

**MÔNICA VOLPINI CAMPOS**

**ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DOS TESTÍCULOS E VESÍCULAS  
SEMINAIS DA ABELHA *Plebeia lucii* (HYMENOPTERA: APOIDEA:  
MELIPONINI), DURANTE A MATURAÇÃO SEXUAL.**

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

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2008**

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

T

V993a  
2008

Volpini-Campos, Mônica, 1964-

Alterações morfológicas dos testículos e visículas seminais da abelha *Plebeia Lucii* (Hymenoptera : Apoidea: Meliponini), durante a maturação sexual. / Mônica Volpini-Campos.

– Viçosa, MG, 2008.

ix, 21f.: il. ; 29cm.

Orientador: Lucio Antonio de Oliveira Campos.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 16-21.

1. Abelha sem ferrão - Reprodução. 2. Visícula seminal - Morfologia. 3. Testículos - Morfologia. 4. *Plebeia Lucii* - Reprodução. 5. *Plebeia Lucii* - Maturação sexual.

6. Morfologia. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

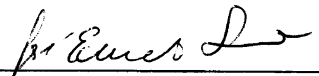
CDD 22.ed. 571.81

MÔNICA VOLPINI CAMPOS

**ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DOS TESTÍCULOS E VESÍCULAS SEMINAIS DA ABELHA *Plebeia lucii* (HYMENOPTERA: APOIDEA: MELIPONINI), DURANTE A MATURAÇÃO SEXUAL.**

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

APROVADA: 26 de Junho de 2008.



Prof. Dr. José Eduardo Serrão  
(Co-orientador)



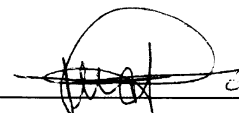
Prof. Dr. José Lino Neto  
(Co-orientador)



Prof. Dr. Sérgio Luis Pinto da Matta



Dra. Luciane Cristina de Oliveira Lisboa



Prof. Dr. Lucio Antonio de Oliveira Campos  
(Orientador)

“Eu prefiro ser  
Essa metamorfose ambulante  
Do que ter aquela velha opinião  
Formada sobre tudo...”  
(Raul Seixas/Paulo Coelho).

Dedico este trabalho a todos que são sem dúvida a razão de minha vida: Deus por tudo e por mais esta conquista; meu marido Marcelino Jardim Campos e as minhas filhas Michelli e Marcella Volpini Campos, por todo o incentivo, paciência e aceitação de minha ausência durante a realização do referido trabalho; meus pais Odilon Volpini e Maria Silva Volpini (i.m.), que mesmo com suas ausências eternas sempre se fizeram presentes em minha vida; meus 16 irmãos, sem exceção e a seus filhos, netos e bisnetos.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, meu Pai, meu Irmão e meu Amigo. Que me cedeu Sua força e coragem para enfrentar tão maravilhosa conquista.

A Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Governo de Estado de Minas Gerais, em especial à Secretaria de Estado de Educação, pela concessão de afastamento no primeiro ano de curso.

À minha amada e estimada mãe (i.m) pelo seu infinito amor, dedicação, ensinamentos e incentivos pelo estudo. Ao meu pai (i.m), um verdadeiro guerreiro, exemplo de luta, força e perseverança – Que saudade!

Ao meu marido, Marcelino Jardim Campos por me emprestar aos meus estudos.

Às minhas filhas, Michelli e Marcella Volpini Campos, por suportarem a minha ausência com muita competência.

Aos meus dezesseis irmãos, sobrinhos, sobrinhos-netos e sobrinhos-bisnetos, por suportarem a minha falta de atenção nesses dois anos de dedicação a esta pesquisa.

Aos amigos Marli e Luizito Alves Pereira pelo incentivo e encorajamento.

Ao amigo Danilo de Castro pelo apoio, incentivo e amizade.

Ao Professor Lúcio Antonio de Oliveira Campos pela orientação, conhecimentos, profissionalismo, paciência e amizade. Minha sincera gratidão.

Ao Professor Sérgio Luís Pinto da Matta pelas idéias, inúmeras sugestões, conselhos, gentilezas, atenção e bom humor, os quais serão sempre lembrados pela inigualável e irreverente forma de ensinar.

Ao Professor José Lino Neto pela Co-orientação para realização deste trabalho. Obrigada por tudo amigo...

Ao Professor José Eduardo Serrão pela Co-orientação, incentivo e amizade.

Ao Professor Clóvis Andrade Neves pelas ajudas nas análises, conselhos, ensinamentos e amizade.

Aos membros da banca pela disponibilidade de avaliarem este trabalho.

À Professora Sílvia das Graças Pompolo (Lab. Citogenética) pelo uso do analisador de imagens.

Aos Professores do Laboratório de Anatomia Vegetal pelo uso do analisador de imagens.

Aos Professores do Laboratório de Biologia Estrutural, pelo bom ambiente de trabalho e auxílio em todas as horas.

Aos Professores do programa de pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural pelos ensinamentos: Sérgio da Matta, Serrão, Everaldo, Mara, João Marcos, Tânia, Clóvis e Sílvia.

Às minhas amigas Cirlei, Marcília e Patrícia pela agradável convivência, pela força e apoio nos momentos mais difíceis, pelas alegrias compartilhadas, pela amizade e cumplicidade que construímos.

Aos meus amigos “co-orientadores” Vinícius e Jane pelo apoio nos momentos mais necessários de socorro.

Aos demais amigos de laboratório Michele, Gisele, Gláucia, Alex, Max, Edalton, Cláudia, Rejane, Reggiani, Sirlene, Katiane, Ana Paula Mata, Daniele, Marli, Diane, pela amizade e alegria que proporcionam ao laboratório.

Às Funcionárias do Departamento de Biologia Geral Beth, Diana, Salvadora e a ex-funcionária Rose.

Aos amigos e funcionários do Apiário, em especial: Íris e Geraldo, Mário e Lila.

Aos demais colegas de curso que me ajudaram de alguma forma.

Às inúmeras *Plebeia lucii* que perderam suas vidas para a realização deste trabalho. Minha sincera gratidão e meu perdão.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho. Jamais esquecerei estes anos em Viçosa, não somente pelo título alcançado, mas, principalmente, pelas pessoas, estas sim, quando dignas e íntegras, valem a pena e ficam para sempre!!!

## BIOGRAFIA

Mônica Volpini Campos, filha de Odilon Volpini e Maria Silva Volpini, nasceu em Cachoeiro de Itapemirim, Espírito Santo, Brasil, em 28 de novembro de 1964.

Em 15 de Dezembro de 1984, licenciou-se em Ciências – Licenciatura de 1º Grau, pela Faculdade de Filosofia Ciências e Letras “Madre Gertrudes de São José”, Cachoeiro de Itapemirim, Espírito Santo, Brasil.

Em 14 de Julho de 1986, habilitou-se em Matemática de 2º Grau, pela Faculdade de Filosofia Ciências e Letras “Madre Gertrudes de São José”, Cachoeiro de Itapemirim, Espírito Santo, Brasil.

Em 23 de Dezembro de 1989, graduou-se em Tecnólogo em Processamento de Dados, pelas Faculdades Integradas Anglo-Americano, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Pós-graduada em Psicopedagogia, pela FERP – Fundação Educacional Rosemar Pimentel – Barra do Piraí, Rio de Janeiro, Brasil, em 1996.

Em 15 de Outubro de 1999, licenciou-se em Ciências Biológicas, pela Universidade Iguazu, Nova Iguazu, RJ, Brasil.

Em 2000, participou do Programa Pró-Ciências IV, promovido pela Secretaria de Estado de Ciências e Tecnologia e pela Secretaria de Estado da Educação de Minas Gerais, com apoio da CAPES, SEMTEC do Ministério da Educação/MEC.

Em 2001, participou do I Curso de Capacitação para a Revitalização da TV Escola.

Professora efetiva de Ciências e Biologia da rede pública de ensino em Minas Gerais. Paralelo a esta função, atua como monitora de Meio Ambiente e no PEAS – Programa Estadual Afetivo Sexual da Secretaria de Estado de Educação de Minas Gerais.

Em 2006, iniciou o curso de Mestrado em Biologia Celular e Estrutural, na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, defendendo tese em 26 de Junho de 2008.

## CONTEÚDO

|   |      |
|---|------|
| <b>1. Resumo</b> .....                              | viii |
| <b>2. Abstract</b> .....                            | ix   |
| <b>3. Introdução</b> .....                          | 01   |
| <b>3.1. Importância Econômica e Ecológica</b> ..... | 02   |
| <b>3.2. O Gênero <i>Plebeia</i></b> .....           | 03   |
| <b>3.3. O Sistema Reprodutor Masculino</b> .....    | 03   |
| <b>3.4. A Espermatogênese em Abelhas</b> .....      | 04   |
| <b>4. Objetivos</b> .....                           | 06   |
| <b>5. Material e Método</b> .....                   | 07   |
| <b>6. Resultados</b> .....                          | 08   |
| <b>7. Discussão</b> .....                           | 12   |
| <b>8. Conclusões</b> .....                          | 15   |
| <b>9. Referências Bibliográficas</b> .....          | 16   |

## RESUMO

**VOLPINI-CAMPOS, Mônica, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Junho de 2008. ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DOS TESTÍCULOS E VESÍCULAS SEMINAIS DA ABELHA *Plebeia lucii* (HYMENOPTERA: APOIDEA: MELIPONINI), DURANTE A MATURAÇÃO SEXUAL.** Orientador: Lucio Antonio de Oliveira Campos. Co-orientadores: José Eduardo Serrão e José Lino Neto.

A abelha sem ferrão *Plebeia lucii* foi descrita pelo Prof. Dr. Pe. Jesus Santiago Moure em 2004, a partir de indivíduos de uma colônia coletada em Viçosa, Minas Gerais. Para contribuir com o conhecimento da morfologia e fisiologia do aparelho reprodutor masculino desta espécie os ductos deferentes, vesículas seminais e os testículos foram investigados em abelhas entre zero e 16 dias de vida. O sistema reprodutor em machos dessa espécie é formado por um par de testículos, cada um com quatro folículos, e por um par de ductos deferentes, os quais possuem uma região dilatada e modificada, as vesículas seminais. Assim como os demais meliponíneos, não possuem glândulas acessórias no trato reprodutor masculino. Após quatorze dias de idade os machos podem ser considerados sexualmente maduros, já que as vesículas estão cheias de espermatozóides e os testículos encontram-se degenerados.

## ABSTRACT

**VOLPINI-CAMPOS, Mônica, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2008.**  
**MORPHOLOGIC OF CHANGES IN TESTES AND SEMINAL VESICLES**  
**OF BEE *Plebeia lucii* (Hymenoptera: APOIDEA: MELIPONINI), DURING**  
**SEXUAL MATURITY.** Adviser: Lucio Antonio de Oliveira Campos. Co-  
Advisers: José Eduardo Serrão and José Lino Neto.

The stingless bee *Plebeia lucii* is a specie described by Prof. Dr. Pe. Jesus Santiago Moure in 2004 from workers of a colony collected in Viçosa, Minas Gerais.. The ducts deferentes, seminal vesicles and testicles were investigated with the use of light microscopy, in adulthood, from zero and 16 days of emerged, in order to contribute to the comprehension of the morphology and physiology of that bee. The male reproductive system of this specie is formed by a pair of testes, each one with four follicles, and by a pair of vasa deferentia that have an expanded and modified region, the seminal vesicles. Lithely in the other stingless bees, there are no accessory glands in the male reproductive tract. Males 14 days old are sexually mature because seminal vesicles are full with spermatozoa and the testes become almost completely degenerated.

### 3. INTRODUÇÃO

A ordem Hymenoptera possui mais de 115.000 espécies descritas, constituindo uma das quatro maiores ordens de insetos. Tradicionalmente esta ordem é dividida nas subordens Symphyta e Apocrita. Os Symphyta são considerados mais basais e contém pouco mais de 5% das espécies Hymenoptera já descritas, distribuídas nas superfamílias: Cephoidea, Megalogontoidea, Orussoidea, Siricoidea, Tenthredinoidea e Xyeloidea. Os Apocrita contêm a grande maioria das espécies e são, ainda, divididos em Aculeata e Parasitica. O grupo Parasitica é definido como sendo formado por todos os Apocrita que não tiveram o ovipositor modificado em ferrão. Este é o maior grupo de Hymenoptera, com aproximadamente 50% das espécies descritas. Os Parasitica são classificados em 48 famílias distribuídas em 11 superfamílias (Mason & Huber, 1993), sendo a maioria das espécies pertencentes às superfamílias Ichneumonoidea e Chalcidoidea (Gaston, 1992). Os Aculeata, representando pouco mais de 45% das espécies descritas (Gaston, 1992), são considerados o grupo mais derivado dos Hymenoptera, no qual o ovipositor foi modificado em ferrão. Eles compreendem 19 famílias (nas superfamílias Chrysidoidea, Vespoidea e Apoidea), nesse grupo, as famílias que apresentam maiores números de espécies são: Formicidae (formigas), entre os Vespoidea e Apidae (abelhas) e Sphecidae, entre os Apoidea (LaSalle & Gauld, 1992). Apidae se divide em três subfamílias: Xylocopinae, Nomadinae e Apinae. Esta última compreende 19 tribos, sendo que quatro destas tribos (Apini, Bombini, Euglossini e Meliponini) são representadas pelas abelhas que possuem corbícula, um alargamento na superfície externa da tíbia posterior das operárias, relacionado ao transporte de pólen e materiais utilizados na construção do ninho (Michener, 2000). Dentre as abelhas corbiculadas, a tribo Meliponini constitui o grupo mais diverso, com 27 gêneros (Silveira *et al.*, 2002) e centenas de espécies. O número exato de espécies permanece indefinido devido, principalmente, ao grande número de espécies crípticas (Michener, 2000).

Apesar das importantes contribuições fornecidas pelos estudos morfológicos, comportamentais e moleculares (Alexander, 1991, 1992; Downton & Austin, 1994, 1999; Brothers, 1999; Carpenter & Wheller, 1999; Melo, 1999; Ronquist, 1999; Noll, 2002), ainda existem controvérsias sobre as relações filogenéticas em Hymenoptera. A subfamília Apinae é considerada um grupo bastante derivado dentro dos Apoidea (Roig-Alsina & Michener, 1993). As relações entre as quatro tribos corbiculadas ainda não

foram totalmente esclarecidas (Winston & Michener, 1977; Kimsey, 1984; Plant & Paulus, 1987; Michener, 1990; Sheppard & MacPherson, 1991; Prentice, 1991; Cameron, 1991, 1993; Roig-Alsina & Michener, 1993; Chavarria & Carpenter, 1994; Mardulyn & Cameron, 1999; Koulianos *et al.*, 1999; Cameron & Mardulyn, 2001; Silveira *et al.*, 2002; Noll, 2002). Acredita-se que muitas questões filogenéticas poderão ser resolvidas com análise conjunta de dados moleculares e morfológicos. É importante a inclusão de novos caracteres como, por exemplo, aqueles sobre as partes internas do sistema reprodutor e dos espermatozoides (Zama *et al.*, 2007; Lino-Neto *et al.*, 2008; Fiorillo *et al.*, 2008). Uma vez que estes caracteres apresentam uma natureza mais conservativa que os caracteres morfológicos usados costumeiramente e por serem menos susceptíveis às condições ambientais (Baccetti, 1972; Jamieson *et al.*, 1999).

### **3.1. Importância Econômica e Ecológica dos Meliponini**

A tribo Meliponini possui centenas de espécies amplamente distribuídas nas regiões tropicais do mundo e subtropicais do hemisfério sul (Michener, 2000; Silveira *et al.*, 2002). A maioria das espécies nidifica em cavidades pré-existentes, como ocos de árvores, ninhos abandonados de cupins e formigas, frestas no solo e em rochas. Entretanto, existem meliponíneos que constroem seus ninhos expostos (Silveira *et al.*, 2002).

Atualmente existe grande interesse econômico focado, principalmente, no uso de diversas espécies de Meliponini para a prática da meliponicultura. Além disso, estas abelhas muitas vezes são polinizadoras específicas de muitas fanerógamas tropicais (Bawa *et al.*, 1985), sendo consideradas de grande importância para a manutenção de espécies vegetais nativas (Neff & Simpson, 1993). Estima-se que estes insetos contribuam com mais de 80% da polinização das angiospermas. A importância das abelhas deve ser ressaltada, ainda, quando se considera a produção de alimentos, pois cerca de 30% de toda a alimentação humana depende direta ou indiretamente da polinização feita por elas (O'Toole, 1992).

Várias espécies de Meliponini estão sob risco de extinção ou rápida redução de suas populações naturais (Mendonça & Lins, 2000), sendo apontadas como as principais causas disso: 1) a introdução e expansão da espécie *Apis mellifera*, a qual compete com grande eficiência por alimento com as espécies nativas (Roubik, 1978, 1980, 1982); 2)

redução de habitats naturais, principalmente pela ação do desmatamento desordenado, levando a perda de locais de nidificação e de fontes de alimento (Silveira *et al.*, 2002); e 3) ação de meleiros que na busca de mel silvestre destroem as colônias de Meliponini, especialmente de espécies que armazenam maior quantidade de mel em seus ninhos.

### **3.2. O Gênero *Plebeia***

O gênero *Plebeia* foi descrito por Herbert Schwarz, em 1938, tendo como espécie tipo *Plebeia mosquito* (Smith, 1863). No Brasil ocorrem 16 espécies descritas (Sidia Witter *et al.*, 2007).

As abelhas pertencentes ao gênero *Plebeia* são caracterizadas por serem pequenas (3-6 mm de comprimento), apresentarem marcas brancas ou amarelas na face ou no tórax, e nidificarem em cavidades de árvores, no chão e em cavidades artificiais (Michener, 2000). É um subgênero de origem pós “Gondwana”, com distribuição do México à Argentina (Michener, 2000), cujo centro de origem parece ser as regiões Sul e Sudeste do Brasil (Camargo & Wittmann, 1989), lugares esses onde é encontrada a maior diversidade de espécies pertencentes a esse subgênero (Michener, 2000).

Existe um paradoxo acerca das abelhas desse gênero: elas são morfologicamente basais (Michener, 1990), mas possuem traços derivados de comportamento (Van Benthem *et al.*, 1995). Para Camargo & Pedro (1992) o grupo *Plebeia* é pobremente definido, sendo as relações entre os táxons obscuras e incertas. Controvérsias sobre a classificação e sistemática desse gênero são frequentemente relatadas na literatura.

*Plebeia lucii* (Moure, 2004) apresenta os favos em cachos e a entrada em tubo muito curto e estreito. Medem aproximadamente 3 mm de comprimento.

### **3.3. O Sistema Reprodutor Masculino**

Devido à grande variedade de histórias de vida e padrões ecológicos, os insetos apresentam grande diversidade nos comportamentos de cópula, regulação endócrina, produção de feromônios e nas estruturas anatômicas associadas à reprodução (Borror *et al.*, 1992; Chapman, 1998). Com isso, variações interespecíficas nos sistemas reprodutores podem ocorrer no tamanho ou número das estruturas, na ausência de

alguma delas ou na posição das mesmas ao longo do trato reprodutivo (Adiyodi & Adiyodi, 1975; Grassé, 1982; Chapman, 1998).

Nos insetos o sistema reprodutor dos machos, em geral, é formado por um par de testículos, vasos deferentes, vesículas seminais, glândulas acessórias e ducto ejaculatório (Chapman, 1998). Cada testículo consiste de folículos, onde ocorre o processo espermatogênico. Nos insetos em geral o número de folículos varia entre um e quatro, mas em alguns casos pode chegar a 200 por testículo, como em *Apis mellifera*. O número de folículos testiculares constitui uma característica que pode, às vezes, separar famílias dentro da ordem Hymenoptera (Ferreira et al., 2004). Os vasos deferentes ligam os testículos ao ducto ejaculatório. As vesículas seminais são, na grande maioria dos insetos, regiões dilatadas e modificadas dos vasos deferentes e consistem no local onde os espermatozoides ficam estocados antes de serem transferidos para as fêmeas. As glândulas acessórias tornam-se funcionais no princípio da vida adulta e suas secreções estão associadas a diversas funções, como por exemplo: maturação e ativação dos espermatozoides, indução e aceleração da oviposição nas fêmeas e a formação do espermatóforo e do “plug” de cópula (Chen, 1984; Gillot, 1988; Raina et al., 1994; Gillot, 2003). No entanto, as glândulas acessórias, presentes na grande maioria dos insetos, estão ausentes nos Meliponini (Kerr, 1948; Dallacqua & Cruz-Landim, 2003).

Nas espécies de insetos, que não possuem glândulas acessórias, as secreções produzidas pelas células epiteliais ao longo do sistema reprodutor são misturadas aos espermatozoides para formar o sêmem (Gillot, 1988).

### **3.4. A Espermatogênese em Abelhas**

Nos insetos, a extremidade mais distal de cada folículo testicular é o germário, local onde as células germinativas se dividem para formar espermatogônias. Estas células germinativas indiferenciadas, conhecidas como espermatogônias primárias sofrem várias mitoses dando origem a um grupo de espermatogônias secundárias. Este grupo de células é então encapsulado por uma célula somática, a célula cística. As células císticas secretam o envelope para a formação do cisto, os espermatocistos, dentro dos quais a espermatogênese ocorre (Báo & Dolder, 1991). Os cistos são formados por clones de células germinativas revestidas por uma camada de células

epiteliais não germinativas (Baccetti & Bairati, 1964). As espermatogônias secundárias após duas divisões meióticas dão origem as espermatídes (Lindsley & Tokuyasu, 1980; Oguma & Kurokawa, 1984; Cruz-Landim, 2001). O número de espermatídes por cisto é característico para cada espécie e pode ser expresso como  $2^n$  onde “n” é usualmente igual a 5, 6, 7 ou 8.

Nos Hymenoptera os machos são originados de ovos não fertilizados, portanto são haplóides e as fêmeas são diplóides, já que se originam de ovos fertilizados. Nestes insetos a primeira divisão meiótica, nos machos, é abortiva, não ocorrendo formação do fuso (Cruz-Landim & Beig, 1980a, b) e nem a separação de material genético. Portanto, o número de cromossomos nos machos de Hymenoptera não muda durante a “meiose” (Kerr, 1969). A segunda divisão meiótica ocorre normalmente, gerando duas espermatídes haplóides com número igual de cromossomos (Cruz-Landim, 2001). Em abelhas, o conteúdo citoplasmático é distribuído de forma desigual entre as duas espermatídes. Uma delas recebe quase todo o citoplasma, ficando a outra apenas com o núcleo e uma quantidade muito reduzida de citoplasma, contendo somente alguns ribossomos (Cruz-Landim & Beig, 1980a, b; Cruz-Landim *et al.* 1980). Estas espermatídes atípicas não são viáveis na formação de espermatozóides (Lino-Neto et al., 2008).

#### **4. OBJETIVO**

Este trabalho teve como objetivo descrever as alterações morfofisiológicas dos testículos e das vesículas seminais de *Plebeia lucii* (Hymenoptera, Apoidea, Meliponini) durante a maturação sexual.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

Para a obtenção de machos com idades conhecidas, de 0 (recém emergidos), 1, 2, 7, 8, 9, 12, 14 e 16 dias de vida adulta, células de cria foram retiradas de colônias de *Plebeia lucii*, mantidas no Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa, e acondicionadas em placas de Petri. Estas foram mantidas em estufa incubadora BOD a 29 °C. Diariamente as placas foram vistoriadas e os machos que emergiram foram marcados com tinta atóxica de cores diferentes para posterior identificação da idade. Todos os indivíduos que emergiram foram transferidos para uma colônia de observação previamente montada e também mantida em BOD a 29 °C, contendo operárias de diferentes idades (para alimentar os indivíduos jovens) e células de cria contendo larvas jovens (para serem manipuladas pelas operárias). A colônia de observação era alimentada diariamente com pólen e xarope de sacarose em água 1:1.

### **Histologia**

Sistemas reprodutivos foram dissecados em tampão cacodilato de sódio (pH 7,2), fixados em glutaraldeído 2,5 % por 12 h ou em líquido de Bouin por 24 h e pós-fixado em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio por 2 h . Em seguida, foram desidratados em série alcoólica crescente e incluídos em historesina (hidroxietil metacrilato). Após a inclusão foram mantidos em estufa por três dias. Cortes de 2 µm de espessura foram feitos em micrótomo Leica RM 2155 e colocados em lâminas histológicas e corados com azul de toluidina. As lâminas foram montadas com lamínula em sacarose 50% ou Entellan (Merck), analisadas e fotografadas em fotomicroscópio Olympus CX31.

## 6. RESULTADOS

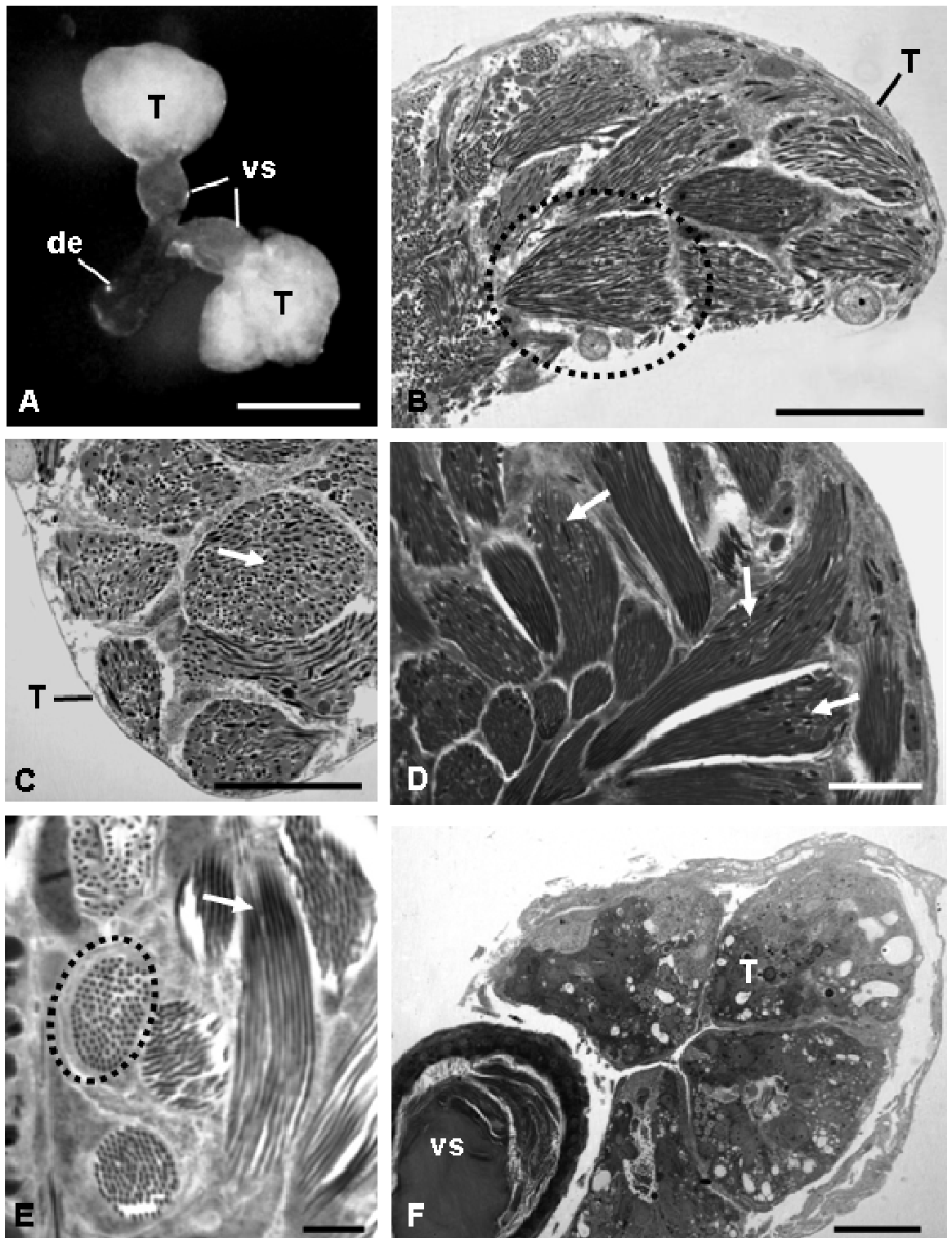
O sistema reprodutor de machos de *Plebeia. lucii* é formado por um par de testículos, cada um contendo quatro folículos, vasos eferentes encapsulados juntamente com os folículos testiculares, vasos deferentes, vesículas seminais e ducto ejaculatório. De cada folículo testicular sai um ducto eferente, os quatro se fundem formando o ducto deferente, o qual possui uma região dilatada e modificada, a vesícula seminal. Os ductos deferentes pós-vesiculares se fundem formando o ducto ejaculatório (Fig. 1A).

Em machos com até 12 dias os testículos já estão bastante desenvolvidos (Fig.1A). Em machos recém emergidos, os cistos possuem células na fase de espermátides (Fig. 1B-C), enquanto que naqueles com 1 e 2 dias, as espermátides se encontram alongadas, mas ainda com bastante citoplasma. As espermátides atípicas são observadas sendo eliminadas na extremidade final dos feixes (Fig. 1D). Do 7º ao 12º dia observam-se, nos testículos, os feixes com os espermatozóides maduros, dos quais todo o citoplasma já foi eliminado (Fig. 1E). Foram observados, em média, 116 espermatozóides por cisto (Fig. 1E). A partir do 11º dia os espermatozóides migram, em feixes, para a vesícula seminal, e os testículos entram em processo de degeneração (Fig. 1F). Portanto, nessa espécie há produção de espermatozóides durante uma única fase da vida. Nos testículos, observa-se a presença de uma estrutura, na qual parte da cabeça do espermatozóide se insere e que é responsável por mantê-los em feixes (Fig. 1D). A produção de espermatozóides completa-se ao redor do 11º dia após a emergência do macho e somente ao redor do 14º dia o zangão está maduro para o acasalamento.

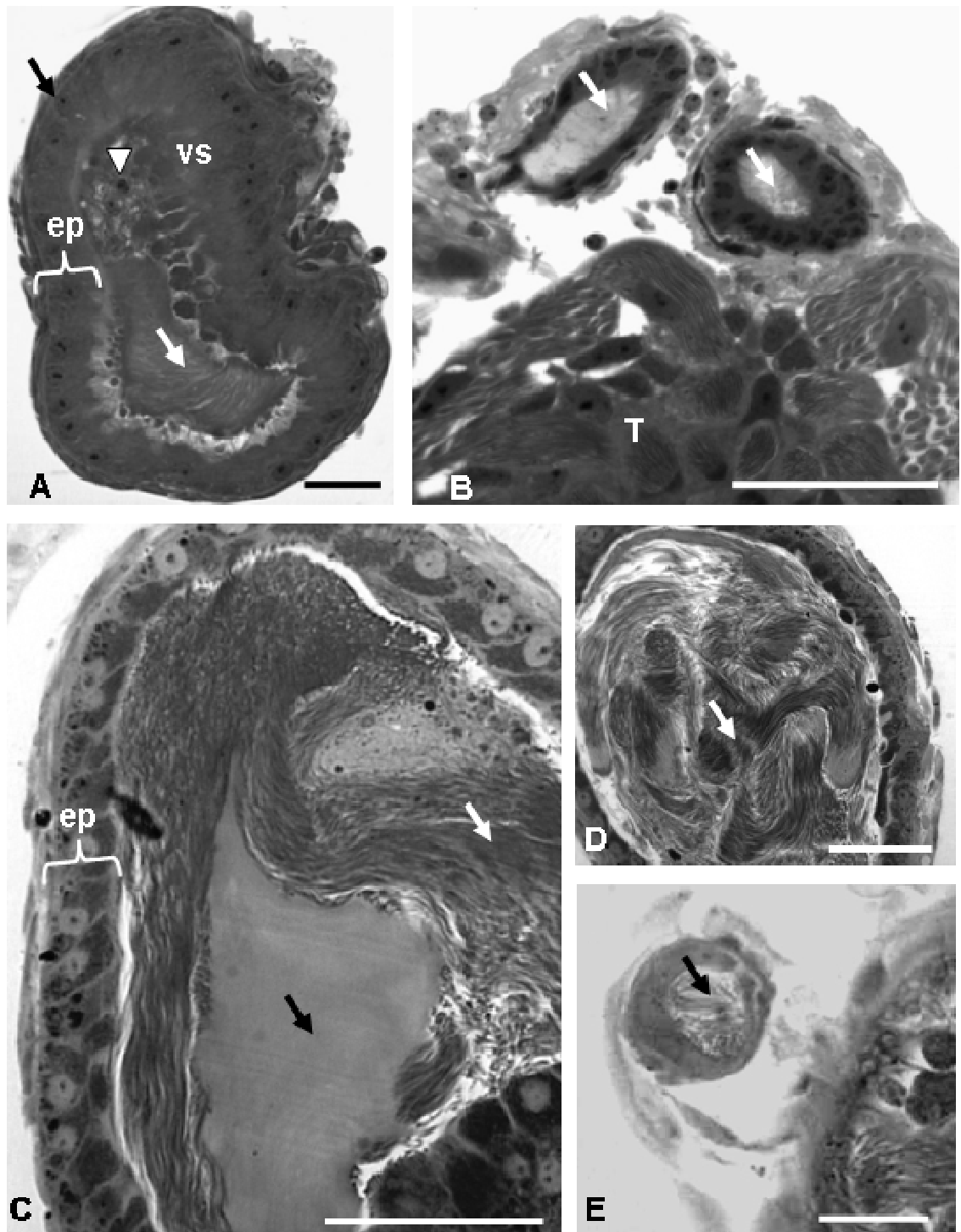
Em macho de 1 a 9 dias de idade a vesícula seminal apresenta lúmen bastante reduzido e repleto de estruturas celulares, em geral, nucleadas e secreção filamentosa (Fig. 2A). As células epiteliais são altas, com núcleos grandes na região basal e nucléolo evidente (Fig. 2A). Machos de 9 dias apresentam o lúmen dos ductos deferentes pré-vesiculares sem a presença de espermatozóides e cheias de secreções (Fig. 2B).

Com 11 dias, quando os espermatozóides começam a chegar às vesículas seminais, o epitélio vesicular torna-se mais baixo, composto por células cúbicas com núcleos esféricos. Nota-se presença de secreção mesmo após a chegada dos espermatozóides (Fig. 2C). Com 14 dias, as vesículas seminais já estão completamente preenchidas por espermatozóides (Fig. 2D). Mas, os ductos deferentes pré-vesiculares ainda contêm espermatozóides no lúmen, evidenciando que ainda há migração destas células para as vesículas seminais (Fig. 2E). Nessa fase, os testículos encontram-se em processo de

degeneração, apresentando-se desorganizados e com células com muitas lacunas, restos de espermatozoides em feixe e alguns isolados, dispostos aleatoriamente (Fig. 1F).



**Figura 1.** Anatomia e histologia do sistema reprodutor de machos de *Plebia lucii*. **A-** Sistema reprodutor, mostrando os testículos encapsulados (T), vesículas seminais (vs) e ducto ejaculatório (de). **B e C-** Machos recém emergidos, nesta fase, nota-se nos testículos (T), a presença de espermátides (círculo tracejado em B e seta em C). **D-** Machos com um e dois dias, onde as espermátides se encontram alongadas, observa-se a eliminação de espermátides atípicas no final dos feixes (setas brancas). **E-** Em macho entre 7 e 12 dias de vida os feixes já possuem espermatozoides maduros (seta). Foram observados, em média, 118 espermatozoides por cisto (círculo tracejado). **F-** Após o 11º dia os espermatozoides migram, em feixes, para a vesícula seminal (vs) e os testículos (T) entram em processo de degeneração. Barras: A = 50  $\mu$ m; B-F = 30  $\mu$ m.



**Figura 2.** Histologia do sistema reprodutor de machos de *Plebia lucii*. A- Macho de sete dias. O lúmen da vesícula seminal é reduzido e com estruturas celulares nucleadas (cabeça de seta) e secreção filamentososa (seta branca). Células epiteliais altas (ep), com núcleos grandes na região basal (seta preta) e nucléolo evidente. B- Machos de nove dias, nota-se secreção no lúmen dos ductos deferentes pré-vesiculares (setas). C- Espermatozóides alcançam as vesículas seminais em machos de 11 dias (seta branca). O epitélio vesicular (ep) torna-se mais baixo, composto por células cúbicas e ainda observa-se a presença de secreção (seta preta). D- Com quatorze dias, as vesículas seminais já estão completamente preenchidas por espermatozóides (seta). E- Machos na mesma fase da figura anterior, os ductos deferentes pré-vesiculares ainda contêm espermatozóides no lúmen (seta). Barras: A e E = 10 µm; B-D = 50 µm;

## 7. DISCUSSÃO

Ainda são poucos os trabalhos que descrevem a morfofisiologia de testículos e vesículas seminais em insetos e muito menos nos Hymenoptera. Nesta ordem, os trabalhos mais completos são aqueles sobre *Camponotus* ssp. (Wheeler, 1992), *Melipona bicolor* (Dallacqua & Cruz-Landim, 2003), *M. mondury* e *M. rufiventris* (Lima, 2004), *Scaptotrigona xanthotricha* (Araújo, 2005) e *Friesella schrottkyi* (Brito, 2006). O sistema reprodutor de machos de *Plebeia lucii* corresponde ao padrão observado em outros Meliponini. O testículo apresenta quatro folículos testiculares e não possui glândulas acessórias. Na espermatogênese em abelhas, o conteúdo citoplasmático das espermátides, no final da meiose, é distribuído de forma desigual, sendo que em uma delas o citoplasma é muito reduzido, com poucos ribossomos (Cruz-Landim & Beig, 1980a, b; Cruz-Landim et al., 1980). Em *Scaptotrigona xanthotricha*, os núcleos das espermátides com pouco citoplasma não acompanham o alongamento dos núcleos das espermátides normais (Araújo, 2005). As espermátides atípicas migram para a periferia dos feixes e são eliminadas durante a espermiogênese juntamente com os restos citoplasmáticos das células que se transformaram em espermatozóides (Lino-Neto et al., 2008). Em machos recém emergidos de *P. lucii* os cistos possuem células na fase de espermátides. Em machos com 1 e 2 dias, as espermátides se encontram alongadas, com bastante citoplasma e núcleos de espermátides atípicas sendo eliminados na extremidade final dos feixes. A chegada dos espermatozóides nas vesículas seminais somente a partir do 11º dia diferencia essa espécie das demais já estudadas. Em *M. mondury* e *M. rufiventris* (Lima, 2004) e *S. xanthotricha* (Araújo, 2005), os espermatozóides começam a ser observados na vesícula seminal a partir do 4º dia, já em *M. quadrifasciata* só começa a partir do 7º dia (Camargo, 1984), em *Friesella schrottkyi*, a partir do 9º dia (Brito, 2006). Embora em *Plebeia lucii* os espermatozóides demorem bem mais tempo para chegar às vesículas seminais, a maturidade sexual dos mesmos ocorre, aproximadamente, na mesma idade que os das demais espécies (Snodgrass, 1978; Tasei et al., 1998; Lima, 2004; Araújo, 2005; Brito, 2006).

Quando as vesículas seminais se enchem de espermatozóides os testículos entram em processo de degeneração e os machos podem ser considerados sexualmente maduros (Cruz-Landim & Dallacqua, 2002; Araújo et al., 2005). Na espécie aqui estudada, os espermatozóides alcançaram as vesículas seminais por volta do 11º dia após a emergência e os testículos encontram-se quase que totalmente degenerados por volta do 16º dia.

Em aculeata e simphyta, como regra geral, os espermatozóides são liberados dos testículos em feixes, sendo que estes só são desfeitos na vesícula seminal (Quicke et al., 1992; Cruz-Landim, 2001; Schiff et al., 2001; Moreira et al., 2004). Em *P. lucii* os espermatozóides saem dos testículos em feixes e chegam dessa mesma forma às vesículas seminais e permanecem assim até o 16º dia.

Outros autores já registraram células do epitélio da vesícula seminal passando de cilíndricas para cúbicas e apresentando projeções apicais em forma de bolhas (secreção apócrina) durante a maturação sexual (Cruz-Landim & Hofling, 1969; Araújo, 2005). Em *Plebeia lucci* as vesículas seminais de machos jovens são revestidas por epitélio simples prismático, com células altas, com núcleos basais grandes e, pelo menos um nucléolo evidente. Esse epitélio sofre profundas modificações estruturais ao longo da maturação sexual do indivíduo, de tal forma que, no macho sexualmente maduro é um epitélio baixo formado por células cúbicas com núcleo esférico situado na porção mediana das células.

No início da vida adulta o lúmen da vesícula seminal encontra-se repleto de estruturas celulares, em geral nucleadas, evidenciando secreção holócrina.

O sucesso reprodutivo dos insetos também está relacionado às secreções produzidas pelas glândulas acessórias do sistema reprodutivo masculino. Dentre as funções desempenhadas por essas secreções, incluem a nutrição dos espermatozóides, o auxílio no deslocamento desses ao longo dos ductos e a indução de comportamentos pós-cópula nas fêmeas (Gillot, 2003). Em Hymenoptera eussociais os machos têm vida curta e normalmente morrem após uma ou poucas cópulas (Boosmam *et al.*, 2005). Comumente, em muitos Hymenoptera as secreções das glândulas acessórias asseguram a fidelidade de cópula da fêmea. Entretanto, os Meliponini não apresentam essas glândulas (Kerr, 1948; Ferreira et al., 2004), por isso vários estudos tiveram como objetivo localizar regiões secretoras nos ductos do sistema reprodutivo que suprissem a ausência das glândulas acessórias. Porém, em machos maduros de *M. bicolor* (Dallacqua & Cruz-Landim, 2003) e *S. xanthotricha* (Araújo, 2005) as células epiteliais da vesícula seminal não apresentaram quaisquer características de células secretoras. Em *Friesella schrottkyi* o epitélio da vesícula seminal apresenta características de células secretoras em todas as idades (Brito, 2006). Apesar da vesícula seminal em *Plebeia lucii* exercer funções secretoras, além de armazenar espermatozóides, é possível que outras regiões do ducto deferente produzam secreções importantes para o processo reprodutivo. Em machos maduros desta espécie, as secreções foram observadas na

vesícula seminal. Acredita-se que a composição e viscosidade das secreções, em conjunto, permitem o deslocamento dos espermatozoides através dos ductos (Happ, 1992). Substâncias desta natureza foram também encontradas nas glândulas acessórias de outras abelhas (Blum, 1962; 1967). É provável que as secreções na vesícula seminal em *Plebeia lucii* auxiliem o transporte dos espermatozoides, e tenham algum papel na nutrição e manutenção dos espermatozoides viáveis até cópula, como encontrado para *A. mellifera* (Cruz-Landim & Hofling, 1969). Como os Meliponini não possuem glândulas acessórias, é possível que o “plug” formado pela retenção do aparelho reprodutor do macho no trato genital da fêmea após a cópula exerça o papel desempenhado pela secreção das glândulas acessórias em *Apis mellifera* (Araújo *et al.*, 2005).

Em *Plebeia lucii* os espermatozoides chegam à vesícula seminal mais tarde que nas espécies de Meliponini estudadas.

Com relação à secreção holócrina na vesícula seminal, *Plebeia lucii* se assemelha a *F. schrottkyi* (Brito, 2006) e estas duas espécies se diferenciam dos demais Meliponini estudados até o momento, nos quais não há evidência de secreção holócrina nas vesículas seminais.

Este trabalho demonstrou que machos de *Plebeia lucii* apresentam grandes modificações morfológicas no epitélio das vesículas seminais ao longo do processo de maturação sexual. Além disso, permitiu relacionar a idade destes indivíduos com os eventos de degeneração testicular e maturidade sexual. Como descrito acima, sugerimos que os machos de *Plebeia lucii* atingem a maturidade sexual após o décimo quarto dia de emergência, quando estarão aptos a abandonarem as colônias para possível cópula. Portanto, tentativas de acasalamentos em condições controladas devem ser realizadas com machos a partir dessa idade.

## 8. CONCLUSÕES

- Os machos de *Plebeia lucii* tornam-se sexualmente maduros por volta do décimo quarto dia de vida, idade na qual as vesículas seminais já estão cheias de espermatozóides e os testículos quase totalmente em degeneração.
- Em *Plebeia lucii* há produção de espermatozóides durante uma única fase da vida, de 7 a 12 dias de vida adulta.
- As vesículas seminais apresentaram sinais morfológicos de atividade secretora durante a maturação sexual, presença de estruturas celulares, em geral, nucleadas no lúmen. Estas secreções podem substituir, em parte, as funções das secreções das glândulas acessórias.
- Os espermatozóides são organizados em feixes nos cistos testiculares e são transferidos para as vesículas seminais mantendo esse arranjo durante a maturação sexual.
- Machos de *Plebeia lucii* apresentaram grandes modificações morfológicas no epitélio das vesículas seminais ao longo do processo de maturação sexual.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adiyodi, K.G. & Adiyodi, R.G., 1975. Morphology and cytology of the accessory sex gland in invertebrates. *Int. Rev. Cytol.* 47: 353-398.
- Alexander, B., 1991. A cladistic analysis of the genus *Apis*. In: D. R. Smith (ed) *Diversity in the genus Apis*. Boulder, CO, Westview Press, pp. 1-28.
- Alexander, B., 1992. An exploratory analysis of cladistic relationship within the suprfamily Apoidea, with special reference to sphecid wasps (Hymenoptera). *Journal of Hymenoptera Research*. 1: 25-61.
- Araújo, V.A., Zama, U., Neves, C.A., Dolder, H., Lino-Neto, J., 2005. Ultrastructural, histological and histochemical characteristics of the epithelial wall of the seminal vesicle of mature males of *Scaptotrigona xanthotricha* Moure (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Brazilian Journal Morphological Science*. In press.
- Báo, S.N., Dolder, H., 1991. Abnormal characteristics observed during spermiogenesis of the RA mutant of *Ceratitis capitata* (Diptera, Tephritidae): spermatid cells. *Revista Brasileira de Genética, Brasil*. 14, 287-297.
- Baccetti, B., Bairati, A., 1964. Indagini comparative sull'ultrastruttura delle cellule germinale maschili in *Dacus oleae* Gmel ed in *Drosophila melanogaster* Meig. (Ins. Diptera)', *Redia*, 49, 1-29.
- Baccetti, B., 1972. Insect sperm cells. *Advances in Insect Physiology*, 9: 315-397.
- Bawa, K.S., Bullock, S.H., Perry, D.R., Coville, R.E. & Grayum, M.H., 1985. Reproductive biology of tropical lowland rain forest trees. II. Pollination system. *American Journal of Botany*. 72: 346-356.
- Blum, M.S., Glowska, Z., TauberIII, S., 1962. Chemistry of the drone honeybee reproductive system. II. Carbohydrates in the reproductive organs and semen. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 55, 135-139.
- Blum, M.S., Bumgarner, J.E., TauberII, S., 1967. Composition and possible significance of fatty acids in lipids classes of honeybee serum. *J. Insect. Physiol.* 13, 1302-1308.
- Boosmam, J.J., Baer, B., Heinze, J., 2005. The evolution of male traits in social insects. *Annu. Rev. Entomol.* 50, 395-420.
- Borror, D.J., Triplehorn, C.A. & Johnson, N.F., 1992. Na introduction to the study of insects. Saunders, Harcourt Brace.
- Brito, P.V.A., 2006. Estudo morfofisiológico da vesícula seminal em machos adultos da abelha *Friesella schrottkyi* (Hymenoptera: Apoidea: Meliponini), durante a maturação sexual. Universidade Federal de Viçosa (Dissertação de Mestrado).
- Brothers, D.J., 1999. Phylogeny and evolution of wasps, ants and bees (Hymenoptera, Crysoideoidea, Vespoidea and Apoidea). *Zoologica Scripta*. 28: 233-249.
- Camargo, C.A., 1984. Spermatozoa numbers and migration to the seminal vesicles in haploid and diploid males of *Melipona quadrifasciata* Lep. *Journal of Apiculture Research*, 23: 15-17.

- Camargo, J.M.F. & Wittmann, D., 1989. Nest Architecture and Distribution of the Primitive Stingless bee *Mourella caerulea* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae): Evidence for the Origin of Plebeia s. lat on the ParisGondwana Continent. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*. Lisse, v. 24, n. 4, p. 213-229.
- Camargo, J.M.F. e Pedro, S.R.M., 1992. Systematics, Phylogeny and Biogeography on the Meliponini (Hymenoptera, Apidae): a Mini Review. *Apidologie*, Versailles, v. 23, p. 293-314.
- Cameron, S.A. & Mardulyn, P., 2001. Multiple data sets suggest independent origins of high eusocial behavior in bees (Hymenoptera: Apinae). *Systematic Biol.*, 50: 194-214.
- Cameron, S.A., 1991. A new tribal phylogeny of the Apidae inferred from mitochondrial DNA sequences. In: Smith D. R. (ed.). *Diversity of the genus Apis*. Westview Press, Boulder, Colorado, pp. 71-78.
- Cameron, S.A., 1993. Multiple origins of advanced eusociality in bees inferred from mitochondrial DNA sequences . *Proceedings of the National Academy Science of United States of America*. 90: 8687-8691.
- Carpenter, J.M. & Wheller, W.C., 1999. Towards simultaneous analysis of morphological and molecular data in Hymenoptera. *Zoologica Scripta*, 28: 251-260.
- Chapman, R.F., 1998. *The Insects: Structure and Function*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Chavarría, G. & Carpenter, J.M., 1994. "Total Evidence" and the evolution of highly social bees. *Cladistic*. 10: 229-258.
- Chen, P.S., 1984. The functional morphological and biochemistry of insect male accessory glands and their secretions. *Ann. Rev. Entomol.* 29: 233-255.
- Cruz-Landim, C., 2001. Organization of the cysts in bee (Hymenoptera, Apidae) testis: number of spermatozoa per cyst. *Iheringia*, 91, 183-189.
- Cruz-Landim, C., 2004. *Biologia do desenvolvimento em abelhas*. Depto. Biologia, Instituto de Biociências, UNESP/Rio Claro.
- Cruz-Landim, C., Beig, D., 1980a. Meiose nos Hymenoptera. *Ciên. Cult.*, 33, 937-966.
- Cruz-Landim, C., Beig, D., 1980b. An electron microscopic study of spermatogenesis in the drone of *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera: Apidae). *Int. J. Invert. Reprod.*, 2, 271-283.
- Cruz-Landim, C., Beig, D., Silva de Moraes, R.L.M., 1980. Process of differentiation during spermatogenesis in bees (Hymenoptera, Apidae). *Caryologia*, 33, 1, 1-15.
- Cruz-Landim, C., Cruz-Hofling, M.A., 1969. Electron microscope observations on honeybee seminal vesicle (*Apis mellifera adansonii*, Hymenoptera, Apidae). *Papéis Avulsos Zool. (S. Paulo)* 14, 145-151.
- Cruz-Landim, C., Dallacqua, R.P., 2002. Testicular reabsorption in adult males of *Melipona bicolor bicolor* Lepeletier (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Cytologia*. 67, 145-151.

- Cruz-Landim, C., Silva de Moraes, R.L.M., 1980. Observations on the mitochondrial complex and head differentiation during spermiogenesis of the stingless bee *Melipona quadrifaciata anthidioides* Lep. *Cytobios*, 27, 167-175.
- Dallacqua, R.P. & Cruz-Landim, C., 2003. Ultrastructure of the ducts of the reproductive tract of males of *Melipona bicolor* Lepeletier (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Anat. Hist. Embryol.* 32: 276-281.
- Dowton, M. & Austin, A.D., 1994. Molecular phylogeny of the insect order Hymenoptera: Apocritan relationships. *Proceedings of the National Academy Science of United States of America.* 91: 9911-9915.
- Dowton, M. & Austin, A.D., 1999. Models of analysis for molecular datasets for the reconstruction of basal hymenopteran relationships. *Zoologica Scripta.* 28: 69-74.
- Ferreira, A., Abdalla, F.C., Kerr, W.E., Cruz-Landim, C., 2004. Comparative anatomy of the male reproductive internal organs of 51 species of bees. *Neotrop. Entomol.* 33, 569-576.
- Fiorillo, B.S., Lino-Neto, J., Bão, S.N., 2008. Structural and ultrastructural characterization of male reproductive tracts and spermatozoa in fig wasps of the genus *Pegoscapus* (Hymenoptera, Chalcidoidea). Universidade Estadual de Campinas (Dissertação de Mestrado).
- Gaston, K.J., 1992. Spatial patterns in the description and richness of the Hymenoptera. In *Hymenoptera and Biodiversity*, eds. J. LaSalle and I.D. Gauld, pp. 277-293. C.A.B International, UK.
- Gillot, C., 1988. Arthropoda - Insecta. In: *Reproductive Biology of Invertebrates* (K. G. Adiyodi and R.G. Adiyodi eds) New York, Wiley. 3: 319-371.
- Gillot, C., 2003. Male accessory gland secretions: Modulators of female reproductive physiology and behavior. *Annu. Rev. Entomol.* 48: 163-184.
- Grassé, D.G., 1982. Ejaculate esterase-6 and initial sperm use by female *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.* 27: 641-650.
- Happ, G.M., 1992. Maturation of the male reproductive system and its endocrine regulation. *Annual Review of Entomology.* 37, 303-320.
- Jameson, B.G.M; Dallai, R; Afzelius, B.A, 1999. *Insects: Their spermatozoa and phylogeny.* Scientific Publishers Enfield, 4-23.
- Kerr, W.E., 1969. Some aspects of the evolution of social bee (Apidae). *Evol. Biol.*, 3, 119.
- Kerr, W.E., 1948. Estudos sobre o gênero *Melipona*. Tese de Doutorado. Piracicaba, USP.
- Kimsey, L.S., 1984. A reevaluation on the phylogenetic relationships in the Apidae (Hymenoptera). *Systematic Entomology.* 9: 435-442.
- Koulianos, S., Schmid-Hempel, R., Roubik, D.W. & Schmid-Hempel, P., 1999. Phylogenetic relationships within the corbiculate Apinae (Hymenoptera) and the evolution of eusociality. *J. Evol. Biol.* 12: 380-384.

- LaSalle, J. & Gauld, I.D., 1992. Hymenoptera: their diversity, and their impact on the diversity of other organisms. In: J. LaSalle & I. D. Gauld (eds) Hymenoptera and Biodiversity. C.A.B. International, UK, pp. 1-26.
- Lima, M.A.P., 2004. Aspectos da biologia de *Melipona rufiventris* Lepeletier, 1836 e de *Melipona mondory* Smith, 1863 (Hymenoptera: Apidae, Meliponina) Universidade Federal de Viçosa (Dissertação de Mestrado).
- Lindsley, D.L., Tokuyasu, K.T., 1980. Spermatogenesis. In: Ashburner, M & Wright, TR. Eds. The genetics and biology of Drosophila. New York, Academic. v. 2d, p. 225-295.
- Lino-Neto, J., Araújo, V.A., Dolder, H., 2008. Inviability of the Spermatids with Little Cytoplasm in Bees (Hymenoptera, Apidae). Sociobiology. 51: 163-172.
- Mardulyn, P. & Cameron, S.A., 1999. The major opsin in bees (Insecta: Hymenoptera): a promoting nuclear gene for higher level phylogenetic. Molecular Phylogenetics and Evolution. 12: 168-176.
- Mason, W.R.M. & Huber, J.T., 1993. Order Hymenoptera. In Hymenoptera of the world: An identification guide to families, eds. H. Goulet and J.T. Huber, pp. 4-12. Canada Communication Group, Ottawa, Canada.
- Mello, M.L.S. & Vidal, B.C., 1980. Práticas de Biologia Celular, Ed. Edgard Blucher. 71p.
- Melo, G.A.R., 1999. Phylogenetic relationships and classification of the major lineages of Apoidea (Hymenoptera), with emphasis on the crabronid wasps. The University of Kansas Science Bulletin. 14: 1-55.
- Mendonça, M.P. & Lins, L.V. (org.), 2000. Lista Vermelha das Espécies Ameaçadas de Extinção da Flora de Minas Gerais. Belo Horizonte, Biodiversitas e Fundação Zoológica de Belo Horizonte.
- Michener, D., 1990. Classification of the Apidae (Hymenoptera). Univ. Kansas Sci. Bull. 54: 75-164.
- Michener, D., 2000. The bees of the world. Johns Hopkins Univ. Press, Baltimore, MA, USA.
- Moreira, J., Zama, U., Lino-Neto, J., 2004. Release, behaviour and phylogenetic significance of spermatozoa in bundles in the seminal vesicle during sexual maturation in Aculeata Hymenoptera). Brazilian Journal of Morphological Sciences, 21: 185-189.
- Moure, J.S., 2004. Duas espécies novas de Plebeia Schwarz do Brasil (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). Revista Brasileira de Entomologia, 48(2): 199-202.
- Neff, J. L. & Simpson, B. B. 1993. Bees, pollination systems and plant diversity. In: La Salle, J. & I. D. Gauld (Eds.), Hymenoptera and Biodiversity, CAB International, Wallingford. pp. 143-167.
- Noll, F.B., 2002. Behavioral phylogeny of corbiculate Apidae (Hymenoptera: Apoidea), with special reference to social behavior. Cladistics. 18: 137-153.

- O`Toole, C., 1992. Diversity of native bees and agroecosystems., eds. In: La Salle & I. D. Gauld, Hymenoptera Biodiversity, UK PP. 277-293.
- Oguma, Y., Kurokawa, H., 1984. The least cell number of first spermatocytes per cyst found in *Drosophila kanekoi*. Jap. J. Genet., Tokio, 59, 263-265.
- Plant, J.D. & Paulus, H.F., 1987. Comparative morphology of the postmentum of bees (Hymenoptera: Apoidea) with special remarks on the evolution of the lorum. Z. Zool. Syst. Evol. Forsc. 25: 81-103.
- Prentice, M., 1991. Morphological analysis of the tribes of Apidae. In: Smith D. R. (ed.). Diversity in the genus *Apis*. Westview Press, Boulder, Colorado, pp. 71-78.
- Quicke, D.J.L., Ingram, S.N., Baillie, H.S., Gaitens, P.V., 1992. Sperm structure and ultrastructure in the Hymenoptera (Insecta). Zoologica Scripta, 21: 381-410.
- Raina, A.K., Kingam, T.G. & Giebultowicz, J.M., 1994. Mating-induced loss of Sex pheromone and sexual receptivity in insects with emphasis on *Helicoverpa zea* and *Lymantra dispar*. Arch. Insect Biochem. Phisiol. 25: 317-327.
- Roig-Alsina, A. & Michener, C.D., 1993. Studies of the phylogeny and classification of long tongue bees (Hymenoptera: Apoidea). Univ. Kansas. Sci. Bull. 55: 123-162.
- Ronquist, F., 1999. Phylogeny of the Hymenoptera (Insecta): the state of the art. Zoologica Scripta. 28: 3-11.
- Roubik, D.W., 1978. Competitive interactive between neotropical pollinators and Africanized honey bees. Science. 201: 1030-1032.
- Roubik, D.W., 1980. Foraging behaviour of competing Africanized honey bees and stingless bees. Ecology. 61: 836-845.
- Roubik, D.W., 1982. Ecological impact of Africanized honybees on naive neotropical pollinators. In: P. Joisson (ed) Social insects in the tropics. Paris, Université Paris-Nord. pp. 233-247.
- Schiff, N., Flemming, A.J., Quicke, D.J.L., 2001. Spermatodesmata of the sawflies (Hymenoptera: Simphita): evidences for multiple increases in sperm bundle size. Journal of Hymenoptera Research, 10: 119-125.
- Sheppard, W.S. & McPheron, B.A., 1991. Ribosomal DNA diversity in the Apidae. In: Smith, D. R. (ed.) Diversity in the genus *Apis*. Westview Press, Boulder, CO. pp. 89-102.
- Silveira, F.A, Melo, G.A.R. & Almeida, E.A., 2002. Abelhas Brasileiras: Sistemática e Identificação. Belo Horizonte, IDM Composição e Arte. 253pp.
- Smith, F., 1863. Descriptions of Brazilian honey bees, belonging of the genera *Melipona* and *Trigona*. Transactions of the Entomological Society of London 11: 497-512.
- Snodgrass, R. E., 1978. Anatomy of the honey bees. Cornel University Press, Londres, 334p.

- Tasei, J., Asano, S., Ohtsubo, T., Kamomae, M., Gotoh, T., 1998. Relationship between aging, mating and sperm production in captive *Bombus terrestris*. *Journal of Apicultural*, 37: 107-113.
- Van Benthem, F.D.J., Imperatriz-Fonseca, V. L. e Vethuis, H.H.W., 1995. Biology of the stingless bee *Plebeia remota* (Holmberg): observations and evolutionary implications. *Insectes Souciaux*, 42: 71-87.
- Wheeler, D.E. & Krutzsch, P.H., 1992. Internal reproductive system in adult males of genus *Camponotus* (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Morphology*, 211: 307-317.
- Winston, M.L. & Michener, C.D., 1977. Dual origin of highly social behavior among bees. *Proceedings of the National Academy Science of United States of America*. 74: 1135-1137.
- Witter, S., Blochtein, B., Andrade, F., Wolff, L.F., Imperatriz-Fonseca, V.L., 2007. Meliponicultura no Rio Grande do Sul: Contribuição sobre a Biologia e conservação de *Plebeia nigriceps* (Friese, 1901) (Apidae, Meliponini). *Biosci. p*, 134-140.
- Zama, U., Moreira, J., Bão, S.N., Campos, L.A.O., Dolder, H. & Lino-Neto, J., 2007. Morphology of Testicular and Post-Testicular Spermatozoa in *Microstigmus arlei* Richards, 1972 and *M. nigrophthalmus* Melo., 1992 (Hymenoptera: Apoidea: Pemphredoninae) with phylogenetic consideration. *Arthropod Structure and Development* 36:304-316.