

TALITTA GUIMARÃES SIMÕES

EFEITO DO HORMÔNIO JUVENIL III EM FÊMEAS E
MACHOS de *Melipona quadrifasciata* (HYMENOPTERA,
APIDAE): CARACTERÍSTICAS MORFOMÉTRICAS

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
2011

TALITTA GUIMARÃES SIMÕES

EFEITO DO HORMÔNIO JUVENIL III EM FÊMEAS E MACHOS DE
Melipona quadrifasciata (HYMENOPTERA, APIDAE):
CARACTERÍSTICAS MORFOMÉTRICAS

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: 22 de fevereiro de 2011.

Prof^a. Georgina Maria de Faria Mucci

Prof^a. Luciane Cristina de Oliveira Lisboa
(Coorientadora)

Prof. Lúcio Antônio de Oliveira Campos
(Orientador)

*Aos professores que participaram da minha formação,
sendo fonte de conhecimento e inspiração...*

... Dedico ...

*C*ada dia que vivo mais me convenço de que o desperdício da vida está no amor que não damos, nas forças que não usamos, na prudência egoísta que nada arrisca, e que, esquivando-se do sofrimento, perdemos também a felicidade".

*C*arlos Drummond de Andrade

E o seu problema tem solução, então não há com que se preocupar. E se o seu problema não tem solução, toda preocupação será em vão."

*P*róverbio Tibetano

*N*ão existe caminho para a felicidade. A felicidade é o caminho."

*M*ahatma Gandhi

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar nos caminhos corretos.

Ao professor Lúcio Campos, pela orientação, amizade, carinho, enorme paciência e por ter me concedido a oportunidade de fazer parte de seu grupo de trabalho, o que é para mim motivo de enorme orgulho e satisfação.

À professora Luciane Lisboa, minha co-orientadora, pela amizade e apoio, por ser um exemplo de humildade, paciência e sucesso, pela força quando as coisas não davam certo, pelas aulas de artesanato para relaxar e, claro, pelo imenso otimismo e bom humor.

À professora Georgina Mucci, por ser minha orientadora na graduação e na vida, pela amizade que levo sempre comigo, pelos bons momentos de trabalho, por me ajudar a crescer profissionalmente e acreditar nos meus sonhos. Não estaria aqui se não fosse por você!

Ao professor José Eduardo Serrão, meu co-orientador, pela paciência, ajuda e pelas boas idéias.

Ao Riudo Paiva e à Uyrá Zama, pelos ensinamentos, idéias, discussões, companheirismo e ajuda nos trabalhos.

À Andreia Arantes Borges, por permitir a utilização de seu trabalho.

A todos os professores da graduação, em especial ao Ely Junior, à Renata Tostes e ao Antônio Daniel, pelo incentivo e motivação.

A todos os professores do mestrado, por contribuir com meu crescimento, em especial às professoras Terezinha Della Lucia, Silvia Pompolo e Denilce Menezes.

Ao professor Edmilson Amaral, pelo otimismo e pelas sugestões.

À Margarete Werneck, por me ajudar na adaptação em Viçosa e na UFV.

Aos colegas da entomologia, pelos produtivos grupos de estudo e, é claro, pelos momentos de descontração nas festas e churrascos.

Aos colegas do Apiário, Bianca, Bruna, Hugo, Lila, Paula, Riudo, Samira, Fábio, Puker, Hudson, Rodrigo, Prof. Alfredo, Profa. Maria Augusta, Prof. Weyder e os agregados, Anderson e Helder, pela ajuda, boa convivência, bons conselhos e por tornar o dia-a-dia mais agradável.

Aos técnicos do Apiário, Ferreira, Gaiola, Lulu, Osmar, Toninho e, em especial, Cabrito e Íris, pela imensa ajuda, amizade e bom humor.

Ao Prof. Alfredo Huertas, pelas oportunidades de atuar em suas disciplinas.

À minha mãe, pelo apoio e amor incondicional, pelos sacrifícios feitos em nome da minha felicidade e por acreditar nos meus sonhos.

Ao meu pai, por me proporcionar esta oportunidade e por se orgulhar de mim.

Ao meu irmão, pela amizade.

Aos queridos amigos, Bianca, Camilinha Camargo, Camilinha Talarico, Gabi, Glau, Igor, Jocasta, Juliana, Luíza, Marcela, Maria Eduarda, Michele, Natalia, Nísia, Paula Marques, Paula Netto, Ramon, Riudo e Wivi, pelos bons momentos juntos, pelo carinho, atenção, compreensão e por nunca terem me deixado de lado.

Ao Hany, pelo amor, carinho, companheirismo e paciência.

Às secretárias da entomologia, Miriam, Paula e Sylvania, que sempre me ajudaram com muita boa vontade.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia, pela oportunidade.

A CAPES, pelo apoio financeiro.

Enfim, agradeço a todos que me ajudaram neste período. Muito Obrigada!

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABELAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
I. INTRODUÇÃO	1
II. MATERIAIS E MÉTODOS	4
II.1. Produção de machos diplóides.....	4
II.2. Tratamento com Hormônio Juvenil III	5
II.3. Análises Morfométricas.....	6
III. RESULTADOS	10
III.1. Produção de machos diplóides	10
III.2. Tratamento com Hormônio Juvenil III	10
III.3. Análises Morfométricas	13
IV. DISCUSSÃO	22
V. BIBLIOGRAFIA	25

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema mostrando diferentes regiões e estruturas do corpo de uma operária de <i>Melipona quadrifasciata</i>	7
Figura 2 – Resultados da aplicação tópica de HJ em larvas das caixas que estavam produzindo machos diplóides	11
Figura 3 - Resultados da aplicação tópica de HJ em larvas das caixas que estavam produzindo machos haplóides	11
Figura 4 – Fotografia dos indivíduos	12
Figura 5 – Diferenciação de grupos entre os tratamentos, de acordo com o comprimento do aparelho bucal	16
Figura 6 – Diferenciação de grupos entre os tratamentos, de acordo com a distância intertégula	17
Figura 7 – Diferenciação de grupos entre os tratamentos, de acordo com o comprimento da mandíbula	18
Figura 8 – Diferenciação de grupos entre os tratamentos, de acordo com a largura da tíbia	19

Figura 9 – Diferenciação de grupos entre os tratamentos, de acordo com a largura do
olho composto20

Figura 10 – Diferenciação de grupos entre os tratamentos, de acordo com a distância
interorbital21

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Tamanho médio $\pm$ erro padrão de cada variável para cada tratamento, em milímetros	14
Tabela 2 – Medidas anatômicas mais representativas para cada CP	15

RESUMO

SIMÕES, Talitta Guimarães, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2011.
Efeito do hormônio juvenil III em fêmeas e machos de *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae): características morfométricas. Orientador: Lúcio Antônio de Oliveira Campos. Coorientadores: Luciane Cristina de Oliveira Lisboa e José Eduardo Serrão.

Abelhas do gênero *Melipona* possuem mecanismo de determinação das castas trofogenético. O nível de hormônio juvenil (HJ) em certas fases do desenvolvimento larval determina as características das fêmeas. Fêmeas e machos diplóides de *Melipona quadrifasciata* que, na fase pré defecante, recebem aplicação tópica de HJ desenvolvem características morfológicas externas de rainha. Este trabalho baseou-se em dados morfométricos para investigar o efeito do HJ III no desenvolvimento de machos haplóides e diplóides de *Melipona quadrifasciata* e comparar estes efeitos com os efeitos já conhecidos em fêmeas desta espécie. Foram utilizados dez indivíduos de cada tratamento, sendo operárias, rainhas naturais, rainhas produzidas a partir da aplicação tópica de HJ, machos haplóides naturais, machos haplóides que receberam aplicação de HJ mas não se diferenciaram, machos haplóides que receberam aplicação tópica de HJ e desenvolveram características de rainha (QLM – Queen-Like Male), machos diplóides naturais, machos diplóides que receberam aplicação tópica de HJ mas não se diferenciaram e QLM diplóides. As medidas anatômicas analisadas foram largura do olho composto, largura da tibia, comprimento do aparelho bucal, comprimento da mandíbula, distância intertégula e distância interorbital. Todas as medidas possibilitaram a separação dos indivíduos em grupos, no entanto o comprimento do aparelho bucal foi a medida com diferenças mais significativas entre os tratamentos. Rainhas naturais e rainhas produzidas a partir do efeito do HJ possuem medidas semelhantes. QLM haplóides e diplóides apresentaram as variáveis medidas com tamanhos semelhantes as das rainhas naturais e produzidas a partir da aplicação tópica de HJ. Operárias se mostraram mais semelhantes aos machos do que as rainhas quanto a maior parte das maioria das variáveis medidas e, em geral, as operárias apresentam médias de tamanho maiores e as rainhas menores. Macho diplóides e haplóides naturais possuem medidas próximas, o que não permite a diferenciação visual desses indivíduos.

Os dados corroboram que o HJ é o principal responsável pela diferenciação das características específicas de cada castas, assim, em altos níveis ele acarreta o aparecimento das características de rainha, independente do genótipo.

ABSTRACT

SIMÕES, Talitta Guimarães, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, february, 2011.
Effect of juvenile hormone III in females and males of *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae): morphometric characteristics. Adviser: Lúcio Antônio de Oliveira Campos. Co-advisers: Luciane Cristina de Oliveira Lisboa and José Eduardo Serrão.

The bees of *Melipona* genus have trofogenetic mechanism to determination of caste. The level of juvenile hormone (JH) in several stages of larval development determines the characteristics of females. Diploid males and females of *Melipona quadrifasciata* that, in last instar larvae, received topical JH develop external morphological characteristics of queen. This work was based on morphometric data to investigate the effect of JH III in the development of haploid and diploid males of *Melipona quadrifasciata* and compare morphological characteristics of them with morphological characteristics already known in females of this species. Ten individuals were used for each treatment; workers, natural queens, queens produced from the topical application of JH, natural haploid males, haploid males received application of JH but did not differ, haploid males that received topical application of JH and developed features of queens (QLM - Queen-Like Male), natural diploid males, diploid males that received topical application of JH but did not differ and diploid QLM. The anatomical averages analyzed were: width of compound eyes, width of tibia, length of mouthparts, length of mandible, intertegule distance and interorbit distance. All averages allowed the separation of individuals into groups. However, the lengths of the mouthpart averages were differences most significantly between treatments. Natural queens and queens produced from the effect of JH had similar averages. Diploid and haploid QLM showed average variables with similar size in the natural queens and queens produced from topical application of JH. Workers were more similar to males than the queens in the most averages variables and, in general, the workers presented average size more than queens. Natural diploid and haploid males had close averages, which does not allow visual differentiation of these individuals. The dates confirm that the JH is primarily responsible for the differentiation of specific characteristics of each

caste, and, in the high levels of it causes the appearance of the characteristics of queen, independent on genotype.

I. INTRODUÇÃO

Segundo Kerr (1948), as abelhas do gênero *Melipona* possuem mecanismo de determinação das castas trofogenético, ou seja, ovos que originam fêmeas são de dois tipos, geneticamente diferentes: duplo heterozigotos para os dois *loci* envolvidos no processo de determinação das castas, que quando adequadamente alimentadas dão origem a rainhas, e homozigotos para um ou para dois *loci*, que originam operárias (Kerr *et al.*, 1966; Kerr *et al.*, 1975; Kerr *et al.*, 1996).

O hormônio juvenil (HJ) está envolvido no processo de determinação das castas e é seu nível em certas fases do desenvolvimento larval que determina as características das fêmeas de abelhas (Asencot & Lensky, 1988; Hartfelder *et al.*, 2006). Wirtz (1973) mostrou que, em *Apis mellifera*, este hormônio desempenha um papel importante na determinação das características morfológicas externas derivadas dos discos imaginais, assim, larvas femininas com altos níveis de HJ desenvolvem características de rainha. Nas abelhas sem ferrão, Campos *et al.* (1975) mostraram que a aplicação tópica de HJ sintético em larvas femininas na fase pré defecante pode produzir até 100% de rainhas, acredita-se então que a alimentação diferencial (associada a homozigose ou heterozigose nos dois *loci* envolvidos no processo de diferenciação das castas, no gênero *Melipona*) levaria a um padrão de síntese de HJ típico de cada uma das castas. O nível de HJ, por sua vez, regularia uma atividade diferencial de genes que levariam ao fenótipo típico da casta correspondente (Judice *et al.*, 2006).

Camargo (1977) demonstrou que, em machos diplóides de *Melipona quadrifasciata*, larvas na fase pré defecante tratadas com HJ sintético desenvolvem características morfológicas externas de rainha.

Em abelhas, como na maioria dos Hymenoptera, ovos fertilizados produzem fêmeas que são diplóides ($2n$) e ovos não fertilizados dão origem aos machos haplóides (n) (Michener, 2000). Em populações endogâmicas, entretanto, ovos fertilizados podem se desenvolver em machos diplóides, isto ocorre porque, segundo Whiting (1943), o sexo nos Hymenoptera é determinado por uma série de alelos em um único *locus* gênico, que ficou então conhecido como *locus* CSD (Complementary Sex Determination), o *locus* CSD pode estar em heterozigose, hemizigose ou homozigose, desenvolvendo, respectivamente, fêmeas, machos haplóides e machos diplóides.

Em *Melipona quadrifasciata* cerca de 50% das colônias em que a rainha acasala-se com um irmão produzem machos diplóides e, neste caso, nasce em média um macho diplóide para cada operária. Machos diplóides possuem desenvolvimento pré imaginal normal, no entanto, após a emergência a longevidade máxima é de 17 dias, contrastando com a de machos haplóides e operárias, de 30 e 190 dias, respectivamente (Camargo, 1982). Em condições naturais os acasalamentos devem ser ao acaso, sendo difícil a ocorrência de machos diplóides.

Machos haplóides e diplóides de *Melipona quadrifasciata* assemelham-se quanto à aparência externa (Camargo, 1979), podendo ser distinguidos principalmente por análises citogenéticas. Estudos morfológicos mostram também que eles diferem quanto ao comprimento dos testículos (menor nos machos diplóides, em comparação aos dos machos haplóides) e pela largura do tórax (maior em machos diplóides) (Irsigler, 2002).

O uso da comparação de características morfológicas tem sido uma importante ferramenta para diferenciar espécies, subespécies ou ainda indivíduos de sexo ou castas diferentes dentro de uma mesma espécie. Assim, a morfometria pode ser tão eficaz

quanto técnicas de biologia molecular e citogenética (Francoy & Imperatriz-Fonseca, 2010).

Este trabalho utilizou dados morfométricos para analisar o efeito do HJ III no desenvolvimento de machos haplóides e diplóides de *Melipona quadrifasciata* e comparar estes com os efeitos já conhecidos em fêmeas desta espécie.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção do material

O material foi obtido a partir de colônias de *Melipona quadrifasciata* mantidas no Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa.

II.1. Produção de machos diplóides

Favos de cria nascente de colônias de *Melipona quadrifasciata* que estavam produzindo machos haplóides foram retirados, colocados em placas de Petri forradas com papel de filtro e mantidos em incubadora a 28°C. Diariamente os favos de cria foram desoperculados para a retirada e separação dos adultos emergentes, os quais foram alimentados com mel de *Apis mellifera* diluído em água e pólen fermentado (Camargo, 1974).

Rainha e macho sexualmente maduros de uma mesma colônia foram colocados em uma pequena caixa de madeira de 14 X 8 X 5,5 cm com tampa de vidro e deixados em contato até ocorrer a cópula.

Foram utilizadas duas colônias para a retirada de favos de cria, realizados oito cruzamentos entre machos e rainhas irmãos para cada colônia, totalizando 16 cruzamentos.

Rainhas fecundadas foram marcadas e transferidas para placas de Petri, forradas com papel de filtro, com alimentadores e algumas operárias nutrizes. As placas foram mantidas em incubadora por 5 a 10 dias, sendo adicionadas operárias nutrizes todos os

dias. Após este período, a rainha e as operárias foram transferidas para caixas de madeira de 16 X 16 X 13 cm, contendo cerume. As colônias foram providas diariamente de alimento e operárias nutrizes, durante cerca de um mês. Quando as rainhas se tornaram fisogástricas foram transferidas para colônias em boas condições, previamente orfanadas.

Após iniciada a postura da rainha foi retirado um favo de cria com larvas pós defecantes de cada colônia para a análise citogenética. Para essa análise foi utilizado o gânglio cerebral, de acordo com Imai *et al.* (1988): as larvas foram dissecadas e os gânglios cerebrais dos machos (identificados por suas gônadas) retirados e mantidos em solução hipotônica-colchicina, na concentração de 0,005 por uma hora, posteriormente, os gânglios cerebrais foram transferidos para lâmina, lavados com o fixador I (1,5 ml de ácido acético, 1,5 ml de etanol e 2 ml de água), realizada a dissociação do tecido ganglionar e aplicadas algumas gotas do fixador II (proporção de 1:1 de ácido acético e etanol) e, em seguida, o fixador III (ácido acético glacial); as lâminas foram deixadas por 24 horas em temperatura ambiente e protegidas da luz para total evaporação dos fixadores e, decorrido este tempo, foram observadas ao microscópio de contraste de fase para a contagem dos cromossomos metafásicos.

II.2. Tratamento com Hormônio Juvenil III

Foram retiradas larvas pré defecantes de favos de cria das colônias que estavam produzindo machos diplóides e de colônias produzindo machos haplóides, as quais foram transferidas para placas de Petri forradas com papel de filtro. Cada larva recebeu, topicamente, 2 µl de solução de HJ III (SIGMA-ALDRICH), diluído em acetona na

concentração de 1 µg/µl, com o auxílio de um microcapilar (DRUMMOND), com volume aferido em 1 µl. O grupo controle foi constituído por larvas do mesmo ínstar, tratadas topicamente com 2µl de acetona.

As larvas dos grupos experimental e controle foram transferidas para cúpulas feitas com cera de *Apis mellifera*, montadas em placas de cultura de fundo chato com 24 poços e mantidas em incubadora a 28°C. As cúpulas de cera foram trocadas constantemente para evitar o acúmulo de fezes.

Após a pupação já era possível identificar algumas características que distinguiam, sob diversos aspectos, os indivíduos: machos de fêmeas, rainhas de operárias e machos típicos (haplóides ou diplóides) dos que apresentam características de rainhas, sendo estes denominados QLM (Queen-Like Male).

II.3. Análises Morfométricas

Cerca de três a seis dias após emergirem, dez indivíduos de cada tratamento: rainhas naturais, operárias, rainhas produzidas a partir da aplicação de HJ (denominadas rainha HJ), machos haplóides naturais, machos haplóides que receberam aplicação de HJ mas não se diferenciaram (denominados macho haplóide HJ), QLM haplóides, machos diplóides naturais, machos diplóides que receberam aplicação de HJ mas não se diferenciaram (denominados macho diplóide HJ) e QLM diplóides foram fotografados ao microscópio estereoscópio e foram feitas medidas de algumas de suas estruturas externas (Figura 1): distância interorbital, distância intertégula, largura do olho composto, comprimento do aparelho bucal, comprimento da mandíbula e largura da tíbia.

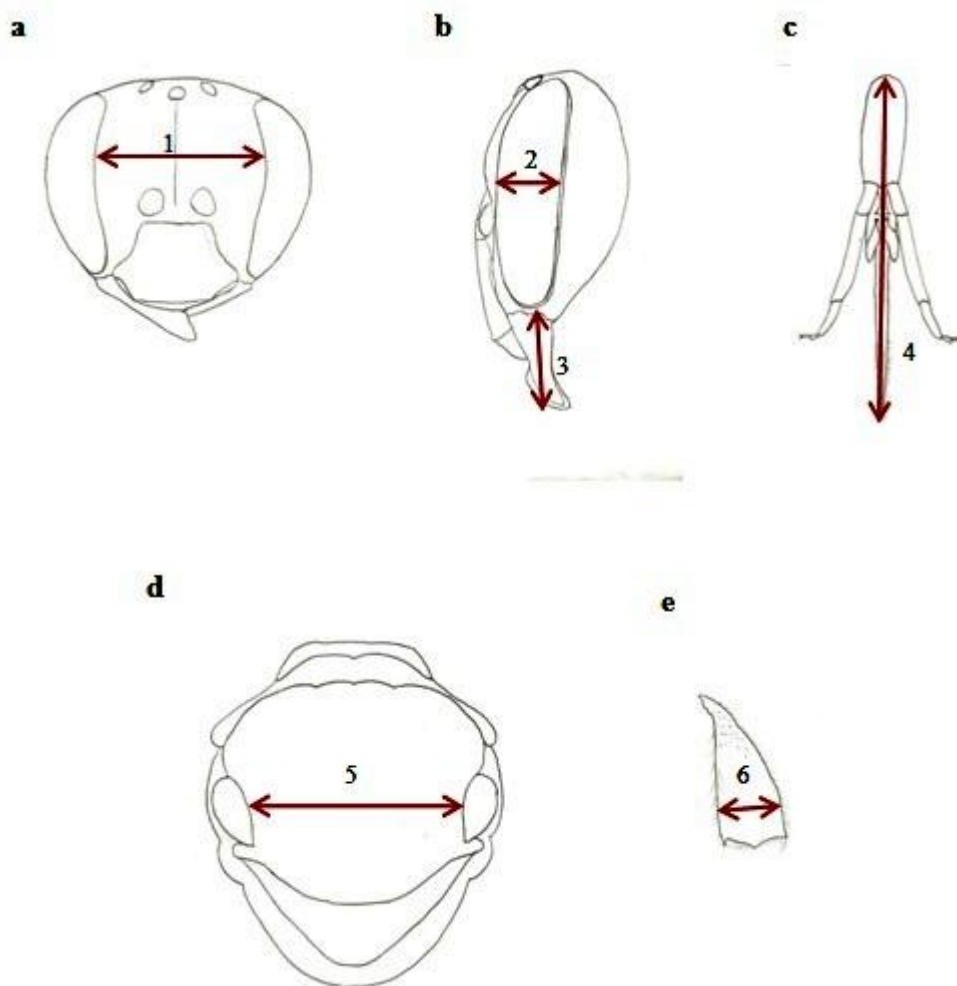


Figura 1- Esquema mostrando diferentes regiões e estruturas do corpo de uma operária de *Melipona quadrifasciata*. a) cabeça, onde foi medida a distância interorbital (seta 1); b) cabeça, vista lateral, onde foram medidas a largura do olho composto e o comprimento da mandíbula (setas 2 e 3, respectivamente); c) aparelho bucal, que foi medido desde o premento até a extremidade da glossa (seta 4); d) tórax, onde foi medida a distância intertégula (seta 5); e) tíbia, medindo sua largura como indicado (seta 6). Este esquema foi feito baseado nas pranchas de Camargo *et al.* (1967).

A distância interorbital foi medida entre os limites internos dos olhos compostos, no ponto mais côncavo entre eles. A distância intertégula foi medida traçando uma linha sobre o mesoscuto, entre as tégulas, em sua região mais convexa. A largura do olho composto foi medida traçando uma linha horizontal na altura da metade de seu comprimento. O comprimento do aparelho bucal foi medido do premento até o final do comprimento da glossa. O comprimento da mandíbula foi medido desde sua articulação até o seu ponto mais extremo. A largura da tíbia foi medida traçando uma linha horizontal em sua extremidade mais alargada, aproximadamente a 0,6 mm da borda.

As medidas foram realizadas com o auxílio do Programa Image-Pro Plus.

As análises foram realizadas no software SAS programa 9.0 (SAS Institute 2002), para a realização dos testes de homogeneidade de variâncias (teste de Levene, teste de Brown e Forsythe e teste de Bartlett), análise multivariada de componentes principais, análise de variância (ANOVA) e teste de médias das variáveis, comparadas pelo teste de Duncan em nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$).

As variáveis (distância interorbital, distância intertégula, largura do olho composto, comprimento do aparelho bucal, comprimento da mandíbula e largura da tíbia) foram analisadas em conjunto, por meio da análise de Componentes Principais (CPs), para gerar supervariáveis que pudessem representar a variação nas medidas anatômicas para os diferentes tratamentos. Cada CP representa o conjunto de medidas anatômicas com maior covariância entre si, permitindo agrupar as variáveis e analisá-las em conjunto. Os componentes principais gerados na análise podem ser tratados como índices, que agregam a informação da variação em cada medida anatômica, de modo proporcional à sua importância na diferenciação dos grupos de abelhas. Os valores destes componentes são gerados por equações cujos coeficientes correlacionam as

variáveis entre si e são proporcionais à importância de cada uma delas para a variação geral.

III. RESULTADOS

III.1. Produção de machos diplóides

Do total de cruzamentos realizados aproximadamente 50% das rainhas morreram ou foram substituídas nas colônias, cerca de 25% realizaram postura mas não produziram machos diplóides e aproximadamente 25% foram aceitas, realizaram postura e produziram machos diplóides.

III.2. Tratamento com HJ III

Larvas das caixas que estavam produzindo machos diplóides, tratadas com 2 μ l de solução de HJ III diluído em acetona, deram origem a 34% de rainhas HJ, 14% de QLM diplóides, 28% de machos diplóides HJ e 24% de mortos ou deformados (Figura 2).

Larvas das caixas que estavam produzindo machos haplóides, tratadas com 2 μ l de solução de HJ III diluído em acetona, deram origem a 6% de rainhas HJ, 11,5% de QLM haplóides, 23,5% de machos haplóides HJ e 59% de mortos ou deformados (Figura 3).

Entre os machos sobreviventes, a resposta ao efeito do HJ foi igual, em ambos haplóides e diplóides 67% mantiveram as características normais e 33% tornaram-se QLM.

Indivíduos dos diferentes tratamentos são apresentados na Figura 4.

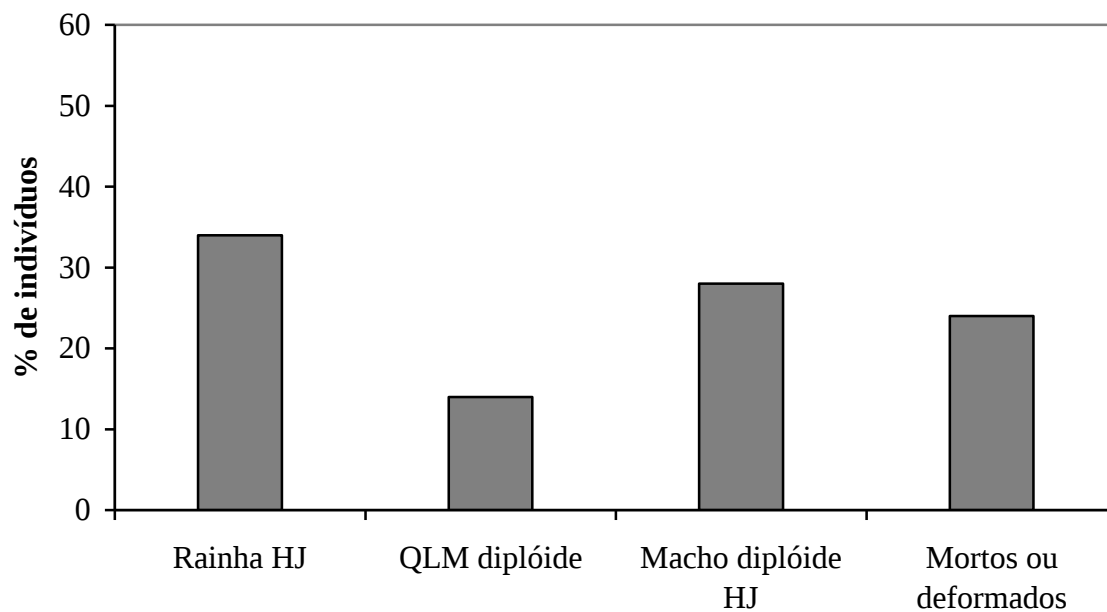


Figura 2 - Resultados da aplicação tópica de HJ em larvas das caixas que estavam produzindo machos diplóides.

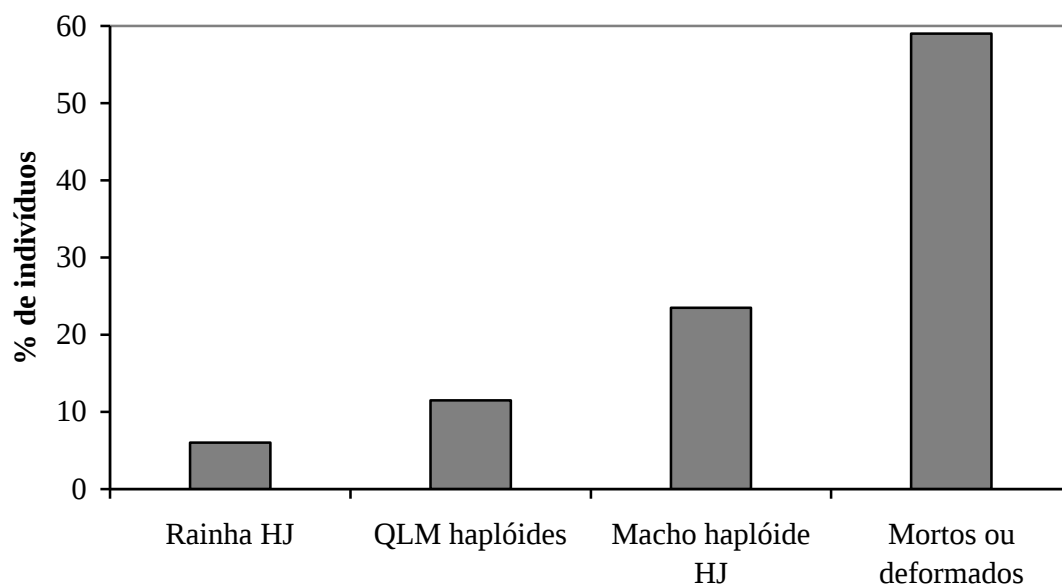


Figura 3 - Resultados da aplicação tópica de HJ em larvas das caixas que estavam produzindo machos haplóides.



Figura 4 – Fotografia dos indivíduos. a) operária; b) rainha natural; c) rainha produzida pelo efeito da aplicação de HJ; d) macho haplóide natural; e) macho haplóide que recebeu aplicação de HJ mas não se diferenciou de machos haplóides naturais; f) QLM haplóide produzido pelo efeito da aplicação de HJ; g) macho diplóide natural; h) macho diplóide que recebeu aplicação de HJ mas não se diferenciou de machos diplóides naturais; i) QLM diplóide produzido pelo efeito da aplicação de HJ.

III.3. Análises Morfométricas

Machos adultos são diferenciados de fêmeas a partir da visualização da genitália sob lupa. Rainhas e operárias podem ser distinguidas visualmente pelo tamanho do olho composto (menor nas rainhas) e proporções corporais, como a relação entre tamanho da cabeça, do tórax e do abdômen (rainhas possuem cabeça e tórax menor e abdômen maior). Então, comparavam-se os machos com fêmeas das duas castas, aqueles que possuíam olhos compostos e proporções corporais de operárias não responderam ao HJ e os que se aproximavam morfologicamente às rainhas responderam ao HJ, sendo denominados QLM.

Todas as variáveis mostraram-se estatisticamente homogêneas em cada medida anatômica para cada tratamento. O valor médio de cada medida anatômica para cada tratamento está apresentado na tabela 1.

Os três primeiros componentes principais gerados (CP1, CP2 e CP3) representam, em conjunto, 97% da variação que ocorre no grupo de variáveis (medidas anatômicas). O CP1 foi o componente mais representativo (responde por 86% da variação) e representa as medidas observadas que possuem maior capacidade de discriminar os grupos de abelhas estudados.

A análise dos valores de coeficientes de cada CP permite distinguir qual o conjunto de variáveis representado por cada componente principal. O CP1 é representado principalmente pelo comprimento do aparelho bucal, o CP2 é representado principalmente pela distância intertégula, comprimento da mandíbula, largura da tíbia e largura do olho composto, respectivamente, e o CP3 é representado principalmente pela distância interorbital (Tabela 2).

Tabela 1 – Tamanho médio $\pm$ erro padrão de cada variável para cada tratamento, em milímetros.

Tratamento	Operária	Rainha natural	Rainha HJ	Macho haplóide natural	Macho haplóide HJ	QLM haplóide	Macho diplóide natural	Macho diplóide HJ	QLM diplóide
Medidas									
Comp. do ap. bucal	5,1011 $\pm$ 0,27 (BC)	4,0746 $\pm$ 0,16 (DE)	3,6971 $\pm$ 0,21 (E)	5,4602 $\pm$ 0,09 (AB)	5,9061 $\pm$ 0,09 (A)	4,5402 $\pm$ 0,24 (CD)	5,2721 $\pm$ 0,19 (B)	5,2561 $\pm$ 0,27 (B)	4,5695 $\pm$ 0,18 (CD)
Distância intertégula	2,9665 $\pm$ 0,03 (AB)	2,5845 $\pm$ 0,02 (E)	2,6202 $\pm$ 0,05 (DE)	2,9027 $\pm$ 0,05 (ABC)	2,9679 $\pm$ 0,04 (AB)	2,6787 $\pm$ 0,06 (DE)	3,0693 $\pm$ 0,03 (A)	2,7782 $\pm$ 0,08 (CD)	2,8659 $\pm$ 0,09 (BC)
Comp. da mandíbula	1,7307 $\pm$ 0,02 (A)	1,3257 $\pm$ 0,01 (C)	1,4194 $\pm$ 0,05 (BC)	1,4215 $\pm$ 0,02 (BC)	1,3556 $\pm$ 0,02 (C)	1,1906 $\pm$ 0,03 (D)	1,4779 $\pm$ 0,03 (B)	1,3448 $\pm$ 0,04 (C)	1,3672 $\pm$ 0,04 (C)
Larg. da tibia	1,1646 $\pm$ 0,01 (A)	0,7636 $\pm$ 0,01 (EF)	0,7474 $\pm$ 0,02 (F)	0,9263 $\pm$ 0,01 (C)	0,8711 $\pm$ 0,02 (CD)	0,8256 $\pm$ 0,03 (DE)	1,0138 $\pm$ 0,02 (B)	0,9412 $\pm$ 0,02 (C)	0,8259 $\pm$ 0,02 (DE)
Larg. do olho comp.	0,9011 $\pm$ 0,02 (A)	0,5778 $\pm$ 0,01 (D)	0,6234 $\pm$ 0,05 (D)	0,9111 $\pm$ 0,02 (A)	0,8566 $\pm$ 0,02 (AB)	0,7444 $\pm$ 0,04 (C)	0,8885 $\pm$ 0,02 (AB)	0,7564 $\pm$ 0,02 (C)	0,8153 $\pm$ 0,01 (BC)
Distância interorbital	2,6337 $\pm$ 0,01 (A)	2,4395 $\pm$ 0,02 (B)	2,4289 $\pm$ 0,04 (B)	2,2242 $\pm$ 0,02 (D)	2,2547 $\pm$ 0,02 (CD)	2,1512 $\pm$ 0,02 (D)	2,4253 $\pm$ 0,02 (B)	2,3489 $\pm$ 0,02 (BC)	2,2346 $\pm$ 0,06 (D)

Linhas com mesma(s) letra(s) não tem diferença significativa (F=12,22; F=8,61; F=17,36; F=27,94; F=19,70; F=18,52)

Tabela 2 – Medidas anatômicas mais representativas para cada CP

CP1	CP2	CP3
Comprimento do aparelho bucal	Distância intertégula	Distância interorbital
	Comprimento da mandíbula	
	Largura da tíbia	
	Largura do olho composto	

Os resultados permitem inferir que o comprimento do aparelho bucal é a medida mais importante para diferenciar esses grupos de abelhas, no entanto, todas as medidas analisadas separadamente permitem esta diferenciação. Então, para entender como cada variável contribui para a diferenciação ou agrupamento dos tratamentos, elas foram analisadas de modo univariado.

Analisando o comprimento do aparelho bucal, os tratamentos foram diferenciados em sete grupos: i) macho haplóide HJ (grupo A); ii) macho haplóide natural (grupo AB); iii) macho diplóide natural e macho diplóide HJ (grupo B); iv) operária (grupo BC); v) QLM haplóide e QLM diplóide (grupo DC); vi) rainha natural (grupo DE); vii) rainha HJ (grupo E) (Tabela 1 e Figura 5).

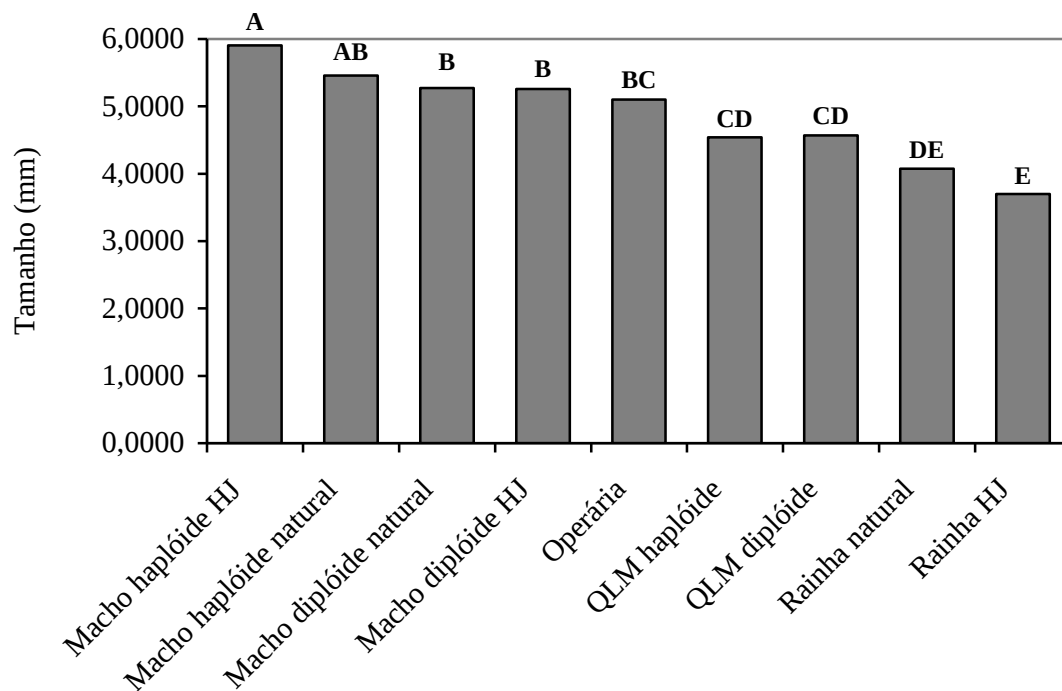


Figura 5 – Diferenciação de grupos entre os tratamentos, de acordo com o comprimento aparelho bucal. Barras com mesma(s) letra(s) não tem diferença significativa ($F=12,22$; $n=10$; $P < 0,001$).

Analisando a distância intertégula, os tratamentos foram diferenciados em sete grupos: i) macho diplóide natural (grupo A); ii) macho haplóide HJ e operária (grupo AB); iii) macho haplóide natural (grupo ABC); iv) QLM diplóide (grupo BC); v) macho diplóide HJ (grupo DC); vi) QLM haplóide e rainha HJ (grupo DE); vii) rainha natural (grupo E) (Tabela 1 e Figura 6).

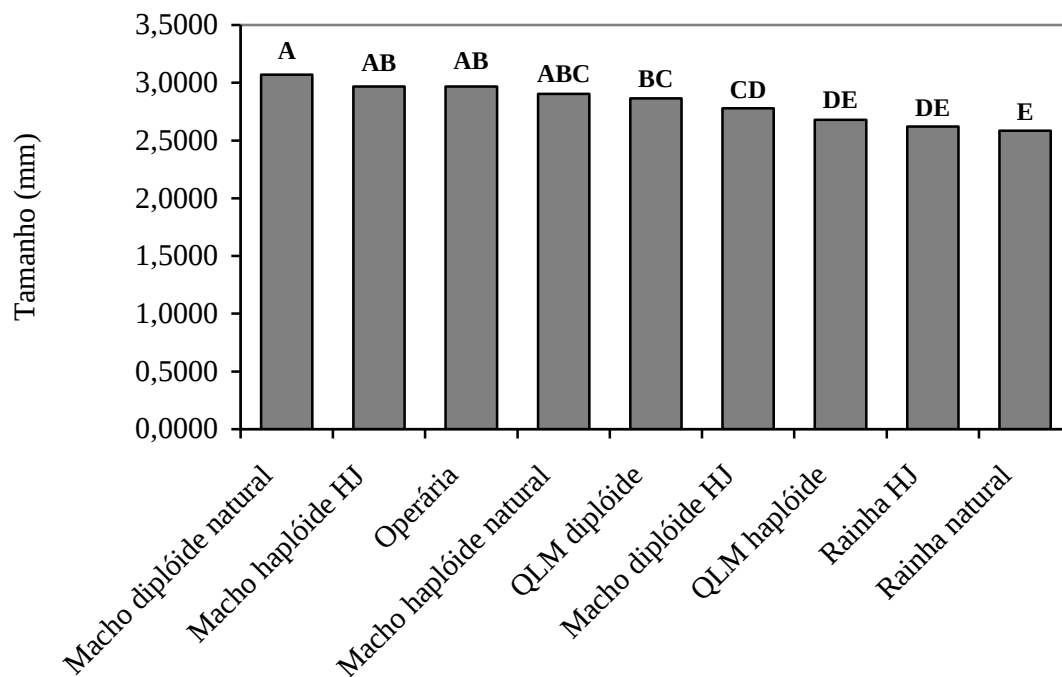


Figura 6 – Diferenciação de grupos entre os tratamentos, de acordo com a distância intertégula. Barras com mesma(s) letra(s) não tem diferença significativa ($F=8,61$; $n=10$; $P < 0,001$).

Analisando o comprimento da mandíbula, os tratamentos foram diferenciados em cinco grupos: i) operária (grupo A); ii) macho diplóide natural (grupo B); iii) macho haplóide natural e rainha HJ (grupo BC); iv) QLM diplóide, macho haplóide HJ, macho diplóide HJ e rainha natural (grupo C); v) QLM haplóide (grupo D) (Tabela 1 e Figura 7).

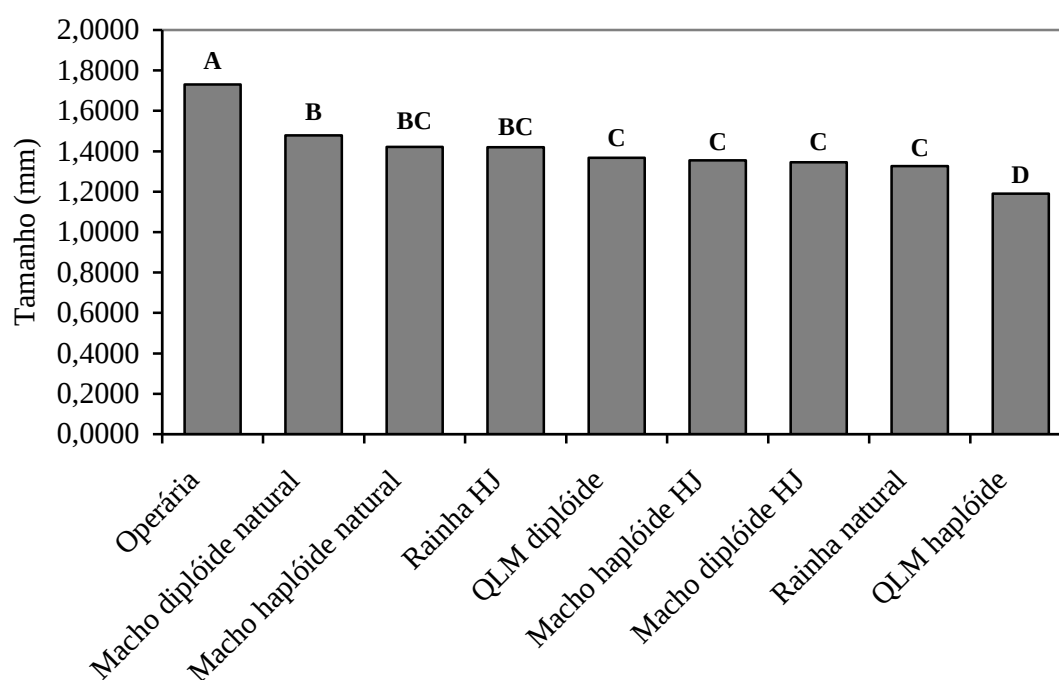


Figura 7 – Diferenciação de grupos entre os tratamentos, de acordo com o comprimento da mandíbula. Barras com mesma(s) letra(s) não tem diferença significativa ($F=17,36$; $n=10$; $P < 0,001$).

Analisando a largura da tíbia, os tratamentos foram diferenciados em sete grupos: i) operária (grupo A); ii) macho diplóide natural (grupo B); iii) macho diplóide HJ e macho haplóide natural (grupo C); iv) macho haplóide HJ (grupo CD); v) QLM haplóide e QLM diplóide (grupo DE); vi) rainha natural (grupo EF); vii) rainha HJ (grupo F) (Tabela 1 e Figura 8).

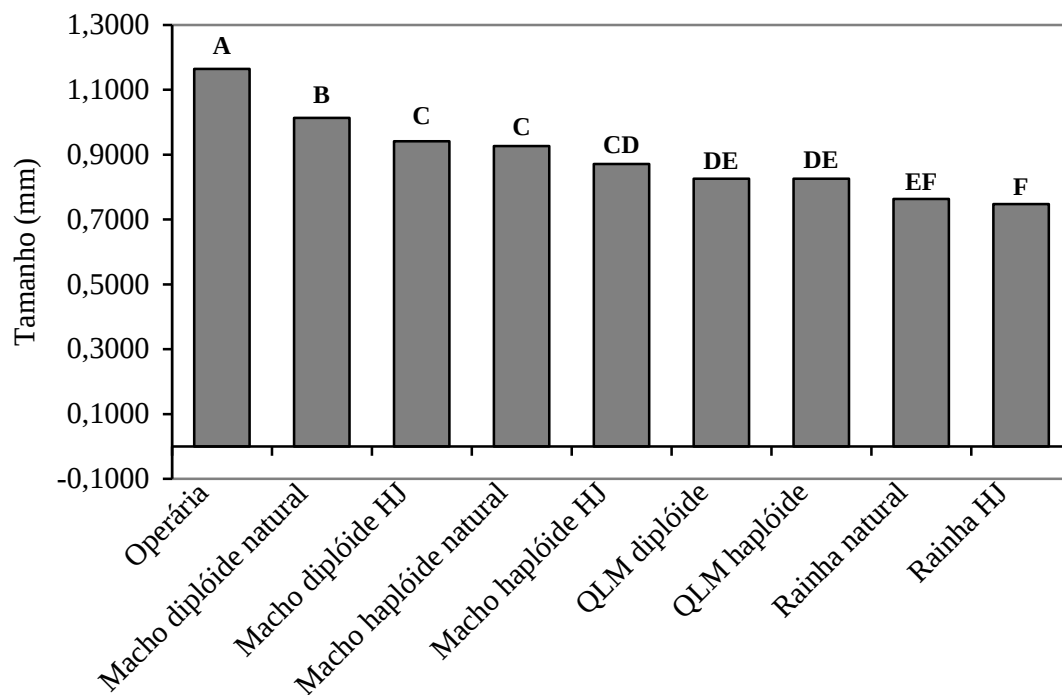


Figura 8 – Diferenciação de grupos entre os tratamentos, de acordo com a largura da tíbia. Barras com mesma(s) letra(s) não tem diferença significativa ($F=27,94$; $n=10$; $P < 0,001$).

Analisando a largura do olho composto, os tratamentos foram diferenciados em cinco grupos: i) macho haplóide natural e operária (grupo A); ii) macho diplóide natural e macho haplóide HJ (grupo AB); iii) QLM diplóide (grupo BC); iv) macho diplóide HJ, QLM haplóide (grupo C); v) rainha HJ e rainha natural (grupo D) (Tabela 1 e Figura 8).

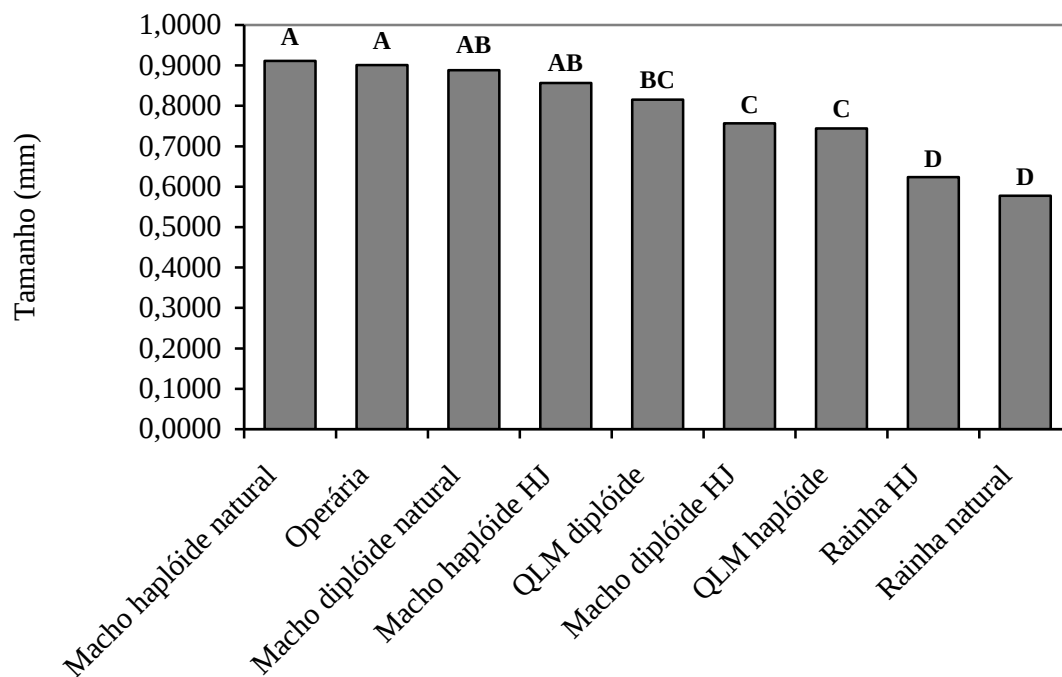


Figura 9 – Diferenciação de grupos entre os tratamentos, de acordo com a largura do olho composto. Barras com mesma(s) letra(s) não tem diferença significativa ($F=19.70$; $n=10$; $P < 0,001$).

Analisando a distância interorbital, os tratamentos foram diferenciados em cinco grupos: i) operária (grupo A); ii) rainha natural, rainha HJ e macho diplóide natural (grupo B); iii) macho diplóide HJ (grupo BC); iv) macho haplóide HJ (grupo CD); v) QLM diplóide, macho haplóide natural e QLM haplóide (grupo D) (Tabela 1 e Figura 10).

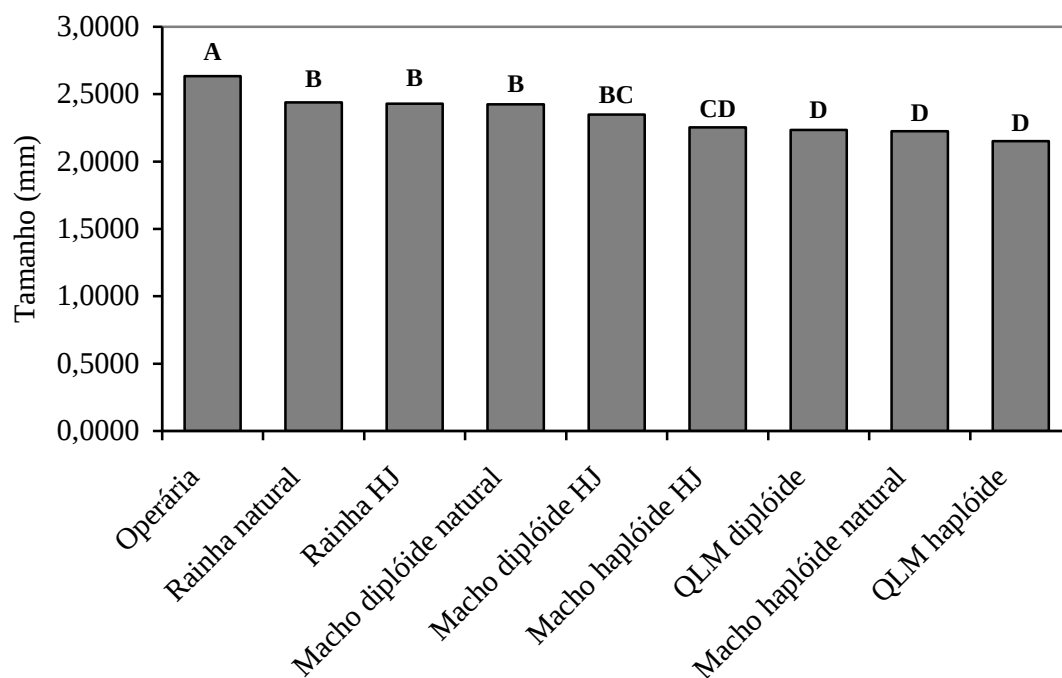


Figura 10 – Diferenciação de grupos entre os tratamentos, de acordo com a distância interorbital. Barras com mesma(s) letra(s) não tem diferença significativa ($F=18,52$; $n=10$; $P < 0,001$).

IV. DISCUSSÃO

O tratamento de larvas no último instar de machos haplóides e diplóides de *Melipona quadrifasciata* com HJ produziu indivíduos com características de rainha, os QLM, mostrando que ambos respondem de forma semelhante ao tratamento com HJ. Camargo (1977) obteve macho diplóides com tais características e atribui essa capacidade exatamente ao fato desses machos serem diplóides.

Segundo Hartfelder (2006), em fêmeas, a dupla heterozigose nos *loci* envolvidos no processo de determinação das castas, associada à alimentação adequada, provoca um aumento nos títulos de HJ casta-específico e é exatamente isto que determina as características de rainhas. Os dados aqui obtidos mostram que o HJ é o principal fator envolvido na determinação das características de rainha, não somente pelo aumento dos títulos endógenos deste hormônio nas larvas femininas duplo heterozigotas como também por sua aplicação tópica em larvas de último instar.

Desta forma, o fato dos machos diplóides possuírem dois conjuntos cromossômicos e poderem possuir os genes responsáveis pela determinação das castas em dupla heterozigose não é o fator preponderante na resposta ao tratamento com HJ. Exceto quanto a medida da distância interorbital, QLM haplóides e diplóides sempre apresentaram as medidas de suas estrutura semelhantes às das rainhas. Além disso, o efeito do HJ na diferenciação das estruturas de machos haplóides e diplóides se mostrou, de maneira geral, semelhante.

Os resultados mostram também que rainhas naturais e rainhas produzidas a partir de larvas femininas tratadas com HJ possuem medidas semelhantes e, como a obtenção de rainhas pode chegar a 100% das larvas que receberam a aplicação de HJ (Campos, *et*

al., 1975), podemos concluir que todas as larvas femininas possuem a capacidade de se tornarem rainhas quando o nível do HJ atinge determinados níveis. Estudos quanto a capacidade destas rainhas de copular e produzir prole viável ainda não são conclusivos. De acordo com Assis *et al.* (dados não publicados), ovários de rainhas produzidas a partir da aplicação de HJ, recém emergidas, apresentam ovários com características aparentemente normais, de acordo com dados morfológicos e ultraestruturais.

Machos diplóides em *Melipona* não ocorrem em condições normais, pois quando são produzidos as operárias da colônia os matam e à rainha, além disso, se eles não forem eliminados pelas operárias, vivem menos que machos haplóides e operárias. Machos diplóides e haplóides naturais possuem medidas próximas, o que não permite a diferenciação visual desses indivíduos.

As operárias se mostraram morfológicamente mais semelhantes aos machos do que às rainhas no que se refere maior parte das estruturas medidas. O comprimento do aparelho bucal e a distância interorbital constituem exceções. A similaridade entre operárias e machos já havia sido observada por Kerr (1974; 1978), que atribuiu tal similaridade fenotípica ao fato dos genes feminilizantes não funcionarem nas operárias e não levarem ao aparecimento das características femininas (exclusivas da rainha), assim elas teriam aparência feminina quanto aos ovários e genitália e aparência masculina quanto a quase todas as demais características (Kerr, 1974; Garófalo *et al.*, 1975).

Analisando o perfil de hidrocarbonetos cuticulares em *Melipona quadrifasciata*, Borges *et al.* (dados não publicados) mostraram que machos haplóides e operárias possuem perfil bastante similar e que o com relação a esse perfil machos diplóides são mais semelhante às operárias que aos machos haplóides, segundo os autores, este

resultado pode ser explicado por serem os machos diplóides e as operárias indivíduos diplóides, apresentando níveis similares de expressão gênica, o que pode refletir na produção similar de enzimas que regulam o padrão síntese dos hidrocarbonetos. Os resultados deste trabalho também mostram uma tendência para a maior similaridade entre machos diplóides e operárias.

De modo geral, as estruturas medidas foram maiores nas operárias que nas rainhas. Estas estruturas estão relacionadas à execução de tarefas próprias das operárias como limpeza e defesa da colônia, coleta e processamento de alimento, manipulação de cerume, entre outros. Os machos, apesar de não contribuírem para a manutenção da colônia, coletam alimento para consumo próprio, o que explicaria seus aparelhos bucais alongados e possuem corpo mais robusto e olhos compostos maiores que as rainhas (semelhante as operárias) características que estariam envolvidas com grande capacidade de vôo e acuidade visual, fatores importantes para a reprodução.

V. BIBLIOGRAFIA

Asencot, M.; Lensky, Y. 1988. The effect of soluble sugars in stored royal jelly on the differentiation of the female honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae to queens. **Insect Biochem.**, 18 (2): p127-133.

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

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

Camargo, C.A. 1979. Sex determination in bees. XI Production of diploid males and sex determination in *Melipona quadrifasciata*. **J. Apic. Res.**, 18. 77-83.

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

Camargo, J.M.F.; Kerr, W.E.; Lopes, C.R. 1967. Morfologia externa de *Melipona* (*Melipona*) *marginata* Lepeletier (Hymenoptera, Apoidea). **Pap. Av. Zool.** 20(10):229-58.

Campos, L.A.O.; Velthuis, H.H.W.; Velthuis-Kluppel, F.M. 1975. Juvenile hormone and caste determination in a stingless bee. **Naturwissenschaften**, v.62, p.427-36.

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

Francoy, T.M.; Imperatriz-Fonseca, V. 2010. A morfometria geométrica de asas e a identificação automática de espécies de abelhas. **Oecologia Australis**. 14(1): 317-321.

Garófalo, C.A.; Kerr, W.E. 1975 Sex determination in bees. I. Balance between femaleness and maleness genes in *Bombus atratus* Franklin (Hymenoptera, Apidae). **Genética**. 45:203-209.

Hartfelder, K; Makert, G.R.; Judice, C.C.; Pereira, G.A.G.; Santana, W.C.; Dallacqua, R.; Bitondi, M.M.G. 2006. Physiological and genetic mechanisms underlying caste development, reproduction and division of labor in stingless bees. **Apidologie**. 37:144-163.

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

Irsigler, A.S.T. 2002. **Machos diploides em colônias endogâmicas de *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae):** Análises morfológica e genética. Dissertação de mestrado. UFV, Viçosa. 61p.

Judice, C.C.; Carazzole, M.F.; Festa, F.; Sogayar, M.C.; Hartfelder, K.; Pereira, G.A.G. 2006. Gene expression profiles underlying alternative caste phenotypes in a highly eusocial bee, *Melipona quadrifasciata*. **Insect Molecular Biology** 15 (1), 33–44.

Kerr, W.E. 1948. Estudos sobre o gênero *Melipona*. **Anais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**. 5:181-276.

Kerr, W.E. 1974. Genética da determinação do sexo em abelhas. X. Programação da atividade dos genes determinadores de sexo e casta. **Anais do 3 Congresso Brasileiro de Apicultura**. ESALQ-USP.

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

Kerr, W.E.; Cunha, R.A.; Pisani, J.F. 1978. Genética da determinação do sexo em abelhas. XII. Aplicação de métodos numéricos para grupar sexos e castas de *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. (Apidae). **Rev. Brasil. Biol.**, 38(2):391-394.

Kerr, W.E.; Nielsen, R.A. 1966. Evidences that genetically determined *Melipona* queens can become workers. **Reprint from Genetics**. 54(3):859-866.

Kerr, W.E.; Stort, A.C.; Montenegro, M. 1966. Importância de alguns fatores ambientais na determinação de castas do gênero *Melipona*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. 38(1): 149-168.

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

Michener, C.D. 2000. **The bees of the world**. Baltimore & London: The Johns Hopkins University Press. 913p.

Silva, I.C.; Message, D.; Cruz, C.D.; Silva, M.V.G.B. 2005. Aplicação de análises multivariadas para determinação da casta de abelhas *Apis mellifera* L. (Africanizadas), obtidas em laboratório. **R. Bras. Zootec.** V.34, n.2, p.635-640.

Snodgrass, R. E. 1956. **Anatomy of the Honeybee**. First Edition. Comstock Publishing Associates. 334p.

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

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