

MARLENE LUCÍA AGUILAR BENAVIDES

**ASPECTOS DA BIOLOGIA REPRODUTIVA DE *Bombus morio* (SWEDERUS) E
Bombus atratus FRANKLIN (HYMENOTERA, APIDAE)**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Entomologia, para
obtenção do título de *Magister Scientiae*.

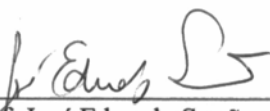
Viçosa
Minas Gerais - Brasil
2008

MARLENE LUCÍA AGUILAR BENAVIDES

**ASPECTOS DA BIOLOGIA REPRODUTIVA DE *Bombus morio*
(SWEDERUS) E *Bombus atratus* FRANKLIN (HYMENOTERA,
APIDAE)**

Dissertação apresentada
à Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Entomologia, para obtenção do título
de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 29 de fevereiro de 2008.



Prof. José Eduardo Serrão
(Co-Orientador)

Prof. José Lino Neto
(Co-Orientador)

Prof. Dejaire Messias

Pesq. Riviane Rodrigues da Hora

Prof. Lucio Antonio de Oliveira Santos
(Orientador)

Dedico este trabalho em memória de meu querido sobrinho Christian Julian Aguilar.

À minha mãe que sempre me apóia em todas minhas loucas idéias e sempre está incondicionalmente nos momentos mais importantes de minha vida.

AGRADECIMENTOS

À minha família pelo amor, apoio em todo momento e compreensão.

À Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade de realização do curso.

Ao professor Lucio Antonio de Oliveira Campos, pela orientação, paciência, apoio e atenção dedicada.

Ao professor Jose Eduardo Serrão pela orientação, paciência, disponibilidade e valiosas sugestões.

Aos professores José Lino Neto e Dejair Message pela disponibilidade e pelas valiosas sugestões.

Ao Edalton, Guta, Lilá e Bruna pela ajuda e as valiosas sugestões na redação.

Ao Hamilton pela ajuda com a identificação dos ácaros.

À Amanda pela ajuda com a identificação do pólen.

Ao Íris, Geraldo, funcionários do apiário pela ajuda no campo e no laboratório, a experiência de vocês foram fundamentais, também a Osmar e Lulu pela ajuda no Apiário.

Aos técnicos dos laboratórios de biologia estrutural e celular: Alex e Jose Luiz Monteiro.

A meus amigos Janina, Guta, Edalton, Amanda, Felipe pelos conselhos e por estar sempre dispostas a ajudar.

Aos colegas e amigos do Apiário em especial á Bruna, Lilá, Rubana, Mário e Karina. Aos amigos do laboratório de Biologia Celular e Estrutural em especial á Dihego, Carolina, Riviane, a meus amigos do laboratório de acarologia e aos amigos Colombianos, a todos eles muito obrigada pelo convívio agradável e ajuda.

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

ÍNDICE

Resumo	v
Abstract	vii
1 - Introdução Geral	1
1.1 – Generalidades do Gênero <i>Bombus</i>	1
1.2 – Importância econômica e ecológica das mamangavas	2
2 - Referências Bibliográficas	5
3 – Capítulos	7
3.1 - Alguns aspectos do estabelecimento, condições apropriadas para criação e iniciação de colônias de <i>Bombus morio</i> (Swederus) e <i>Bombus atratus</i> Franklin (Hymenoptera, Apidae) em condições de cativeiro.....	8
3.2 Determinação da ativação, tempo de viabilidade dos ovários e efeito da cópula no desenvolvimento da espermateca de <i>Bombus morio</i> (Swederus) (Hymenotera, Apidae).....	43
4 – Conclusões Gerais.....	61

RESUMO

AGUILAR-BENAVIDES, Marlene Lucía, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2008. **Aspectos da biologia reprodutiva de *Bombus morio* (Swederus) e *Bombus atratus* Franklin (Hymenoptera, Apidae).** Orientador: Lucio Antonio de Oliveira Campos. Co-Orientadores: Jose Eduardo Serrão e José Lino Neto.

No mundo inteiro o gênero *Bombus* tem uma importância ecológica e econômica, uma vez que estas abelhas são polinizadores de muitas culturas como tomate, abóbora, morango entre outras. O fato de que estas abelhas serem de uma forma geral agressivas, faz com que seus ninhos sejam destruídos levando ao risco de extinção. Muitos trabalhos já foram desenvolvidos para o conhecimento da biologia desse grupo. O objetivo deste estudo foi estudar alguns aspectos do estabelecimento de colônias em condições de cativeiro e da biologia reprodutiva de *B. morio* e *B. atratus*. Foram feitos vários métodos de iniciação de postura das rainhas das duas espécies. Machos de diferentes idades de *B. atratus* foram dissecados e a idade de maturação sexual foi determinada. Também foram estudados alguns aspectos na reprodução e ativação dos ovários de rainhas de *B. morio* em ausência de cópula, através da histologia e testes histoquímicos. Os resultados contribuíram para o conhecimento geral da criação em cativeiro e da biologia reprodutiva das espécies estudadas. Determinou-se que a introdução seja de imaturos, de operárias ou de uma rainha irmã (nas duas espécies), induzem as rainhas a iniciarem postura. Das 110 rainhas testadas, 80% iniciaram postura e produziram imaturos. Apenas duas rainhas (*B. atratus*) conseguiram produzir adultos (machos). Machos de *B. atratus* a partir do sétimo dia de vida os testículos estavam regredidos e as vesículas seminais totalmente cheias de espermatozóides, mostrando que nesta idade já se estão sexualmente maduros. Sugere-se que nas tentativas de acasalamento em laboratório sejam utilizados machos dessa idade. No caso das rainhas, o estudo do comportamento e do desenvolvimento ovariano mostrou que seus ovários são ativos a partir de cinco dias após a emergência permanecendo assim por até mais de 30 dias. Sugere-se que para tentativas de acasalamento em laboratório sejam utilizadas rainhas de 10 dias até 40 dias de idade. Os resultados tanto da parte de acompanhamento dos ninhos e iniciação de colônias a partir de rainhas quanto dos estudos histológicos nos mostram que as rainhas destas espécies têm um tempo longo de ativação de seus ovários (+ de 30 dias) e como consequência disto as rainhas podem permanecer mais tempo nos ninhos e iniciar a postura sem ter copulado antes. A presença de indivíduos ou imaturos das mesmas ou outras espécies faz que acelere o processo de início de postura.

É necessário fazer estudos aprofundando relacionados a dietas alimentares para garantir a continuidade nas colônias produzidas e das rainhas que iniciam postura no laboratório.

ABSTRACT

AGUILAR-BENAVIDES, Marlene Lucía, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, february of 2008. **Aspects of Reproductive Biology of *Bombus morio* (Swederus) and *Bombus atratus* Franklin (Hymenoptera, Apidae).** Adviser: Lucio Antonio de Oliveira Campos. Co-Advisers: Jose Eduardo Serrão and José Lino Neto.

The genus *Bombus* in the entire world it has an ecological and economic importance; these bees are being used as pollinators of many cultures as tomatoe, pumpkin, strawberry among others. But the fact of that these bees have some levels of aggressiveness, they make that its nests are destroyed leading to the extinguishing risk. Many works already had been developed for the knowledge of the biology of this group. The objective of this study was to study some aspects of the establishment of colonies in captivity conditions and of the reproductive biology of *B. morio* and *B. atratus*. Some methods of induce of oviposition of queens of the two species had been made. Males of different ages of *B. atratus* had been dissected and the age of sexual maturation was determined. Also some aspects in the reproduction and activation of the ovaries of queens in absence of mating of *B. morio* had been studied, through the histology and histochemistry tests. The results had contributed for the common knowledge of the rearing in captivity and the reproductive biology of the studied species. It was determined that the introduction of immature, of workers or a queen sister (in these species), induce the queens to star oviposition. Of the 110 tested queens, 80% had star oviposition and produced immature. Only two queens (*B. atratus*) obtained to produce adults (males). Males of *B. atratus* from the seventh day of life, the testicles were total reduced and the seminal vesicles are full of spermatozoa, showing that in this age is sexually mature. This suggests that in the attempts of mating in laboratory, male of this age should be used. In the case of the queens, the study of behaviour of queens and ovarian development showed that its ovaries are active from five days after the emergency thus remaining for until more than 30 days. This suggests that for attempts of mating in laboratory, queens of 10 days up to 40 days of age should be used. The results of the observation of nests and start colonies from queens, showed that queens of these species have a long time of activation of its ovaries (more of 30 days) and as consequence of this, the queens can remain more time in the nests and to star oviposition without mating. The presence of immature or individuals of the same specie or the other species the same genus makes that it accelerate the process of start oviposition. It is necessary to make studies related the alimentary diets to guarantee the

continuity in the produced colonies and of the queens that start oviposition in the laboratory.

1- Introdução Geral

1.1 – Generalidades do Gênero *Bombus*

As abelhas mamangavas sociais são abelhas que pertencem à família Apidae, tribo Bombini, gênero *Bombus* e constituem um grupo de abelhas eusociais primitivas. Elas são robustas, pilosas e freqüentemente têm variações no padrão da coloração e no tamanho do corpo, podendo variar de 9 a 22 mm de comprimento (Michener, 2000). Atualmente se conhecem aproximadamente 250 espécies de *Bombus* (Michener, 2000) distribuídas em 38 subgêneros (Williams, 1998). Destas, 199 espécies estão na Ásia, 58 na Europa, 41 na América do Norte e 43 nas Américas Central e do Sul (Williams, 1985; Michener, 2000). Na América do Sul são reconhecidas 21 espécies em oito subgêneros (Abrahamovich & Díaz, 2002); adaptadas a uma grande variedade de ambientes, com distribuição geográfica desde o nível do mar até os 4400 m de altitude nos Andes (Abrahamovich *et al.*, 2004). No Brasil ocorrem somente seis espécies de *Bombus*, todas pertencentes ao subgênero *Fervidobombus*: *B. atratus*, *B. bellicosus*, *B. brasiliensis*, *B. brevivillus*, *B. morio* e *B. transversalis* (Moure & Sakagami, 1962; Williams, 1998). Essas espécies não Brasil tem a agressividade bastante desenvolvida, o que tem levado as pessoas destruírem os seus ninhos em várias regiões, diminuindo suas populações (Garófalo, 2005).

As abelhas do gênero *Bombus* são primitivamente eussociais que apresentam cuidado com a prole e divisão do trabalho (Michener, 1974; Alford, 1975). Cada colônia tem uma fase inicial subsocial, quando há apenas a rainha, a qual faz todo o trabalho, inclusive cuidar da prole (Alford, 1975; Prys-Jones & Corbet, 1991). Ao surgirem as primeiras operárias filhas inicia-se a fase social, caracterizada pela divisão de trabalho. Nesta fase, a rainha se limita à função reprodutiva, deixando as operárias encarregadas dos trabalhos da colônia, inclusive ajudando a rainha na incubação. (Alford, 1975; Prys-Jones & Corbet, 1991). De acordo com alguns estudos, as operárias que forrageiam são, em geral, maiores do que as demais. As operárias menores ficam dentro do ninho, caso as maiores morram elas podem sair para forragear. As que são muito menores ficam sempre no ninho realizando tarefas de limpeza e cuidado com os imaturos (Heinrich, 2000). Em algumas espécies, as rainhas novas podem ajudar nas tarefas da colônia. Mas, na maioria das espécies, elas se dedicam apenas a forragear, constituindo suas reservas para suportar o período de hibernação (Heinrich, 2000). Os

machos da colônia têm como única função reproduzir, porém, ocasionalmente, alguns podem ajudar na incubação dos ovos. Os machos quando sexualmente maduros abandonam a colônia para copularem e, em seguida, morrem. Seu tempo de vida é de apenas três a quatro semanas (Alford, 1975; Prys-Jones & Corbet, 1991)

No final do ciclo da colônia se observa alta mortalidade de operárias, falta de alimento e, conseqüentemente, morte da rainha fundadora. Ainda, pela baixa densidade populacional, as temperaturas do ninho diminuem e, também, se observa invasões por muitos parasitos, tudo isso, levando a extinção total da colônia (Alford, 1975).

Entretanto, em regiões tropicais, às vezes, algumas rainhas filhas permanecem nas colônias e, quando a rainha mãe morre, elas copulam e reativam a colônia, completando mais um ciclo biológico no ano, como, por exemplo, *B. atratus* (Sakagami *et al.*, 1967; Garófalo *et al.*, 1986).

O método de comunicação dentro da colônia tem sido objeto de numerosos estudos. Até o momento este parece ser determinado quase em sua totalidade por feromônios. Algumas operárias adquirem o odor das flores visitadas e, ao entrarem no ninho, esse odor é detectado pelas demais, influenciando o comportamento de forrageamento (Heinrich, 2000).

O comportamento de defesa em *Bombus* difere daquele observado em outros gêneros de insetos sociais. Em situações de perigo, eles saem do ninho, elevam as patas traseiras, assumem uma posição encurvada e mostrando o ferrão. As mamangavas sociais não perdem o ferrão, podendo utilizá-lo inúmeras vezes. Entretanto, a utilização do ferrão depende muito do grau de agressividade da espécie e do tipo de inimigos e/ou situação (Alford, 1975; Heinrich, 2000). Por exemplo, *B. rubicundus*, a pesar de as operárias assumirem postura de defesa quando se sentem ameaçadas, nunca usam o ferrão. Elas, aparentemente, utilizam as mandíbulas, que são bastante grossas, para atacar seus inimigos (Aguilar, 2004). Ainda, em *B. fervidus*, as operárias se defendem regurgitando mel em seus inimigos paralisando-os (Heinrich, 2000).

1.2 – Importância econômica e ecológica das mamangavas

As mamangavas são importantes polinizadores de muitas culturas, assim como de vegetação nativa. Elas são rápidas, podendo, por exemplo, visitar o dobro de flores por minuto do que *Apis mellifera* visitaria. E, por serem grandes, podem transportar cargas relativamente pesadas, permitindo visitarem muitas flores antes de voltarem à colônia, e conseguem melhor contato com os estames e pistilos do que os insetos de

menor tamanho (Heinrich, 2000; Koppert, 2007). Além disso, possuem língua longa que permite polinizar flores com corolas profundas, por exemplo, flores do feijão e do trevo vermelho, e também possuem o comportamento de vibrar as anteras para liberar o pólen (Shelly & Villalobos, 2000; Heinrich, 2000).

Como as abelhas do gênero *Bombus* conseguem manter a temperatura corporal, elas podem forragear em temperaturas variando dos 10 aos 32 °C, portanto podendo sair nas primeiras horas do dia, quando a temperatura ambiente ainda é baixa (Heinrich, 2000). Em Israel foram observados indivíduos de *B. terrestris dalmatinus* forrageando aos 2 °C (Winter *et. al.*, 2006) e na Colômbia, operárias de *B. rubicundus* forrageando a 7 °C (Aguilar, 2004). Outras características importantes de *Bombus* são capacidade de as operárias trabalharem com baixas intensidades de luz e sob condições climáticas muito adversas como, por exemplo, ventos fortes ou chuva (Koppert, 2007; Winter *et. al.*, 2006). Winter *et. al.*, (2006) observaram operárias visitando de 20 a 50 flores por minuto durante uma chuva.

Na Colômbia, o gênero *Bombus* poliniza plantas nativas em regiões onde outros polinizadores podem estar ausentes pela grande altitude, como é o caso das plantas da família de Asteraceae que ocorre em uma grande faixa de altitude e suas flores são visitadas com frequência pelas operárias e rainhas dessas abelhas (Cruz *et al.*, 2005; Almanza, 2007). Em alguns países como Alemanha, Holanda, Inglaterra e Estados Unidos, o gênero *Bombus* tem sido um dos mais bem estudados como insetos polinizadores, permitindo desenvolver metodologias para produção de colônias em condições de cativeiro (Heinrich, 2000; Koppert, 2007). Holanda e Estados Unidos produzem colônias em escala comercial e as vendem para todo o mundo, incluindo países da América Latina como México e Chile (Koppert, 2007; Heinrich, 2000). Espécies como *B. terrestris*, *B. impatiens* e *B. canariensis* têm sido produzidas comercialmente para a polinização de tomate cultivado em casa de vegetação (Heinrich, 2000). Algumas espécies têm se mostrado também eficientes polinizadores em culturas de melão, berinjela, abóbora, pimentão e morango (Free, 1970; Kevan *et al.*, 1991; Heinrich, 2000; Koppert, 2007).

A criação em cativeiro de espécies nativas de abelhas pode ser uma alternativa para a conservação, já que muitos fatores têm ameaçado tanto as espécies como seus habitats naturais. Entre estes fatores estão a fragmentação de ecossistemas, o desmatamento, a introdução de polinizadores exóticos, o uso de pesticidas, doenças, parasitas, entre outros (Macfarlane *et al.*, 1995; De Ruijter, 1997; Nates & Gonzalez,

2000). Ainda, os ninhos de *Bombus*, por serem construídos no solo, podem ser destruídos por práticas agrícolas e agropecuárias (Williams, 1989).

Para evitar a introdução de espécies exóticas para a polinização de culturas como, por exemplo, o tomate, a abóbora e a pimenta, são necessários estudos de criação em cativeiro de espécies nativas. Assim, neste trabalho pretendeu-se estudar alguns aspectos do estabelecimento de colônias de *B. morio* e *B. atratus* em condições de cativeiro na região neotropical e, ainda, buscou-se conhecer a morfofisiologia do sistema reprodutivo de rainhas e de machos, pois estas informações podem contribuir para a criação contínua de colônias.

Este trabalho se apresenta dividido nos capítulos:

1. Alguns aspectos do estabelecimento, condições apropriadas para criação e iniciação de colônias de *Bombus morio* e *Bombus atratus* (Hymenoptera, Apidae) em condições de cativeiro;
2. Ativação e tempo de viabilidade dos ovários e efeito da cópula no desenvolvimento da espermateca de fêmeas de *Bombus morio* (Hymenoptera, Apidae).

2. Referências Bibliográficas

- Abrahamovich, A.H., Diaz, N.B. & Morrone, J.J. 2004. **Distributional patterns of the Neotropical and Andean species of the genus *Bombus* (Hymenoptera: Apidae).** Acta Zoológica Mexicana (n. s), 20: 99-117.
- Aguilar, M.L. **Biología y nidación de *Bombus rubicundus* Smith, 1854 (Hymenoptera: Apidae) en condiciones de Cautiverio.** Tesis de grado, 2004. Universidad Militar Nueva Granada, Bogotá.
- Alford, D.V. 1975. **Bumblebees.** London: Davis – Poynter.
- Almanza, M.T. 2007. **Management of *Bombus atratus* bumblebees to pollinate Lulo (*Solanum quitoense* L), a native fruit from the Andes of Colombia.** Ecology and Development Series. Cuvillier Verlag, Göttingen. No 50.
- Cruz, O., Almanza, M.T. and Cure, J.R. 2005. **Determinación de las diferencias en las dietas de tres especies de abejorros del género *Bombus* en sus ambientes naturales mediante análisis palinológico.** Memorias del XXXI Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología. Bogotá, Colombia.
- De Ruijter, A. 1997. **Commercial Bumblebee rearing and its implications.** Acta Horticulturae, 437:261-270
- Free, J. 1970. **Insect pollination of crops.** Academic Press – London and New York. pp 89-101.
- Garófalo, C.A., Zucchi, R. & Muccillo, G. 1986. **Reproductive studies of a neotropical bumblebee, *Bombus atratus* (Hymenoptera, Apidae).** Revista Brasileira de Genética, IX(2): 231-243
- Garófalo, C.A. 2005. ***Bombus*: as mamangavas de chão e sua importância como agentes polinizadores.** Apacame Mensagem Doce n° 80. <http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/80/msg80.htm>
- Gretenkord, C. 1996. **Laborzucht der dunklen Erdhummel *Bombus terrestris* L. (Hymenoptera: Apidae) und toxikologische Untersuchungen unter Labor – und Halbfreilandbedingungen.** Ph. D. Thesis. Institut für Landwirtschaft Zoologie und Bienenkunde Rheinischen Friederich – Wilhelms. Universität Bonn, Alemanha.
- Heinrich, B. 2000. **Bumblebee Economics.** Harvard College. United States of America.
- Kevan, P.G., Straves, W.A., Offer, M. & Lavery, T.M. 1991. **Pollination of greenhouse tomatoes by bumble bees in Ontario.** Proceedings of the Entomological Society of Ontario, 122: 15-19.

- Koppert B.V. 2007. Koppert Biological Systems. **Natural Pollination**. The Netherlands. <http://www.koppert.nl/e003.shtml>.
- Macfarlane, R.P., J.J. Lipa, and H.J. Liu. 1995. **Bumblebee pathogens and internal enemies**. *Bee World*, 76:130-148.
- Michener, C.D. 1974. **The social behavior of the bees**. The Belknap Press of Harvard University Press.
- Michener, C.D. 2000. **The bees of the world**. The Johns Hopkins University Press.
- Moure, J.S. & Sakagami, S.F. 1962. **As mamangabas sociais do Brasil (Bombus Latr.) (Hymenoptera, Apoidea)**. *Studia Entomologica*, 5: 65-194.
- Nates, G. & González, V. 2000. **Las abejas silvestres de Colombia: Por qué y cómo conservarlas**. *Acta Biológica Colombiana*, 5: 5-37.
- Prys-Jones, O.E. & Corbet, S.A. 1991. **Bumblebees**. Richmond Publishing Co. Ltd.
- Sakagami, S. F., Akahira, Y. and R. Zucchi. 1967. Nest architecture and brood development in a neotropical bumblebee, *Bombus atratus*. *Insectes Sociaux*, 14(4): 389-414.
- Shelly, T. E., Villalobos, E. 2000. **Buzzing Bees (Hymenoptera: Apidae, Halictidae) on Solanum (Solanaceae): Floral Choice and Handling Time Track Pollen Availability**. *The Florida Entomologist*, 83(2): 180-187.
- Velthuis H.H.W. & Van Doorn A. 2006. **A century of advances in bumblebee domestication and the economic and environmental aspects of its commercialization for pollination**, *Apidologie*, 37: 425-431.
- Williams, P.H. 1985. **A preliminary cladistic investigation of relationships among the bumblebees (Hymenoptera, Apidae)**. *Systematic Entomology*, 10: 239 – 255.
- Williams, P.H. 1989. **Bumble bees and their decline in Britain**. Central Association of Bee-Keepers, Ilford. www.nhk.ac.uk/entomology/bombus/decline.html
- Williams, P.H. 1998. **An annotated checklist of bumble bees with an analysis of patterns of description (Hymenoptera: Apidae, Bombini)**. *Bulletin Natural History Museum. London*. 67: 79-152.
- Winter K., Adams L., Thorp R., Inouye D., Day, L., Ascher, J., & Buchman S. 2006. **Importation of Non-native Bumble bees into North America. Potential Consequences of Using Bombus terrestris and Other Non-Native Bumble Bees for Greenhouse Crop Pollination in Canada, Mexico, and the United States** North American Pollinator Protection Campaign (NAPPC). www.pollinator.org/Resources/BEEIMPORTATION_AUG2006.pdf.

3. Capítulos

3.1 Alguns aspectos do estabelecimento, condições apropriadas para criação e iniciação de colônias de *Bombus morio* (Swederus) e *Bombus atratus* Franklin (Hymenoptera, Apidae) em condições de cativeiro.

RESUMO

Alguns aspectos do estabelecimento e as condições apropriadas para criar e iniciar colônias de *Bombus morio* e *B. atratus* em cativeiro foram estudados. Para isso, rainhas de *B. morio* foram capturadas em campo e colocadas em caixas de iniciação de colônias. Ainda, ninhos de *B. morio* e *B. atratus*, em fase de produção de sexuais, foram capturados, transferidos para caixas de criação mantidas em uma sala escura. Destes ninhos, rainhas filhas virgens e copuladas, com machos irmãos no laboratório, foram transferidas para caixas de iniciação, as primeiras para a produção de machos. Todas as caixas de iniciação foram mantidas em estufa de cultura a temperatura de 28 a 30 °C. Os ninhos e as rainhas testadas foram alimentados com pólen e uma solução aquosa (70% mel) de *Apis mellifera*. Para induzir a oviposição, nas caixas de iniciação foram mantidas rainhas: (1) sozinhas, (2) com imaturos e (3) com rainhas irmãs virgens. Este último não foi feito para as rainhas coletadas em campo. Para determinar a idade de maturação sexual, o sistema reprodutivo de machos em diferentes idades de *B. atratus* foi dissecado e analisado. Os resultados mostraram que a introdução de imaturos induz rainhas fecundadas a iniciar postura em tempo menor (três a quatro dias) do que as rainhas que ficaram sozinhas (entre seis dias a duas semanas) ou com rainhas irmãs (mais de uma semana). Das 110 rainhas testadas, 80% iniciaram postura e produziram imaturos. Apenas duas rainhas (*B. atratus*) conseguiram produzir adultos (machos). Em machos de *B. atratus*, a partir do sétimo dia de vida os testículos estavam regredidos e as vesículas seminais totalmente cheias de espermatozoides, mostrando que nesta idade já estão sexualmente maduros.

Palavras-chave: *Bombus morio*, *Bombus atratus*, rainhas, criação, oviposição, machos.

3.1 - Some aspects of establishment, appropriate conditions for rearing and initiation of colonies of *Bombus morio* e *Bombus atratus* (Hymenoptera, Apidae) in captivity conditions

ABSTRACT

Some aspects of establishment and the conditions appropriate to rearing and to initiation of colonies of *Bombus morio* and *Bombus atratus* in captivity had been studied. For this, queens of *B. morio* had been captured in field and transferred in boxes of initiation of colonies. In addition, nests of *B. morio* e *B. atratus*, in phase of production of males and queens, had been captured, transferred to boxes of initiation maintained in a dark room. Of these nests, virgin queens and virgins queens crossed with male brothers in the laboratory had been transferred to boxes of initiation, the first ones for the production of males. All the boxes of initiation had been kept in incubators of culture to temperature of 28 to 30 °C. The nests and the tested queens had been fed with pollen and a diluted solution (70% honey) of *Apis mellifera*. To induce the oviposition, in the boxes of initiation, the queens had been kept: (1) alone, (2) with immature and (3) with virgins queens sisters. This last one was not made for the queens collected in field. To determine the age of sexual maturation, the reproductive system of males in different ages of *B. atratus* it was dissected and analyzed. The results showed that the introduction of immature induces fertilized queens to initiate oviposition in lesser time (three to four days) of that the queens who had been alone (between six days to two weeks) or with virgin queens sisters (more than one week). Of the 110 tested queens, 80% had initiated oviposition and produced immature. But only two queens (*B. atratus*) obtained to produce adults (males). In males of *B. atratus*, from the seventh day of life the testicules were reduced and full the seminal vesicles of spermatozoa, showed that in this age is sexually mature.

Keywords: *Bombus morio*, *Bombus atratus*, queens, rearing, oviposition, males.

INTRODUÇÃO

Alford (1975) e Gretenkord (1996), entre outros, estudaram amplamente as espécies do gênero *Bombus* das zonas temperadas do norte assim a biologia da maioria das espécies já é bem conhecida. As espécies Neotropicais são as menos estudadas. Entre os principais pesquisadores que descreveram as espécies neotropicais de *Bombus* estão Frison (1925) e Milliron (1973a, b). Labougle (1990) estudou as espécies do México e América Central. Na América do Sul, trabalhos taxonômicos foram feitos por Moure & Sakagami (1962) para a fauna brasileira, Lievano *et al.* (1994) para espécies da Colômbia e Rasmussen (2003) estudou as espécies presentes no Peru.

As espécies *Bombus morio* (Swederus, 1787) e *Bombus atratus* Franklin, 1913 são as mais estudadas no Brasil. *B. morio* ocorre desde o noroeste da América do Sul até o sudeste do Brasil, Uruguai e Norte da Argentina. *B. atratus* está distribuída desde o noroeste da América do Sul até o sudeste do Brasil, Uruguai e Argentina central. A distribuição das duas espécies coincide em grande parte do território brasileiro (Moure & Sakagami, 1962; Abrahamovich *et al.*, 2004). No Brasil, *B. morio* e *B. atratus* não apresentam diferenças de distribuição em relação a altitude. Praticamente todas as espécies brasileiras são encontradas desde o nível do mar até 1000 m de altitude (Moure & Sakagami, 1962). Na Colômbia, *B. atratus* pode ser encontrada em altitudes acima de 3200 m (Lievano *et al.* 1994) e no Peru, *B. morio* pode ser encontrada até um altitude de 2500 m (Rasmussen, 2003).

Bombus morio e *Bombus atratus* pertencem ao subgênero *Fervidobombus* (Moure & Sakagami, 1962; Williams, 1998) e no Brasil foram classificadas como Odontobombus ou constructores de bolsas alimentares (“pocket maker”) (Garofalo, 1979 e 1980). Na Colômbia se observaram indivíduos de *B. atratus* tendo as duas formas de alimentação (constructores de bolsas alimentares (“pocket maker”) e armazenadores de alimento (“pollen storer”)) (Rojas *et al.* 2003).

Nas espécies neotropicais o ciclo biológico é similar ao das espécies de zonas temperadas. A diferencia está no fato de haver dois ciclos biológicos durante o ano, formando assim colônias poligínicas pelo menos por algum tempo e a colônia-mãe poderá ser reativada por uma das rainhas filhas ou mesmo pelas operarias que conseguem desenvolver ovários (Sakagami *et al.*, 1967; Zucchi, 1973; Silva-Matos & Garófalo, 1995).

Em todas as espécies de *Bombus*, o ninho é sempre iniciado por uma rainha sozinha. A qual requer quantidade suficiente de néctar e pólen para iniciar seus ninhos (Alford, 1975; Prys-Jones & Corbet, 1991; Delaplane, 1995). Além disso, para iniciar sua própria colônia é requisito indispensável conseguir um lugar apropriado onde possa desenvolver-se, por isto, exploram constantemente buracos e zonas protegidas entre a vegetação em busca de um sitio apropriado, isto pode durar desde uns poucos dias até semanas (Michener, 1974; Alford, 1975; Sakagami *et al.*, 1967; Prys-Jones & Corbet, 1991). O lugar de construção do ninho tem que fornecer proteção adequada principalmente contra o clima. Na maioria dos ninhos é estabelecida em refúgios habitados anteriormente por pequenos mamíferos como roedores, geralmente subterrâneos. Outras espécies de *Bombus* nidificam preferencialmente em moitas densas de ervas na superfície do solo (Alford, 1975; Prys-Jones & Corbet, 1991; Delaplane, 1995). Após ter selecionado o local para a construção do ninho, a rainha constrói um pote de cera para armazenar o néctar coletado por ela das flores e, em seguida, constrói sua primeira célula para oviposição (Laroca, 1976; Garófalo, 1978; Sakagami *et al.*, 1967; Prys-Jones & Corbet, 1991; Delaplane, 1995).

Em todas as espécies de *Bombus*, quando as operárias emergem a rainha abandona as atividades de campo que passam a ser exercidas pelas operárias (Alford, 1975; Prys-Jones & Corbet, 1991; Delaplane, 1995). Nas zonas neotropicais depois que a população é bastante numerosa, com mais de 500 operárias, a rainha vai perdendo sua dominância sobre elas. Isso leva ao aparecimento de operárias com ovários desenvolvidos que iniciam a construção de células e a oviposição (Sakagami *et al.*, 1967; Zucchi, 1973; Garófalo *et al.*, 1986; Cameron & Jost, 1998). Durante algum tempo, a rainha tenta manter sua dominância, comportando-se de maneira agressiva diante das operárias. Não conseguindo manter sua dominância por meio de agressões, ela passa a destruir as posturas realizadas pelas operárias. É durante esta fase de agressões entre a rainha e operárias que se inicia a produção de machos e rainhas (Alford, 1975; Garófalo *et al.*, 1986; Cameron & Jost, 1998).

Em todas as espécies de *Bombus*, as novas rainhas serão produzidas a partir de posturas realizadas apenas pela rainha velha enquanto os machos são produzidos a partir de ovos postos pela rainha e operárias (Alford, 1975). A rainha velha pode ser morta pelas operárias antes ou logo a emergência das rainhas filhas. Em seguida à produção de sexuais, a colônia pode perecer totalmente com a morte de quase todas as operárias e o abandono do ninho pelos machos e rainhas novas (Alford, 1975; Prys-Jones & Corbet,

1991). No caso de espécies de zonas neotropicais, a colônia pode ser reativada pelas rainhas produzidas (Garófalo *et al.*, 1986; Cameron & Jost, 1998).

Para iniciar colônias em condições de cativeiro varias técnicas têm sido descritas. Sladen (1912) utilizou os seguintes métodos para estimular as rainhas a começarem postura no laboratório: 1) duas rainhas numa mesma caixa, 2) uma rainha com algumas operárias novas e 3) rainhas com operárias novas e imaturos. Esse autor observou que a oviposição foi mais freqüente quando colocou rainhas ou operárias que quando deixaram sozinha a rainha numa caixa. Estas observações foram confirmadas por Duchateau (1991) & Van Eijnde *et al.* (1991). Gretenkord (1996) comparou estes métodos usando a espécie *B. terrestris*, sendo a técnica mais adequada a de colocar operárias e larvas juntamente. Delaplane (1996) descreve algumas técnicas para coleta e instalação de rainhas do gênero *Bombus* em caixas de iniciação de colônias e uma metodologia para alimentação de colônias em condições de cativeiro.

As condições ambientais dos trópicos (temperatura, umidade relativa, época de chuvas e tipo de vegetação) são diferentes das encontradas em zonas temperadas (Duchateau, 2000). Por isto, devem ser feitos estudos que indiquem as melhores condições ambientais para criação em cativeiro de espécies neotropicais nativas. Assim, este trabalho teve como objetivo conhecer algumas condições necessárias para o estabelecimento de colônias a partir da criação e iniciação de rainhas das espécies *Bombus morio* e *Bombus atratus*, em cativeiro. Acreditamos ainda que este conhecimento poderá contribuir para o manejo destas espécies de *Bombus* na polinização de culturas de importância econômica como o tomate ou na introdução delas em ambiente onde as mesmas vem sendo diminuídas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coletas de rainhas e ninhos

As rainhas fecundadas de *B. morio* foram coletadas no período de outubro de 2006 a março de 2007, na comunidade dos Barros (20° 50' 316"S; 042° 55' 417" W) (Figura 1) pertencente ao município de Paula Cândido, Minas Gerais, e no Córrego do Engenho (20° 49' 154"S; 042° 53' 093"W) (Figura 2) pertencente ao município de Viçosa, Minas Gerais. Nestes locais tinham áreas cultivadas com abóbora (*Cucurbita moschata* Poir),

áreas de fragmentos de flora nativa e áreas com diversas espécies vegetais circundantes, como *Phaseolus vulgaris* e *Lycopersicon esculentum*.



Figura 1 e 2. Vista geral das áreas cultivadas com *Curcubita moschata*. **Fig. 1.** Comunidade dos Barros, município de Paula Candido. **Fig. 2.** Córrego do Engenho, Viçosa. Fotos: Bruna Serra.

As rainhas foram coletadas com rede entomológica e transportadas em frascos, no menor tempo possível, para o laboratório. Onde foram transferidas para caixa de iniciação de colônia medindo 15 x 7 x 15 cm e construída, as laterais, com madeira, o fundo de tela de arame e a coberturas com placa de vidro por onde se observou o desenvolvimento da colônia (Figura 3). Cada caixa era rotulada com a data e o lugar de coleta da rainha.

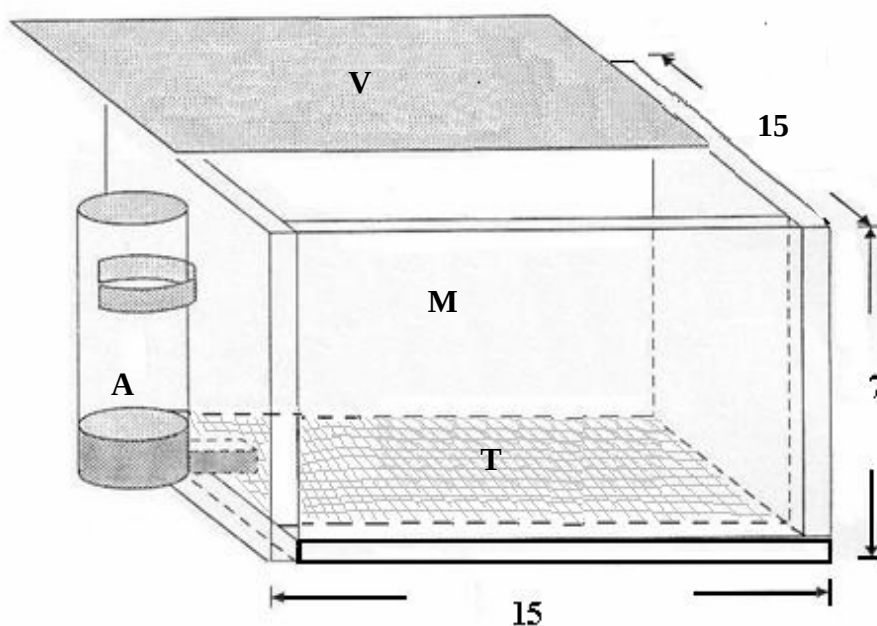


Figura 3. Caixa de iniciação de colônia a partir de Gretenkord (1996). (A) alimentador, (T) tela de arame, (V) coberta de vidro e (M) laterais de madeira. Medidas em cm.

Os ninhos de *B. morio* e *B. atratus* foram capturados no período de março a agosto de 2007 em Três Barras (20° 43' 004"S e 43° 07' 538"W) no município de Porto Firme, Minas Gerais. A captura era feita entre as sete e 10 h da manhã para que a maioria dos indivíduos ainda estivesse na colônia. Durante a escavação, os indivíduos que saíam da colônia eram coletados com rede e colocados em frascos. Logo após aberto o ninho, as células de imaturos eram extraídas com muito cuidado e transferidas para as caixas de criação para colônias (Figura 4). Em seguida eram transferidos os adultos (rainhas, operárias e machos). A caixa era fechada e transportada rapidamente para o laboratório do Apiário Central na Universidade Federal de Viçosa, MG., onde os adultos e as células de imaturos (ovos, larvas e pupas) eram contados.

As caixas de criação para colônias (Figura 4), adaptadas de Gretenkord (1996) e Almanza *et al.* (2006), mediam 21 x 16 x 21 cm e eram construídas, as laterais, com madeira. O fundo tinha uma parte de madeira (14 x 21 cm), onde se colocou a cria, e outra de arame (7 x 21 cm), para defecação e ventilação (Figura 4). A entrada do ninho, com 3,2 cm de diâmetro em uma das laterais, foi fechada com tela de arame para evitar a saída dos indivíduos. Orifícios com 0,3 cm foram feitos em todas as laterais para ventilação. A caixa era coberta com uma folha de acetato transparente com uma abertura no centro e, sobre a folha, um vidro. Para alimentar e limpar a colônia, bem como coletar as rainhas para os experimentos, retirava-se o vidro e fazia através da abertura na folha de acetato.

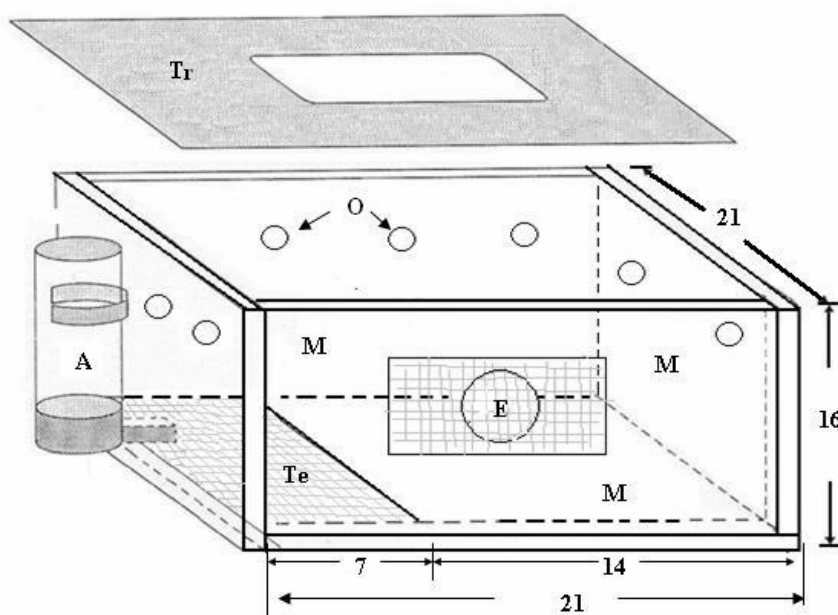


Figura 4. Caixas de criação para colônias em cativeiro a partir de Gretenkord (1996). (A) alimentador, (E) entrada do ninho, (O) orifício de ventilação, (Te) tela de arame, (Tr) transparência e (M) paredes de madeira.

Acondicionamento no laboratório

Primeira Fase

Esta fase foi feita no período de outubro de 2006 a março de 2007 no laboratório do Apiário Central da UFV. As caixas de iniciação, com as rainhas em experimento, e as caixas de criação, como os dois primeiros ninhos capturados, eram mantidos durante todo tempo em estufa de cultura entre 26 e 30 °C, sendo retiradas da estufa apenas para durante as observações.

Segunda Fase

Esta fase compreendeu o período de abril a setembro de 2007 e foi feita em uma sala escura, com temperatura variando entre 22 e 35 °C, adaptada para a manutenção dos ninhos nas caixas de criação. Nesta sala também foram colocadas duas estufas de culturas, com temperatura entre 28 e 30 °C, dentro das quais as caixas iniciação de colônias. Para a manipulação das colônias (alimentação, limpeza e extração de rainhas e machos) se usou luz vermelha, cujo comprimento de onda não é percebido pelas (Prys-Jones & Corbet, 1991; Delaplane, 1996; Gretenkord, 1996).

Alimentação das colônias e das rainhas

Como não foi permitido os indivíduos saírem das respectivas caixas à procura de alimento, este era colocado diretamente nas caixas, conforme metodologias descritas anteriormente por Delaplane (1996) e Gretenkord (1996). Como alimento energético (xarope) foi oferecido aos ninhos e às rainhas uma solução aquosa (70% de mel de *Apis mellifera* e 30% de água). Inicialmente como fonte protéica foi oferecida aos ninhos e às rainhas pólen coletado em colônias de *A. mellifera* e mantido em geladeira. Para o uso, o pólen foi macerado até obter um pó fino ao qual foi adicionado um pouco de mel diluído para umedecê-lo e obter uma pasta fina (Delaplane, 1996; Gretenkord, 1996). A quantidade e frequência do alimento fornecido ao ninho foi proporcional ao tamanho do mesmo e as rainhas foram alimentadas a cada dois dias.

Nos meses de agosto a setembro de 2007 foram testadas algumas rainhas das duas espécies adicionando ao pólen, um suplemento alimentício (continha farinha de soja, farinha de trigo e farinha de milho em relação 1:1:1) e misturado com xarope.: Este suplemento é usado em muitos apiários para evitar perdas de colônias de *A.*

mellifera, quando o pólen coletado pelas colônias não é suficiente para sua sobrevivência.

Para esta parte do experimento somente foram testadas 12 rainhas (oito rainhas de *B. morio* e quatro rainhas de *B. atratus*):

- Seis rainhas (quatro de *B. morio* e duas de *B. atratus*) foram alimentadas somente com pólen.

- Seis rainhas (quatro de *B. morio* e duas de *B. atratus*) foram alimentadas com uma mistura de pólen (70%), o suplemento alimentício (30%) e o xarope.

Parte do pólen fornecido na alimentação no período de junho até agosto de 2007 foi separado para sua posterior identificação, conforme a seguir.

Análise do pólen utilizado na alimentação

Para análise, as amostras de pólen foram preparadas de acordo com a técnica de acetólise de Erdtman modificado por Louveaux *et al.*, (1978). Para isso, adicionou-se 5 ml de ácido acético glacial a 2g da amostra de pólen homogeneizado. Após 48 horas de repouso foi centrifugado por 5 min a 1600 mg e, em seguida, descartou-se o sobrenadante. Ao sedimento foi acrescentado 5 ml de solução de ácido sulfúrico e anidrido acético (1:9), centrifugou-se novamente a 1600 mg por 5 min e, novamente desprezou-se o sobrenadante. Ao sedimento foi misturada uma solução de glicerina e água destilada (1:1) e, após 30min em repouso, foi centrifugado a 1600 mg por 10 min. Amostras do sedimento foram montadas em três lâminas histológicas com gelatina glicerinada e lutadas com parafina. A análise microscópica das lâminas foi feita considerando os aspectos morfológicos dos grãos de pólen (Barth, 1989; Barth & Melhem, 1988), os quais foram identificados por comparação com o laminário de referência da palinoteca do Apiário Central da UFV e também com base em catálogos palinológicos. As frequências dos tipos polínicos presentes nas amostras foram estabelecidas pela contagem de 300 grãos de pólen (100 grãos por lâmina).

Alguns aspectos fenológicos e longevidade das rainhas em cativeiro

Durante o período de um ano (outubro de 2006 até setembro de 2007) foram realizadas observações de rainhas e operárias das espécies *Bombus morio* e *Bombus atratus* capturadas nos municípios de Viçosa, Paula Cândido e Porto Firme. Para estabelecer as épocas de produção de sexuais (rainhas e machos) das duas espécies,

foram tabuladas as datas de captura de rainhas e de ninhos (anotando a quantidade de indivíduos de cada casta). Também foram tabuladas as datas de observações de operárias nas flores.

Para estimar o tempo de vida das rainhas de *B. morio* e *B. atratus* no laboratório foram marcadas com tinta atóxica de diferentes cores às rainhas que emergiram e que foram utilizadas nos tratamentos para produção de colônias e machos. Também foram marcadas algumas rainhas que emergiram e foram mantidas em dois ninhos (um de *B. morio* e outro de *B. atratus*).

Obtenção de rainhas fecundadas no campo

Para obtenção de rainhas fecundadas, coletou-se àquelas que estavam procurando recursos florais presumindo elas que estavam fecundadas, conforme estudos feitos em zonas temperadas por Prys-Jones & Cobert (1991) e Gretenkord (1996) onde descrevem que as rainhas que estão em procura de recursos florais estão em sua maioria fecundadas e fundando novos ninhos. Entretanto, para se verificar se elas estavam de fato fecundadas, logo, que elas morriam eram dissecadas em solução salina para insetos 125 mm e observado se seus ovários continham ovócitos e sua espermateca espermatozóides.

Obtenção de rainhas fecundadas no laboratório

Alguns dos ninhos capturados estavam na fase de sexuais, mas como não foi possível ter ao mesmo tempo dois ou mais ninhos da mesma espécie produzindo sexuais, foram usados rainhas e machos nos cruzamentos. Em caixas especiais para cruzamentos (20x30x20 cm) eram colocados três machos por rainha e esta caixa era mantida em lugar iluminado com bastante sol, uma vez que o êxito dos acasalamentos depende em parte da iluminação e da temperatura. A caixa permanecia fora do quarto durante o dia para os acasalamentos, e na noite era colocada no quarto de criação. Os casais que copulavam eram transferidos para uma caixa de iniciação. Após a cópula se retirava o macho, deixando a rainha sozinha instalada com pólen e xarope para que iniciasse a oviposição conforme estudos feitos por Gretenkord (1996).

Produção de machos

Os ninhos das duas espécies coletados no campo continham em sua maioria rainhas virgens. Algumas foram isoladas em caixas de iniciação para produção de machos.

Formação de novas colônias a partir de rainhas

Para formação de novas colônias foram usadas rainhas de *B. morio* fecundadas e coletadas no campo e rainhas das duas espécies fecundadas no laboratório (Tabela 1). Foram usadas rainhas de diferentes idades marcadas com tintas atóxicas de cores diferentes para a identificação.

Tabela 1. Total de rainhas utilizadas para iniciação de colônias em condições de cativeiro

Totais de rainhas usadas para iniciação de colônias	<i>B. morio</i>	<i>B. atratus</i>
Rainhas fecundadas coletadas no campo usadas para iniciação de colônias	30	0
Rainhas virgens usadas para iniciação de colônias	20	30
Rainhas cruzadas no laboratório usadas para iniciação de colônias	20	10
Total de Rainhas por espécie	70	40

Tratamentos utilizados para produção de colônias e produção de machos em cativeiro

Para acelerar o processo de oviposição, foram testados vários métodos (Sladen, 1912; Duchateau, 1985; Delaplane, 1996; Gretenkord, 1996) (Figuras 5 e 6). Um total de 110 rainhas, das duas espécies, foram distribuídas em dois tratamentos da seguinte forma:

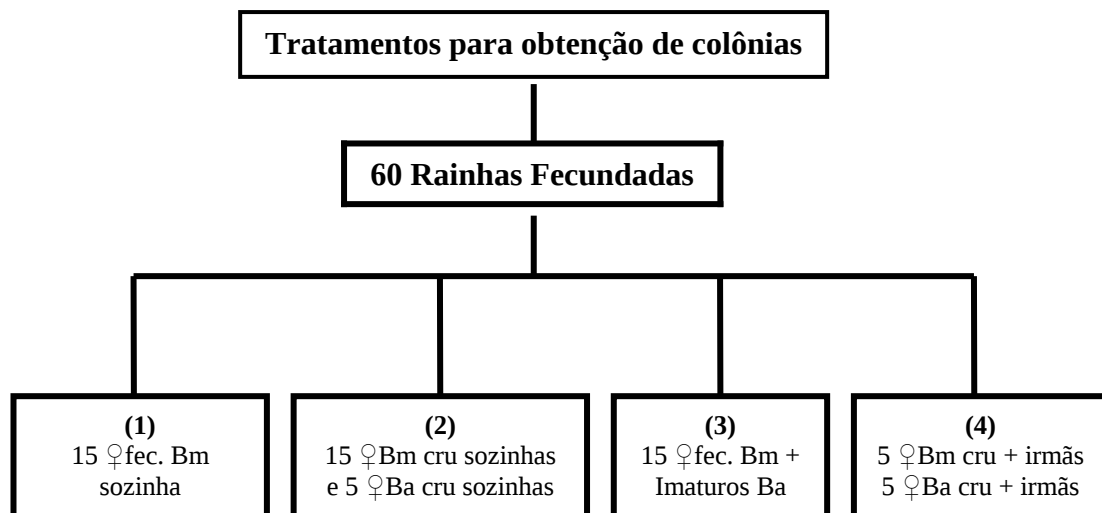


Figura 5. Tratamentos utilizados para iniciar rainhas das duas espécies em condições de cativeiro. ♀fec (Rainhas fecundada de *Bombus morio* trazidas do campo), ♀cru (Rainhas virgens cruzada com machos irmãos), Imaturos (contendo células de larvas e pupas de operarias) de *B. atratus*. Bm (*Bombus morio*) e Ba (*Bombus atratus*). Todas as rainhas testadas foram colocadas isoladas em caixas de iniciação.

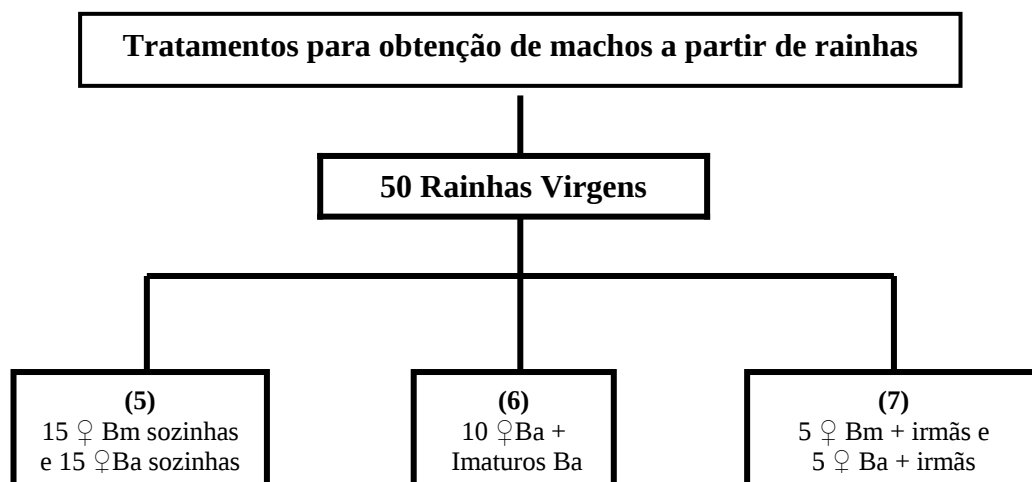


Figura 6. Tratamentos utilizados para produção de machos das duas espécies em condições de cativeiro. ♀ (Rainhas virgens), Imaturos (contendo células de larvas e pupas de operarias) de *B. atratus*. Bm (*Bombus morio*) e Ba (*Bombus atratus*). Todas as rainhas testadas foram colocadas isoladas em caixas de iniciação.

As caixas foram mantidas em lugar livre de vibrações e de movimentos fortes, pois quando são submetidas a movimentos fortes, as rainhas fazem zumbidos e assumem uma postura defensiva. Perturbações contínuas reduzem o êxito da nidificação (Delaplane, 1996).

Biologia reprodutiva de machos de *Bombus atratus*

Para esta parte do trabalho foi usado um ninho de *B. atratus* que se encontrava em fase de produção de machos e rainhas. Alguns machos foram utilizados para casamentos com rainhas irmãs. Os machos foram retirados do ninho imediatamente após a emergência sendo marcados com tinta atóxica de cores diferentes identificando as datas de emergência e transferidos para uma caixa menor (caixa de iniciação) onde foram mantidos isolados até serem utilizados. O objetivo de separar os machos era para evitar que eles acasalassem com as fêmeas dentro do ninho e para saber a idade em que seriam acasalados. Uma semana após a emergência, eles começaram a ser usados nos cruzamentos com as rainhas irmãs. Os machos escolhidos para os cruzamentos foram aqueles que tentavam sair da caixa, assumindo que estes estavam prontos para sair à procura de rainhas no campo. Para estimar a idade de maturação sexual, machos adultos com idades de zero dia (recém-emergidos) a dez dias tiveram seu sistema reprodutor dissecados em solução salina para insetos, seminais e o ducto ejaculatório foram fixadas em solução de glutaraldeído a 2,5% . Os órgãos foram observados em microscópio estereoscópico para determinar a maturação sexual dos machos e poder usar esta informação para próximos estudos referentes a acasalamentos de sexuais em condições de cativeiro.

RESULTADOS

Obtenção de rainhas em campo

No período de novembro de 2006 a janeiro de 2007, foi coletado um total de 30 rainhas de *Bombus morio* fecundadas no campo (Figura 7). Algumas delas estavam forrageando flores em árvores de grande altura nos meses de maio até agosto de 2007. No período de outubro de 2006 até setembro de 2007 foram observadas operárias *B. morio* e de *Bombus atratus* visitando flores de plantas de mata nativa e de interesse econômico como, por exemplo, abóbora.



Figura 7. Rainha de *B. morio* visitando uma flor de *Cucurbita moschata* no Córrego do Engenho, Viçosa – MG.

Obtenção de ninhos em campo

No município de Porto Firme foram capturados cinco ninhos das duas espécies (Figuras. 8 e 9): o primeiro ninho (N1) capturado foi de *B. morio*, coletado em outubro de 2006 e se encontrava em etapa de produção de operárias. Em março de 2007 foi capturado o ninho (N2) de *B. atratus*. Este se encontrava em etapa de produção de sexuais em sua maioria rainhas e com 10 machos no total (Tabela 2). De junho até agosto de 2007, foram capturados os três últimos ninhos, sendo o N3 de *B. morio*, o N4 de *B. atratus* e o N5 de *B. morio*. Estes três estavam em etapas finais da produção de machos e rainhas (Tabela 2) e não tinham rainha mãe. Parte dos indivíduos destes três ninhos foi utilizada em cruzamentos e outra parte foi destinada para estudos histológicos.



Figuras 8 Ninho de *B. morio* aberto em campo com parte de vegetação que estava cobrindo os imaturos. Pode-se observar (P) pupas de rainha (L) larvas de rainha. **Figura 9.** Ninho de *B. morio* sem rainha mãe e em etapa de sexuados, introduzido na caixa de populações. Pode-se observar (R) rainhas, (Op) operárias, (M) machos, (N) potes de néctar, células de imaturos de (P) pupas, (L) larvas e (Ov) ovos.

Tabela 2. Total de indivíduos encontrados em cada um dos ninhos capturados nos meses de outubro de 2006 até agosto de 2007. Bm (*B. morio*) Ba (*B. atratus*)

Ninhos	Rainhas	Machos	Operarias	Totais de adultos por ninho	Mês em que foi coletado
N1 Bm	1	0	114	115	Outubro de 2006
N2 Ba	200	10	49	259	Março de 2007
N3 Bm	374	5	78	457	Junho de 2007
N4 Ba	160	40	26	226	Julho de 2007
N5 Bm	255	25	113	393	Agosto de 2007

Alimentação das colônias e das rainhas

No caso do xarope, a solução aquosa a 70% de mel de *A. mellifera* e 30% de água se mostrou a mais adequada para os ninhos e as rainhas das duas espécies de *Bombus*. Em relação ao pólen: o usado nos meses de outubro de 2006 até abril de 2007 foi aceitado bem pelas rainhas e os ninhos das duas espécies. O pólen usado nos meses de maio até agosto de 2007, não foi consumido pelas rainhas e nos ninhos somente uma parte do pólen era consumido.

Nos experimentos usando a mistura de pólen com suplemento alimentício mostraram que as seis rainhas tratadas aceitaram facilmente essa mistura e começaram a produzir rapidamente ovos, os quais eclodiram entre quatro a oito dias. Já as seis rainhas apenas com pólen descartavam seus ovos.

A identificação do pólen mostrou que o fornecido nos meses de junho até agosto de 2007 (coletado por *Apis mellifera*) não apresentava grande variedade e pertencia

principalmente à família Myrtaceae (gênero *Eucalyptus*) (60%) e à família Asteraceae (23%). As demais famílias estavam presentes numa menor proporção. (Tabela 3).

Tabela 3. Porcentagem de cada uma das famílias identificadas no pólen fornecido às colônias de *Bombus* comparado com as famílias que visitam as duas espécies em Viçosa, Minas Gerais do trabalho feito por Cortopassi-Laurino (2003).

Famílias	Pólen usado na alimentação no laboratório*	
	Gênero	% de grãos de pólen
Asteraceae	<i>Elephantopus sp.</i>	3%
	<i>Vernonia sp.</i>	20%
Arecaceae	----	1%
Bromeliaceae	----	2%
Leguminosae	<i>Mimosa scrabella</i>	4%
Myrtaceae	<i>Eucalyptus sp.</i>	60%
Rubiaceae	<i>Psycotria sp.</i>	2%
Solanaceae	<i>Solanum sp.</i>	8%

(*) Pólen identificado e utilizado para alimentar os *Bombus* nos meses de julho até agosto de 2007.

Alguns aspectos fenológicos e longevidade das rainhas em cativeiro

Os resultados mostraram que as duas espécies de *Bombus* estão presentes em todos os meses do ano nas localidades de Viçosa, Paula Cândida e Porto Firme. Isto foi verificado pela presença de operárias praticamente o ano todo visitando flores nas três localidades.

Na figura 10 podem-se observar os dados registrados de precipitação média mensal (mm) e os dados da temperatura ambiente média mensal (°C) do ano todo no município de Viçosa, e os meses em que foram coletadas rainhas e, ou machos no campo ou nos ninhos capturados. Os resultados indicaram que nesta região as espécies estudadas têm dois períodos de produção de sexuais. O primeiro período foi entre os meses de novembro de 2006 até início de março de 2007 e o segundo período foi entre os meses de junho até inícios de agosto de 2007.

Na figura 10 observa-se as condições climáticas aparentemente não estão afetando a frequência de mamangavas na região. Nos meses de inverno onde as temperaturas são baixas, as duas castas de rainhas e operarias estavam presentes. Além

disso, nesta época foi quando se coletaram os ninhos mais numerosos (+ de 400 indivíduos) (Tabela 1) de *B. morio* com operárias e sexuais. Os indivíduos das duas espécies foram encontrados o ano todo. A produção de rainhas e machos pode-se dar duas vezes por ano, mas nesta região o maior número de rainhas coletadas em campo foi nos meses de verão onde há abundância de recursos florais.

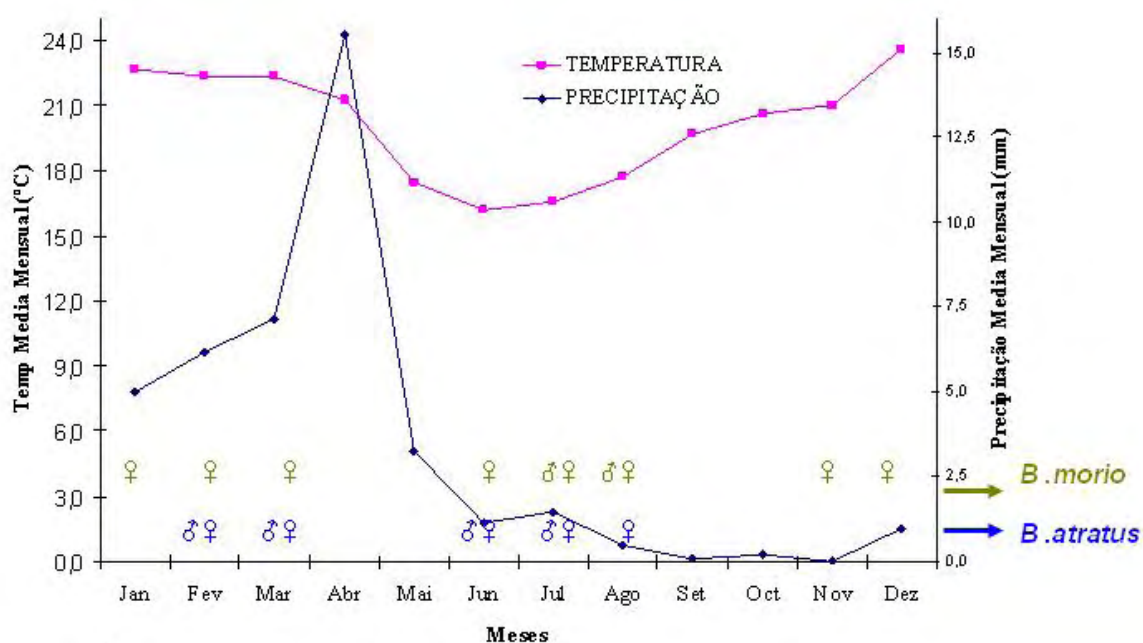


Figura 10. Sazonalidade de sexuais a partir de observações de indivíduos, as coletas de rainhas fecundadas e dos ninhos capturados de *B. morio* e *B. atratus* nos municípios de Viçosa, Paula Cândida e Porto Firme, MG. As operárias das duas espécies são encontradas em todos os meses.

O tempo de vida das rainhas que foram mantidas nos ninhos foi mais curto do que o daquelas que estavam isoladas em caixas de iniciação. Das 110 rainhas que estavam isoladas em caixas de iniciação, 80 (50 cruzadas no laboratório e 30 virgens) viveram em média 93,96 dias tendo idades (mín - máx: 48 – 120). As 30 restantes foram às rainhas adultas coletadas no campo e seu tempo de vida no laboratório foi em média de 50, 56 dias de vida. Das 50 rainhas marcadas com tinta atóxicas no ninho de *B. morio*, 32 viveram de 15 a 30 dias e foram as rainhas que tentaram ovipositar. As outras 18 rainhas viveram até 60 dias e apresentaram comportamento semelhante ao das operárias.

Obtenção de rainhas fecundadas no campo

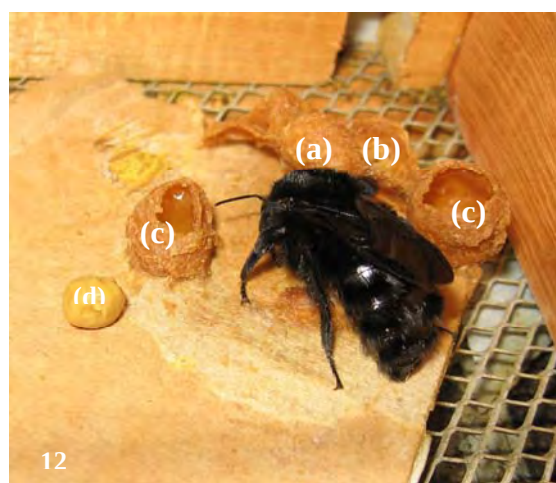
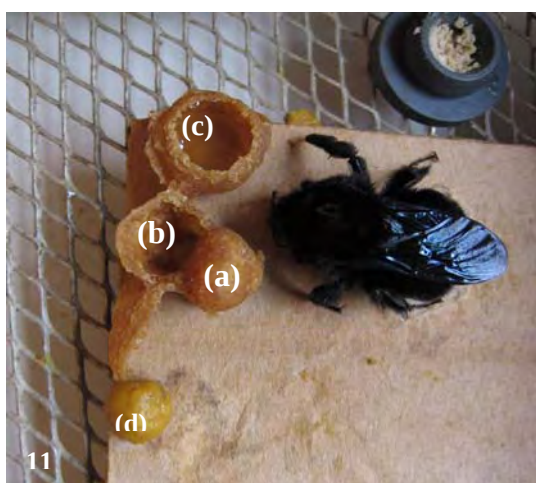
Das 30 rainhas coletadas no campo foram observadas as espermatecas e ovários de cinco e somente os ovários das outras 25. Todas as espermatecas estavam com espermatozóides e todos os ovários continham ovos maduros e prontos para serem ovipositados. Assim assumimos que todas as rainhas coletadas em campo estavam fecundadas.

Obtenção de rainhas fecundadas no laboratório

Nesta parte do trabalho para os cruzamentos de rainhas virgens com machos irmãos foram utilizados quatro dos cinco ninhos capturados que se encontravam em etapa de produção de sexuais (Tabela 1).

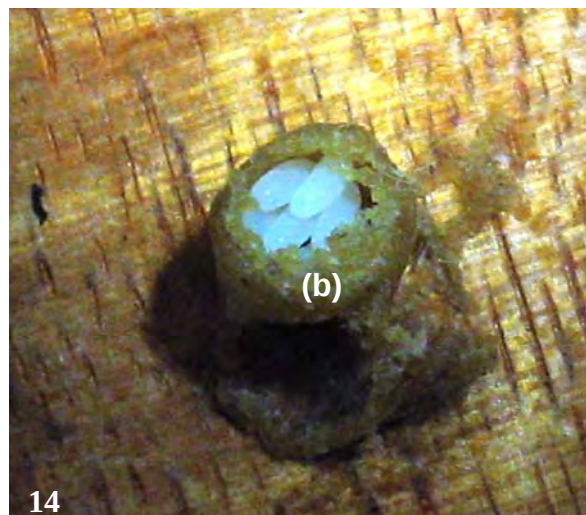
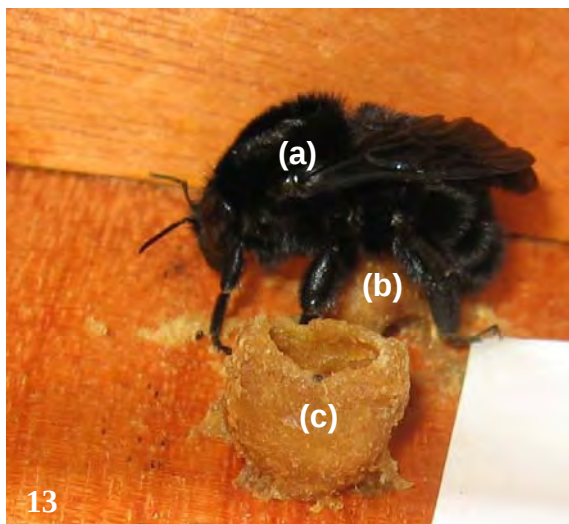
Dos Tratamentos utilizados para produção de colônias e produção de machos das duas espécies em condições de cativeiro foram obtidos os seguintes resultados:

1. Rainhas fecundadas de *B. morio* em campo mantidas sozinhas: Das 15 rainhas coletadas no total, apenas uma não fez postura. 12 rainhas iniciaram postura a partir do sexto e sétimo dias no laboratório. Os ovos destas eclodiram e os imaturos atingiram só até fase de larva. Porém estas larvas não chegaram a se tornar pupa (Figuras 11 e 12).



Figuras 11 e 12. Rainha de *B. morio* com célula que contém larvas (de seis a oito larvas) (a). Pode se observar a bolsa alimentar construída ao lado (b). Pote construído para armazenamento de néctar (c). Pólen fornecido (d).

2. *Rainhas das duas espécies cruzadas com machos irmãos no laboratório e mantidas sozinhas*: Das 20 rainhas, doze rainhas de *B. morio* e três rainhas de *B. atratus* conseguiram ovipositar e cinco não fizeram postura. Das 15 rainhas que ovipositaram, Os ovos de treze rainhas conseguiram que seus ovos eclodiram e os imaturos chegaram à fase de larva. Os ovos de duas rainhas não eclodiram. (Figuras 13 e 14). Portanto, em nenhum casos houve produção de pupas e adultos. Estas rainhas iniciaram postura depois de duas semanas de serem cruzadas.



Figuras 13 e 14. Rainha de *B. morio* (a) com células que contêm ovos (b), pote construído para armazenamento de néctar (c).

3. *Rainhas Fecundadas no campo colocadas com imaturos*: Às 14 rainhas de *Bombus morio* foram introduzidos 15 imaturos em fase de larva e pupa de *B. atratus* e emergiram entre 6 a 11 operárias em cada caixa de iniciação. As 14 rainhas conseguiram produzir ovos, estes eclodiram e as larvas chegaram até terceiro instar (Figura 15).

As operárias de *B. atratus* duas semanas após emergirem, e serem cuidadas e alimentadas como filhas das rainhas de *B. morio* atacaram a suas mães adotivas. Das 15 rainhas, cinco foram atacadas e mortas pelas operárias. Nas 10 caixas restantes o comportamento de agressividade das operarias com as rainhas era bastante alto, pelo qual foram retiradas das caixas. As rainhas não ovipositaram mais e morreram entre duas e três semanas depois disto.

As rainhas de *B. morio* coletadas no campo iniciaram postura a partir do terceiro e quarto dias após introdução dos imaturos nas caixas de iniciação.

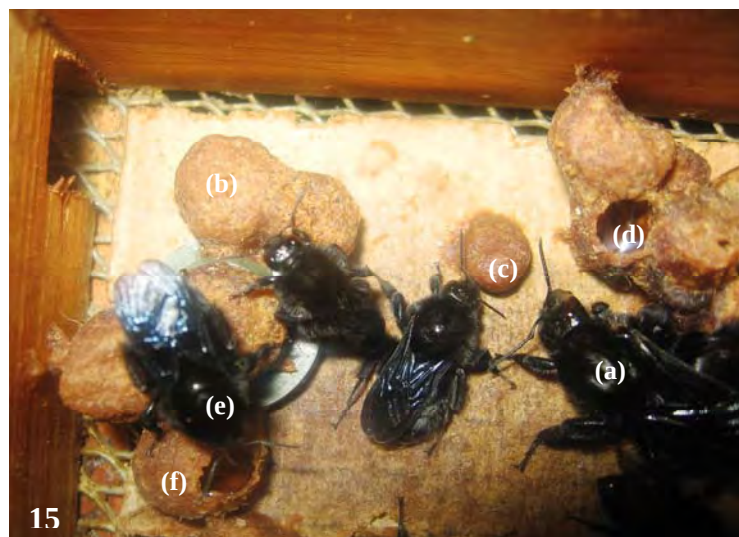


Figura 15. Rainha de *B. morio* (a) com células que contêm larvas (b), células com ovos (c), bolsa alimentar unida ao grupo de larvas (d), operárias de *B. atratus* (e) e pote de néctar (f).

4. *Rainhas das duas espécies cruzadas no laboratório e mantidas com rainhas virgens irmãs da mesma espécie:* as 10 rainhas das duas espécies usadas neste experimento começaram a ovipositar a partir de uma semana após serem cruzadas. Os ovos de apenas duas não eclodiram, aqueles das demais eclodiram, mas os imaturos não passaram da fase larval (Figura 16).

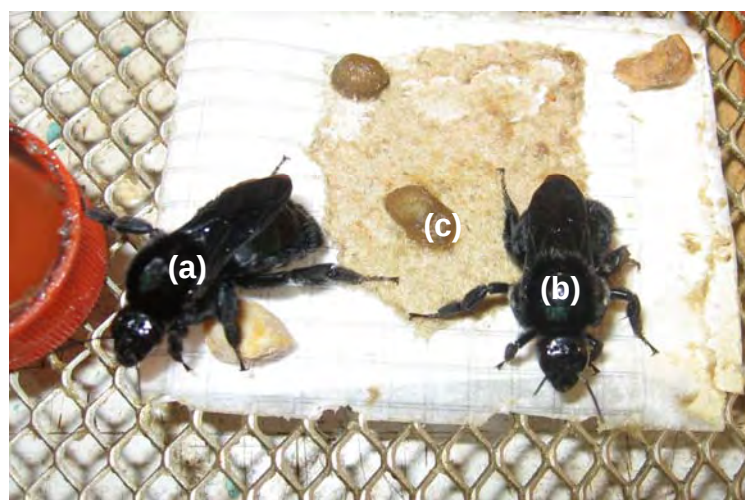


Figura 16. Rainha de *B. atratus* cruzadas no laboratório (a) com uma rainha virgem irmã (b) com célula que contém ovos (c).

5. *Rainhas virgens mantidas sozinhas:* As 30 rainhas usadas para este experimento iniciam postura depois da terceira semana de isolamento. Destas 50% das

rainhas de *B. morio* e 66% de *B. atratus* produziram ovos, estes eclodiram, mas os imaturos não passaram da fase larval (Figura 17).

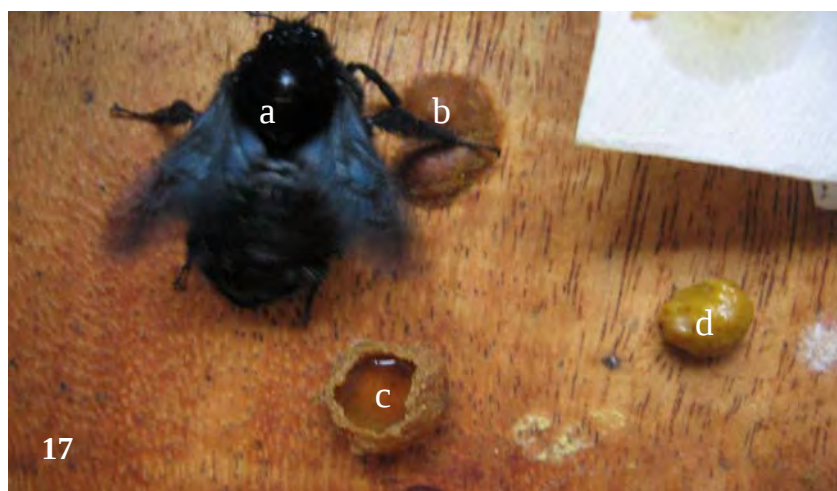


Figura 17. Rainha de *B. morio* (a) com células que contêm ovos (b), pote de néctar (c) e pólen fornecido (d).

6. *Rainhas virgens de B. atratus apenas com imaturos:* As 10 rainhas conseguiram ovipositar depois de duas semanas, seus ovos eclodiram e os imaturos chegaram até o estado de larva. As larvas de duas rainhas chegaram à fase de pupa e destas pupas, obteve-se 14 adultos machos, sendo seis de uma rainha e oito da outra (Figuras 18 e 19).

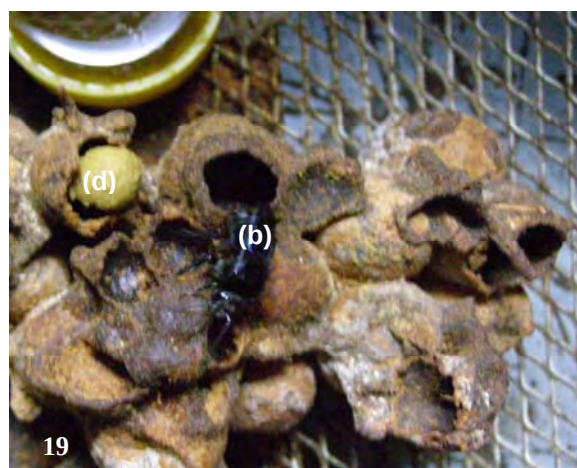


Figura 18 e 19. Rainha de *B. atratus* (a), machos produzidos pela rainha (b), pupas (c) e pólen fornecido (d).

7. *Rainhas virgens mantidas com rainhas virgens irmãs:* das 10 rainhas usadas neste experimento, três não ovipositaram e sete começaram a ovipositar depois de três semanas, mas os imaturos não passaram da fase larval

Comparação entre os tratamentos usados para iniciar colônias a partir de rainhas das duas espécies:

A maior parte das rainhas fecundadas, tanto as capturadas no campo como aquelas que foram cruzadas no laboratório nas duas espécies produziram ovos (80%). Das rainhas virgens somente 50% conseguiram ovipositar (Figura 20). Das 40 rainhas de *B. atratus* só duas (5%) conseguiram produzir adultos. Como estas rainhas eram virgens, todos os adultos produzidos eram machos. Das demais rainhas (considerando as duas espécies) o desenvolvimento dos imaturos foi anormal, não chegando atingir a fase de adultos. A produção de machos ocorreu nos meses de novembro a março, época em que as colônias de *A. mellifera* estavam coltando grande variedade e quantidade de pólen. No laboratório não foi possível produzir operárias e rainhas novas (Figura 20).

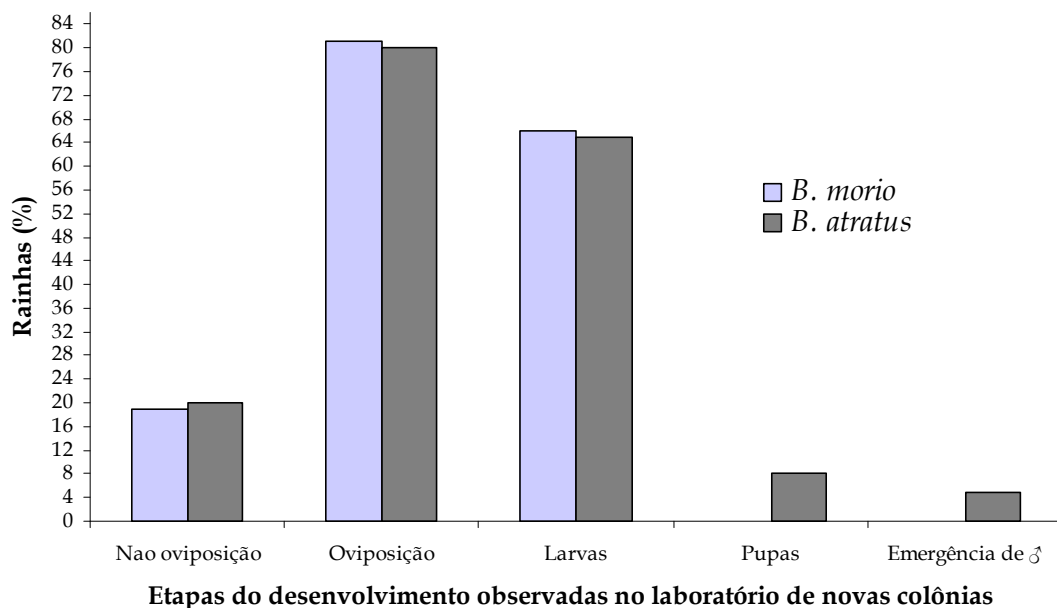


Figura 20. Porcentagem de rainhas de *B. morio* e *B. atratus* que conseguiram produzir imaturos e machos.

Biologia reprodutiva de machos de *Bombus atratus*

A maioria dos machos encontrados nos ninhos já estava na fase adulta, por tanto não sendo possível determinar as idades deles. Esses ninhos estavam na fase final de produção de machos, já que a maioria das pupas era de rainhas, sugerindo que nestas espécies de *Bombus* são produzidos primeiro os machos e depois as rainhas. Como a produção de machos foi pequena não foi possível obter dados sobre a maturação sexual diariamente.

Os resultados obtidos mostram que nos machos de *B. atratus* a migração dos espermatozoides já começa no primeiro dia de vida adulta. Na medida em que os espermatozoides migram para as vesículas seminais este vai aumentando de tamanho e os testículos vão diminuindo gradualmente. Aos quatro dias começa a diminuir a quantidade de espermatozoides nos folículos testiculares e aos seis dias os testículos estavam praticamente regredidos e as vesículas muito mais volumosas. Aos sete dias os testículos já estavam totalmente regredidos, quando provavelmente os machos atingiram a maturidade sexual e estando prontos para se acasalar.

Identificação de ácaros associados

Dos ninhos coletados no campo, quatro apresentaram grandes quantidades de ácaros, associados aos imaturos. Foram identificados no laboratório de acarologia. Utilizando o manual de acarologia de Krantz (1978), mostrando que estes indivíduos pertencem à família Ascidae (Figura 21).

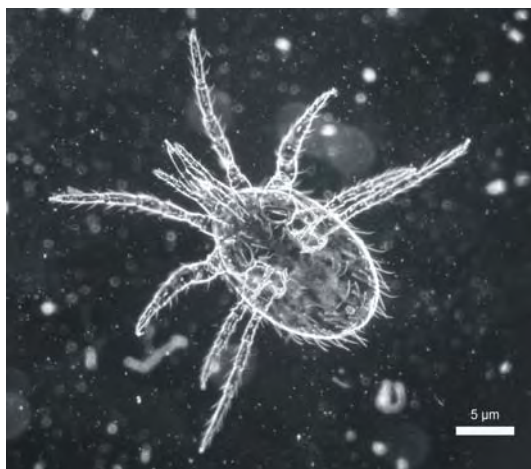


Figura 21. Fotomicroscopia de luz de um ácaro adulto da família Ascidae, obtido de um ninho de *Bombus morio*. Tirada no microscópio de luz. Barra de 5 µm.

DISCUSSÃO

Alimentação das colônias e das rainhas

Observou-se que a qualidade do alimento é importante tanto para as rainhas começarem a ovipositar, como para a produção de novas rainhas. O aumento da demanda alimentícia quando o ninho está em etapa de produção de sexuais é porque tanto durante o desenvolvimento como na maturação sexual, as rainhas filhas requerem altas quantidades de proteínas e carboidratos para desenvolver seus ovários (Alford, 1975). Durante esta etapa a colônia tem que ser alimentada com maior frequência e para manter e para que as colônias se mantenham em condições ótimas, é preciso que o pólen tenha alto conteúdo de proteínas e carboidratos. Quando o pólen é rico em proteínas, ativa o desenvolvimento dos ovários, do corpo gorduroso e das glândulas hipofaríngeas estimulando assim a produção de ovos e o desenvolvimento dos imaturos (Duchateau & Velthuis, 1989).

Ribeiro *et al.* (1996) mostraram que pólen de baixa qualidade afetava em especial as rainhas jovens e que as rainhas mães tinham dificuldade em conseguir manter vivos seus imaturos. Nosso trabalho observou-se que somente o 80% do total das rainhas ovipositaram, dessas rainhas 5% conseguiram manter vivos seus imaturos e conseguiram que seus imaturos emergiram. A carência de certos nutrientes provavelmente foi uma das causas de que o 95% dos imaturos das duas espécies não passaram de uma fase de ovo a uma fase larval, e de uma fase larval a uma fase de pupa, apresentando doenças e altos índices de mortandade.

Os resultados obtidos na identificação do pólen mostraram que eram poucos os recursos que as abelhas de *Apis mellifera* estavam coletando nos meses de julho até setembro de 2007 e esses recursos não tinham o total de nutrientes necessários para alimentar seus imaturos. Quando os requerimentos de uma colônia de *A. mellifera* diminuem, muitos apicultores utilizam alguns suplementos protéicos para substituir parte do pólen. Estas dietas algumas vezes apresentam-se satisfatórias na manutenção das populações (Couto, 1991).

Nas colônias de *A. mellifera* do Apiário da UFV no período de menor disponibilidade de recursos florais com as qualidades nutritivas ótimas diminuiriam, visitaram outras plantas provavelmente com menor conteúdo protéico tentando procurar uma alternativa de alimento. Este pólen coletado pelas operárias de *A. mellifera* foi o usado para alimentar as espécies de *Bombus* testadas.

As rainhas de *B. morio* e *B. atratus* que estavam sendo iniciadas não estavam tendo as quantidades protéicas necessárias para se manter, afetando a produção de ovos. Além disso, esta alimentação pobre não estava permitindo que os imaturos não passassem da fase larval. Gennisel *et al.* (2002) encontraram que as variações na quantidade e qualidade de proteína do pólen têm uma alta influência no sucesso reprodutivo de *Bombus*. O crescimento larval tem uma demanda específica de nutrientes, que é proporcionada pelo pólen. A causa do baixo sucesso reprodutivo das rainhas pode ter sido deficiência em componentes como aminoácidos essenciais e vitaminas.

Um pólen baixo em nutrientes pode ser um fator importante que pode interferir no bom desenvolvimento dos imaturos. Os componentes alimentícios no pólen diferem de uma planta a outra inclusive entre espécies do mesmo gênero. Por isto, as abelhas são afetadas em seu desenvolvimento quando são alimentadas por só um tipo de pólen o por uma única planta (Stanley & Linskens, 1974). Quando o pólen fornecido às abelhas é proveniente de poucas famílias de plantas ou a grande maioria dos grãos pertence a apenas um gênero, a quantidade de algumas proteínas necessárias para o desenvolvimento dos imaturos pode ser deficiente causando doenças e mortes. O pólen oferecido no laboratório que era coletado pelas operarias de *A. mellifera* não apresentava grande variedade. A maior parte dos grãos coletados pertencia ao gênero *Eucalyptus* da família Myrtaceae (60%) e 23% à família Asteraceae. As demais famílias estavam presentes numa menor proporção. Uma família de plantas pode ter vários gêneros e espécies apresentando grandes diferenças protéicas em seu pólen. Por isto, achamos que para garantir o êxito reprodutivo nas colônias de *Bombus* é importante proporcionar suplementos alimentícios. Quando as rainhas testadas foram alimentados com este suplemento, elas conseguiram ovipositar mais rapidamente e manter seus imaturos muito mais tempo. Especialmente nos meses onde os recursos florais necessários podem ser escassos e não há muita diversidade.

Alguns aspectos fenológicos e de longevidade das rainhas em cativeiro

Em estudos feitos anteriormente sobre fenologia do gênero *Bombus* nos biomas brasileiros, verificou-se a presença de indivíduos do gênero durante todo o ano, e também que as mamangavas das duas espécies *Bombus morio* e *Bombus atratus* visitam flores de algumas plantas cultivadas como Asteraceae, Verbenaceae, Labiatae e algumas

de grande consumo humano como as famílias Solanaceae e Curcubitaceae (Cortopassi-Laurino, 2003). Como a Zona da Mata de Minas Gerais é uma região agrícola onde as famílias de plantas como Curcubitaceae e Solanaceae são cultivadas, seria importante fazer estudos sobre a polinização destas plantas usando mamangavas. Além disso, a frequência de operárias visitando flores não é afetada por baixas temperaturas, o que poderia ser de grande benefício para o agricultor, pois haveria polinizadores em suas culturas durante o ano todo. Isso, além de aumentar a produção desses cultivares, evitaria a diminuição ou perda total das espécies nativas do gênero *Bombus*, uma vez que seus ninhos estão sendo destruídos (comunicação pessoal de agricultores e apicultores da zona) tanto por nidificarem no chão onde os agricultores cultivam, quanto por serem agressivas.

As rainhas apresentaram menor longevidade nos ninhos porque estes não tinham rainha mãe. Isto acontecia porque as rainhas que tentavam iniciar oviposição competiam entre si pela dominância da colônia. Outras rainhas tiveram comportamento de operárias evitando ser mortas por suas irmãs. Por isto, as rainhas isoladas em caixas de iniciação tiveram uma maior longevidade uma vez que não tinham competição e conseguiam assumir o comportamento de postura, tentando iniciar novos ninhos, sendo ou não fecundadas.

Obtenção de rainhas fecundadas no laboratório

A existência de colônias que produzem muitos machos em diferentes meses do ano e outras que produzem principalmente rainhas contribui na prevenção da endogamia no campo. Em mamangavas quando ocorre endogamia são produzidos machos diplóides. Em mamangavas como em outras espécies de himenópteros, o sexo é determinado por haplodiploidia, onde as fêmeas são diplóides e os machos são haplóides, originando-se de ovos não fecundados (Alford, 1975, Duchateau and Marien, 1995). No laboratório os cruzamentos foram entre rainhas e machos irmãos, porque não foi possível conseguir ninhos em diferentes etapas de produção de sexuais. Para evitar endogamia no laboratório quando as colônias não estão produzindo machos, uma forma é a de utilizar machos produzidos a partir de rainhas virgens ou operárias. É recomendável que para próximos trabalhos sejam coletadas rainhas fecundadas nas flores ou obter ninhos com diferenças na produção de sexuais (alguns ninhos com

machos e outros com rainhas) e de diferentes lugares para poder ser usados nos cruzamentos.

A baixa porcentagem de acasalamentos realizados no laboratório deveu-se em parte a vários aspectos tais como a idade das rainhas e machos disponíveis para serem utilizados nos cruzamentos. Outros fatores como a luz, temperatura e hora do dia também influenciaram no êxito dos acasalamentos.

Iniciação de rainhas em condições de cativeiro

Embora o objetivo final desta etapa, a obtenção e criação de colônias em cativeiro, não tenham sido plenamente alcançados, se obtiveram alguns dados referentes ao sucesso reprodutivo das rainhas retiradas dos ninhos capturados. Das 110 rainhas utilizadas das duas espécies *B. atratus* e *B. morio*, somente duas rainhas de *B. atratus* conseguiram produzir adultos. Estes resultados referem-se à iniciação de colônias em cativeiro com fornecimento de alimento durante todo o período e com as caixas totalmente isoladas do exterior. Garófalo (1979) fez observações a respeito da fundação solitária de colônias a partir de rainhas retiradas de colônias de *B. atratus*, sendo que após a fundação as caixas onde se encontravam as rainhas eram ligadas ao exterior.

O sucesso na criação de colônias de espécies regiões temperadas, assim como com espécies de regiões neotrópicas, depende de aspectos biológicos distintos como condições climáticas e outros fatores como a alimentação e a limpeza das colônias (Alford, 1975, Garófalo, 2000). Neste estudo somente duas rainhas conseguiram produzir adultos (machos), a pesar da maioria delas terem produzido ovos, as condições da sala de criação e alimentação não foram as adequadas para conseguir o êxito na produção de adultos (operárias). As rainhas fecundadas capturadas em campo foram comparadas com rainhas que acasalaram no laboratório. Os resultados mostraram que as rainhas da espécie *B. morio* coletadas no campo iniciam a postura mais rápido em comparação com as rainhas das duas espécies fecundadas em laboratório.

Em estudos feitos por Gredenford (1996) se observou que as rainhas criadas no laboratório podem ser induzidas à oviposição mais rapidamente quando colocadas com operárias ou com células de larvas da mesma espécie, do que quando mantidas sozinhas. A oviposição por rainhas de *B. rubicundus* no laboratório, foi induzida quando elas foram colocadas com células de imaturos de outras colônias da mesma espécie (Aguilar, 2004). Neste trabalho comprovou-se que efetivamente o uso de imaturos nas duas

espécies pode acelerar o processo de postura das rainhas, uma vez que as rainhas com imaturos começaram a realizar postura em três a sete dias, ao contrario das rainhas sem imaturos, que demoraram mais de uma semana. A presença de rainhas irmãs virgens também induz a realização de postura por uma rainha sendo esta virgem ou fecundada. As rainhas irmãs introduzidas assumem o papel de operaria e ajudando nas tarefas de cuidado e alimentação das crias e limpeza da colônia.

E importante que em estudos posteriores sejam usados imaturos da mesma espécie. Observou-se que quando são introduzidos imaturos de outra espécie a rainhas de *B. morio*, após duas semanas de idade, as operarias podem atacar e matar as rainhas. Não foi possível saber exatamente porque as operarias depois de duas semanas começaram a atacar as rainhas. Isto pode ser devido a fatores como, por exemplo, a idade das rainhas. Estas rainhas tinham mais de 30 dias e já estavam fecundadas quando foram coletadas, o que sugere que a idade aproximada destas rainhas fosse mais de 40 dias de idade. Este é um dos fatores que afetam colônias tanto em campo como em cativeiro, as rainhas velhas perdem a dominância das colônias quando os ninhos estão nas etapas finais e são atacadas por suas filhas. Este pode ter sido o caso, já que nestas duas espécies a regulação social esta associada com o nível de agressividade. Outro fator é que são espécies diferentes e pode ser que a rainha seja mais facilmente aceita por uma única operária do que por grupos de 5 a 10 operárias. Pelo fato de estas abelhas se comunicarem por feromônios, o não reconhecimento do odor da rainha pode fazer com que as operárias desenvolvam seus ovários e também que ataquem a rainha adotiva até a morte.

De acordo com trabalhos feitos na Colômbia, *B. atratus* é uma espécie que se adapta facilmente a condições de cativeiro (Almanza, 2007). No presente trabalho tanto *B. morio* como *B. atratus* conseguiram se adaptar e produzir ovos, o que sugere que as duas podem ser usadas na criação de colônias em condições de cativeiro. No caso de *B. morio* só uma das rainhas coletadas em campo não iniciou postura. O que nos permite dizer que o sucesso na iniciação de colônias é alto, e está mais influenciado por outros fatores, como por exemplo, comportamento da própria espécie. É recomendável fazer, mas estudos com a espécie de *B. morio* já que está aparentemente, mais freqüente na região e foi encontrada visitando flora de importância agrícola das famílias de Cucurbitaceae e Solanaceae.

Em conclusão além de que somente *Bombus atratus* chegou a produzir adultos, as duas espécies de *B. morio* e *B. atratus* conseguiram produzir ovos e que seus

imaturos chegaram à fase larval. As duas espécies conseguem se adaptar às condições de temperatura e do quarto de criação. É necessário fazer mais experimentos utilizando preferivelmente rainhas fecundadas coletadas em campo e para garantir o êxito na copula é preciso fazer cruzamentos entre ninhos com diferentes etapas de produção de sexuais (machos e rainhas) para garantir o êxito na criação de colônias de *Bombus* em cativeiro.

Biologia reprodutiva de machos de *Bombus atratus*

Como foi observado nos machos de *B. atratus*, o processo de maturação sexual ocorre imediatamente após o nascimento. Estes machos estarão prontos para se acasalar no momento em que todos os espermatozóides tenham chegado às vesículas seminais. Nas abelhas a espermatogênese inicia na fase de pupa, somente após a emergência é que se inicia a migração dos espermatozóides até as vesículas seminais (Chapman 1998).

Estes resultados dos machos foram confirmados também pelo comportamento destes nas colônias de *B. atratus*. Estudos feitos na Colômbia, machos recém emergidos de *B. atratus* mantidos em cativeiro, ficam dentro do ninho se alimentando e depois de mais de seis dias tentam sair das colônias para poder se acasalar (Almanza *et al.*, 2003). Em observações feitas anteriormente com espécies de *Bombus* de zonas temperadas (Alford, 1975) os machos começam a sair com 3 a 4 dias de idade.

O tempo de amadurecimento sexual dos machos pode variar entre espécies do gênero *Bombus* e de outras abelhas. No caso de *B. terrestris* os machos saem da colônia para se acasalar no décimo dia após terem emergido. Em espécies como *Melipona rufiventris* a maturação sexual demora um pouco mais ocorrendo 18 dias após terem emergido. No caso de *Apis mellifera* os machos aos 12 dias após terem emergido tornam-se funcionalmente maduros (Snodgrass, 1978; Duchateau & Marien, 1995; Pereira-Lima *et al.*, 2006)

Com base nos resultados obtidos neste estudo podemos sugerir que os machos de *B. atratus*, chegam a sua maturidade sexual aos 7 dias após a emergência, idade em que é recomendável sejam utilizados para cruzamentos em condições de laboratório, para se ter um êxito na reprodução.

Esperamos que este estudo preliminar possa contribuir com futuros estudos de estabelecimento de colônias e para conseguir uma criação continua das espécies em cativeiro para poder utiliza-las em estudos de polinização de culturas de interesse

econômico onde eles são importantes agentes, além disso, possam ser utilizados na conservação destas espécies.

Algumas sugestões para próximos trabalhos:

- Introduzir nas dietas suplementos alimentícios usados pelos apicultores nas colônias de *A. mellifera* para melhorar a qualidade do alimento em épocas onde os recursos florais são escassos.

- Melhorias nas condições de umidade no quarto de criação. Ter uma umidade de 70%.

- Fazer estudos relacionados com aos organismos associados já que estes podem ter um papel muito importante no estabelecimento de colônias em cativeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrahamovich A.H., Díaz N. B. & Morrone J. J. 2004. **Patterns of the Neotropical and Andean Species of the Genus *Bombus* (Hymenoptera: Apidae).** Acta Zoológica Mexicana 20(1): 99-117.
- Aguilar, M.L. 2004 **Biología y nidación de *Bombus rubicundus* Smith, 1854 (Hymenoptera: Apidae) en condiciones de Cautiverio.** Dissertação de graduação. Universidad Militar Nueva Granada. Bogotá.
- Alford, D.V. 1975. **Bumblebees.** London: Davis – Poynter.
- Almanza, M.T., Aguilar, M.L., Alvarez, C., Vecil, D., Rojas, D., Aldana, J., Diaz, L. and Fuentes, L. E. 2003. **Cría en cautiverio de colonias de *Bombus atratus* (Hymenoptera; Apidae) y su actividad polinizadora en tomate bajo invernadero.** Resúmenes XXX Congreso Sociedad Colombiana de Entomología. Cali, Colombia.
- Almanza, M.T. 2007. **Management of *Bombus atratus* bumblebees to pollinate Lulo (*Solanum quitoense* L), a native fruit from the Andes of Colombia.** Ecology and Development Series. Cuvillier Verlag, Göttingen. No 50.
- Barth, O. M. 1989. **O pólen no Mel Brasileiro.** Rio de Janeiro: Luxor, 150p.
- Barth, O.M.; Melhem, T. S. 1988. **Glossário Ilustrado de Palinologia.** Campinas: UNICAMP, 75p.
- Cameron, S.A. & Jost, M.C. 1998. **Mediators of dominance and reproductive success among queens in the cyclically polygynous Neotropical bumble bee *Bombus atratus* Franklin.** Insectes Sociaux. 45: 135-149.
- Chapman, R.F. 1998. **The Insects Structure and Function.** Fourth Edition. Cambridge University Press. 770p.
- Cortopassi-Laurino, M., Knoll, F.R.N. & Imperatriz-Fonseca, V. 2003. **Nicho trófico e abundância de *Bombus morio* e *Bombus atratus* em diferentes biomas brasileiros.** In: G.A.R. Melo & I. Alves-dos-Santos (eds.) - Apoidea Neotropica: Homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure. Editora UNESC, Criciúma, SC, Brasil, pp. 285-296.
- Delaplane, K.S. 1995. **Bumble Bee keeping: The Queen starter Box.** American Bee Journal. 135:743-745.
- Delaplane, K.S. 1996. **Bumble Beekeeping: Inducing queens to nest in captivity.** American Bee Journal. 136: 42-43.

- Duchateau, M. 1985. **Analyse einiger Methoden des Hummelzüchtung**. Apidologie. 16: 225 - 227.
- Duchateau, M. & Velthuis, H.H.W., 1989. **Ovarian development and egg laying in workers of *Bombus terrestris***. Entomologia Experimentalis et Applicata. 51:199-213.
- Duchateau M.J. 1991.**Regulation of colony development**. Acta Horticulturae. 288: 139-143.
- Duchateau M.J. and Marien J. 1995. **Sexual biology of haploid and diploid males in the bumble bee *Bombus terrestris***, Insectes Sociaux. 42: 255-266.
- Duchateau, M. J. 2000. **Biological aspects of rearing bumblebees for pollination**. In: Sommeijer MJ, de Ruijter A (eds) Insect Pollination in Green House. pp. 25–29. Royal Library, Den Haag.
- Free, J. 1970. **Insect pollination of crops**. Academic Press – London and New York. pp 89 – 101.
- Frison, T.H. 1925. **Contribution to the classification of the Bremidae (Bumble-bees) of Central and South America**. Transactions of the American Entomological Society. 51:137-165.
- Garófalo, C.A. 1978. **On the bionomic of *Bombus (Fervidobombus) morio* (Swederus) (Hymenoptera, Apidae). I. Cell construction and oviposition behavior of the queen**. Revista Brasileira de Biologia. 39 (1): 227-236.
- Garófalo, C.A. 1979. **Observações preliminares sobre a fundação solitária de colônias de *Bombus (Fervidobombus) atratus* Franklin (Hymenoptera, Apidae)**. Boletim de Zoologia - Universidade De São Paulo, São Paulo. 4: 53-64.
- Garófalo, C.A. 1980. **Aspectos bionômicos de *Bombus (Fervidobombus) morio* (Swederus). III. Tamanho das operárias e desenvolvimento da colônia (Hymenoptera, Apidae)**. Revista Brasileira de Biologia .40 (2): 345-348.
- Garófalo, C.A., Zucchi, R. & Muccillo, G. 1986. **Reproductive studies of a neotropical bumblebee, *Bombus atratus* (Hymenoptera, Apidae)**. Revista Brasileira de Genética. Ribeirão Preto, SP. IX (2): 231-243
- Génissel, A., Aupinel, P., Bressac, C., Tasei, J-N., Chevrier, C. 2002. **Influence of pollen origin on performance of *Bombus terrestris* micro-colonies** Entomologia Experimentalis et Applicata. 104 (2-3), 329–336.

- Gretenkord, C. 1996. **Laborzucht der dunklen Erdhummel *Bombus terrestris* L. (Hymenoptera: Apidae) und toxikologische Untersuchungen unter Labor – und Halbfreilandbedingungen.** Ph. D. Thesis. Institut für Landwirtschaft Zoologie und Bienenkunde Rheinischen Friederich – Wilhelms. Universität Bonn, Alemanha.
- Heinrich, B. 2000. **Bumblebee Economics.** Harvard College. United States of America.
- Krantz, G.W. 1978. **A manual of acarology.** 2º ed. Oregon State University Book Store, Inc., Corvallis, Oregon.
- Koppert B.V. 2007. Koppert Biological Systems. **Natural Pollination.** The Netherlands. <http://www.koppert.nl/e003.shtml>.
- Labougle, J.M. 1990. ***Bombus* of Mexico and Central America (Hymenoptera, Apidae).** Kansas University Science Bulletin. 54:35-73.
- Laroca, S. 1976. **Sobre a Bionomia de *Bombus morio* (Hymenoptera, Apoidea).** Acta Biológica Paranaense. Curitiba. 5 (1,2): 107 – 127.
- Liévano, A., Ospina, R., Nates, G. 1994. **Contribución al Conocimiento de la Taxonomía del Género *Bombus* en Colombia (Hymenoptera: Apidae).** Trianea: Acta científica y tecnológica deINDERENA. 5: 221 – 233.
- Michener, C.D. 1974. **The social behavior of the bees.** The Belknap Press of Harvard University Press.
- Milliron, H.E. 1973a. **A monograph of the Western Hemisphere Bumblebees (Hymenoptera: Apidae; Bombinae). II. The genus *Megabombus*, Subgenus *Megabombus*.** Memoirs of the Entomological Society of Canada. 89:81-236.
- Milliron, H.E. 1973b. **A monograph of the western hemisphere bumblebees (Hymenoptera: Apidae; Bombinae). III. The genus *Pyrobombus*. Subgenus *Cullumanobombus*.** Memoirs of the Entomological Society of Canada. 91:239-333.
- Moure, J.S. & Sakagami, S.F. 1962. **As mamangabas sociais do Brasil (*Bombus Latr.*) (Hymenoptera, Apoidea).** Studia Entomologica, 5: 65-194.
- Pereira-Lima, M. A., Lino-Neto J. & Campos L. A. O. 2006. **Sexual Maturation in *Melipona mondury* males (Apidae: Meliponini).** Brazilian Journal of Morphological Sciences. 23 (3-4). 369-375
- Prys-Jones, O.E. & Corbet, S. A. 1991. **Bumblebees.** Richmond Publishing Co. Ltd. England.

- Rasmussen, C. 2003. **Clave de identificación para las especies peruanas de *Bombus* Latreille, 1809 (Hymenoptera, Apidae) con notas sobre su biología y distribución.** Revista Peruana de Entomología. 43: 3145.
- Ribeiro, M F; Duchateau, M J; Velthius, H W.1996. **Comparison of the effect of two kinds of commercially available pollen on colony development and queen production in the bumble bee *Bombus terrestris* L. (Hymenoptera, Apidae).** Apidologie. 27: 133–144.
- Rojas D. L., Vecil, D., Almanza, M. T. & Cure J. R. 2003. **Desarrollo, patrón de construcción y forma de alimentación en colonias de *B. atratus* (Hymenoptera: Apidae).** Resúmenes XXX Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología. Cali, Colombia.
- Sakagami, S. F., Akahira Y. & R. Zucchi. 1967. **Nest architecture and brood development in a Neotropical, bumblebee, *Bombus atratus*.** Insect Sociaux. V. XIV. No.4. 389 – 413.
- Silva-Matos, E.V. & Garófalo, C.A. 1995. **Observations on the development of queenless colonies of *Bombus atratus* (Hymenoptera, Apidae).** Journal of Apicultural Research.34(4): 177-185.
- Sladen, F.W.L. 1912. **The humble-bees, its life-history and how to domesticate it, with descriptions of all the British species of *Bombus* and *Psithyrus*.** 283 pp. Macmillan, London.
- Snodgrass, R.E., 1978. **Anatomy of the Honeybee.** 3rd edn. Cornell University Press: London.
- Stanley, R.G. & Linkens, H. F. 1974 **Pollen: biology biochemistry management.** Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Van den Eijnde, J., de Ruijter, A., and van der Steen, J. 1991. **Method for rearing *Bombus terrestris* continuously and the production of bumblebee colonies for pollination purposes. In 6th Pollination Symposium.** Acta Horticulturae, pp. 154-158.
- Williams, P.H. 1998. **An annotated checklist of bumble bees with an analysis of patterns of description (Hymenoptera: Apidae, Bombini).** Bulletin Natural History Museum. London. 67: 79 – 152.
- Zucchi R. 1973. **Aspectos bionômicos de *Exomalopsis aureopilosa* e *Bombus atratus* incluindo considerações sobre a evolução do comportamento social (Hymenoptera, Apoidea).** Tese de Doutorado. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

3.2 - Determinação da ativação, tempo de viabilidade dos ovários e efeito da cópula no desenvolvimento da espermateca de fêmeas de *Bombus (Fervidobombus) morio* (Hymenoptera: Apidae)

RESUMO

Aspectos histológicos do sistema reprodutor de *Bombus morio* podem contribuir significativamente para um maior conhecimento das espécies além de fornecer dados para criação e iniciação de rainhas para formação de novas colônias. Neste estudo foram analisados aspectos relacionados a ativação, viabilidade dos ovários, diferenças nas espermatecas de rainhas virgens, rainhas copuladas e operárias assim como os efeitos no desenvolvimento da espermateca. Rainhas virgens com 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias de idade foram dissecadas para verificar o tempo que permanecem férteis e se o atraso na cópula provocaria degeneração nos ovários. Os ovários foram analisados histologicamente e por meio de testes histoquímicos. Os resultados indicam que os ovários podem permanecer funcionais durante um longo período de vida da rainha, pois depois de 40 dias de idade, as rainhas conseguem ovipositar. Os ovários das rainhas com 25 dias de idade apresentam reabsorção de ovócitos. Isto ocorre quando várias rainhas virgens estão na mesma colônia sugerindo que estas rainhas não estão prontas para sair da colônia e assumem o papel de operárias. As rainhas virgens isoladas em caixas começam a ovipositar indicando que rainhas de *B. morio*, não precisam copular para começar a ovipositar, inclusive produzindo machos, sendo um resultado importante no estabelecimento de criação em condições de cativeiro. Na análise da espermateca observou-se que as operárias não têm uma glândula espermatecal funcional estando ausente ou pouco desenvolvida. Diferença no tamanho da espermateca nos indivíduos está relacionada com o tamanho do indivíduo já que as operárias são menores.

Palavras chave: *Bombus morio*, rainhas, reabsorção de ovócitos, cópula, espermateca.

3.2 - Activation and viability of the ovaries and mating effect in the development of the spermathecal of females of *Bombus (Fervidobombus) morio* (Hymenoptera: Apidae)

ABSTRACT

Histological aspects of the reproductive system of *Bombus morio*, can contribute significantly to the knowledge of the species, to a better understanding of their breeding and initiation of queens for formation of new colonies. In this study had been analyzed related aspects the activation, viability of the ovaries, spermathecal differences in virgin queens, copulated queens and workers and the effect in the development of the spermatheca. Virgin queens with 5, 10, 15, 20, 25 and 30 days of age, had been dissected to verify the time that the virgin queens are fertile and if the mating delay would caused degeneration in the ovaries. The ovaries had been analyzed by histology, histochemical tests. The results indicate that the ovaries can remain functional for a long period of life of the queen, after 40 days of age; the virgins queens isolated may be inducing oviposition. The ovaries of the queens with 25 days of age present reabsorption process of oocytes. This occurs when some virgin queens are in the same colony suggesting that these queens are not ready to leave the colony and assume the role of worker. The isolated virgin queens in boxes start to oviposition indicating that queens of *B. morio* do not need be mating to induce oviposition. These queens can be produce males and this important result in the establishment of breeding in captivity conditions. In it analyzes of the spermathecal was found that workers does not have developed a functional espermatecal gland including can be absent. The increase of the volume of the spermatheca in the females this related more to the increase of the size because the workers are smaller.

Keywords: bumble bee, *Bombus morio*, queen, reabsorption of oocytes, mating, spermatheca.

INTRODUÇÃO

O aparelho reprodutor das fêmeas das abelhas é semelhante ao da maioria dos insetos, formado por: dois ovários, dois ovidutos laterais, um oviduto comum, uma câmara genital (vagina) que se abre para o exterior, uma spermateca, que recebe e armazena os espermatozóides durante o intervalo entre a cópula e a fecundação do óvulo, e glândulas acessórias com funções variadas, (Chapman, 1998).

A fertilidade das rainhas parece se manifestar de diferentes formas. O número de ovários em um ovário varia em relação ao tamanho e ao estilo de vida dos insetos. No caso do gênero *Bombus* cada ovário é composto por quatro ovários. Em *Apis mellifera*, a rainha pode apresentar até 180 ovários por ovário; nos meliponíneos o número de ovários de rainhas e operárias é, para a maioria das espécies, igual e em número de quatro por ovário. Essas variações estão relacionadas ao hábito da espécie, sua posição taxonômica ou casta, no caso das abelhas socais (Cruz-Landim, 2004).

Os ovários das abelhas são do tipo meroístico politrófico, sendo que, cada folículo no vitelário dos ovários tem um ovócito associado às células nutridoras. Os ovários são as unidades funcionais dos ovários, são estruturas alongadas, afiladas que contêm no seu interior as células germinativas em diferentes fases da ovogênese e células somáticas de sustentação (Bunning, 1994; Chapman, 1998; Cruz-Landim, 2004).

Cada ovário está constituído por um filamento terminal, que é formado pelas membranas peritoneais e tecido conjuntivo e consiste de um centro celular circundado por uma túnica própria. Em seguida, encontram-se os filamentos mediais que se combinam para formar um ligamento suspensório. O germário é a porção do ovário que contém células somáticas e germinativas (ovogônias primárias e secundárias) e é o lugar onde ocorre a diferenciação dos ovócitos. Após está o vitelário, a maior porção do ovário que distingue-se do germário pela presença de folículos. Os folículos estão divididos em duas câmaras, a ovocítica e a nutridora. Nesta porção os ovócitos encontram-se em desenvolvimento e ocorre a deposição de vitelo (vitelogênese). Os ovários estreitam-se em um fino ducto, chamado pedicelo que o conecta ao oviduto. Os ovários podem chegar a variar em relação ao tamanho e de acordo com o estilo de vida das espécies (Bunning, 1994; Chapman, 1998; Cruz-Landim, 2004).

A spermateca é uma bolsa globular única que se abre na extremidade dorsal do oviduto, e é o local onde são armazenados os espermatozóides desde a inseminação até fertilização dos ovos (Cruz-Landim, 2004; Chapman, 1998). Em abelhas a parede da spermateca está constituída por uma camada única de células altas com um

revestimento cuticular na face luminal. Na face externa apresenta uma lâmina basal muito espessa e lamelar e uma extensa rede traqueolar (Cruz-Landim, 2004; Martins & Serrão, 2004).

No caso das rainhas das espécies eussocias os espermatozóides podem permanecer alojados durante anos. Um exemplo disto são as rainhas de *Bombus* de zonas temperadas, as quais após serem fecundadas, fazem diapausa para conseguir sobreviver a estação do inverno e os espermatozóides são mantidos na espermateca durante vários meses sem serem utilizados (Alford, 1975; Cruz-Landim, 2004). O epitélio da espermateca promove proteção aos espermatozóides e evita que a viabilidade destes seja afetada (Taber & Blum, 1960 citado por Souza *et al.*, 2008).

A espermateca das espécies do gênero *Bombus* contém um ducto espermatecal comprido, conectados ao oviduto comum. O ducto é comumente encontrado como parte do sistema de armazenagem em insetos, mas em *Bombus* é muito mais comprido e representativo que nos outros grupos de hymenopteros (Schoeters & Billen, 2000).

Em abelhas os ovos podem ser fertilizados ou não, desta forma depende da rainha a produção de determinadas castas: rainhas, operárias e machos, estes últimos são produzidos de ovos não fertilizados (Alford, 1975; Goulson, 2003). Existe ainda uma glândula geralmente associada à espermateca, a glândula espermatecal (Chapman, 1998). Em algumas espécies do gênero *Bombus* polissacarídeos são secretados pelas células do ducto da espermateca como uma fonte de energia para os espermatozóides antes da fertilização dos ovócitos (Schoeterers & Billen, 2000).

O conteúdo da espermateca derivado das glândulas contém proteínas e carboidratos que provavelmente provêm nutrientes necessários para os espermatozóides durante o período de estocagem, e também sua ativação (Chapman, 1998).

As abelhas do gênero *Bombus* são primitivamente eussociais, onde as castas são muito semelhantes em sua morfologia externa e a maioria das espécies diferem em seu tamanho e algumas também em sua coloração (Michener, 1974; Pryst & Jones, 1991). As rainhas do gênero *Bombus* pelas características morfológicas e comportamentais podem viver sozinhas e estabelecer novos ninhos (Alford, 1975; Goulson, 2003).

Na maioria das espécies de abelhas eussociais as operárias podem desenvolver ovários e realizar postura. Alguns estudos feitos com *B. atratus* e *B. morio* mostraram que as rainhas virgens podem passar por várias etapas na colônia: podem assumir o papel de operárias até serem fecundadas, podem após serem copuladas, continuar na

colônia por um curto período de tempo enquanto outras vão embora depois de serem fecundadas (Garófalo, 1980 e 1986).

Nas espécies de *Bombus* a ovogênese nos ovários das operárias são controlados por feromônios produzidos pela rainha. Mesmo assim, quando a rainha perde algumas vezes o controle, certa porcentagem de operárias, inclusive rainhas virgens que estão na colônia podem realizar posturas de ovos (Alford, 1975). Em *B. atratus* a rainha e as operárias se alimentam desses ovos, mas alguns podem se desenvolver e dar origem a machos (Almanza *et al.*, 2003).

Ativação da vitelogênese é um processo que não está totalmente esclarecido. Este pode ser desencadeado ou ser acelerado pelo acasalamento, e sua ausência pode provocar varias modificações no trato reprodutivo do inseto, dentre elas a reabsorção de ovócitos, de células nutridoras e foliculares (Martins & Serrão, 2004). A copula é a responsável de maturação dos ovos nos insetos e é um dos principais estímulos no processo de ovogênese (Engelman, 1970; Wheeler, 1996).

Estudos referentes à biologia reprodutiva, bem como, dos aspectos morfológicos do sistema reprodutor de *Bombus* neotrópicos podem contribuir significativamente para um maior conhecimento das espécies além de fornecer dados para criação, iniciação de rainhas para formação de novas colônias, uso na polinização e na re-introdução de espécies ameaçadas. Este trabalho tem como objetivo comparar os ovários e as espermatecas das rainhas virgens de diferentes idades, de operárias e de rainhas fecundadas de *B. morio* para observar o desenvolvimento e verificar se o atraso na cópula afeta as funções dos ovários e das espermatecas.

MATERIAL E MÉTODOS

Rainhas virgens foram obtidas de um ninho de *B. morio* em etapa de produção de sexuais (rainhas e machos) em Três Barras, cidade de Porto Firme, Minas Gerais. O ninho foi extraído nas primeiras horas da manhã, transferido e instalado no Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa.

O ninho foi mantido numa caixa de populações de 21x19x18 cm em um quarto escuro e observado diariamente para detecção de rainhas recém-emergidas. As rainhas recém emergidas foram marcadas no tórax com tinta atóxica e mantidas na colônia.

Para verificar se ausência da cópula influenciaria a viabilidade e fertilidade das rainhas, um total de quinze rainhas virgens foi estudado, sendo três rainhas para cada

idade. Rainhas virgens com 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias de idade foram dissecadas para retirada e análise dos ovários.

As rainhas virgens e rainhas em postura foram dissecadas em solução salina para insetos 125 mM e fixados em solução de Zamboni (Stefanini, 1967), posteriormente foram desidratados em uma série crescente de etanol (70%, 80%, 90% e 95%), e incluídas em historesina Leica JB4. Secções com 5µm de espessura foram corados com Hematoxilina e Eosina. Algumas secções foram submetidas aos testes histoquímicos de Alcian blue + PAS para evidenciação de polissacarídeos, Azul do Nilo para evidenciação de lípidos e Mercúrio bromofenol para evidenciação de proteínas (Pearse, 1985).

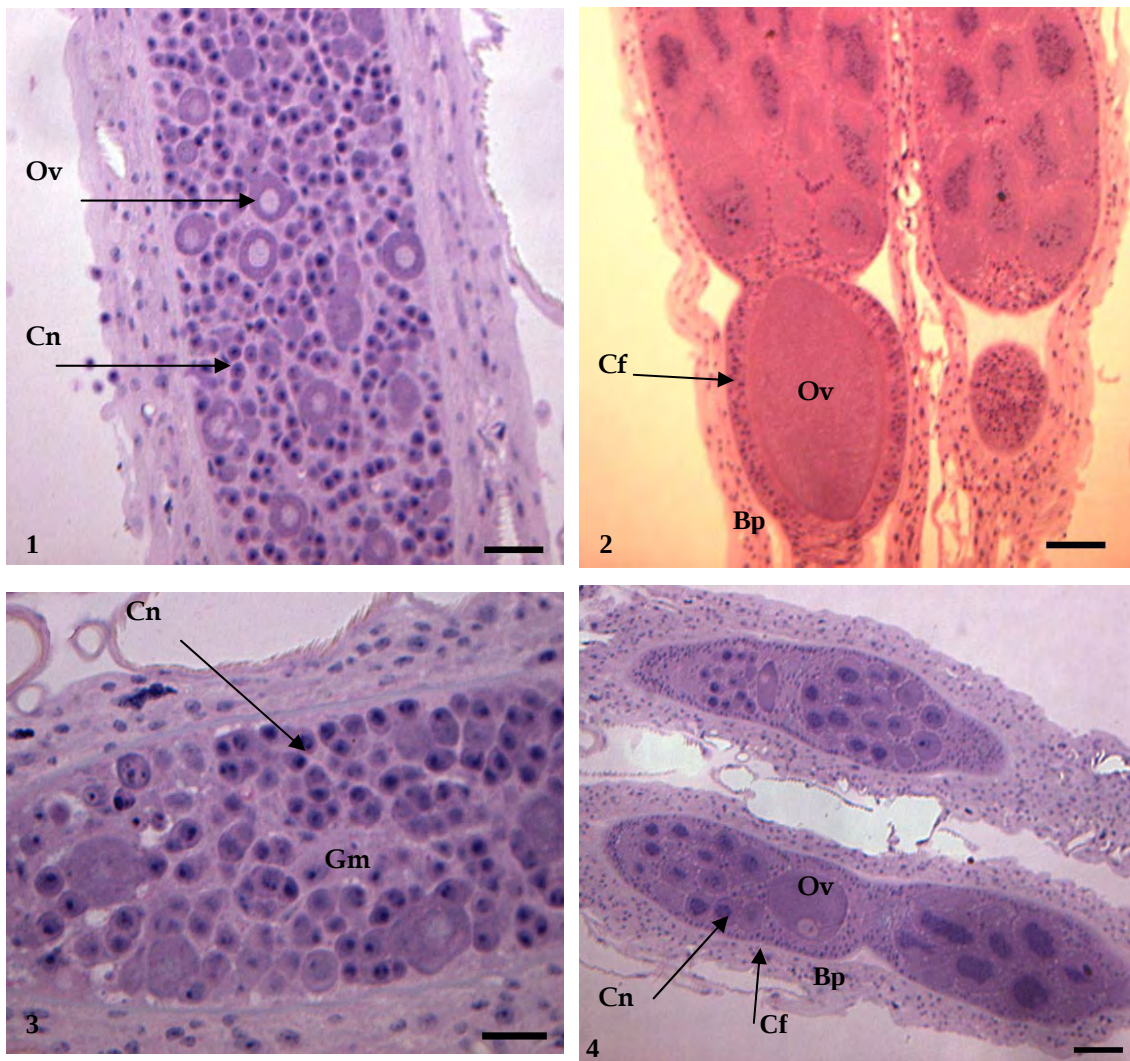
Duas Rainhas copuladas adultas e duas operárias de *B. morio*, foram coletadas com ajuda de rede entomológica, visitando flores de abóbora (*Cucurbita pepo*, Cucurbitaceae) no Córrego do Engenho, na cidade de Viçosa, Minas Gerais foram transferidas ao Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa, e mantidas para observar a postura e iniciação de novas colônias. Após um mês de cativeiro as rainhas e as operárias tiveram seus ovários e espermatecas analisados como descrito acima.

RESULTADOS

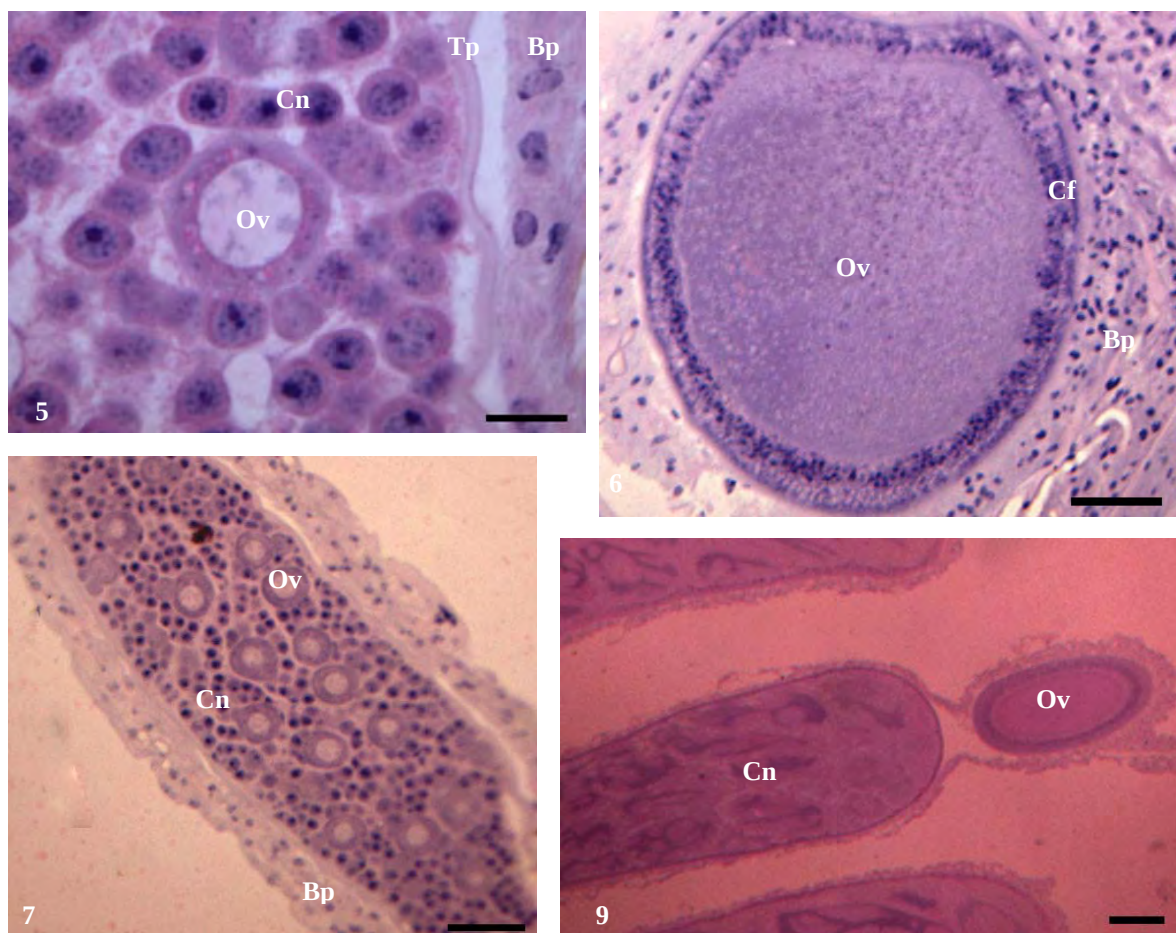
O ovário de *B. morio* apresenta três regiões distintas: filamento terminal, o germário e o vitelário. Cada ovário apresenta quatro ovariólos, conectados a um oviduto.

Os ovários das rainhas virgens de *B. morio*, com cinco dias e dez dias de idade são longos e apresentam diferenciação entre as porções do germário (Figs. 1 e 3) e do vitelário (Fig. 2 e 4), com inúmeros ovócitos em diferentes fases do desenvolvimento e inúmeras células nutridoras. O vitelário apresentou folículos com ovócitos e células nutridoras envolvidas por uma camada de células foliculares, túnica própria e pela bainha peritoneal (Fig. 2).

Nas rainhas virgens de *B. morio*, de 15, 20, 25 e 30 dias de idade. O germário apresentou ovócitos em processo de diferenciação (Fig. 5), bem como há presença de ovócitos em processo de vitelogênese (Fig.6, 7, 8).

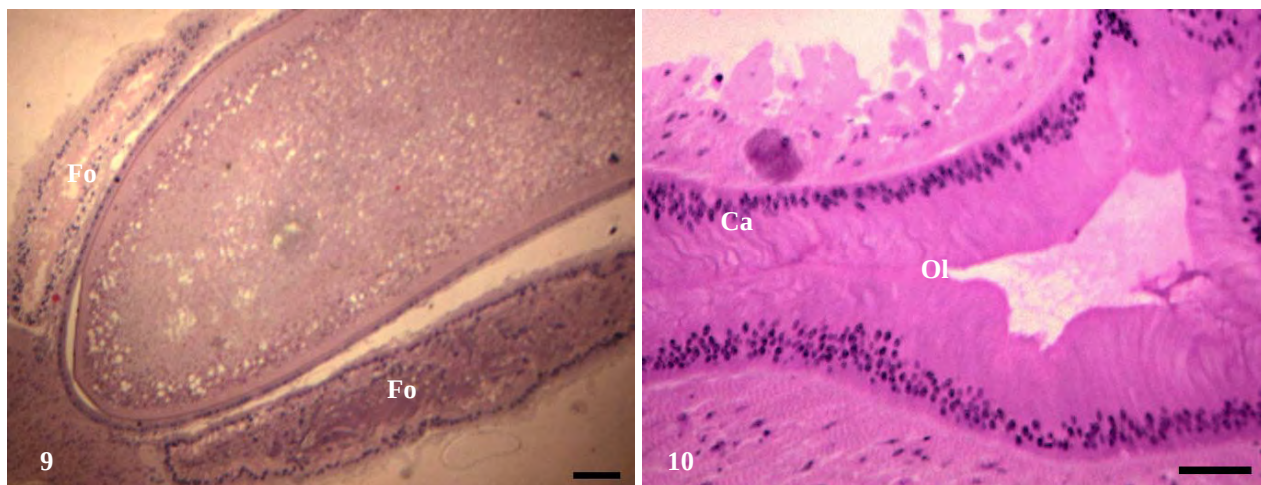


Figs. 1- 4. Ovários de rainhas virgens de *Bombus morio* . **Fig. 1.** Secção histológica do ovário da rainha com cinco dias de idade. Pode-se observar começo de formação de ovócitos (Ov) em diferentes fases do desenvolvimento e inúmeras células nutritoras (Cn). Barra: 30 μ m. **Fig. 2** Secção histológica do ovário da rainha de cinco dias mostrando a região do vitelário. Pode-se observar um ovócito desenvolvido (Ov), células foliculares e a bainha peritoneal (Bp). Barra: 20 μ m Na **Fig. 3.** Secção histológica dos ovários das rainhas com dez dias de idade mostrando a região do germário (Gm), com células em diferenciação (Cn). Barra: 30 μ m. **Fig. 4.** Secção histológica do ovário da rainha de dez dias mostrando a região do vitelário. Pode-se observar ovócitos (Ov), células nutritoras (Cn), Bainha peritoneal (Bp) e Células foliculares (Cf) Barra: 30 μ m.



Figs. 5 – 8. Ovários de rainhas virgens de *Bombus morio*. **Fig. 5.** Secção histológica do ovário de uma rainha de 15 dias de idade, mostrando a região do germário, com um ovócito (Ov), seu grupo de células nutritoras (Cn), bainha peritoneal (Bp) e Túnica própria (Tp). Barra: 10 μ m. **Fig. 6.** Numa rainha de 20 dias Pode-se observar um ovócito (Ov) com uma camada de células foliculares (Cf). Barra: 20 μ m. **Fig. 7.** Secção histológica do germário da rainha de 25 dias evidenciando inúmeros ovócitos (Ov) e suas células nutritoras (Cn). Bainha peritoneal (Bp). Barra: 20 μ m. **Fig. 8,** um ovócito (Ov) de uma rainha de 30 dias pode ser visualizado e sua câmara nutritora (Cn). Barra: 50 μ m.

As rainhas de 25 dias de idade apresentam ovários ativos e desenvolvidos e alguns folículos ovarianos que estão sendo reabsorvidos (Fig. 9). Mesmo com sinais de reabsorção de folículos ovarianos, as regiões do germário e do vitelário não apresentam sinais de degeneração (Figs. 7 e 9). As rainhas de 30 dias de idade apresentam folículos em estado de degeneração e nos ovidutos há presença de células desorganizadas (Fig. 10).



Figs. 9 – 10. Ovários de rainhas virgens de *Bombus morio*. **Fig. 9.** Secção histológica do ovário da rainha com 25 dias de idade, mostrando alguns folículos ovarianos (Fo) que estão sendo reabsorvidos Barra: 50µm e na **Fig. 10** se pode observar no oviduto lateral (Ol) comum grande numero de células colunares (Ca). Barra: 20µm

A região do germário de uma operária de *B. morio*, demonstrou ser semelhante ao das rainhas, pois possui inúmeros ovócitos em início de desenvolvimento, sempre associados com células nutridoras, (Figs. 11 e 12). Entretanto não há ovócitos maduros nos ovários das operárias. Nos ovários das rainhas copuladas foi possível observar ovócitos em diferentes estágios de desenvolvimento (Figs.13 -16).

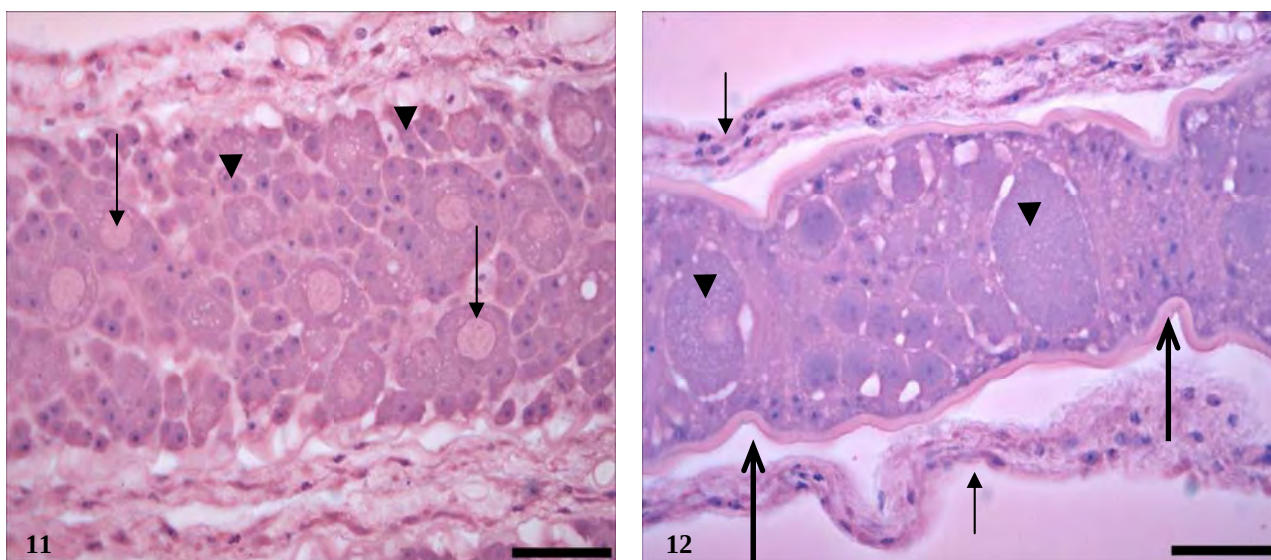
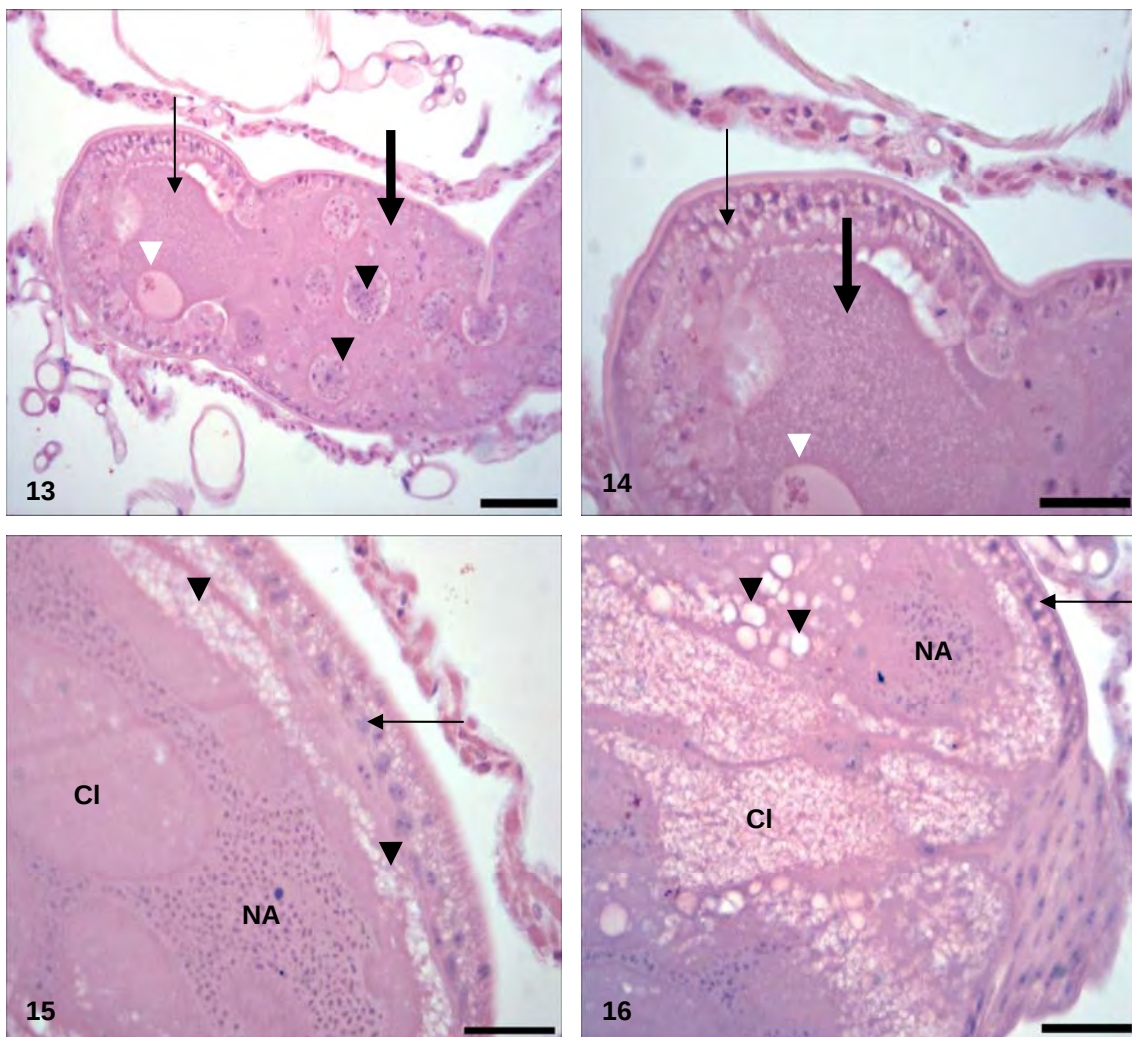


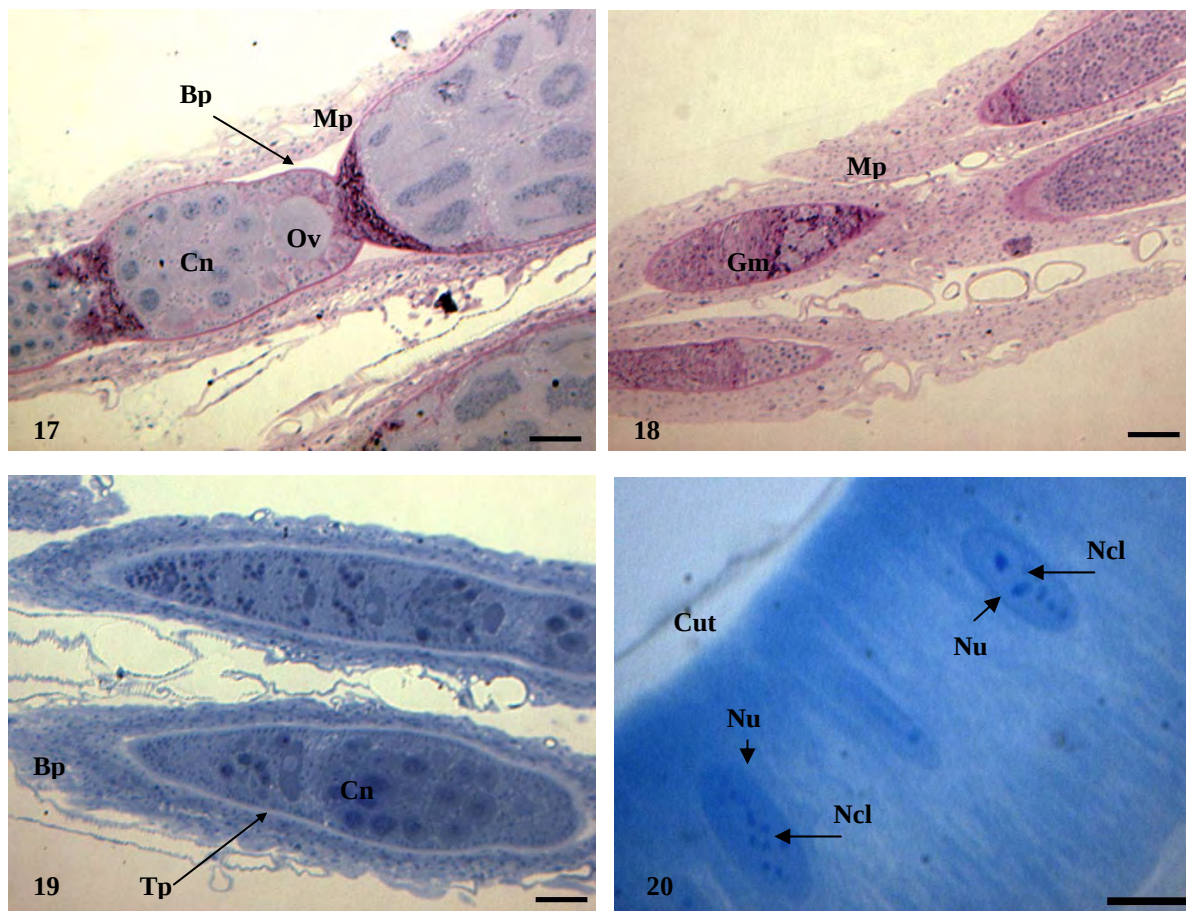
Fig. 11 e 12. Ovário de uma operaria de *B. morio*. **Fig. 11** Detalhe da porção mediana do germário do ovário de operária: ovócitos (seta fina), células nutridoras (cabeça de seta) Barra: 30µm. **Fig. 12** Uma câmara nutridora do ovário: bainha peritoneal (seta fina), ovócito (cabeça de seta preta), túnica própria (seta larga) Barra: 30µm.



Figs. 13-16. Ovário de rainha copulada de *B. morio*. **Fig. 13.** Vista geral de um ovócito (seta fina) e sua câmara nutridora (seta larga): núcleo do ovócito (cabeça de seta branca), traquéias (asteriscos), núcleos das células nutridoras (cabeças de setas pretas). Barra: 50µm. **Fig. 14.** Detalhe da extremidade do ovócito imaturo: células foliculares (seta fina), citoplasma do ovócito (seta larga), núcleo do ovócito (cabeça de seta branca). Barra: 30µm. **Figs. 15 e 16.** Detalhe da extremidade de um ovócito mais desenvolvido: citoplasma do ovócito (CI), núcleo amebóide do ovócito (NA), vacúolos (cabeça de seta), epitélio folicular (seta fina). Barra: 30µm.

Nos testes histoquímicos as secções submetidas ao teste de PAS apresentam positividade, indicando a presença de carboidratos, na região do germário e do vitelário em rainhas virgens de 5 até 15 dias de idade (Fig. 17 e 18) As secções submetidas ao teste de mercúrio-bromofenol demonstraram reações positivas, indicando a presença de proteínas na região do germário e do vitelário nas rainhas de 10 dias até 30 dias (Fig. 19). Nas rainhas virgens, a parede da spermateca e o epitélio apresentaram regiões

positivas ao mercúrio-bromofenol. Em todas as rainhas analisadas há marcação positiva e homogênea na espermateca, nas glândulas da espermateca. Núcleos volumosos com nucléolos foram identificados no epitélio da espermateca (Fig. 20).



Figs. 17 e 20. Rainha virgem de *Bombus morio*. **Fig. 17 e 18.** Secção histológica do ovário com células interfoliculares, bainha peritoneal (Bp) da rainha virgem de cinco e dez dias de idade, mostrando positividade no teste de PAS, membrana peritoneal (MP), ovócito (Ov), células nutritoras (Cn) e germário (GM). Barra: 30µm **Fig. 19.** Secção histológica do ovário da rainha com 10 dias de idade, apresentando positividade ao teste de mercúrio-bromofenol. Observando-se células nutritoras (Cn), Túnica própria (Tp) e bainha peritoneal (Bp) Barra: 30µm. **Fig. 20.** Detalhe do epitélio da espermateca mostrando núcleos alongados (Nu) e com reação positiva ao teste de mercúrio.bromofenol. Cutícula (Cu).

A espermateca das operárias de *B. morio* (Fig. 21), apresentou-se menor que a das rainhas virgens (Figs. 22 e 23) e fecundadas (Figs. 24, 25, 26). Nas espermatecas das operárias não foi observado o reservatório e a glândula espermatecal (Fig. 21). Nas espermatecas das rainhas virgens e fecundadas de *B. morio*, observou-se um epitélio colunar simples, com núcleos arredondados, na posição mediana, cromatina condensada em alguns pontos, além de inúmeros vacúolos nas células da parede; foi observado

também um revestimento cuticular bem desenvolvido (Fig. 23 e 26), e no caso de rainhas fecundadas contendo uma grande quantidade de espermatozóides em seu reservatório indicando a realização de cópula prévia (Fig. 24). A glândula espermatecal das rainhas apresentou-se acoplada a espermateca e ligada a seu ducto (Figs. 22 e 24). Suas células são classificadas como células do tipo III, com canais intracelulares que desembocam no canal coletor e possuem tamanhos variados (Fig. 25). Em rainhas fecundadas de *B. morio*, foram observadas inúmeras traquéias próximas à espermateca e à glândula espermatecal (Fig. 25).

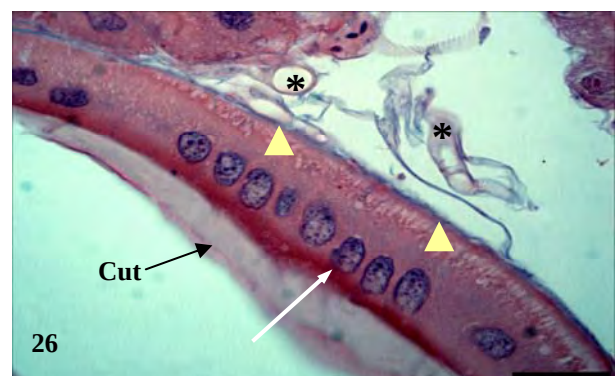
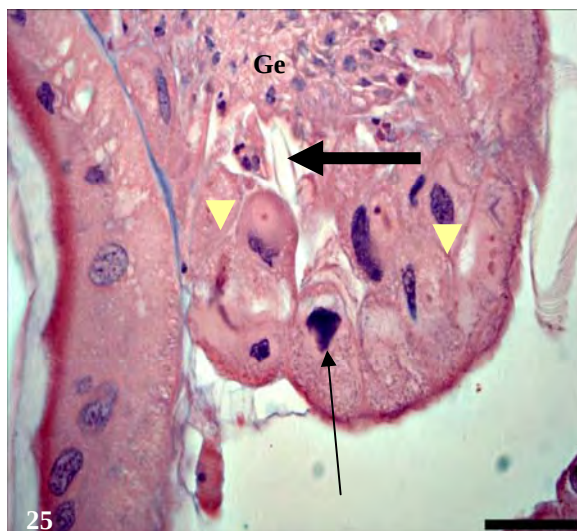
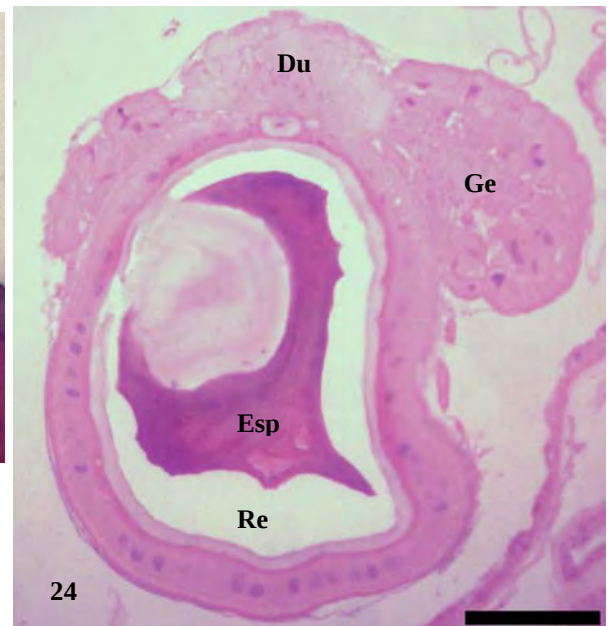
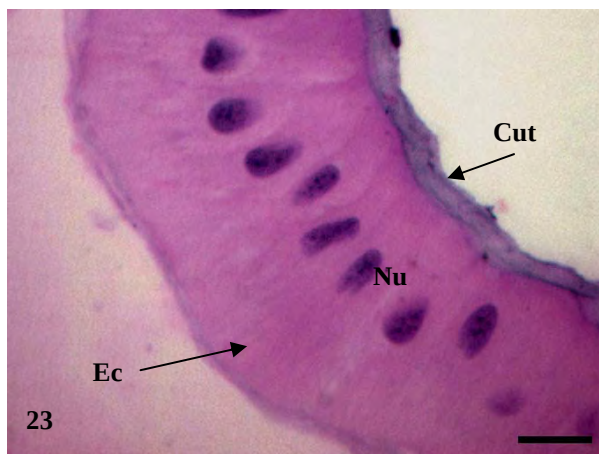
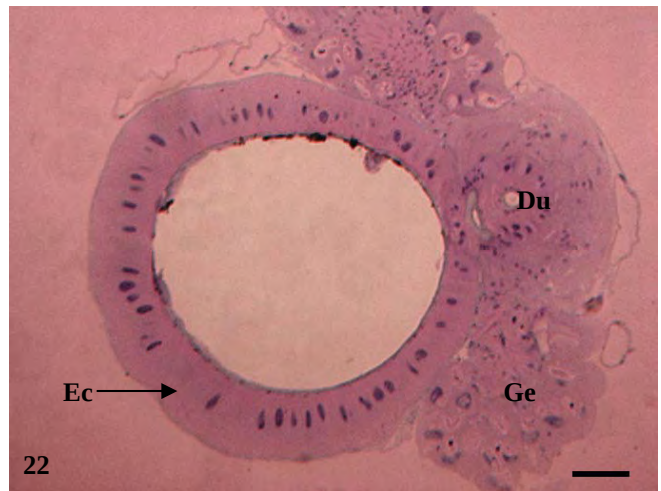
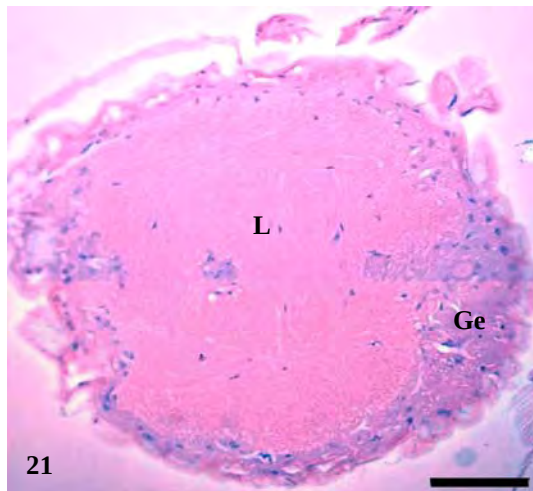


Fig. 21. Espermateca de operária de *Bombus morio*. Lúmen (L), Glândula espermatecal (Ge) Vista geral. Barra: 50µm.

Fig. 22. Vista geral da espermateca da rainha virgem de 30 dias de idade: glândula espermatecal (Ge), ducto espermatecal (De), epitélio columnar (Ep) Barra: 30µm. **Fig. 23.** Epitélio colunar da espermateca (Ec), com núcleos levemente alongados (Nu), cutícula (Cut). Barra: 10µm. **Fig. 24.** Vista geral da espermateca da rainha: reservatório da espermateca (Re), glândula espermatecal (Ge) e espermatozóides (Esp) Barra: 100µm. **Fig. 25.** Vista geral da glândula espermatecal (Ge), células da glândula (setas finas), canais intracelulares (cabeça de seta), canal principal (seta larga). Barra: 30µm. **Fig. 26.** Epitélio da espermateca com presença de núcleos (seta fina branca), invaginações da membrana basal do epitélio (cabeças de setas amarelas), traquéias (asterisco), cutícula (Cut). Barra: 30µm.

DISCUSSÃO

Os resultados mostram que rainhas de 5, 10 e 15 dias de idade apresentam ovários ativos, longos e possuem diferenciação entre o germário e o vitelário. Os ovócitos estão prontos para se desenvolver e iniciar o processo de vitelogênese. Nestas idades as rainhas estão prontas para acasalar. As células do germário e do vitelário não apresentaram indícios de morte celular.

Segundo Cruz-Landim (2004) não existe cápsula envolvendo os ovários das abelhas adultas, mas cada ovário tem um envoltório constituído por duas bainhas: uma camada externa que é formada por uma rede de fibras musculares viscerais e ramificações traqueais, chamada bainha peritoneal e uma camada interna que corresponde à lâmina basal denominada túnica própria, provavelmente secretada pelas células somáticas do filamento terminal, células pré-foliculares do germário e foliculares do vitelário. Esta camada é espessa, acelular e porosa, o que permite a passagem de substâncias da hemolinfa que constituirão o vitelo. Estas duas estruturas foram observadas tanto nos ovários de operárias como no ovário de rainhas de *B. morio*.

As rainhas de mais de 25 dias apresentaram folículos ovarianos que estão sendo reabsorvidos. São rainhas que se chegarem a ser isoladas, poderiam produzir ovos. No teste de proteínas foi possível identificar positividade na região do germário, indicando que o mesmo está ativo na produção de ovócitos.

A reabsorção celular observada em rainhas virgens pode ser causada por duas hipóteses: na primeira, as rainhas reabsorvem folículos ovarianos como parte das reservas para evitar perdas nutricionais, e isso pode indicar que nas rainhas mantidas no laboratório as condições de alimentação não eram as adequadas para a produção de ovos. A segunda hipótese está relacionada com a cópula e as substâncias produzidas pelos machos que são transmitidas às fêmeas durante este processo, estimulando os ovários para produzir rapidamente ovos e assim evitar a reabsorção celular (Colonello & Hartfelder, 2005).

Na maioria de espécies de abelhas eussociais, as operárias podem desenvolver e produzir ovos em seus ovários e realizar postura. A produção de ovos acontece na medida em que a vitelogênese ocorre. Durante o desenvolvimento, com a maturação sexual, as rainhas jovens necessitam de fatores nutricionais com altas quantidades de proteínas de carboidratos para crescimento de seus ovários. Também dependem de fatores hormonais, da cópula e da idade (Velthuis & Doorn, 2006; Wheeler, 1996).

Rainhas virgens de *Apis mellifera* a partir de seis dias iniciam o processo de degeneração celular (Patrício & Cruz-Landim, 2007). As rainhas virgens de *B. morio* de 5 dias apresentaram os ovários intactos sem nenhuma sinal de morte celular.

As rainhas virgens de *B. morio* podem viver parte de sua vida na colônia e assumir o papel de operárias. Os ovários destas rainhas possuem um tempo mais longo de viabilidade, já que além de terem reabsorção ovocítica a partir de 25 dias de idade, esta degeneração não causa esterilidade permanente em rainhas. Estas rainhas virgens não precisam ser fecundadas para produzirem ovos e podem chegar a produzir indivíduos haplóides (machos). Nas rainhas de *A. mellifera* de mais de 15 dias aparentemente os ovários com morte celular tem a capacidade de ser restaurados somente se estas rainhas são fecundadas e entram em postura (Patrício & Cruz-Landim, 2007). No caso de rainhas virgens de *Melipona quadrifasciata anthidioides*, a degeneração dos ovários aumenta com o tempo de vida, causando esterilidade permanente em rainhas a partir de 30 dias de idade (Souza *et al.*, 2007).

Em algumas espécies de rainhas altamente eussociais, rainhas virgens de até 30 dias podem chegar a ser fertilizadas (Chaud-Netto & Stort, 1980 citado por Souza *et al.*, 2007). Tanto nos resultados histológicos como nos resultados do estabelecimento de colônias, as rainhas de *B. morio* podem ser fertilizadas até 40 dias de idade e conseguem produzir ovos. O funcionamento dos ovários das operárias é de especial interesse na consideração da sociabilidade por causa dos graus das diferenças fisiológicas e comportamentais entre rainhas e operárias que resultam na divisão do trabalho reprodutivo entre as castas nas abelhas eusociais. Nestas abelhas encontram-se desde condições em que fêmeas funcionando como operárias têm condições de serem fecundadas e fazerem posturas, como algumas espécies do gênero *Bombus*, até a completa infertilidade das espécies que nunca desenvolvem seus ovários nos adultos (Michener, 1974).

Segundo Cruz-Landim (2004) a espermateca de abelhas eussociais é bem desenvolvida e apresenta epitélio diferenciado quando já recebeu espermatozoides. Nas espermatecas das rainhas virgens e fecundadas de *B. morio* também foram encontradas tais características como foram observados nos resultados. Cruz-Landim (2004) sugere que os vacúolos presentes nas células da parede da espermateca, provavelmente contenham material absorvido da hemolinfa, e que a presença de camada cuticular luminal representa um empecilho para fagocitose dos espermatozoides pelas células epiteliais.

O epitélio da espermateca das rainhas virgens apresentou células com núcleos e nucléolos com alta positividade ao mercúrio-bromofenol, Souza *et al.*, (2008) sugere que estas células podem secretar substâncias para o reservatório da espermateca. Outros autores sugerem que estas secreções ocupam o lúmen da espermateca das rainhas virgens e provavelmente seja constituído de glicoproteína ou glicosaminoglicanos (Davey & Webster, 1967; Clements & Potter, 1967; Bhatnagar & Musgrave, 1971 citados por Souza *et al.*, 2008).

A espermateca tem como função armazenar os espermatozóides recebidos durante a cópula até seu uso na fertilização dos ovócitos. No caso de rainhas de algumas espécies eussociais os espermatozoides podem permanecer aí alojados durante anos (Cruz-Landim, 2004). No caso das espécies de *Bombus* de zonas temperadas fazem diapausa e armazenam os espermatozóides durante a estação de inverno (Alford, 1975).

Na análise do epitélio da espermateca, das rainhas virgens, fecundadas e operárias, não foram encontrados sinais de morte nem divisão celular. O aumento do volume da espermateca nos indivíduos está mais relacionado ao tamanho, já que as operárias são menores que as rainhas, além disso, o aumento da espermateca também é favorecido pela cópula onde os espermatozóides são depositados na bolsa espermatecal. As glândulas espermatecais das operárias apresentaram-se pouco desenvolvidas, provavelmente, pelo fato de não realizarem postura e provavelmente por sua baixa atividade secretora, uma vez que estas secreções apresentam funções de lubrificação e proteção dos espermatozóides nas fêmeas copuladas.

As mamangavas têm uma parede espermatecal bem desenvolvida (epitélio colunar) alinhado com uma capa cuticular fina. Os núcleos destas células são geralmente grandes (Schoeters & Billen, 2000). Estas características foram observadas nas espermatecas das rainhas de *B. morio*.

Os ovários das operárias e rainhas de *B. morio* possuem semelhanças e diferenças entre si, os ovários das rainhas são maiores que os das operárias. Os ovários contêm um ovócito e várias células nutritoras associadas. Não foram vistos ovócitos maduros nos ovários das operárias.

Em conclusão, na ausência de cópula, os ovários das rainhas de *B. morio* tem reabsorção de folículos ovarianos a partir de 25 dias de idade. Mais este fato não impede que as rainhas possam copular até os 40 dias e possam produzir ovos.

Os ovários das operárias e das rainhas de *B. morio* apresentaram características semelhantes, indicando que ambas são capazes de produzir ovos. A diferença está no

tempo de viabilidade dos ovários, já que as operárias possuem um menor tempo de vida (mais ou menos 30 dias) quando comparadas com as rainhas (até um ano) e atividade dos feromônios liberados pelas rainhas, que inibem os ovários das operárias, evitando que elas produzam ovos. As diferenças observadas nas espermatecas de rainhas (virgens e fecundadas) e de operárias foram marcantes, provavelmente devido a diferenças na atividade secretora das mesmas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alford, D. V. 1975. ***The Bumblebees***. Ed. Davis-Poynter. London. 352 p.
- Almanza, M. T., Aguilar, M. L., Alvarez, C., Vecil, D., Rojas, D., Aldana, J., Diaz, L. and Fuentes, L. E. 2003. **Cría en cautiverio de colonias de *Bombus atratus* (Hymenoptera; Apidae) y su actividad polinizadora en tomate bajo invernadero**. Resúmenes XXX Congreso Sociedad Colombiana de Entomología. Cali, Colombia.
- Büning, J. 1994. **The Insect Ovary: ultrastructure, previtellogenic, growth and evolution**. London: Chapman & Hall. 400p.
- Chapman, R. F. 1998. **The Insects Structure and Function**. Fourth Edition. Cambridge University Press. 770p.
- Chaud-Netto, J. & Stort, A.C., 1980. **Successful mating of chatreuse-eyed queens of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)**. *Ciência Cultura* 32, 1542–1543.
- Colonello N. A. & Hartfelder K. 2005. **She is my girl: male accessory gland products and their function in the reproductive biology of social bees**. *Apidologie*. 26, 231-244.
- Cruz-Landim, C. 2004. **Biologia do desenvolvimento em abelhas**. Depto. Biologia, Instituto de Biociências, Unesp/Rio Claro. Disponível em <<http://www.rc.unesp.br/ib/biologia/carmina.html/>>. Acesso em 18/11/07.
- Duchateau, M. & Velthuis, H.H.W., 1989. **Ovarian development and egg laying in workers of *Bombus terrestris***. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 51:199-213.
- Engelman, F. (1970). **The Physiology of Insect Reproduction**. First Edition. Pergamon Press. 307p.
- Garófalo, C.A. 1980. **Aspectos bionômicos de *Bombus* (*Fervidobombus*) morio (*Swederus*). III. Tamanho das operárias e desenvolvimento da colônia (*Hymenoptera, Apidae*)**. *Revista Brasileira de Biologia* .40 (2): 345-348.
- Garófalo, C.A., Zucchi, R. & Muccillo, G. 1986. **Reproductive studies of a neotropical bumblebee, *Bombus atratus* (*Hymenoptera, Apidae*)**. *Revista Brasileira de Genética*. Riberão Preto, SP. IX (2): 231-243
- Goulson, D. 2003. **Bumblebees; their behaviour and ecology**. Oxford University Press, Oxford.

- Martins, G. F. & Serrão, J. E. 2004. **A Comparative Study of the Ovaries in Some Brazilian Bees (Hymenoptera, Apoidea)**. Papéis Avulsos de Zoologia (São Paulo). 44(3): 45-53.
- 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.
- Patricio, K. & Cruz-Landim, C., 2002. **Mating influence in the ovary differentiation in adult queens of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae)**. Brazilian Journal of Biology. 62, 641–649.
- Patrício K. & Cruz-Landim, C., 2007. **Effect of mating delay in the ovary of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae) Queens: Histological Aspects**. Brazilian Journal of Morphological Sciences. 24(1), 25–28.
- Pearse A.G.E. 1985. **Histochemistry: Theoretical and Applied**, Churchill, London.
- Prys-Jones, O. E. & Corbet, S. A. 1991. **Bumblebees**. Richmond Publishing Co. Ltd.
- Schoeters E. & Billen J. 2000. **The importance of the spermathecal duct in bumblebees**. Journal of Insects Physiology. 46: 1303- 1313.
- Stefanini M., Demartino C. & Zamboni L. 1967. **Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy**. Nature. 216, 173–174.
- Souza, E. A., Neves C. A., Campos L. A. O., Zanuncio J.C & Serrão, J. E. 2007. **Effect of mating delay on the ovary of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera: Apidae) queens**. Micron 38, 471 - 477.
- Souza, E. A., Neves C. A., Campos L. A. O., Zanuncio J.C & Serrão, J. E. 2008. **Effect of delayed mating on spermathecal activation in *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera: Apidae) queens**. Apidologie. 39, 1 - 9.
- Taber S. & Blum M. S. 1960. **Preservation of honey bee semen**, Science 131, 1734 - 1735.
- Velthuis H.H.W. & Van Doorn A. 2006. A century of advances in bumblebee domestication and the economic and environmental aspects of its commercialization for pollination, **Apidologie** 37, 425 - 431.
- Wheeler, D. 1996. The role of nourishment in oogenesis. **Annu. Rev. Entomol.** 41: 407-431

CONCLUSÕES GERAIS

Para obter colônias novas é preciso ter uma alta qualidade de nutrientes (pólen rico em proteínas) para evitar morte de imaturos e garantir um ótimo desenvolvimento de adultos.

Para prover as necessidades alimentícias das colônias no laboratório no período de inverno, quando a floração é mais escassa, é necessário utilizar suplementos de soja o outros suplementos alimentícios que sejam usados nas colônias de *A. mellifera*.

A melhor época para capturar rainhas fecundadas no campo é no período de verão onde a floração é abundante e as rainhas são facilmente encontradas em visita às flores. No verão e inverno se obtém ninhos produzindo sexuais.

Para os acasalamentos é recomendável que se utilizem machos com mais de sete dias e rainhas com mais de 10 dias para assegurar que os indivíduos já estejam maduros para ser acasalados aumentando o êxito na cópula.

Na ausência de cópula, os ovários das rainhas de *B. morio* iniciam a reabsorção de folículos ovarianos a partir de 25 dias de idade. Mas este fato não impede que as rainhas possam copular até os 40 dias e possam produzir ovos.

As diferenças observadas nas espermatecas de rainhas (virgens e fecundadas) e de operárias foram marcantes, provavelmente devido a diferenças na atividade secretora das mesmas.