anais do 55º Congresso Brasileiro de Genética.** Águas de Lindóia , Brasil. p.297.

Camargo, C.A. 1974. Produção de machos diplóides de *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae). **Cien. e Cult.** 26(7):267.

Camargo, C.A. (1977) Effects of juvenile hormone on diploid drones of *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera, Apidae). **VIIIth Int. Congr. I.U.S.S.I.** (Wageningen, Netherlands), 193-194.

Camargo, C.A. (1984) Spermatozoa number and migration to the seminal vesicle in haploid and diploid males of *Melipona quadrifasciata* Lep. **J. Apic. Res.** 23 (1), 15-17

Camargo, C.A. (1982) Longevity of diploid males, haploid males and workers of the social bee *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera, Apidae). **J. Kansas Entomol. Society.** 55 (1), 8-12.

Campos, L.A.O. (1977) **O hormônio juvenil nas abelhas, seu papel na diferenciação das castas e nos aspectos do controle social.** Tese de Doutorado, FM, USP, Ribeirão Preto, 60p.

Campos, L.A.O. (1978) Determinação de sexo em abelhas. VI. Effect of juvenile hormone analogue in male and females of *Melipona quadrifasciata* (Apidae). **J. Kansas Entomol. Society.** 51 (2), 228-234.

Campos, L.A.O., Coelho, C.D.P. (1993) Determinação de sexo em abelhas. XXX. Influência da quantidade de alimento e do hormônio juvenil na determinação de castas de *Partamona Cupira helleri* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Rev. Brasil. de Zool.** 10 (3), 449-452.

Campos, L.A.O., Velthuis, H.H.W., Velthuis-Kluppel, F.M. (1975) Juvenile hormone and caste determination in a stingless bee. **Naturwiss.** 62, 427-36.

Chapman, R.F. (1998) **The Insects, Structure and Function.** Cambridge, Cambridge University Press.

Chaud-Netto, J., Kerr, W. (1980) Genetic mechanisms of the development of reproductive organs of *Apis mellifera* workers and diploid drones: a complementary hypothesis. **Brazil. J. Genetis.** 2, 127-138.

Colonello-Fratini, N.A., Guidugli-Lazzarini, Simões, Z.P., Hartfelder, K. (2010) Mars is close to venus – Female reproductive proteins are expressed in the fat body and reproductive tract of honey bee (*Apis mellifera* L.) drones. **J. Insect Physiol.** 56(11), 1638-1644.

Conte, M., Lino-Neto, J., Dolder, H. (2005) Spermatogenesis of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera, Apidae), Fate of the Atypical spermatids. **Caryologia** 58( 2), 183-188.

Cruz-Landim, C.(2009) **Abelhas,** Morfologia e função dos sistemas. São Paulo, Editora UNESP. 408p.

Dallacqua R.P., Cruz-Landim C. (2003) Ultrastructure of the ducts of the reproductive tract of males of *Melipona bicolor bicolor* Lepeletier (Hymenoptera, Apinae, Meliponini). **Anat. Histol. Embryol.** 32, 276–281.

Duchateau, M.J.e Mariën, J.( 1995) Sexual biology of haploid and diploid males in the bumble bee *Bombus terrestris*. **Ins. Soc.** 42, 255-266.

Ferreira, A., Abdalla, F.C., Kerr, W.E. e Cruz-Landim, C. (2004) Comparative Anatomy of Male Reproductive Internal Organs of Bees. **Neotrop. Entomol.** 33(5), 569-576.

Garófalo, C. A. (1973) Occurrence of diploid drones in a Neotropical bumblebee. **Experientia** 19, 726–727.

Garófalo C.A, Zucchi R. & Muccillo G. (1986) Reproductive studies of a neotropical bumblebee, *Bombus atratus* (Hymenoptera, Apidae). **Rev. Bras. Genet.** 9, 31–34.

Hartfelder, K., Engels, W. (1998) Social insect polymorphism, hormonal regulation of plasticity in development and reproduction in the honeybee. **Curr. Top. Develop. Biol.** 40, 45–77.

Hartfelder, K. ; Tozetto, S.O. e Rachinsky, A. (1993) Sex-specific developmental profiles of juvenile hormone synthesis in honey bee larvae. **Roux's Arch. Dev. Biol.** 202, 176-180.

Heimpel, G e de Boer, J.G. (2008) Sex Determination in Hymenoptera. **Annu.Rev.Entomol.** 53, 209-230.

Imai, H.T.; Taylor, R.W.; Crosland, M.W.J.; Crozier, R.H.. 1988. Modes of spontaneous chromosomal mutation and karyotype evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis. **Jpn. J. Genet.** 63, 159-185.

Kerr, W.E.; Akahira, Y.; Camargo, C.A. (1975) Sex determination in bees. Iv. Genetic control of juvenile hormone production in *Melipona quadrifasciata* (Apidae). **Genetics** 81, 749-759.

Kerr, W.E., Carvalho, G.A., Nascimento, V.A. 1996 **Abelha Uruçu**, Biologia, manejo e conservação. Ed. Fundação Acangaú, 144p.

Lima, M. A. P., Lino-Neto J., Campos, L.A.O. (2006) Sexual maturation in *Melipona mondury* males (Apidae, Meliponini). **Braz. J. Morphol. Sci.** 23 (3-4), 369-375.

Moors, L. Spaas O., Koeniger, G., Billen, J.(2005) Morphological and ultrastructural changes in the mucus glands of *Apis mellifera* drones during pupal development and sexual maturation. **Apidologie** 36, 245–254.

Oliveira, F. F. ; Andrade, M. A. P. (2006) Ginandromorfia em *Melipona mondury* Smith (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Sitientibus** 6(4), 272-276.

Schuetz, M. J. C., Furtado, A. F. (1991) Juvenile hormone III and nutrition effects on spermatogenesis in the 4th instar nymphs of *Panstrogylus megistus* (Hemiptera: Reduvidae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 86 (1), 11-18.

Simões, T. G. (2011). **Efeitos do hormônio juvenil em fêmeas e machos de *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae): características morfológicas**. Dissertação de Mestrado. UFV, Viçosa, MG, 43p.

Stefanini, M. C. De Martino, L. Zamboni (1967) Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy, **Nature** 216, 173–174.

Tavares, M.G., Irsigler, A.S.T. e Campos, L.A.O. (2003) Testis length distinguishes haploid and diploid drones in *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Meliponinae). **Apidologie** 34, 449–455.

Tozetto S.O. (1997) **Hormonelle Steuerung in der Entwicklung von Drohnen** (*Apis mellifera carnica*), Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften der Fakultät für Biologie der Eberhard-Karls Universität Tübingen.

Tozetto, S.O., Rachinsky, A. e Engels, W. (1997) Juvenile hormone promotes flight activity in drones (*Apis mellifera carnica*). **Apidologie** 28, 77–84.

Wcilo, W. T.; Gonzalez, V. H.; Arneson, L. (2004) A review of deviant phenotypes in bees in relation to brood parasitism, and a gynandromorph of *Megalopta genalis* (Hymenoptera: Halictidae). **J. Natural Hist.** 38, 1443-1457.

Woyke, J. (1965) Genetic proof of the origin of diploid drones from fertilised eggs of the honeybee. **J. Apic Res.** 4, 7–11.

Woyke J. (1973) Reproductive organs of haploid and diploid drone honeybees. **J. Apic. Res.** 12, 35–51.

Woyke J. (1977) Cannibalism and brood-rearing efficiency in the honeybee. **J. Apic. Res.** 13, 84-94.

Whiting, P.W. (1943) Multiple alleles in complementary sex determination of *Habrobracon*. **Genetics** 28, 365-382.

Wirtz, P.( 1973) **Differentiation in the honeybee larva**, A Histological, electron-microscopical and physiological study of caste induction in the *Apis mellifera mellifera* L. Departmente of Entomology, Agricultural University, Wageningen, The Netherlands. 155p. Tese de doutorado.

Yagi, S., Fukushima, T. (1975) Hormonal effect on cultivated insect tissues II: Effects of juvenile hormone on spermiogenesis of the silkworm, *Bombyx mori* L. “in vivo” (Lepidoptera: Bombycidae). **Appl. Ent. Zool.** 10,77-83.

Yosida, T.(1951) Testicular transplation is grasshoppers, with special remarks on cytological phenomena in grafted testes (studies on abnormal nuclear divisions). **J. Fac. Sci. Hokkaido Univ. Ser. VI. Zool.** 10, 127,135.

Zama, U., Lino-Neto, J. e Dolder, H. (2001) Ultrastructure of spermatozoa in *Plebeia (Plebeia) droryana* Friese (Hymenoptera, Apidae, Meliponina). **J. Hym. Res.** 10, 261-270.

Zama, U., Lino-Neto, J. e Dolder, H. (2004) Structure and ultrastructure of spermatozoa in Meliponini (stingless bees) (Hymenoptera, Apidae). **Tissue Cell** 36, 29-41.

Zama, U., Lino-Neto, J., Melo, S.M., Campos, L.A.O. & Dolder, H. (2005) Ultrastructural characterization of spermatozoa in Euglossini bees (Hymenoptera: Apidae: Apinae). **Ins. Soc.** 52, 122-131.