

Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Biologia – Programa de Pós-Graduação em Entomologia

**Papel do sistema endócrino na reprodução
e divisão de trabalho em operárias de
Melipona quadrifasciata (Apidae:
Meliponini)**

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de DOUTOR em CIÊNCIAS – Área de concentração:
ENTOMOLOGIA

Aluno: Weyder Cristiano Santana

Ribeirão Preto

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Biologia – Programa de Pós-Graduação em Entomologia

**Papel do sistema endócrino na reprodução
e divisão de trabalho em operárias de
Melipona quadrifasciata (Apidae:
Meliponini)**

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de DOUTOR em CIÊNCIAS – Área de concentração:
ENTOMOLOGIA

**Aluno: Weyder Cristiano Santana
Orientador: Klaus Hartfelder**

Ribeirão Preto

2007

**AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES
TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO DE DIVULGAÇÃO
CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO
E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.**

Santana, Weyder Cristiano

Papel do sistema endócrino na reprodução e divisão de trabalho em operárias de *Melipona quadrifasciata* (Apidae: Meliponinae) / Weyder Cristiano Santana; Orientador Klaus Hartfelder – Ribeirão Preto, 2007.

1?? p.: il. ; 30 cm

Tese de Doutorado (Área de Concentração: Entomologia) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

1. *Melipona quadrifasciata* 2. Vitelogenina 3. Divisão de trabalho 4. Hormônio juvenil 5. PER

Aos meus pais, familiares e amigos por tanto contribuiem para o meu eterno aprendizado e por proporcionarem a minha vida momentos de felicidades.

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Klaus Hartfelder pela paciente orientação, mas, sobretudo pelos exemplos de grande profissionalismo e competência acadêmicos/científicos.
- Às professoras Dra. Zilá Luz Paulino Simões e Dra. Márcia Gentile Bitondi pela ajuda incessante quando necessárias e acesso irrestrito aos laboratórios.
- Ao Prof. Dr. Ademilson Espencer Soares pelo apoio, amizade e permitir que participasse do seu grupo de alunos.
- À dileta e amada Luanda Medeiros por estes anos compartilhando as felicidades imorredouras e o crescimento científico.
- À técnica e grande amiga Marcela A. Framartino Bezerra Laure pelo incansável trabalho de dissecação, sem o qual seria impossível tal realização.
- À Dra. Karina Rosa Guidugli Lazzarini e Dra. Érica Tanaka pela grande amizade, pelos ensinamentos de Biologia Molecular de Abelhas e em especial pela colaboração científica.
- Ao grande amigo Ivan Paulo Akatsu por estes anos de paciência, papo cabeça e de amizade irrestrita.
- À companheira de idéias e de muito trabalho Dra. Geusa Simone de Freitas.
- À Sra Maria Sílvia Postingue pelo carinho e por me alimentar adequadamente.
- À técnica Dra. Vera Lucia Castelo Figueiredo pelo carinho e atenção a mim dedicado.
- Aos colegas de laboratório Gesline, Omar, Umberto, Sérgio, Carlos, Tiago, Ezequiel, Davi, Mônica, Nínive, Anete, Rodrigo, Adriana M., Adriana C., Roberto, Alexandre, Barchuk, Aline A, Aline M, Cristiane, Eduardo, Fernanda, Francis, Gustavo, Inês, Juliana, Michelle P, Moysés, Rogério, Michelle, Rosana, Vanessa, por tornarem o meu cotidiano um constante aprendizado divertido.
- Às minhas “ex-co-orientadas” Camila e Ana Rita por me darem ouvidos.
- À Renata Aparecida de Andrade Cavallari por toda a gentileza e presteza ao me atender na secretaria da pós-graduação.
- Aos técnicos Jairo de Souza e Roberto Mazzuco pelo suporte e manutenção do meliponário do Departamento de Genética – FMRP/USP.
- Aos demais técnicos Adelino Penatti, Luiz Aguiar, Paulo Epifânio, João José dos Santos, Dr Pedro Prado e Dr Sidnei Mateus por toda atenção, apoio e suporte quando solicitados.

- À Regiane A. de Mello por manter-me acordado com o seu café e deixar os locais adequados ao uso.
- Às secretárias Maria Inês Joaquim, Maria Aparecida Oliveira Silva Elias, Susie Adriana Penha Nalon e Miriam Cristina Osório de Souza pelo atendimento oportuno.
- Ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia do Departamento de Biologia da FFCLRP/USP pela oportunidade de realização do curso de doutorado.
- Ao Departamento de Genética da FMRP/USP por também contribuir para a realização deste trabalho.
- À CAPES pela concessão da bolsa de doutorado e pelo apoio financeiro para realização deste trabalho.
- Obrigado a Deus por todas as oportunidades de aprender em minha vida.
- A todos que direta ou indiretamente colaboraram na realização deste trabalho.

Muito obrigado.

"As melhores idéias são propriedade de todos" - Sêneca

"O aumento da sabedoria pode ser medido com exatidão pela diminuição do mau humor" - Friedrich Wilhelm Nietzsche

"O dia mais desperdiçado de todos é aquele no qual não demos uma risada" - Nicolas Chamfort

"A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido, não na vitória propriamente dita" - Ghandi

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

"A sorte faz os parentes, a escolha faz os amigos" -- Padre Jacques Delille

"Não confunda jamais conhecimento com sabedoria. Um ajuda a ganhar a vida, o outro a construir uma vida" -- Sandra Carey

RESUMO

Santana, WC. **Papel do sistema endócrino na reprodução e divisão de trabalho em operárias de *Melipona quadrifasciata* (Apidae: Meliponini)**. 2007. 98pp. Tese (Doutorado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007-06-25.

Vitelogenina (Vg) é incorporada dentro dos oócitos em crescimento nos insetos via endocitose mediada por receptores e é estocada dentro dos ovos como maior proteína do vitelo. Os objetivos do presente estudo foram analisar a expressão do gene *vg* e quantificar o hormônio juvenil (HJ) e as proteínas na hemolinfa de operárias de *Melipona quadrifasciata* em relação à reprodução e divisão de trabalho. Uma alta quantidade de RNAm de *vg* foi detectada em operárias que receberam uma dieta rica em proteína, enquanto que uma dieta pobre em proteína foi associada com um decréscimo na quantidade de RNAm de *vg*, sugerindo que uma dieta rica em proteína (pólen) é fundamental para a ativação dos ovários das operárias nesta abelha sem ferrão. A aplicação de análogo de hormônio juvenil Pyriproxifen (PPN) resultou num decréscimo no RNAm de *vg* no corpo gorduroso, mas não causou um declínio nos títulos da proteína Vg na hemolinfa. Os títulos de HJ na hemolinfa de operárias recém-emergidas, nutridoras e forrageiras não mostraram diferenças significantes, indicando que este hormônio não está intimamente relacionado ao polietismo etário em operárias adultas de *M. quadrifasciata*. Em operárias coletadas durante um evento de enxameação, nós pudemos observar que um elevado título de HJ na hemolinfa de operárias com ovários ativado está correlacionado com altos títulos de Vg. Quando colônias foram suplementadas com pólen adicional, notamos que estas foram capazes de produzir crias de machos continuamente, independentemente da variação na disponibilidade de alimento no ambiente. Uma vez que os machos são oriundos de ovos haplóides não fertilizados, muitos desses machos podem ser filhos de operárias, significando que as operárias podem ajustar seus componentes do fitness de acordo com o recurso de pólen disponível e, podem assim, alterar a razão sexual na colônia. Esses resultados indicam um alto grau de plasticidade comportamental em operárias *M. quadrifasciata*, que é, aparentemente, relacionada às condições sociais, por um lado, e pela disponibilidade de dieta de pólen, por outro. Nossos resultados contribuem para clarear a relação entre disponibilidade de pólen, regulação hormonal e polietismo etário em espécies nativas, e podem contribuir para estudos comparativos em outras espécies de abelhas sem ferrão.

Palavras-chave: *Melipona quadrifasciata*, vitelogenina, divisão de trabalho, hormônio juvenil, PER

ABSTRACT

Santana WC. **The role of the endocrine system in reproduction and division of labor in workers of *Melipona quadrifasciata* (Apidae: Meliponini)**. 2007. 98pp. Doctoral Thesis - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007-06-25.

Vitellogenin (Vg) is incorporated into the growing oocytes of insects, via receptor mediated endocytosis and is stored within the egg as a major yolk protein. The aims of the present study were to analyze the expression of the *vg* gene and to quantify juvenile hormone (JH) and the total amount of proteins in hemolymph of *Melipona quadrifasciata* workers in relation to reproduction and division of labor. A high amount of *vg* mRNA was detected in workers that had received a protein-rich diet, whereas a low-protein diet was associated with a decrease in *vg* mRNA, suggesting that a protein-rich (pollen) diet is fundamental for the activation of the ovaries of workers in this stingless bee. Application of the juvenile hormone analog Pyriproxifen (PPN) resulted in a decrease in *vg* mRNA in fat body, but did not cause a decline in the Vg protein titer in hemolymph. The JH titer in hemolymph of newly emerged workers, nurses and foragers did not show significant differences indicating that this hormone is not strongly related to age polyethism in adult workers of *M. quadrifasciata*. In workers collected during a swarming event we observed that an elevated JH titer in hemolymph of workers with activated ovaries is correlated with a high Vg titer. When supplying colonies with additional pollen we noted that these were able to produce male brood continuously, independent of the seasonally varying supplies. Since males arise from unfertilized haploid eggs, many of these males may be the sons of workers, meaning that workers may adjust their fitness components according to the pollen resources available in the colony and can, thus, alter the colony sex ratio. Taken together, all these results indicate a high degree of behavioral plasticity in *M. quadrifasciata* workers, which is apparently directly related to the social conditions on the one hand and the availability of a pollen-rich diet on the other. Our results contribute to clarify the relationship between pollen availability, hormonal regulation, and age polyethism in a native bee species that may set guidelines for comparative studies on other stingless bee species.

Key words: *Melipona quadrifasciata*, vitellogenin, division of labor, juvenile hormone, plasticity, PER

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AHJ	Análogo de hormônio juvenil
20HE	20–hidroxiecdisona
CA	<i>corpora allata</i>
cDNA	DNA complementar a partir de mRNA
dsRNA	RNA de fita dupla
ECD	Ecdisteróides
HJ	Hormônio juvenil
Lp	Proteína lipoforina
PER	Resposta reflexa da extensão da probóscide
POP	Processo de aprovisionamento e oviposição
PPN	Pyriproxifen® (Sumimoto)
PRG	Placar de resposta gustativa
PT	Proteína total
RIA	Radioimunoensaio
RNAi	RNA de interferência
SEM	Erro padrão da média
SD	Desvio padrão
Tp	Temperatura de pareamento dos <i>primers</i>
UA	Unidade arbitrária
Vg	Proteína vitelogenina
vg	Gene que codifica a proteína vitelogenina

SUMÁRIO

<i>Agradecimentos</i>	<i>iv</i>
<i>Resumo</i>	<i>vi</i>
<i>Abstract</i>	<i>vii</i>
<i>Lista de Abreviaturas e Siglas</i>	<i>viii</i>
<i>Sumário</i>	<i>ix</i>
<i>1. Introdução</i>	<i>11</i>
1.1. Colônia de abelhas sem ferrão	11
1.2. Mecanismo de determinação de castas	11
1.3. Vitelogenina na reprodução de abelhas	13
1.4. Mecanismo de determinação de castas na sub-tribo Meliponina	14
1.5. Polietismo etário em abelhas sociais	15
1.6. Os hormônios no polietismo etário	15
1.7. Resposta reflexa da extensão da probóscide (PER).....	18
1.8. Alimentação nos Meliponínios	18
1.9. Postura de operárias nos Meliponini.....	20
1.10. Divisão de trabalho em Meliponini	21
<i>2. Objetivos</i>	<i>23</i>
2.1. Objetivo Geral.....	23
2.2. Objetivos específicos	23
<i>3. Material e métodos</i>	<i>24</i>
3.1. Material biológico.....	24
3.2. Resposta reflexa da extensão da probóscide (PER).....	26
3.3. Coleta de hemolinfa, extração e quantificação de proteínas.....	27
3.4. Extração do mRNA de Vg.....	28
3.4.1. Extração de RNA total.....	28
3.4.2. Estimativa da concentração e pureza do RNA.....	28
3.4.3. Síntese de cDNA de fita simples	28
3.4.4. Amplificações de fragmentos de vitelogenina por PCR Semiquantitativa RT-PCR (Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction).....	29
3.5. Metodologias para análise de proteínas	30
3.5.1. Eletroforese em poliacrilamida (SDS-PAGE)	30
3.6. Relação entre os títulos de Vg e HJ em operárias de <i>M. quadrifasciata</i>	30

3.6.1.	Preparo e análise das amostras.....	30
3.6.2.	Radioimunoensaio (RIA) para HJ.....	31
4.	<i>Resultados</i>	34
4.1.	PER.....	34
4.2.	Relação entre o <i>status</i> ovariano e os títulos de Vg e HJ na hemolinfa de operárias de <i>M. quadrifasciata</i>	37
4.3.	Efeitos do análogo do HJ Piryproxifen (PPN) sobre a expressão do mRNA de <i>vg</i> e título de Vg.....	40
4.4.	Efeito de diferentes dietas sobre a expressão de <i>vg</i> , título de Vg, HJ e proteína total na hemolinfa de operárias adultas de <i>M. quadrifasciata</i>	44
4.5.	<i>Status</i> ovariano, título de HJ e Vg na hemolinfa de operárias de <i>M. quadrifasciata</i> em enxameação.....	48
4.6.	Efeito da dieta protéica sobre o nascimento de machos em colônias de <i>M. quadrifasciata</i>	52
5.	<i>Discussão</i>	58
5.1.	PER.....	58
5.2.	Relação entre o <i>status</i> ovariano e os títulos de Vg e HJ na hemolinfa de operárias de <i>M. quadrifasciata</i>	60
5.3.	Efeitos do análogo do HJ Piryproxifen (PPN) sobre a expressão do mRNA de <i>vg</i> e título de Vg.....	63
5.4.	Efeito de diferentes dietas sobre a expressão de <i>vg</i> , título de Vg, HJ e proteína total na hemolinfa de operárias adultas de <i>M. quadrifasciata</i>	64
5.5.	<i>Status</i> ovariano, título de HJ e Vg na hemolinfa de operárias de <i>M. quadrifasciata</i> em enxameação.....	66
5.6.	Efeito da dieta protéica sobre o nascimento de machos em colônias de <i>M. quadrifasciata</i>	68
6.	<i>Conclusões</i>	77
7.	<i>Referências Bibliográficas</i>	79

1. INTRODUÇÃO

1.1. Colônia de abelhas sem ferrão

As abelhas sem ferrão (meliponínios) são o grupo irmão ao das abelhas melíferas (Michener, 2000) compreendendo mais de 300 espécies, todas exclusivamente tropicais e subtropicais (Camargo & Pedro, 1992), subdivida em duas tribos: Meliponini, hoje subtribo Meliponina, com *Melipona* como único gênero; e a tribo Trigonini, hoje subtribo Trigonina, com mais de vinte gêneros (Michener, 2000).

A subtribo Meliponina (Hymenoptera, Apidae, Apinae) (Michener, 2000), à qual pertence *Melipona quadrifasciata* Lepteleter, constitui um grupo de abelhas sem ferrão amplamente distribuídas nas regiões Neotropicais (Roubik, 1989), ocorrendo desde o México até o estado do Rio Grande do Sul, no Brasil (Kerr, 1969; Nogueira-Neto, 1997), sendo esta espécie distribuída ao longo da costa, desde a Paraíba até o Paraná (Moure & Kerr, 1950).

1.2. Mecanismo de determinação de castas

O desenvolvimento das castas nos insetos sociais, em geral, está relacionado com o amplo fenômeno de polimorfismo nos insetos. O tipo de polimorfismo em que o indivíduo tem potencial para desenvolver-se em uma série de formas alternativamente através da diferenciação das castas é denominado polimorfismo facultativo (Nijhout & Wheeler, 1982). Em abelhas, o polimorfismo de castas envolve exclusivamente a população feminina, que são caracterizadas por diferenças morfológicas, fisiológicas e comportamentais (Michener, 1974).

A monopolização da reprodução pela rainha fisogástrica em colônias de abelhas sociais é resultado de um longo processo evolutivo no qual a fêmea dominante suprime os atos reprodutivos das demais fêmeas presentes na colônia, tornando-as operárias. Em colônias com número restrito de fêmeas, tal controle pode ser exercido pela rainha por atos agressivos diretos ou pela remoção (oofagia) dos ovos postos pelas operárias. Já nas colônias maiores dos Apinae (Apinini e Meliponini), o controle sobre as operárias se dá por feromônio da rainha, que é mais eficiente, bem como acompanhado de uma progressiva diferenciação morfológica e anatômica das castas. Tais características podem ser interpretadas como um fator de manipulação das operárias e também servir com um “*sinal honesta*”, sinalizando a presença da rainha e da sua alta capacidade reprodutiva (Keller & Nonacs, 1993).

A diferenciação de castas nas abelhas eusociais, que tem como resultado a produção de dois fenótipos claramente distintos, ocorre integrada aos processos de metamorfose, e desta forma é controlada pelos mesmos hormônios: hormônio juvenil (HJ) e os ecdisteróides (ECD), especialmente makisterona A (Hartfelder & Engels, 1998, para revisão ver Hartfelder & Emlen, 2005). As principais diferenças anatômicas entre as castas geradas neste processo estão concentradas no sistema reprodutor, no tamanho dos ovários, número de ovariolos, presença de espermateca e estrutura da bursa copulatrix. Além disso, foram descobertas diferenças fisiológicas entre as operárias e rainhas, especialmente na produção de vitelogenina (Vg). Em *Apis mellifera*, a regulação hormonal da síntese de vitelogenina (Vg) tem sido estudada intensamente, mostrando que HJ e ECD não modulam, de forma significativa, a sua produção pelas células do corpo gorduroso, na fase adulta (Engels *et al.*, 1990; Hartfelder & Engels, 1998). Já na fase pupal, o perfil casta-específico do aumento do título de HJ constitui um sinal importante na iniciação da expressão de Vg (Barchuk *et al.*, 2002). Contrastando com as amplas informações sobre a regulação da diferenciação das castas e sua fisiologia em *A. mellifera*, pouco se sabe sobre os meliponíneos (Engels & Engels, 1974), nas quais, a maioria dos experimentos com aplicação hormonal demonstrou um efeito indutor de características de rainhas quando o HJ foi aplicado no último instar larval (Campos, 1975, 1978 e 1979). Dados sobre os títulos hormonais endógenos nas fases pré-imaginais foram verificados apenas em duas espécies de Meliponini, *Scaptotrigona postica* (Hartfelder & Rembold, 1991) e *M. quadrifasciata* (Pinto *et al.*, 2002).

1.3. Vitelogenina na reprodução de abelhas

A proteína precursora do ovo é chamada de vitelogenina e tem recebido muita atenção em estudos sobre a regulação por HJ em insetos (para revisão ver Wyatt & Davey, 1996). Esta proteína pertence à superfamília de glicoproteínas de alto peso molecular, que são processadas no corpo gorduroso por clivagem proteolítica e adição de carboidratos, fosfatos, sulfatos e lipídios (para revisão ver Engelmann, 1979).

A vitelogenina geralmente é sintetizada pelo corpo gorduroso e secretada na hemolinfa, de onde é seqüestrada pelos ovócitos em crescimento através de endocitose mediada por receptores (Hagedorn & Kunkel, 1979; Postlethwait & Giorgi, 1985; Raikel & Dhadialla, 1992; Valle, 1993). A Vg de *A. mellifera* é uma lipoglicoproteína de 180 kDa (Engels *et al.*, 1990; Wheeler & Kawooya, 1990; Piulachs *et al.*, 2003). Já a Vg de *M. quadrifasciata* apresenta um alto grau de homologia (99%) em relação à Vg de *A. mellifera* e peso molecular semelhante (Silva, 2003), estando intimamente relacionada à capacidade reprodutiva dos insetos.

A rainha recém emergida de *A. mellifera* possui baixo título da Vg que aumenta durante os quatro primeiros dias após a emergência e se mantém elevado, representando no mínimo 50% do total das proteínas da hemolinfa (Engels, 1974; Engels *et al.*, 1990; Hartfelder & Engels, 1998). Já a síntese de Vg não é contínua em operárias de *A. mellifera*. Durante a fase que exercem a função de nutridoras a concentração de Vg na hemolinfa é alta, 30 – 40% do total das proteínas da hemolinfa, sendo baixa em operárias recém emergidas e forrageiras (Engels, 1974; Fluri *et al.*, 1982; Engels *et al.*, 1990). Já, na ausência da rainha, o título de Vg nas operárias que ovipositam é aproximadamente igual ao da rainha poedeira (Engels, 1974; Engels *et al.*, 1990; Zillikens *et al.*, 1998).

O HJ e os ecdisteróides são hormônios que atuam no processo de iniciação, manutenção ou inibição da síntese de Vg em vários insetos (para revisão ver Raikhel *et al.*, 2005). Há uma clara relação, em *A. mellifera*, entre os títulos de Vg e HJ presentes na hemolinfa de operárias; naquelas com função nutridora, os títulos de Vg são altos e de HJ baixos na hemolinfa. Já nas operárias forrageiras, os títulos de Vg são baixos e os de HJ são altos (Engels *et al.*, 1990; Hartfelder & Engels, 1998).

Nos Meliponini, duas espécies (*S. postica* e *M. quadrifasciata*) foram estudadas quanto ao título de Vg, sendo que as operárias recém emergidas não a apresentam na hemolinfa. A síntese de Vg está relacionado com a função de nutriz pelas operárias, nas quais esta proteína representa 40-50% da proteína total da hemolinfa, possivelmente relacionada a produção de ovos durante esta fase, mesmo na presença da rainha. Já operárias forrageiras apresentam baixos títulos de Vg (Engels & Engels, 1977). A expressão do gene da Vg foi verificada em abelhas recém emergidas, nutridoras e forrageiras de *M. scutellaris* e até mesmo nas operárias de *Frieseomellita varia*, espécie na qual as operárias apresentam os ovários atrofiados durante a vida adulta, verificando a abundância da proteína Vg na hemolinfa das operárias nutridoras destas espécies (Dallacqua *et al.*, 2007).

Trabalhos recentes com *A. mellifera* demonstraram que a Vg foi caracterizada como uma proteína multifuncional envolvida em vários processos biológicos como: reprodução, longevidade, imunidade, transporte de zinco e síntese de alimento larval (Hartfelder & Engels, 1998; Amdam & Omholt, 2002; Amdam *et al.*, 2003a; Amdam & Omholt, 2003; Amdam *et al.*, 2004b; Amdam *et al.*, 2005).

1.4. Mecanismo de determinação de castas na sub-tribo Meliponina

No gênero *Melipona* pressupõem-se que a determinação das castas ocorra a partir de sistema mendeliano clássico por meio de mecanismo genético-alimentar, sendo as rainhas heterozigotas para dois pares de alelos sexuais, xa e xb, apresentando a seguinte constituição genética: xa1 xa2 / xb1 xb2 (Kerr, 1946, 1948, 1950, 1969; Kerr & Nielsen, 1966; Kerr *et al.*, 1966). Só serão rainhas as abelhas que apresentarem estas duas heterozigoses e receberem uma quantidade de alimento suficiente durante a fase de larva. As demais abelhas heterozigotas pouco alimentadas ou homozigotas em qualquer dos loci, darão origem à operárias. Durante a metamorfose as diferenças genóticas entre as castas serão transformadas em fenótipos distintos.

Ratnieks (2001) e seu grupo de trabalho propuseram, a partir da observação do excesso de nascimento de rainhas, que o mecanismo de produção desta casta passaria pela escolha da própria larva, sendo que a maioria das larvas não se tornam rainhas devido a impossibilidade de todas constituírem uma nova colônia. Dentro do aspecto

sociobiológico, este tema ainda é discutido e considerando-se o contexto evolutivo e a existência de rainhas fisogástricas anãs em outros Meliponini (Ribeiro *et al.*, 2006) tais propostas parecem ser corroborar. Contudo, um trabalho recente realizado por Santos (2006), utilizando técnica de genética molecular AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), sugeriu a existência de genes específicos às castas de operária e de rainha em *M. quadrifasciata*, reafirmando trabalhos anteriores de Kerr sobre a

ao desenvolvimento comportamental como mudança da função deste hormônio de um regulador de processos reprodutivos para um integrador da vida social (Hartfelder, 2000). Tal interpretação está de acordo com análises de títulos de HJ em rainhas adultas e experimentos de aplicações tópicas de HJ. Destes, ficou claro que HJ não tem função gonadotrópica na fase adulta de ambas as castas de *A. mellifera*.

A aplicação de HJ ou AHJ também induz algumas mudanças na fisiologia de operárias de *Apis*, que estão associadas com o polietismo etário, como, por exemplo, em adultos jovens, nos quais as glândulas hipofaríngeas que secretam substâncias para a alimentação larval são afetadas. A injeção de HJ (Rutz *et al.*, 1974), mimético de HJ (Jaycox *et al.*, 1974) ou análogo de HJ (AHJ) (Sasagawa *et al.*, 1986) ou também por administração oral (Beetsma & Houten, 1974), promove uma prematura degeneração da glândula hipofaríngeas, um processo que normalmente acompanha a mudança de atividade das operárias da região do ninho para a coleta em campo. Além disso, a retirada da CA bloqueia esta degeneração (Sullivan *et al.*, 2000). AHJ também induz a prematura produção, pelas operárias, de feromônio de alarme 2-heptanona e isopentilacetato (Robinson, 1985). Estes resultados demonstram que o HJ está envolvido na coordenação exócrina e desenvolvimento comportamental em abelhas *A. mellifera* (ver revisão em Robinson, 1992).

A carência de forrageadoras em colônias experimentais com somente abelhas de mesma idade (jovens), causa um prematuro aumento no título de HJ nas operárias jovens, resultando no forrageamento precoce destas. Similarmente, a ausência de abelhas recém emergidas acarreta o prolongamento da fase de nutriz em algumas operárias, que retardaram o seu desenvolvimento endócrino e comportamental em duas semanas (Robinson *et al.*, 1989). A plasticidade do título de HJ também é fundamental para a reversão comportamental (Robinson *et al.*, 1989). Mudanças no título de HJ e comportamento podem ocorrer rapidamente. Reversão hormonal e comportamental são detectadas dentro de 24 horas do esgotamento de abelhas jovens na colônia (Robinson, 1992).

O alto título de HJ em forrageadoras é antecipado não devido à experiência de forrageamento em si, mas é modulado pela exposição à luz do dia no “pré-forrageamento” durante os vôos de orientação (Elekovich *et al.*, 2001). A organização hormonal e a atividade comportamental em insetos sugerem que as variações na

antecipação do nível hormonal e posterior variação no comportamento sejam devidas a substratos neurais, que parecem ser determinados pela variação na temperatura, densidade populacional, disponibilidade de alimento e dietas diárias (Elekonich & Robinson, 2000). Assim o efeito do tratamento não é unicamente dependente do título de HJ, mas também do contexto social (Robinson *et al.*, 1989; Huang *et al.*, 1991).

O envolvimento do sistema endócrino na reprodução de meliponíneos foi alvo de apenas um estudo (Hartfelder *et al.*, 2002), mostrando que ecdisteróides perdem a sua função reprodutiva conforme avança o grau de socialidade nas abelhas. Esta perda progressiva de funções do HJ e ECD na regulação da reprodução das fêmeas em abelhas eusociais está acompanhada por uma aparente associação do HJ na regulação da divisão de trabalho e polietismo etário observado em operárias adultas de diversos himenópteros eusociais (Robinson & Vargo, 1997). Neste caso, a maioria dos estudos foi direcionada a *A. mellifera*, nas quais aplicações de HJ em operárias recém emergidas provocam uma transição precoce de tarefas que estas exercem dentro do ninho para tarefas associadas com o forrageamento (Jaycox, 1976; Robinson, 1992). A atribuição de uma função chave ao HJ no processo de divisão de trabalho tornou-se um paradigma (Robinson & Vargo, 1997). Contudo, um estudo criterioso deste mesmo grupo demonstrou que em indivíduos alectomizados, isto é, em indivíduos que sofreram remoção cirúrgica dos *corpora allata* (CA) e assim da principal fonte de HJ, ocorreu apenas um atraso e não a abolição da transição de tarefas de intra para extra-nidal, e que a aplicação de HJ nestas operárias alectomizadas promoveu o avanço nesta transição de tarefas (Sullivan *et al.*, 2000).

Em *Bombus*, insetos eusociais primitivos, o HJ regula a reprodução das operárias (Röseler, 1977; Röseler *et al.*, 1981; Cameron & Robinson, 1990), mas parece não estar envolvido na divisão de trabalho entre os indivíduos desta casta. Rainhas poedeiras não possuem alto título de HJ na hemolinfa em relação a rainhas não poedeiras (Fluri *et al.*, 1981). Observou-se uma “divisão de trabalho” entre os dois principais hormônios de insetos; o HJ atuou sobre a reprodução e dominância em operárias, enquanto os ecdisteróides regularam processos reprodutivos em rainhas (Bloch *et al.*, 2000). Daí surge a pergunta sobre trajetórias evolutivas da utilização e função destes dois hormônios.

1.7. Resposta reflexa da extensão da probóscide (PER)

Um aspecto interessante e recentemente descoberto nas análises sobre divisão de trabalho relaciona a transição da operária de funções intra para extra-nidais em *A. mellifera* com o limiar de resposta a sacarose. Quando testadas no ensaio de resposta reflexa da extensão da probóscide (PER), operárias jovens possuem limiares de resposta muito superiores às operárias forrageiras, e entre as forrageiras, as coletoras de néctar apresentam limiares muito superiores as coletoras de pólen (Scheiner *et al.*, 2001a). Tais diferenças foram associadas ao amadurecimento das abelhas no contexto da aprendizagem (Scheiner *et al.*, 2001b), já que as concentrações de açúcares encontradas pelas forrageiras em flores diferem muito das encontradas pelas nutrizes nos estoques dentro da colmeia.

A hipótese para o aumento nas habilidades cognitivas durante o desenvolvimento comportamental de *A. mellifera* tem sido testada em vários estudos por comparação da performance entre abelhas nutrizes e forrageiras. Esta hipótese foi bem estabelecida, em laboratório, pelo ensaio associado ao aprendizado olfativo. Este ensaio é baseado na resposta reflexa da extensão da probóscide (PER) ao estímulo por solução de sacarose na antena (Menzel, 1999; para revisão ver Scheiner *et al.*, 2004). Os resultados das análises comparativas das abelhas nutrizes e forrageiras têm sido variável. Bhagavan *et al.* (1994) mostraram não haver diferenças entre nutrizes e forrageiras. Já Ray & Ferneyhough (1999) reportaram que forrageadoras demonstraram aquisição mais rápida do que nutrizes e resultados similares foram obtidos por Pham-Delegue *et al.* (1990). Pankiw & Page (1999), mostraram que o limiar de resposta à sacarose decai com o aumento da idade das operárias e o baixo limiar de resposta foi correlacionado com melhor aquisição, sugerindo que algumas diferenças na performance que podem existir são relacionadas às mudanças na sensibilidade e não nas habilidades cognitivas.

1.8. Alimentação nos Meliponínios

Nos Hymenoptera sociais, a quantidade de alimento é um fator muito importante no processo de determinação das castas (Beetsma, 1979). A alimentação das abelhas é

composta por néctar e pólen, sendo o primeiro uma solução de açúcares geralmente pobre em proteínas, lipídios e sais minerais, constituindo a fonte de carboidratos para as abelhas. O pólen é um alimento rico em proteínas, constituindo, portanto, a fonte de nitrogênio para a colônia contendo também lipídios, açúcares, sais minerais e vitaminas, principalmente do complexo B (Cruz-Landim & Akahira, 1966).

Nas abelhas sem ferrão, não foram encontradas diferenças qualitativas entre o alimento oferecido às larvas que originarão rainhas e operárias (Kerr *et al.*, 1966; Camargo, 1972; Hartfelder & Engels, 1989), sendo o processo de alimentação das larvas massal, no qual as abelhas nutrizas depositam todo o alimento nas células antes da postura da rainha (Kerr 1946, 1948, 1950 e Kerr *et al.*, 1966).

Na fase adulta a necessidade nutricional de cada indivíduo está relacionada à atividade que este exerce na colméia e em relação a casta e sexo. Necessidade de vôo requer mais energia; postura e desenvolvimento necessitam de mais proteína (Zerbo *et al.*, 2001).

Segundo Cruz-Landim & Akahira (1966), a alimentação com pólen é praticamente dispensável para as abelhas adultas, inicialmente por causa das reservas remanescentes do período larval e posteriormente, porque a taxa de nitrogenados requerida é baixa; contudo, durante um período prolongado de alimentação sem proteína ocorre o depauperamento geral do organismo da abelha operária.

Uma dieta ausente de uma fonte protéica (pólen) não possibilita o desenvolvimento das glândulas hipofaríngeas em *S. postica* (Penedo *et al.*, 1976) e promove um baixo desenvolvimento ovariano (Testa *et al.*, 1981). As operárias nutrizas e rainhas fisogástricas são os indivíduos que mais consomem pólen, contrapondo com os machos e operárias forrageiras, que pouco o consomem (Zerbo *et al.*, 2001). As operárias de *M. quadrifasciata* digerem pólen durante toda a vida, inclusive durante a vida adulta (Martinho, 1975), sendo esta característica comumente encontrada nos Meliponini em geral.

As rainhas de Meliponini recebem uma dieta diferenciada da dieta das operárias, alimentando-se de ovos não funcionais, ovos tróficos, postos pelas operárias (Sakagami & Zucchi, 1966; Velthuis *et al.*, 2001) e também pelo processo de trofalaxe, principalmente entre as operárias cortezãs e a rainha fisogástrica (Sommeijer *et al.*,

1984, Contrera, 2005), além disso, consomem o alimento depositado nas células de cria, secreção glandular, antes da oviposição (Sakagami & Zucchi, 1966).

1.9. Postura de operárias nos Meliponini

O sexo em Hymenoptera é controlado durante a fertilização dos ovos, isto é, as fêmeas são originadas de ovos fecundados (diplóides) e machos de ovos não fecundados (haplóides), sendo este mecanismo conhecido como partenogênese arrenótoca.

A teoria proposta por Hamilton sobre o fitness revolucionou o estudo dos insetos sociais, pois ofereceu uma explicação para o paradoxo de como as operárias não reprodutivas foram favorecidas pela seleção. Estas poderiam compensar a perda da reprodução direta assumindo os cuidados aos seus parentes mais próximos, garantindo a transferência de seus genes para as futuras gerações. Entretanto esta teoria prevê conflitos de interesse entre parentes, até mesmo em sociedades altamente cooperativas de insetos sociais, entre elas as abelhas. Operárias irmãs completas possuem $\frac{3}{4}$ do seu genoma semelhante, mas somente $\frac{1}{2}$ com a sua mãe e $\frac{1}{4}$ com os irmãos; a rainha mãe possui somente metade do genoma comum às filhas e filhos (para revisão veja Hamilton, 1964).

A habilidade das operárias em produzirem machos é ecologicamente importante para o grupo e tem implicações evolutivas como a modificação da razão sexual. Sendo as operárias a casta mais numerosa da colônia, seus interesses podem ser uma importante força na determinação dos resultados deste conflito, onde operárias tornam-se reprodutivas com a produção de machos, promovendo a variação da razão sexual dos indivíduos produzidos e o parentesco entre eles (para revisão veja Crozier & Pamilo, 1996). As operárias são mais aparentadas com seus filhos que com os filhos de outras operárias, ocorrendo o policiamento entre estes dois grupos (para revisão veja Ratnieks & Reeve, 1992).

Colônias de abelhas sem ferrão são geralmente monogínicas, entretanto é comum a reprodução por operárias (Beig, 1972; Machado *et al.*, 1984; Beig *et al.*, 1985; Bego, 1990; Koedam *et al.*, 1999; Sommeijer *et al.*, 1999; Tóth *et al.*, 2002). Nos meliponíneos, a produção de machos ocorre de modo cíclico (Beig, 1972, Silva, 1973; Zucchi, 1993) durante o período de maior disponibilidade de alimento. Nestas épocas,

as operárias realizam posturas após a rainha (Sakagami *et al.*, 1965), sendo que, a probabilidade dos machos serem filhos das operárias em *M. quadrifasciata* é de 40% (Tambasco, 1971), semelhante ao que ocorre com *M. subnitida* (Contel & Kerr, 1976), de 95% em *M. favosa* (Sommeijer *et al.*, 1999) e (Paxton *et al.*,). Os ovários de operárias de Meliponini estão ativos mesmo na presença da rainha (Sakagami *et al.*, 1965), ocorrendo o oposto com operárias de *A. mellifera*, geralmente não ativo na presença da rainha.

A produção de machos está diretamente relacionada a disponibilidade de alimentos dentro das colônias, principalmente aos estoques de pólen (Roubik, 1982; Moo-Valle *et al.*, 2001; Morais, 2003; Pereira, 2003; Koedam *et al.*, 1999; Koedam *et al.*, 2005; para revisão ver Velthuis *et al.*, 2005; Sommeijer *et al.*, 2006).

1.10. Divisão de trabalho em Meliponini

A organização social de abelhas sem ferrão, especialmente com respeito ao papel das operárias que assumem uma atividade reprodutiva dentro do ninho, foram observados em *M. favosa* (Sommeijer *et al.*, 1982). Em abelhas sem ferrão, a atividade de postura de operárias na presença de rainha fisogástrica bem como a divisão de trabalho baseada nas idades, semelhantes ao observado em *Apis*, também são verificados (Kerr & Santos-Neto, 1956; Sommeijer & Bruijn, 1994; para revisão ver Cepeda, 2006).

Antecipadamente à oviposição de uma rainha de *Melipona*, as operárias nutridoras geralmente ovipositam um ovo trófico que é devorado pela rainha. Em adição a esta ovofagia, a rainha pode se alimentar de um pouco do alimento larval, sendo comum na ausência do ovo trófico (Kerr & Santos-Neto, 1956; Sakagami *et al.*, 1965). O alimento larval e os ovos tróficos consumidos são componentes da dieta de rainha em Meliponini (Meliponina e Trogonina) e possuem grande valor nutritivo (Sommeijer & Bruijn, 1994). Em 35% dos casos observados de postura de rainha em *M. quadrifasciata* ocorre também a postura de ovos tróficos pelas operárias, sendo que esta operária poedeira participa na construção das células e no processo de aprovisionamento (Sakagami *et al.*, 1965).

Em abelhas indígenas a divisão de trabalho (Sommeijer, 1984), o POP (para revisão ver Zucchi *et al.*, 1999) e a plasticidade das operárias de *Melipona* (Waldschmidt, 1995; Waldschmidt *et al.*, 1998) já foram relatadas. Em *M. quadrifasciata* as operárias atuam, em função da idade, em três áreas distintas: trabalho no ninho (operárias recém emergidas até 16 dias de vida adulta); trabalho com cria (operárias com idades entre 9 e 22 dias); e trabalho fora da colônia (operárias com idades entre 16 e 38 dias) (Kerr & Santos-Neto, 1956).

A avaliação da função do sistema endócrino, tanto na reprodução como na divisão de trabalho, apresentam-se como questões intrigantes nas abelhas sem ferrão, que possuem relação filogenética conhecida e organização social equivalente com abelhas melíferas. Portanto, os Meliponini oferecem todas estas condições de estudo, além de uma gama de variações na sua organização social que podem contribuir e ajudar a elucidar o papel do sistema endócrino na fisiologia reprodutiva e na divisão de trabalho, inclusive sobre aspectos evolutivos da organização social em abelhas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo geral elucidar fatores fisiológicos e especialmente o papel do sistema endócrino na reprodução e divisão de trabalho em operárias de *M. quadrifasciata*. Os objetivos específicos foram:

2.2. Objetivos específicos

- Verificar o limiar de resposta a diferentes concentrações de sacarose com extensão reflexa da probólide em operárias de idades/funções distintas;
- Avaliar o efeito do análogo do hormônio juvenil Pyriproxifen® (PPN) na expressão do mRNA de *vg*, título de Vg e HJ em operárias adultas;
- Verificar as reações comportamentais ao tratamento hormonal com Pyriproxifen® (PPN) em operárias mantidas em colônias de observações;
- Analisar o efeito da dieta protéica ou a carência desta sobre a expressão do mRNA de *vg*, da proteína total, do título de Vg e HJ em operárias adultas;
- Analisar o perfil de hormônio juvenil (HJ) e o *status* ovariano em operárias adultas em funções distintas;
- Avaliar o efeito da alimentação suplementar com pólen em colônias mantidas em campo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material biológico

As abelhas foram obtidas do Meliponário do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP), Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

Para obtenção de abelhas operárias adultas, favos de crias contendo pupas prestes a emergir (pupa-farato) foram retirados de diversas colônias e acondicionados em placa de petri em uma estufa a 28°C e 80% de umidade relativa. Abelhas operárias que emergiram num período de 0-16 horas foram coletadas, marcadas com Opalith® numerados colados no mesonoto e devolvidas às colônias de observação para serem coletadas com função e idade controladas.

Diariamente as operárias marcadas foram coletadas e dissecadas. Os ovários foram examinados, coletados e classificados como inativados, se eles não apresentavam ovariolos contendo folículos em desenvolvimento (estágio I), fracamente ativados, se eles apresentavam folículos em pré-vitelogênese (estágio II), ativados, se eles apresentavam folículos em vitelogênese (estágio III) ou com ovócitos maduros (estágio IV). A hemolinfa e o corpo gorduroso aderido à carcaça abdominal também foram coletados para posterior correlação com os estágios de ativação dos ovários. Cada amostra analisada de corpo gorduroso correspondeu a um *pool* de 3 – 4 indivíduos.

Nos experimentos de avaliação do efeito hormonal sobre o início da transcrição do gene que codifica a vitelogenina (Vg), operárias recém emergidas foram coletadas cuidadosamente dos favos mantidos em estufa e divididas em 4 grupos de 12

indivíduos: i) sem tratamento; ii) tratadas topicamente com 1µg de análogo do hormônio juvenil (PPN) *pyriproxyfen* (2-[1-methyl-2(4-phenoxyphenoxy) ethoxyl] pyridine) (Sumitomo); iii) tratadas topicamente com 10µg de PPN; iv) tratadas topicamente com metanol (solvente do PPN). Posteriormente, as abelhas foram mantidas em estufa a 28°C e 80% de umidade relativa por sete dias. Após este período as operárias foram coletadas de cada grupo para extração da hemolinfa para verificar o título de HJ, Vg e do RNA total do corpo gorduroso (cada amostra analisada corresponde a um *pool* 3 - 4 abelhas). Houve três repetições nestes experimentos (em triplicata).

Operárias recém emergidas foram coletadas cuidadosamente dos favos mantidos em estufa e divididas em 4 grupos com 3 repetições cada (em triplicata) que receberam tratamento tópico de PPN de 1µg, 10µg e 100µg, bem como o metanol (solvente do PPN). Tais indivíduos foram marcados com Opalith® numerados e introduzidos na colônia de observação para testar o efeito hormonal exógeno sobre o comportamento das operárias de *M. quadrifasciata*.

Para os experimentos sobre a influência do tipo de dieta na expressão de vg, título de Vg, PT e HJ, três grupos de 12 operárias recém-emergidas, em triplicata, foram confinados separadamente em placas de petri durante sete dias. Estas placas foram acondicionadas em estufa a 28°C e 80% de umidade relativa. As abelhas pertencentes ao grupo (1) foram alimentadas com uma dieta preparada com pólen retirado da colônia (natural), portanto processado pelas abelhas, e uma solução de sacarose a 50% (*p/v*). O grupo (2) foi alimentado com pólen desidratado de *A. mellifera* (adquirido no comércio – Apiários Balardin - SC) e fermentado com pólen de *M. quadrifasciata* por 25 dias (modificado de Camargo, 1976a), e uma solução de sacarose a 50% (*p/v*). O grupo (3) foi alimentado apenas com uma solução de sacarose a 50% (*p/v*). Tais dietas foram oferecidas *ad libitum* e trocadas diariamente. Após sete dias de confinamento, as abelhas foram coletadas para a retirada da hemolinfa e do corpo gorduroso. Cada amostra analisada de corpo gorduroso correspondeu a um *pool* de 3 – 4 indivíduos.

Acompanhamos também uma enxameação natural e coletamos as operárias que estavam realizando este procedimento após do início da postura da rainha fisogástrica. Por meio do fechamento do tubo de entrada da nova colônia, durante a noite, todas as abelhas foram anestesiadas com nitrogênio gasoso para possibilitar a coleta dos indivíduos. As abelhas foram coletadas e dissecadas para a retirada da hemolinfa para verificação do título de Vg e HJ, bem como dos ovários, os quais foram classificados como descrito acima.

Para se acompanhar o efeito da alimentação suplementar, colônias de *M. quadrifasciata* foram alimentadas com uma dieta de pólen de *A. mellifera* fermentado por pólen de *M. quadrifasciata* (modificado de Camargo, 1976a) em pote de cera de *Apis* (Aidar, 1996) e 50ml de solução de sacarose a 50% (p/v), semanalmente. Favos de crias, contendo pupas prestes a emergir (pupa-farato), foram coletados quinzenalmente e o número de indivíduos que emergiram foi determinado.

Para as análises hormonais a hemolinfa foi coletada das abelhas como descrito no item 3.7 e depositada diretamente na solução de extração do hormônio juvenil (acetonitrila).

3.2. Resposta reflexa da extensão da probóscide (PER)

As abelhas recém emergidas, nutrizes das colônias de observação e forrageadoras de néctar e resina, foram coletadas para a realização das análises por PER. Indivíduos de idades determinadas foram coletadas nas colônias de observação, tomando-se o cuidado de não repetir os experimentos com os mesmos indivíduos em testes com idades diferentes.

Estas abelhas foram mantidas em pequenas placas de petri e colocadas em gelo à 4°C, para diminuição da atividade. Posteriormente, foram contidas individualmente dentro de ponteiras plásticas de micropipetas de 100µl (1cm de diâmetro) e ali mantidas presas com fita adesiva inibindo o movimento do tórax (Erber, *et al.*, 1997; 1998;

Scheiner *et al.*, 1999). Tais conjuntos foram colocados em estufa (28°C e 80% de umidade relativa) por até 60 minutos até o momento dos testes.

A resposta individual nos testes de PER às concentrações crescentes de sacarose de (p/v) 0,1%, 0,3%, 1%, 10%, 30% e 50% foram mensurados por toques nas antenas das abelhas operárias. Anterior a cada solução de sacarose, a antena foi tocada com água para efeito do teste de sensibilidade. As concentrações de sacarose nas quais as abelhas estenderam a probóscide e o número total de respostas positivas do primeiro até o último estímulo com diferentes concentrações de sacarose constituiu o “placar de resposta gustativa” (PRG) das abelhas. As abelhas que não responderam a água, mas somente a todas as concentrações de sacarose receberam o PRG de nota 6 (Scheiner *et al.*, 2001a; 2001b).

3.3. Coleta de hemolinfa, extração e quantificação de proteínas

A hemolinfa foi coletada com auxílio de um microcapilar a partir de uma pequena incisão lateral no tórax, próximo a tégula. Durante o tempo de coleta, as amostras de hemolinfa permaneceram no gelo. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3000g por 15 minutos a temperatura de 4°C para descarte de células do corpo gorduroso e hemócitos contaminantes. Alíquotas do sobrenadante foram utilizadas para a quantificação das proteínas totais (PT) na hemolinfa pelo método de Bradford (1976), utilizando-se albumina sérica bovina (BSA) para a construção da curva-padrão. As leituras foram realizadas a 595 nm, em espectrofotômetro Beckman® Coulter DTX 880 – Multimode Detector.

3.4. Extração do mRNA de Vg

3.4.1. Extração de RNA total

Para extração do RNA total de abelhas adultas, foram utilizadas 3 – 4 carcaças abdominais com o corpo gorduroso aderido, que foram dissecados em NaCl 0,9% estéril e homogenizados em 1 ml de reagente TRIzol[®] (TRIzol[®] Reagent, Invitrogen), sendo o procedimento de extração do RNA total conduzido de acordo com as instruções do fabricante.

Para inibir a ação de RNAses, o RNA total extraído foi ressuspenso em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) 0,1% (v/v). Em seguida, para eliminar a possível contaminação com DNA genômico, as amostras foram incubadas na presença de 0,1 unidade de DNase (RQ1 *RNase-Free* DNase, Promega) por 40 minutos a 37°C e posteriormente a 70°C por 15 minutos (para inativação da DNase).

3.4.2. Estimativa da concentração e pureza do RNA

A pureza e a quantidade de RNA foram avaliadas a partir da leitura da absorbância óptica obtida em espectrofotômetro Nanodrop[®] ND-1000. Para estimar a concentração do RNA, considera-se que uma unidade de absorbância a 260nm corresponde a 40 µg/ml de RNA (Sambrook *et al.*, 1989). O grau de pureza foi estimado através da razão entre os valores da leitura a 260nm e a 280nm, sendo que as amostras foram consideradas puras quando a razão era maior que 1,4.

3.4.3. Síntese de cDNA de fita simples

O RNA total obtido das amostras foi submetido diretamente a uma reação de transcrição reversa (RT). Nesta reação, as moléculas de cDNA foram sintetizadas

utilizando-se: 1µg de RNA total, 1 µl de Oligo (dT)₁₂₋₁₈ (500 µg/ml) e 1 µl de uma mistura de dNTP (10 mM) em um volume de 12 µl, posteriormente, a reação foi aquecida a 65°C por 5 minutos, seguido de resfriamento em gelo. Subseqüentemente, foram adicionados: 4 µl de *First-Strand buffer* (Invitrogen), 2 µl de DTT (0,1M) e 1 µ

Os produtos das PCRs semiquantitativas foram analisados em géis de agarose 1% com tampão TBE 1x (89 mM Tris base, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA, pH 8,0) e corados com brometo de etídio (0,5 µg/ml gel de agarose). O marcador de peso molecular usado foi *100 bp DNA Ladder* (Promega).

3.5. Metodologias para análise de proteínas

3.5.1. Eletroforese em poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para eletroforese foram utilizadas amostras contendo de 1-15 µg de proteína dissolvida em tampão Tris-HCl 0,25 M, pH 6,8, contendo 70% de sacarose, 0,25% SDS, 0,1% bromofenol azul e 5% β mercaptoetanol. A metodologia usada foi descrita por Laemmli (1970), com algumas modificações. As amostras foram submetidas à desnaturação térmica e posteriormente aplicadas em géis (100 x 120 x 0,9 mm) com concentração de poliacrilamida de 7,5%. A migração das proteínas foi feita a 4°C e com uma corrente constante de 15 mA, até que as amostras atingissem o final do gel. Após a separação por eletroforese, o gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R-250, em etanol, água e ácido acético (5:5:1 v/v) para visualização das proteínas. As proteínas Miosina, β-Galactosidase, Fosforilase-B, Albumina sérica bovina, Ovoalbumina e Anidrase carbônica de 205, 116, 97, 66, 45 e 29 kDa, respectivamente, foram utilizadas como marcadores de massa molecular.

3.6. Relação entre os títulos de Vg e HJ em operárias de *M. quadrifasciata*

3.6.1. Preparo e análise das amostras

Após os sete dias de confinamento, as operárias foram anestesiadas em gelo antes da coleta de hemolinfa. De cada abelha, 1 µl de hemolinfa foi dissolvido em 9 µl de tampão da amostra para eletroforese em gel de SDS-PAGE 7,5% (item 3.5.1).

Posteriormente à coloração, os géis foram digitalizados por meio de um scanner e as imagens resultantes destes géis foram analisadas pelo software Kodak® 1D – Scientific Imaging Systems (versão 3.6.2) para quantificar a intensidade da coloração e o tamanho das bandas referentes a Vg e apoLp – I. Devido a proteína apoLp–I ser encontrada em níveis constantes durante toda a vida adulta das abelhas em *A. mellifera* (Lazzarini-Guidugli, 2006), esta proteína foi utilizada para normalização dos níveis de Vg.

Também foram coletados 1 – 2 µl de hemolinfa que foram adicionados a 500 µl de acetonitrila para dosagem de HJ (item 3.13). Posteriormente à coleta de hemolinfa, o abdômen de cada operária foi então separado do tórax com auxílio de uma pinça e o intestino removido. Os tergitos abdominais com o corpo gorduroso aderido foram colocados em 0,5 ml de reagente TRIzol® (Invitrogen) para extração do RNA total como descrito no item 3.5. Após a extração do RNA total procedeu-se a análise das amostras por RT-PCR semiquantitativa como descrito no item 3.4. As abelhas foram analisadas individualmente.

3.6.2. Radioimunoensaio (RIA) para HJ

O método de extração de HJ a partir de hemolinfa foi baseado no protocolo descrito por Huang *et al.* (1994). As amostras contendo 1 – 2 µl de hemolinfa em 500 µl de acetonitrila foram colocadas em tubos de vidro de 1 ml, misturadas e centrifugadas (7500 rpm) a 4°C por 3 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi transferido para tubos de extração (tubos de 5 ml), aos quais foram também adicionados 1 ml de NaCl 0,9% e 1 ml de hexano. Esta mistura foi fortemente agitada e mantida em gelo por 10 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (750 rpm) a 4°C por 5 minutos e tiveram o sobrenadante (fase hexano) cuidadosamente transferido para um novo tubo de extração. Os passos de extração correspondentes a adição de mais 1 ml de hexano ao restante de salina e acetonitrila, manutenção em gelo por 10 minutos, centrifugação e retirada do sobrenadante foram repetidos 2 vezes mais. Perfazendo, assim, 3 ml de hexano mais o HJ presentes no tubo de extração, ao final do

procedimento. O volume de hexano foi evaporado utilizando-se centrifugação a vácuo (*SpeedVac*), por aproximadamente 15 minutos. Posteriormente, o HJ foi redissolvido em 75 µl de tolueno.

Para construção da curva padrão, foram pipetados 0,5, 1, 2, 5, 10, 50, e 100 µl de solução de HJ3 (100ng/ml de metanol) em tubos de 1 ml com auxílio de seringas Hamilton.

Os tubos das amostras e os da curva padrão foram centrifugadas a vácuo (*SpeedVac*) para a remoção do solvente, por aproximadamente 20 minutos. Em seguida, foram acrescentados 50 µl de solução *tracer* (solução de ³H-HJ3 com atividade de 6500 cpm por 50 µl de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2 e 0,02% de azida sódica) em todos os tubos. Após a agitação, acrescentou-se em todos os tubos, exceto no controle zero da curva padrão, 200 µl de soro anti-HJ3 específico produzido em coelhos. Ao controle zero da curva padrão acrescentou-se 200 µl de soro controle (10% de soro de coelho não-imunizado em tampão fosfato). Todos os tubos foram agitados vigorosamente e mantidos a 4°C por 16 horas.

Após este período, foram adicionados 250 µl de solução saturada de sulfato de amônia (para precipitação das proteínas) em todos os tubos, que em seguida foram novamente agitados, deixados a 4°C por 30 minutos e centrifugados a 7500 rpm por 15 minutos. Os sobrenadantes foram descartados. Aos precipitados foram adicionados 500 µl de solução de sulfato de amônia 50%. Após agitação e permanência a 4°C por mais 30 minutos, os tubos foram novamente centrifugados por 15 minutos a 7500 rpm, descartando-se em seguida, o sobrenadante.

Os precipitados foram ressuspensos em 40 µl de água bidestilada estéril. Após agitação, estas amostras foram transferidas

espectrômetro de cintilação líquida (Multi-Purpose Scintillation Counter/LS 6500 Beckman – USA).

Os valores das leituras das amostras de hemolinfa e da curva padrão foram lançadas em uma planilha do Excel para obtenção dos valores das concentrações de HJ3, em pg de HJ3/ μ l de hemolinfa. Para análise estatística foi usado o *software* Jandel Sigma Stat 2.0.

4. RESULTADOS

Foram coletadas, marcadas e introduzidas em três colônias de observações 1739 abelhas recém emergidas dos favos obtidos em 14 colônias distintas. Tais indivíduos foram utilizados nos experimentos que se seguem:

4.1. PER

Respostas PER positivas às diferentes concentrações de sacarose foram obtidas com sucesso em operárias e machos de *M. quadrifasciata* de diferentes idades ao serem submetidos ao “tempo de repouso”, anterior aos testes, por aproximadamente 60 minutos em estufa (28°C e 80% de umidade relativa), diferentemente de *A. mellifera*. A partir destes gerou-se o placar de resposta gustativa apresentado abaixo.

Observa-se que em operárias e machos recém emergidos e indivíduos com sete dias de vida a resposta gustativa sofreu um acréscimo em respostas positivas, principalmente a maiores concentrações de sacarose em solução. Indivíduos de mesma idade, independente do sexo, aparentemente apresentam respostas semelhantes e significativamente melhores que indivíduos recém emergidos (Figura 1). Abelhas mais velhas, doze dias, possivelmente com função de nutridoras e forrageiras (29,8 dias \pm 3,09), apresentam valores significativamente maiores em relação aos demais indivíduos a soluções de sacarose a concentrações menores, mas semelhantes entre si em resposta gustativa positiva (Figura 1). As abelhas respondem a solução com concentração de 50% de sacarose em diferentes proporções que aumentam com o aumento da idade e, possivelmente, a mudança de função (Figura 2).

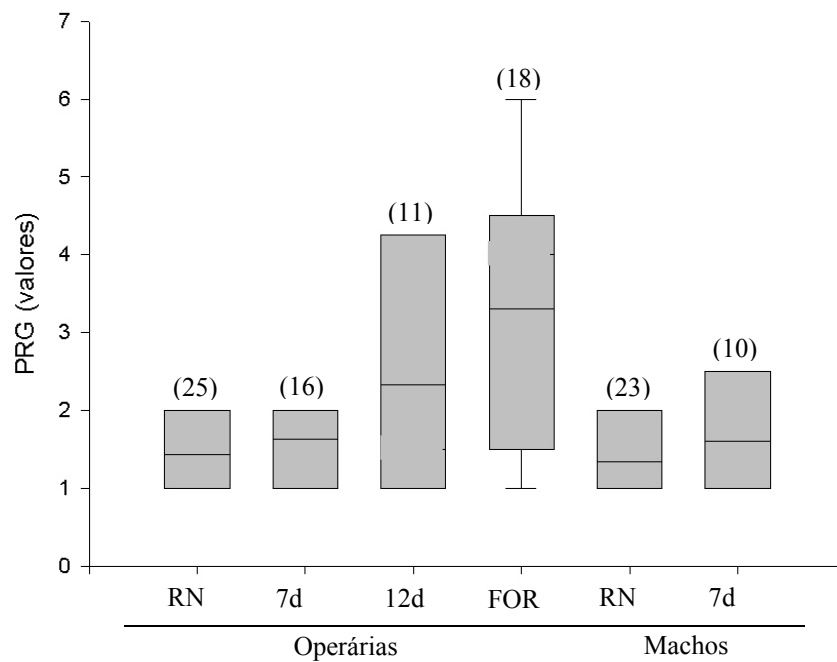


Figura 1 - Variação do limiar de resposta gustativa (placar de resposta gustativa - PRG, valor máximo 6) no paradigma da extensão reflexa da proboscide (PER) em *M. quadrifasciata*. Operárias e machos em diferentes idades: RN: recém emergido; 7d: sete dias de vida adulta; 12d: doze dias de vida adulta; FOR: forrageiras (idade média de $29,8 \pm 3,09$ dias). Entre parênteses o número de indivíduos que estenderam a probóscide. São representados os valores médios, S.E.M e a representatividade dos dados entre 5% e 95%.

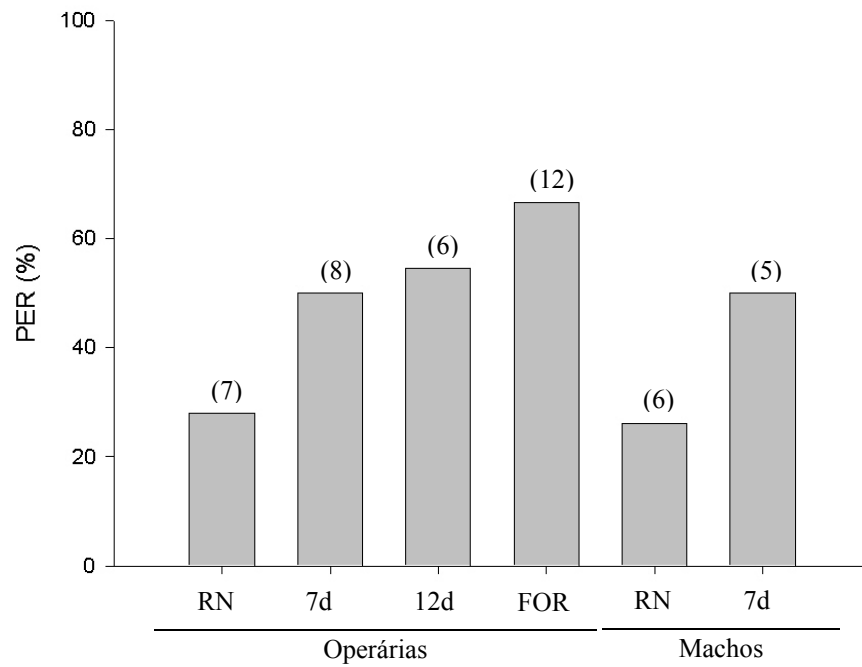


Figura 2 - Porcentagem de operárias e machos que responderam ao PER expondo a probóscide a solução de 50% de sacarose (p/v). Operárias e machos em diferentes idades: RN: recém emergido; 7d: sete dias de vida adulta; 12d: doze dias de vida adulta; FOR: forrageiras idade média de $29,8 \pm 3,09$ dias). Entre parênteses o número de indivíduos que estenderam a probóscide.

4.2. Relação entre o *status* ovariano e os títulos de Vg e HJ na hemolinfa de operárias de *M. quadrifasciata*

A relação do título de HJ e Vg na hemolinfa e o *status* ovariano foi analisado em operárias de *M. quadrifasciata* que possuíam diferentes idades/funções na colônia. Também foi verificado que operárias recém emergidas não apresentam mRNA *vg* no corpo gorduroso ao nascerem (valor densitométrico igual a zero em análise por RT-PCR em três repetições com pools de 3-4 indivíduos) (dado não mostrado).

Os títulos de Vg presentes na hemolinfa de operárias de *M. quadrifasciata* foram avaliados por SDS – PAGE (Figura). Podemos observar um já esperado aumento dos

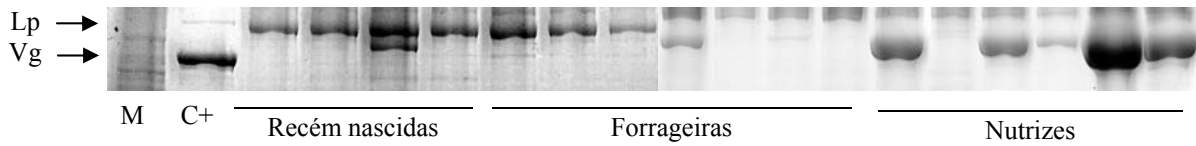


Figura 3 - Análise dos títulos de Vg na hemolinfa de operárias de *M. quadrifasciata* em SDS – PAGE das proteínas presentes. Estão indicadas as bandas referentes a Vg e a Lp (lipoforina); C+: controle positivo (rainha de *A. mellifera* em diluição de 1/10) e M: marcador molecular. Observa-se altos, baixos títulos ou até mesmo a falta da proteína Vg nas operárias com idades/funções distintas.

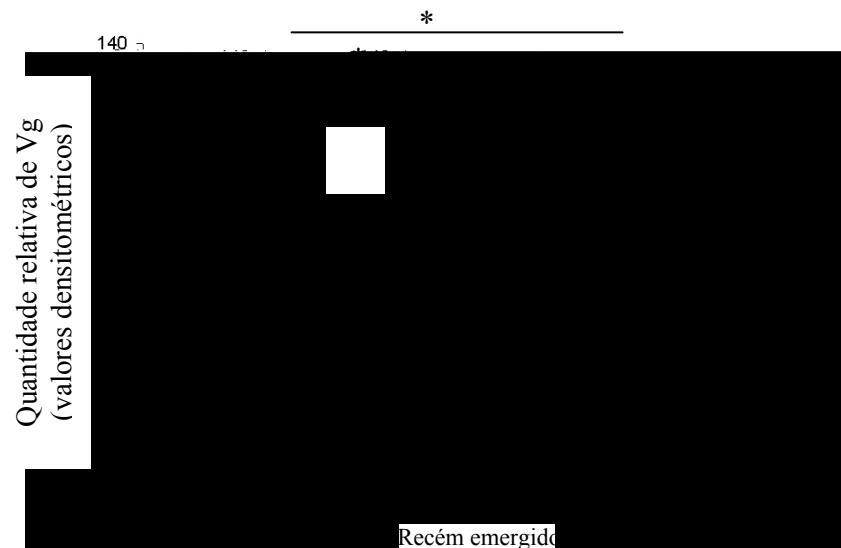


Figura 4 - Quantidade relativa de Vg (valores densitométricos) da hemolinfa das operárias de *M. quadrifasciata* com idade/funções distintas. Os asteriscos indicam diferenças estatísticas (* $P < 0,05$, Kruskal-Wallis on Ranks, Teste de múltiplas comparações: Dunn's test). Valores densitométricos normalizados pela expressão de lipoforina.

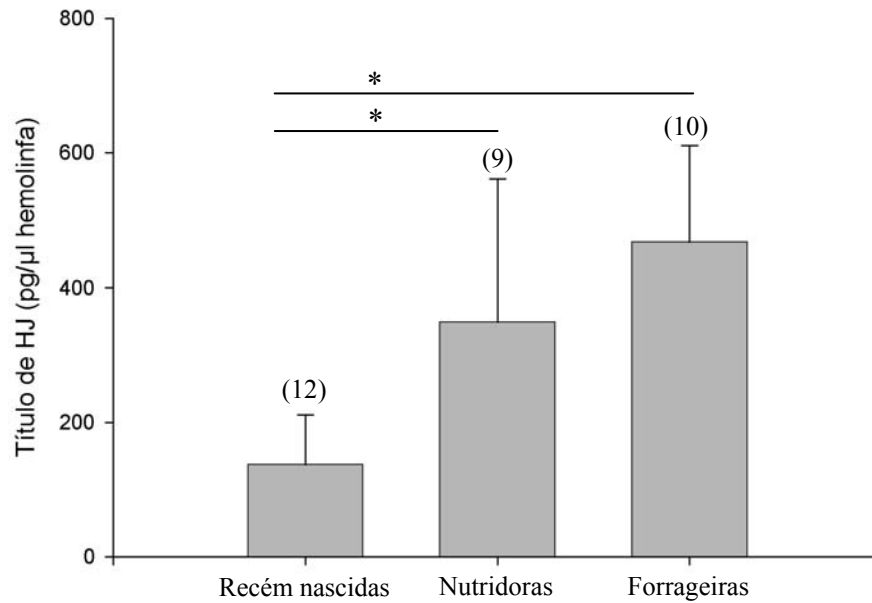


Figura 5 - Valores do título de HJ na hemolinfa de operárias adultas de *M. quadrifasciata*. O número de abelhas analisadas por grupo está indicado sobre as barras. São representados os valores médios e SD. Os asteriscos indicam diferenças estatísticas entre os grupos (* $P < 0,001$; Teste Kruskal-Wallis on Ranks, Teste de múltiplas comparações: Dunn's test).

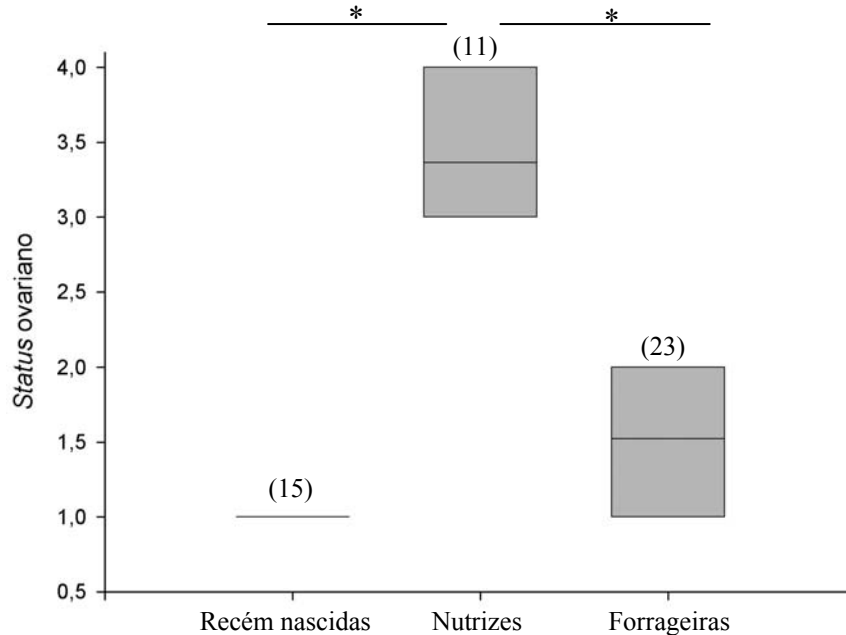


Figura 6 - Status ovariano de operárias de *M. quadrifasciata*. Operárias com diferentes idades/funções: Recém nascida; Nutridora; Forrageira. Entre parênteses o número de indivíduos. São representados os valores médios, SD e a representatividade dos dados entre 5% e 95% . (* $P < 0,05$, Kruskal Wallis on Ranks, Teste de múltiplas comparações: Dunn's test).

4.3. Efeitos do análogo do HJ Piriproxifen (PPN) sobre a expressão do mRNA de *vg* e título de Vg

Para as análises do mRNA de *vg* por RT-PCR semiquantitativa foram coletadas, durante a reação de PCR, alíquotas de 5µl de cada amostra a partir do 20º ciclo e então a cada 5 ciclos (20, 25, 30, 35 e 40 ciclos) e após análise em gel de agarose 1% em tampão TBE (Tris/Borato/EDTA), ficou estabelecido que 40 ciclos era a quantidade ideal para termos uma boa amplificação com os *primers* de *vitelogenina*. Para o controle endógeno feito com a amplificação de β -actina de *M. quadrifasciata* com *primers* desenhados para *A. mellifera*, nós usamos um total de 35 ciclos.

O ação do AHJ (PPN) sobre o início da expressão de *vg* foi avaliado sobre o início da síntese de Vg. Os efeitos na transcrição de *vg* foram analisados após sete dias do tratamento. Pôde-se detectar uma alteração nos níveis do mRNA de *vg*. Podemos observar também que o tratamento com metanol (solvente do PPN) promoveu uma redução nos níveis do mRNA de *vg*, enquanto que 10µg de PPN foi eficaz e 1µg de PPN foi parcialmente eficaz em inibir a síntese de Vg (Figura 7 e 8).

A quantidade da proteína Vg na hemolinfa avaliada por SDS-PAGE (Figura) não foi alterada pela ação do AHJ (PPN), entretanto o tratamento com Metanol (controle do solvente do PPN) apresentou a maior ação sobre a Vg (Figura 9 e 10). A aplicação do AHJ (PPN) não alterou significativamente o título de HJ na hemolinfa das operárias experimentais. Abelhas aplicadas com PPN mostraram quantidades baixas ou nulas de Vg na hemolinfa, ausência do mRNA de *vg*. Estes resultados indicam que títulos baixos e/ou ausência de Vg na hemolinfa das operárias de alguma maneira são alteradas pelos títulos de AHJ (PPN).

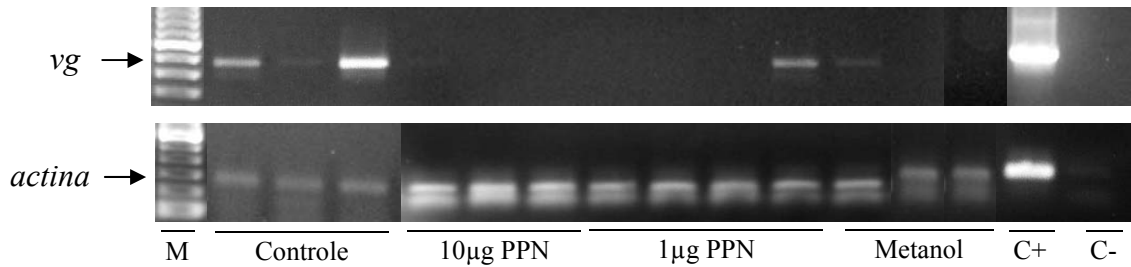


Figura 7 - Análise dos níveis do mRNA de *vg* em operárias de *M. quadrifasciata* após tratamento hormonal. As análises foram feitas por meio de RT-PCR semiquantitativa. Abelhas recém emergidas foram tratadas com análogo do HJ (PPN - *pyriproxyfen*) e analisadas sete dias depois. M: marcador molecular; C+: controle positivo; C-: controle negativo; Controle: nenhum tratamento; Metanol: solvente do PPN; 1µg PPN: operárias tratadas com 1µg de PPN; 10µg PPN: operárias tratadas com 10µg de PPN. As bandas, em gel de agarose, coradas com brometo de etídio correspondentes a amplificação do transcrito de actina foram utilizadas como controle.

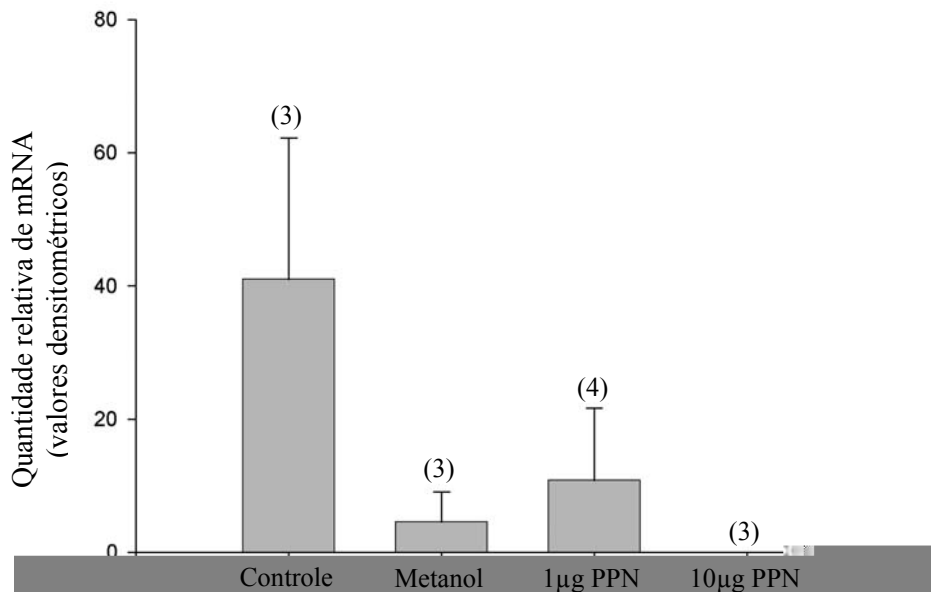


Figura 8 - Quantidade relativa de mRNA de *vg* (valores densitométricos) da hemolinfa das operárias de *M. quadrifasciata* tratadas com análogo de HJ (PPN - *pyriproxyfen*). Abelhas recém emergidas foram tratadas com PPN e analisadas sete dias depois. Controle: nenhum tratamento; Metanol: controle do solvente do PPN; 1µg PPN: operárias tratadas com 1µg de PPN; 10µg PPN: operárias tratadas com 10µg de PPN. Não há diferenças estatísticas entre os grupos. Valores densitométricos normalizados pela expressão de *actina* para mRNA de pools de 3-4 indivíduos. São representados os valores médios e SD.

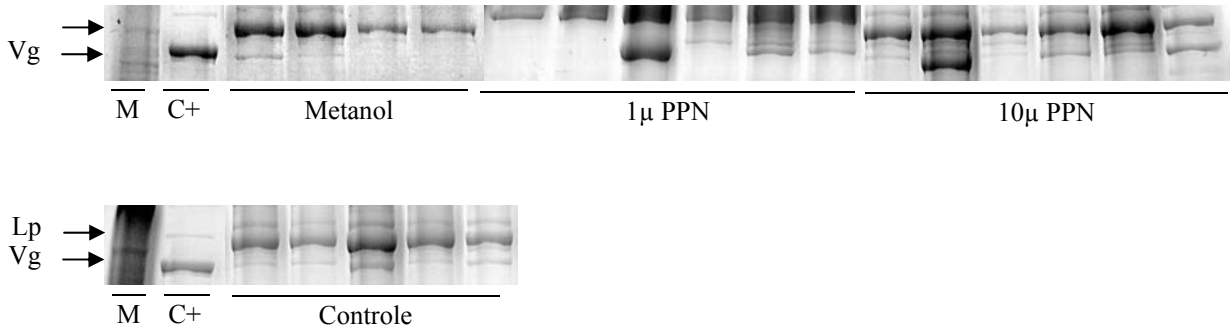


Figura 9 - Análise da hemolinfa de operárias de *M. quadrifasciata* em SDS – PAGE das proteínas presentes. Estão indicadas as bandas referentes a Vg e a Lp (lipoforina). Abelhas recém emergidas foram tratadas com PPN e analisadas sete dias depois. ; C+: controle positivo; M: marcado molecular; Controle: nenhum tratamento; Metanol: controle do solvente do PPN; 1µg PPN: operárias tratadas com 1µg de PPN; 10µg PPN: operárias tratadas com 10µg de PPN. Baixos títulos ou até mesmo a falta da proteína Vg nas operárias com tratamentos distintos.

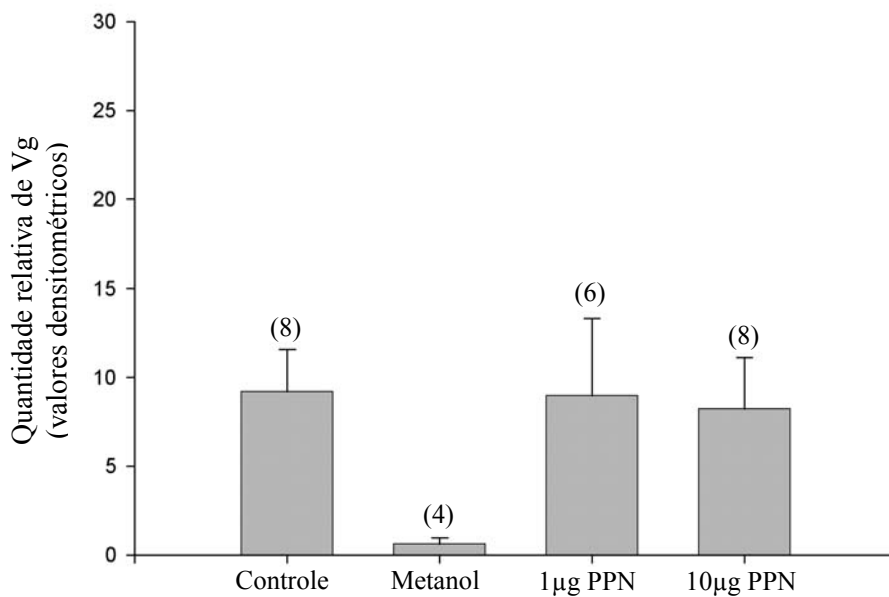


Figura 10 - Quantidade relativa de Vg (valores densitométricos) (Média ± SD) da hemolinfa de operárias experimentais. Abelhas recém emergidas foram tratadas com PPN e analisadas sete dias depois. Controle: nenhum tratamento; Metanol: controle do solvente do PPN; 1µg PPN: operárias tratadas com 1µg de PPN; 10µg PPN: operárias tratadas com 10µg de PPN. Não há diferença estatística entre os grupos (ANOVA One Way). Valores densitométricos normalizados pela expressão de lipoforina.

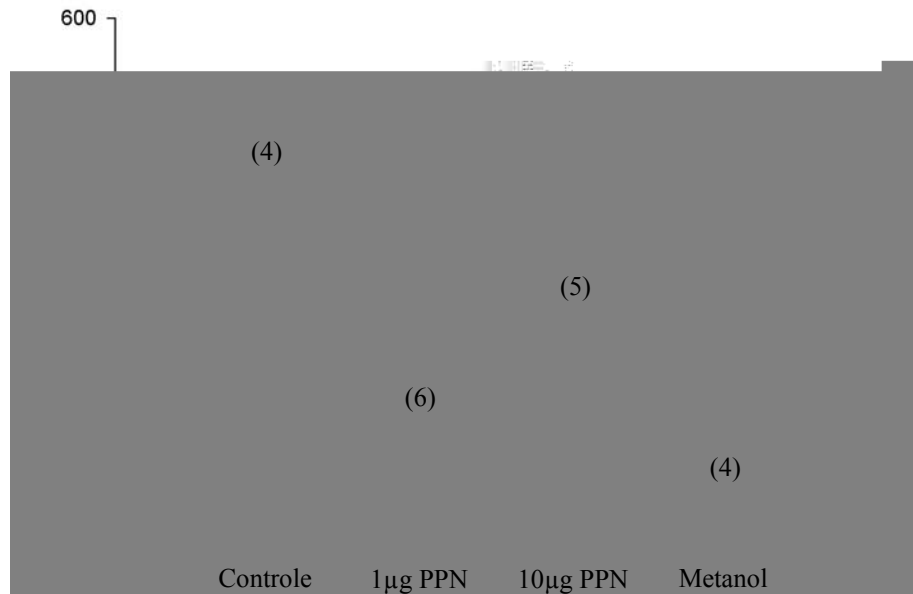


Figura 11 – Análise, por radioimunoensaio do título de hormônio juvenil (Média \pm SD) da hemolinfa de operárias experimentais. Abelhas recém emergidas foram tratadas com PPN e analisadas sete dias depois. Controle: nenhum tratamento; Metanol: controle do solvente do PPN; 1µg PPN: operárias tratadas com 1µg de PPN; 10µg PPN: operárias tratadas com 10µg de PPN. O número de abelhas analisadas por grupo está indicado sobre as barras. Não há diferenças estatísticas entre os valores (ANOVA One Way).

O experimento sobre o efeito da aplicação tópica de PPN sobre o comportamento de operárias de *M. quadrifasciata*: Tratamento com 1µg de PPN: 41 indivíduos; tratamento com 10µg de PPN: 35 indivíduos; tratamento com 100µg de PPN: 21 operárias; tratamento com 1µl de metanol: 34 operárias. Observou-se que tais indivíduos tratados topicamente com PPN ou metanol não foram observados no POP durante as idades nas quais deveriam ser operárias nutridoras, contudo participavam mordiscando cerume ou reparando o invólucro da área de cria. Entretanto o análogo de hormônio juvenil foi incapaz de promover uma precoce mudança de função para forrageira. Tais operárias tratadas com PPN foram observadas no tubo de entrada ventilando e realizando a função de guardas com as idades dentro da amplitude do comportamento natural desta espécie ($29,8 \pm 3,09$ dias), semelhante às operárias não tratadas (27 ± 5 dias).

4.4. Efeito de diferentes dietas sobre a expressão de *vg*, título de Vg, HJ e proteína total na hemolinfa de operárias adultas de *M. quadrifasciata*

Neste experimento, foram avaliados os efeitos de dietas com e sem proteína sobre os níveis de mRNA de *vg* e de sua respectiva proteína presente na hemolinfa. A dieta sem proteína (dieta 3), constituída por uma solução de 50% de sacarose (*p/v*), além de impedir o aumento significativo dos títulos de Vg na hemolinfa, normalmente observados durante os primeiros dias de vida adulta das operárias confinadas (Figura 14 e 15), também promoveu uma diminuição significativa dos níveis de mRNA de *vg* presentes no corpo gorduroso (Figura 12 e 13). Independente das operárias terem sido alimentadas com uma dieta protéica natural (dieta 1) ou por uma dieta manipulada (dieta 2), não foram observadas alterações significativas tanto nos níveis do mRNA de *vg* no corpo gorduroso quanto nas concentrações de Vg na hemolinfa destas abelhas. Já a dieta com apenas a solução de sacarose (dieta 3 - sem proteína) implicou em alterações significativas da quantidade de proteína total na hemolinfa destas abelhas. Entretanto o título de HJ na hemolinfa das abelhas não sofreu modificações significativas em relação aos três tratamentos.

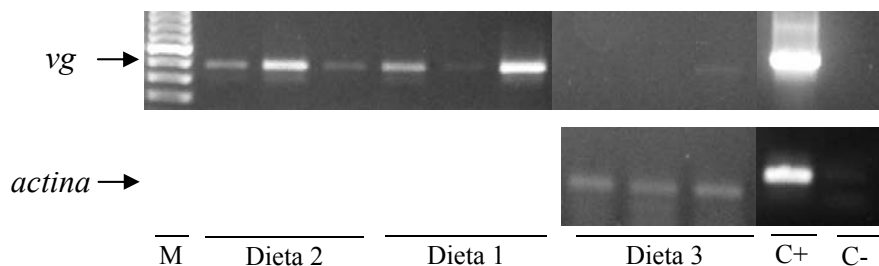


Figura 12 - Análise dos níveis do mRNA de *vg* presentes no corpo gorduroso de operárias de *M. quadrifasciata* alimentadas com diferentes dietas. Níveis do mRNA de *vg* presentes no corpo gorduroso foram avaliados por RT-PCR semiquantitativa seguida por eletroforese dos produtos de PCR em géis de agarose 1% corados com brometo de etídio. A amplificação dos transcritos de *actina* foi utilizada como controle.

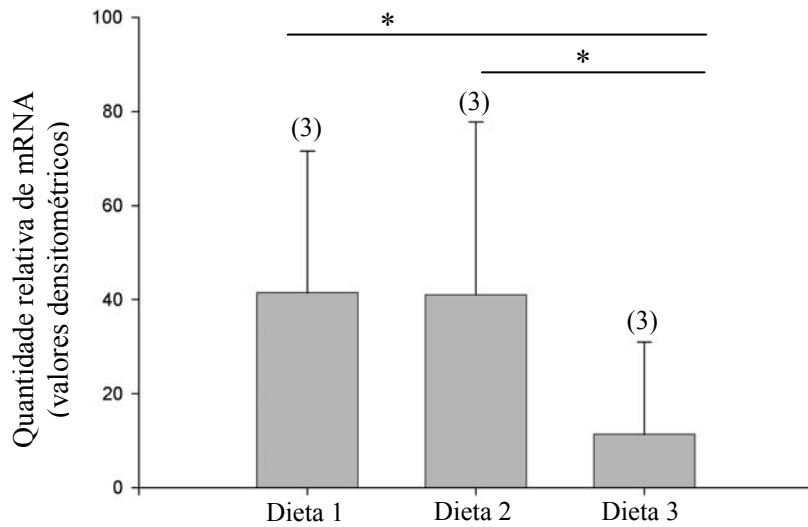


Figura 13 - Representação gráfica dos valores densitométricos, normalizados pela expressão de *actina*, correspondentes às bandas de amplificação do mRNA de *vg*. Níveis do mRNA de *vg* presentes no corpo gorduroso foram avaliados por RT-PCR semiquantitativa seguida por eletroforese dos produtos de PCR em géis de agarose 1% corados com brometo de etídio. Os asteriscos indicam diferenças estatísticas (* $P < 0,05$, ANOVA One Way, teste de múltiplas comparações: Teste de Tukey).

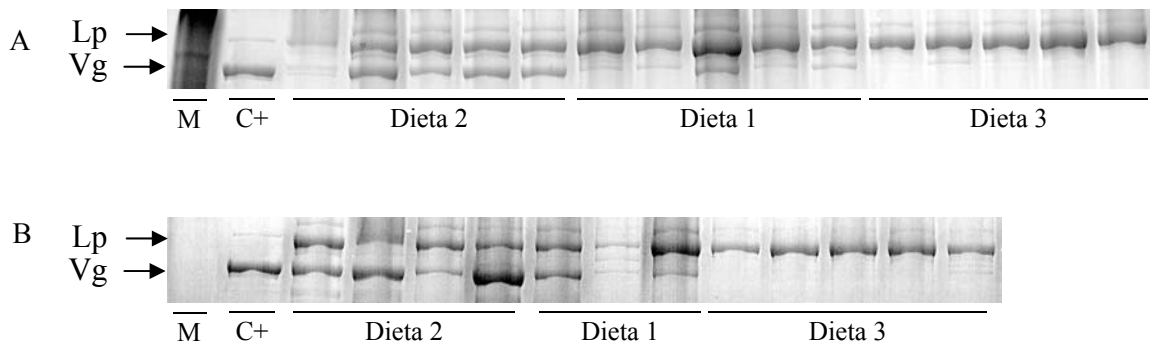


Figura 14 A e B - Análise da hemolinfa de operárias de *M. quadrifasciata* em SDS – PAGE das proteínas presentes. Estão indicadas as bandas referentes a *Vg* e a subunidade *Lp* (apoproteína I); C+: controle positivo (rainha de *A. mellifera* em diluição de 1/10) e M: marcador molecular; Dieta 1; Dieta 2; Dieta 3. Observa-se altos títulos, baixo e até mesmo a falta da proteína *Vg* na hemolinfas das operárias em tratamentos distintos.

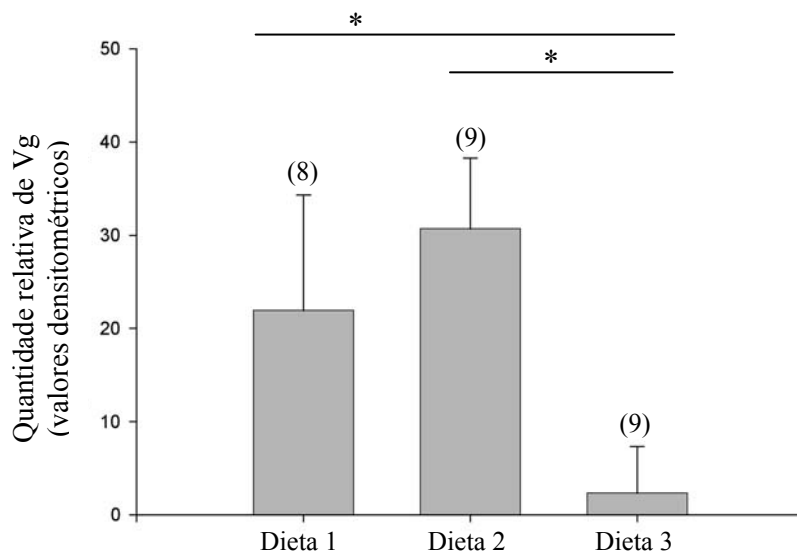


Figura 15 - Quantidade relativa de Vg (valores densitométricos) (Média±SD) da hemolinfa de operárias experimentais de *M. quadrifasciata* com sete dias de idade adulta: Dieta 1 (pólen natural); Dieta 2 (pólen de *A. mellifera* fermentado); Dieta 3 (solução de sacarose a 50% (p/v)). O número de abelhas analisadas por grupo está indicado sobre as barras. Os asteriscos indicam diferenças estatísticas entre os grupos (*P < 0,05; Teste Kruskal-Wallis on Ranks, Teste de múltiplas comparações: Dunn's test). Valores densitométricos normalizados pela expressão de lipoforina.

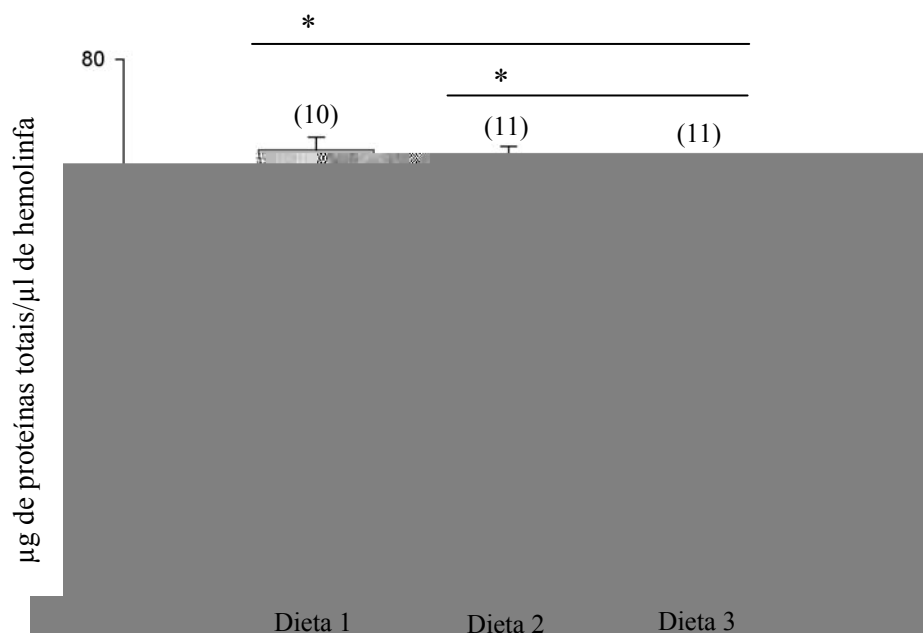


Figura 16 - Análise da proteína total presente na hemolinfa de operárias de *M. quadrifasciata*. Dieta 1: Pólen Natural; Dieta 2: Pólen de *A mellifera* fermentado; Dieta 3: solução de sacarose 50% (p/v). O número de abelhas analisadas por grupo está indicado sobre as barras. Os asteriscos indicam diferenças estatísticas entre os grupos (*P < 0,05; ANOVA One Way, Teste de múltiplas comparações: Student-Newmman-Keuls).

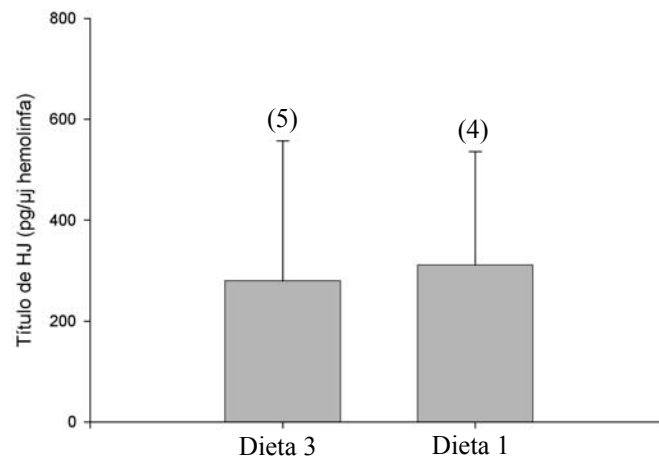


Figura 17 - Título de HJ presente na hemolinfa de operárias de *M. quadrifasciata* sob diferentes tratamentos: Dieta 1 : pólen natural; Dieta 3: solução de sacarose 50% (p/v). Não há diferenças estatísticas entre os valores (Kruskal-Wallis on Ranks, Teste de múltiplas comparações: Dunn's test).

4.5. Status ovariano, título de HJ e Vg na hemolinfa de operárias de *M. quadrifasciata* em enxameação

Neste experimento, foi acompanhado o processo de enxameação natural em *M. quadrifasciata*. Este iniciou-se em 10 de janeiro de 2007 em uma caixa de madeira vazia com um volume aproximado de 20 litros, que estava no depósito de materiais do Apiário do Departamento de Genética da FMRP. Primeiramente, as abelhas mantiveram guardas na entrada da caixa pernoitando no local. Esta caixa foi aberta no dia seguinte e não havia qualquer material no interior e poucas abelhas estavam vedando as frestas junto a tampa. Dia 13 de janeiro de 2007 a boca de entrada da caixa estava sendo construída com barro pelas operárias e o número destas tinha aumentado. As operárias entravam com cerume trazido na corbícula e não foi possível precisar qual a colônia de origem das abelhas. No dia 20 de janeiro de 2007 poucos potes foram construídos e o invólucro da área de cria estava em construção; as abelhas entravam na colônia com pólen na corbícula. Dia 05 de fevereiro de 2007 a primeira célula foi ovipositada pela rainha. Dia 08 de fevereiro de 2007 o tubo de entrada da colônia foi vedada com fita e no dia 09 de fevereiro de 2007 todas as abelhas da colônia foram anestesiadas com nitrogênio gasoso, contadas (127 abelhas no total) e destas foram coletas 43 operárias ao acaso, incluindo as abelhas do invólucro junto a área de cria, para as análises que se seguem.

Algumas operárias em enxameação apresentaram os ovários ativos classificados como III e IV estando significativamente relacionados com a quantidade de Vg na hemolinfa (Figura 19). Tais indivíduos apresentam o título de HJ maiores que aqueles apreentados por operárias em enxameação com os ovários classificados como I e II (Figura 21 e 22).

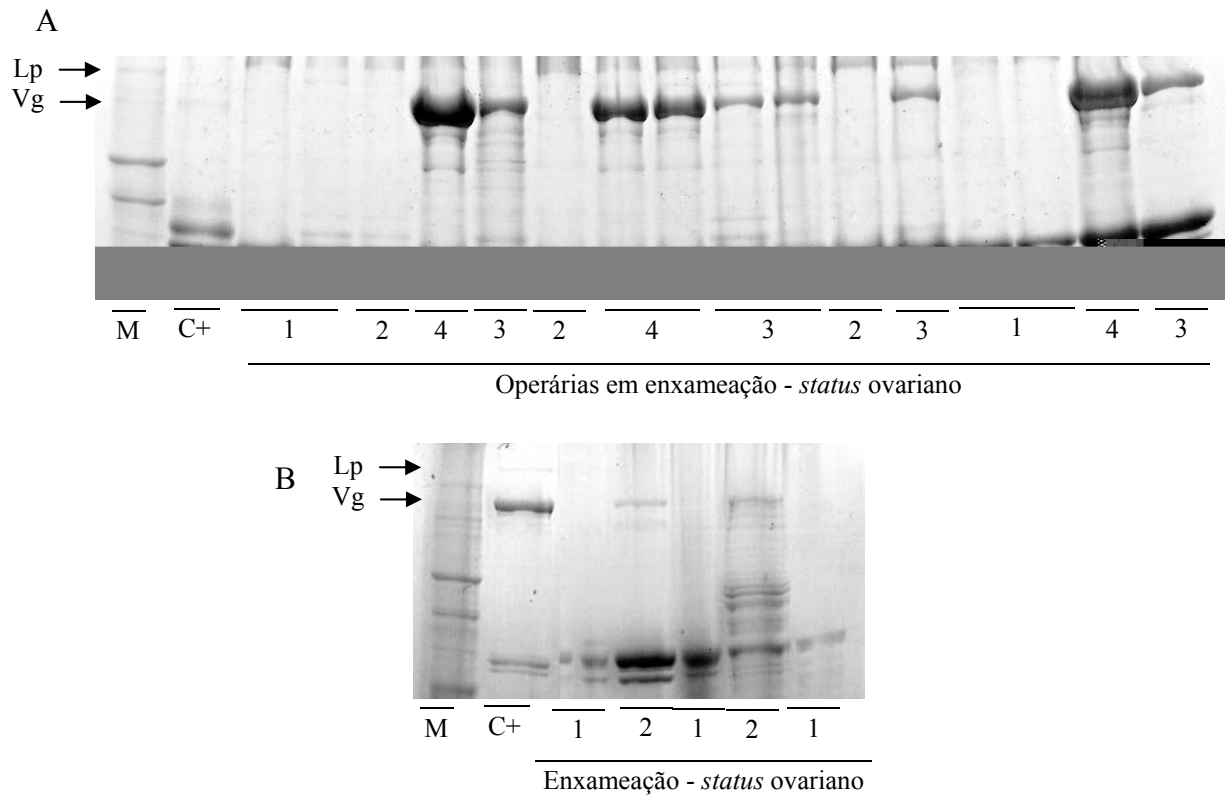


Figura 18 A e B - Análise dos níveis de Vg na hemolinfa de operárias de *M. quadrifasciata* em enxameação natural. SDS - PAGE das proteínas presentes na hemolinfa de operárias em enxameação. Estão indicadas as bandas referentes a Vg e a Lp (lipoforina;); C+: controle positivo (operária de *A. mellifera* com 7 dias) e M: marcador molecular; *status* ovariano das operárias: 1 - inativo; 2 - início da ativação; 3 - folículo vitelogênico e 4 - ovócito completamente maduro. Observa-se altos títulos, baixo e até mesmo a falta da proteína Vg na hemolinfas das operárias com *status* ovariano distintos.

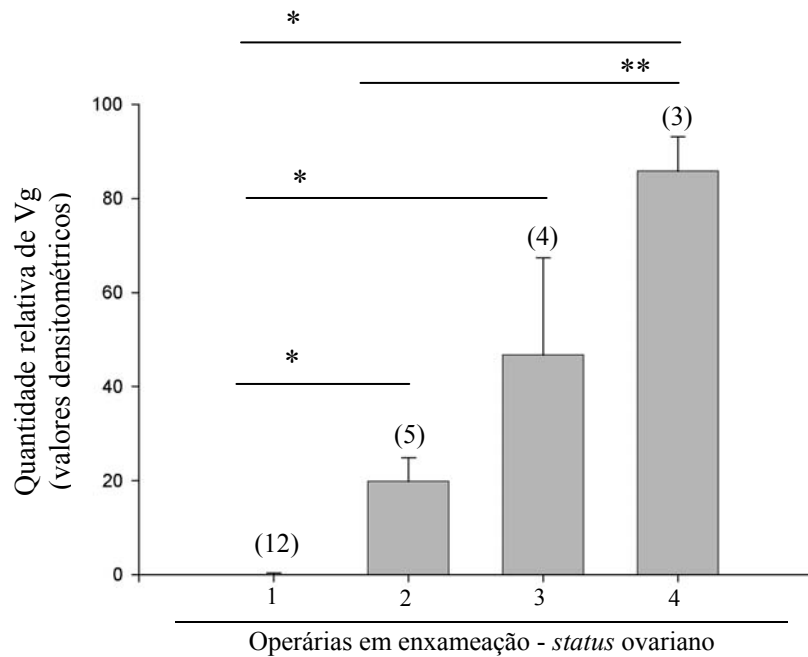


Figura 19 - Avaliação dos níveis da proteína Vg presente na hemolinfa de operárias em enxameação de *M. quadrifasciata* com diferentes graus de ativação dos ovários (*status* ovariano): 1 - inativado; 2 - ativado com folículos pré-vitelogênicos; 3 - com folículos em vitelogênese e 4 - com ovócito completamente maduro. Representação gráfica dos valores densitométricos, normalizados pela proteína lipoforina (* $P < 0,05$; ** $p < 0,001$, Teste Kruskal-Wallis on Ranks, Teste de múltiplas comparações: Dunn's Test).

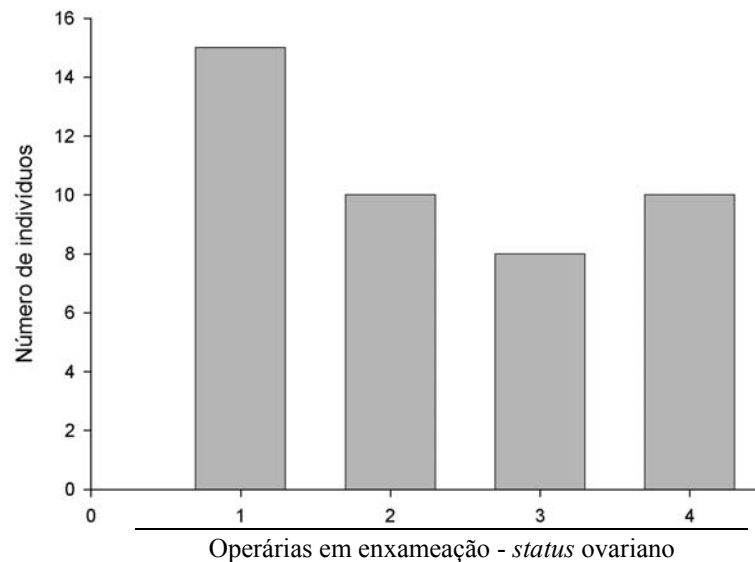


Figura 20 - *Status* ovariano de operárias em enxameação de *M. quadrifasciata* com diferentes graus de ativação dos ovários (*status* ovariano): 1 - inativado; 2 - ativado com folículo pré-vitelogênico; 3 - com folículos em vitelogênese e 4 - com ovócito completamente maduro .

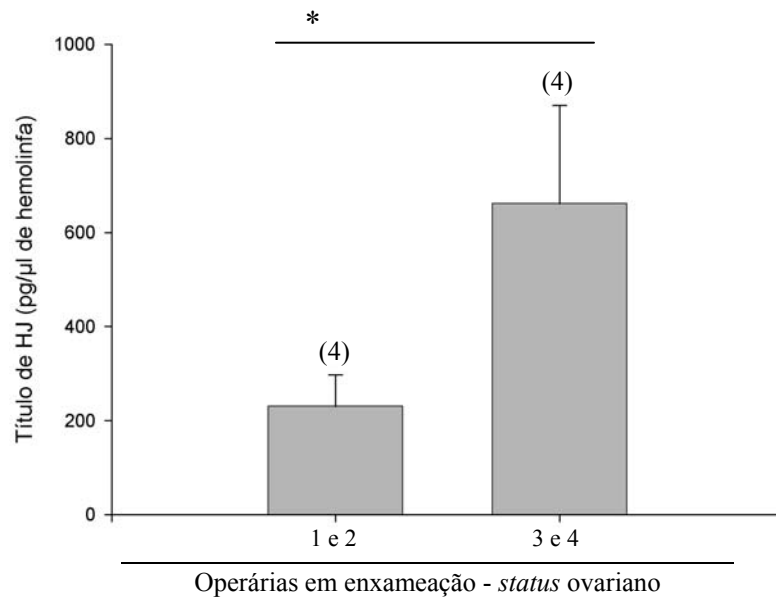


Figura 21 - Análise por radioimunoensaio do título de hormônio juvenil (Média \pm SD) da hemolinfa de operárias em enxameação de *M. quadrifasciata* com diferentes graus de ativação dos ovários (*status* ovariano): 1 - inativado; 2 - ativado com folículos pré-vitelogênicos; 3 - com folículos em vitelogênese e 4 - com ovócito completamente maduro. O número de abelhas analisadas por grupo está indicado sobre as barras. (* $P < 0,05$; ANOVA One Way, teste de múltiplas comparações: Teste Tukey)

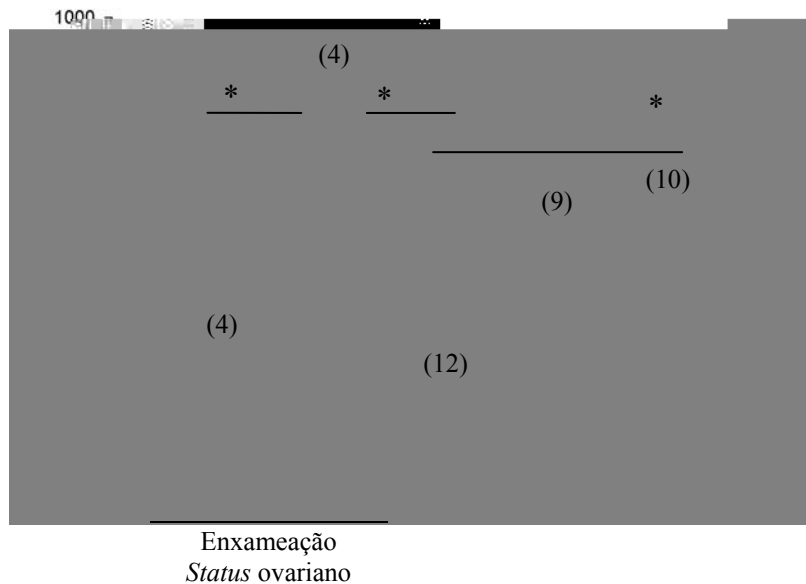


Figura 22 - Análise por radioimunoensaio do título de hormônio juvenil (Média \pm SD) da hemolinfa de operárias em enxameação de *M. quadrifasciata* com diferentes graus de ativação dos ovários (*status* ovariano): 1 - inativado; 2 - ativado pré-vitelogênico; 3 - com folículos em vitelogênese e 4 - com ovócito completamente maduro; RN: operárias recém emergidas; NUT: operárias nutridoras; FOR: operárias forrageiras. O número de abelhas analisadas por grupo está indicado sobre as barras (* $p < 0,05$ Kruskal-Wallis on Ranks, teste de múltiplas comparações: Dunn-s test).

4.6. Efeito da dieta protéica sobre o nascimento de machos em colônias de *M. quadrifasciata*

As colônias de *M. quadrifasciata* foram alimentadas com aproximadamente $17,14g \pm 0,99$ ($12,44g \pm 0,72$ em peso seco) de uma dieta protéica suplementar (para detalhes ver item 3.1) semanalmente. Sempre foi mantido um pote de cera com alimento protéico fechado no interior da colônia, no qual as abelhas ainda não iniciaram o consumo do alimento.

Observou-se a ocorrência de machos nos favos de crias em sete colônias experimentais de *M. quadrifasciata* que estavam recebendo semanalmente alimentação suplementar. Os favos de cria nascentes foram coletados das colônias experimentais quinzenalmente e observou-se o nascimento dos indivíduos durante o período de junho de 2002 à dezembro 2004. A partir de janeiro de 2004 as colônias não receberam a dieta de pólen de *Apis* fermentado para efeito controle da alimentação protéica suplementar. Contudo as colônias receberam 50ml de solução de sacarose a 50%. As colônias C3 e 2W não receberam alimentação suplementar com pólen.

Verificamos que a produção de machos se apresentou de forma contínua nas colônias 1W, 2A, 4A, 5A e 7A durante o período de observação (Figura 23, 24, 25, 26 e 27). Não há uma correlação entre o nascimento de machos e as condições ambientais, entretanto somente em duas colônias ocorreu uma correlação positiva entre o nascimento maior de operárias (Figura 23, 26 e 29) e a temperatura ambiente, bem como este com a emergência de rainhas em somente uma colônia experimental (Figura 27).

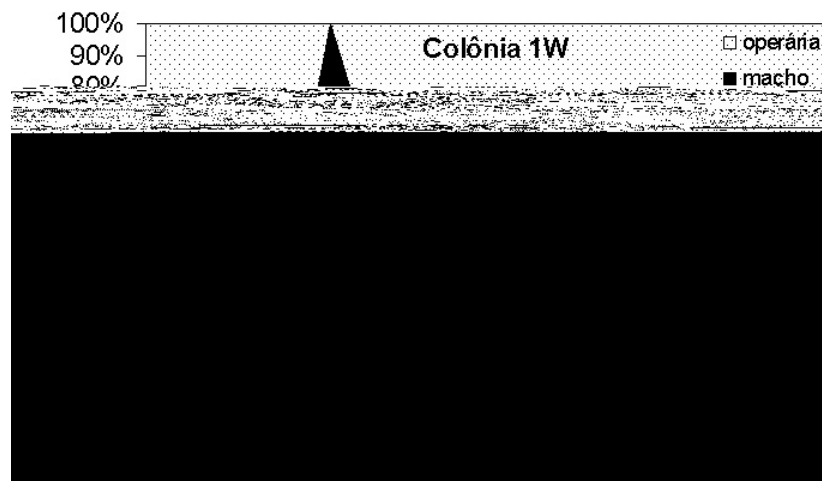


Figura 23 - Colônia 1W: Ocorrência do nascimento de operárias, machos e rainhas nos favos de *M. quadrifasciata*. Dados apresentados mensalmente. Existe uma correlação positiva entre a temperatura e o nascimento de operárias ($p=0,0404$), entretanto não há correlação entre o nascimento de rainhas e machos em relação a temperatura (rainhas, $p=0,418$ e machos $p=0,842$). Não há correlação entre UR (operárias, $p=0,254$; rainhas, $p=0,241$ e machos, $p=0,769$), insolação (operárias, $p=0,410$; rainhas, $p=0,147$ e machos, $p=0,744$) e precipitação (operárias, $p=0,574$; rainhas, $p=0,717$ e machos, $p=0,987$) e os indivíduos da colônia (teste de correlação de Pearson).

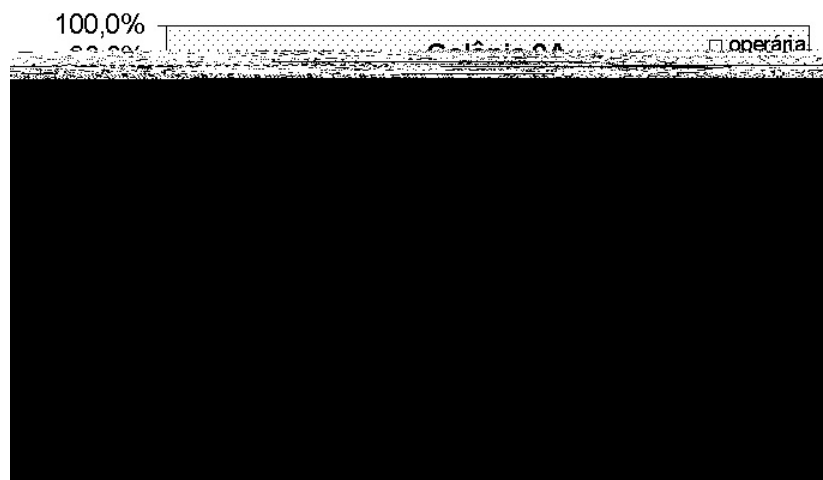


Figura 24 - Colônia 2A: Ocorrência do nascimento de operárias, machos e rainhas nos favos de *M. quadrifasciata*. Dados apresentados mensalmente. Não há correlação entre o nascimento de operárias, rainhas e machos em relação a temperatura (operárias, $p=0,213$; rainhas, $p=0,510$; e machos, $p=0,624$), UR (operárias, $p=0,998$; rainhas, $p=0,347$ e machos, $p=0,610$), insolação (operárias, $p=0,505$; rainhas, $p=0,294$ e machos, $p=0,878$) e precipitação (operárias, $p=0,946$; rainhas, $p=0,454$ e machos, $p=0,804$) (teste de correlação de Pearson).

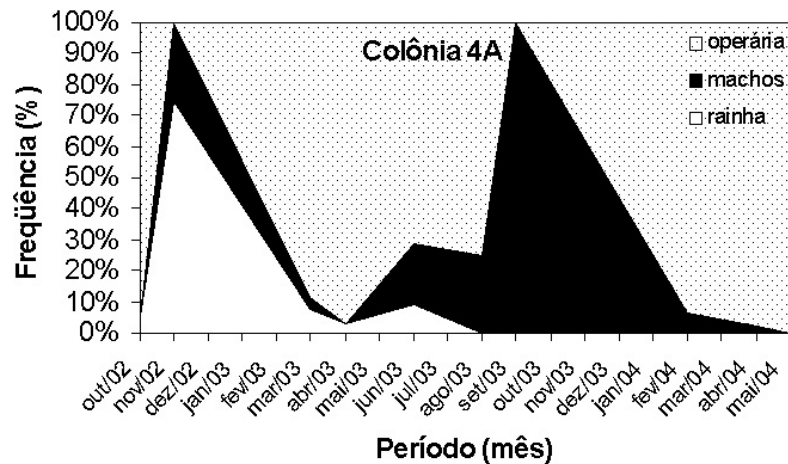


Figura 25 - Colônia 4A: Ocorrência do nascimento de operárias, machos e rainhas nos favos de *M. quadrifasciata*. Dados apresentados mensalmente. Não há correlação entre o nascimento de operárias, rainhas e machos em relação a temperatura (operárias, $p=0,716$; rainhas, $p=0,263$; e machos, $p=0,538$), UR (operárias, $p=0,513$; rainhas, $p=0,904$ e machos, $p=0,234$), insolação (operárias, $p=0,237$; rainhas, $p=0,927$ e machos, $p=0,562$) e precipitação (operárias, $p=0,517$; rainhas, $p=0,835$ e machos, $p=0,261$) (teste de correlação de Pearson).

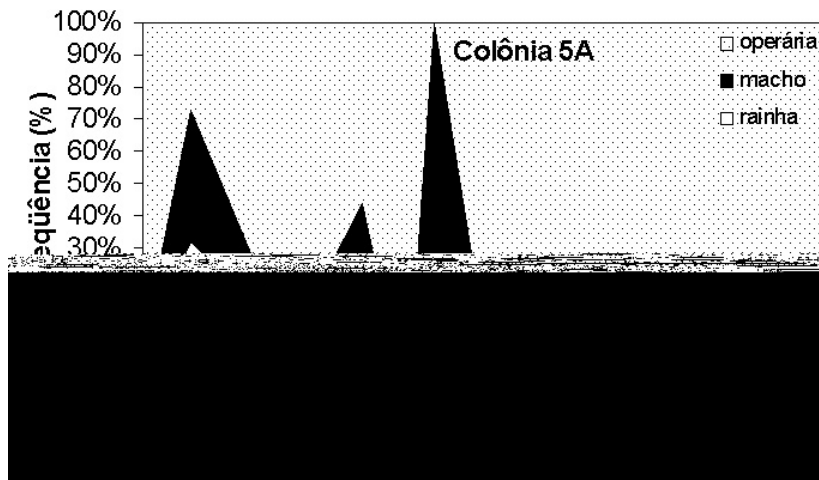


Figura 26 - Colônia 5A: Ocorrência do nascimento de operárias, machos e rainhas nos favos de *M. quadrifasciata*. Dados apresentados mensalmente. Existe uma correlação positiva entre a temperatura e o nascimento de operárias ($p=0,00818$), entretanto não há correlação entre o nascimento de rainhas e machos em relação a temperatura (rainhas, $p=0,774$ e machos $p=0,584$). Não há correlação entre UR (operárias, $p=0,419$; rainhas, $p=0,372$ e machos, $p=0,915$), insolação (operárias, $p=0,286$; rainhas, $p=0,521$ e machos, $p=0,837$) e precipitação (operárias, $p=0,440$; rainhas, $p=0,502$ e machos, $p=0,600$) e os indivíduos da colônia (teste de correlação de Pearson).

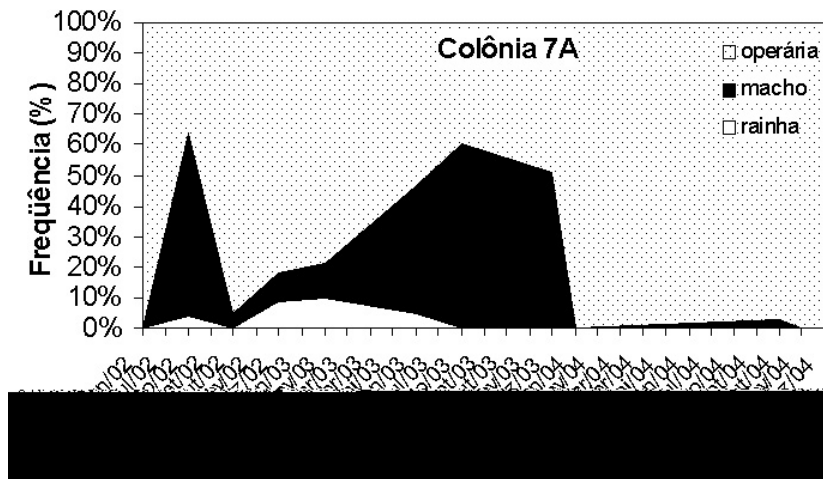


Figura 27 - Colônia 7A: Ocorrência do nascimento de operárias, machos e rainhas nos favos de *M. quadrifasciata*. Dados apresentados mensalmente. Existe uma correlação positiva entre a temperatura e o nascimento de rainhas ($p=0,00672$), entretanto não há correlação entre o nascimento de operárias e machos em relação a temperatura (operárias, $p=0,169$ e machos $p=0,404$). Não há correlação entre UR (operárias, $p=0,582$; rainhas, $p=0,471$ e machos, $p=0,283$), insolação (operárias, $p=0,557$; rainhas, $p=0,514$ e machos, $p=0,425$) e precipitação (operárias, $p=0,199$; rainhas, $p=0,359$ e machos, $p=0,250$) e os indivíduos da colônia (teste de correlação de Pearson).

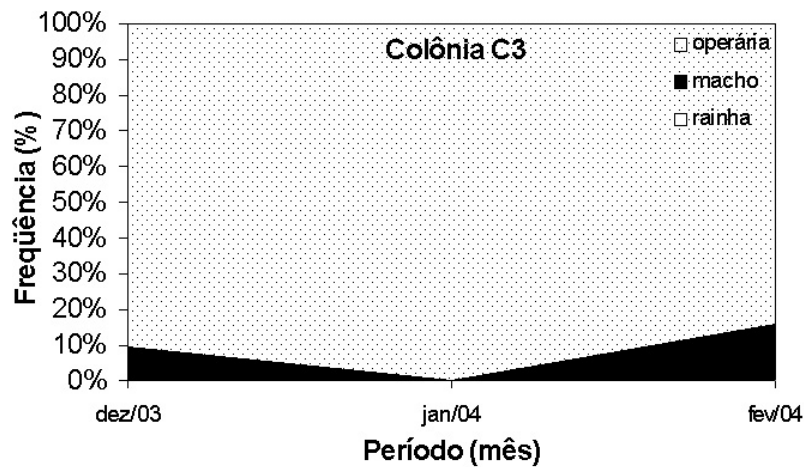


Figura 28 - Colônia C3: Ocorrência do nascimento de operárias, machos e rainhas nos favos de *M. quadrifasciata*. Dados apresentados mensalmente. Não há correlação entre o nascimento de operárias em relação a temperatura (operárias, $p=0,571$), UR (operárias, $p=0,837$), insolação (operárias, $p=0,571$) e precipitação (operárias, $p=0,571$). Os demais indivíduos não apresentaram números suficientes para serem destacados (teste de correlação de Pearson).

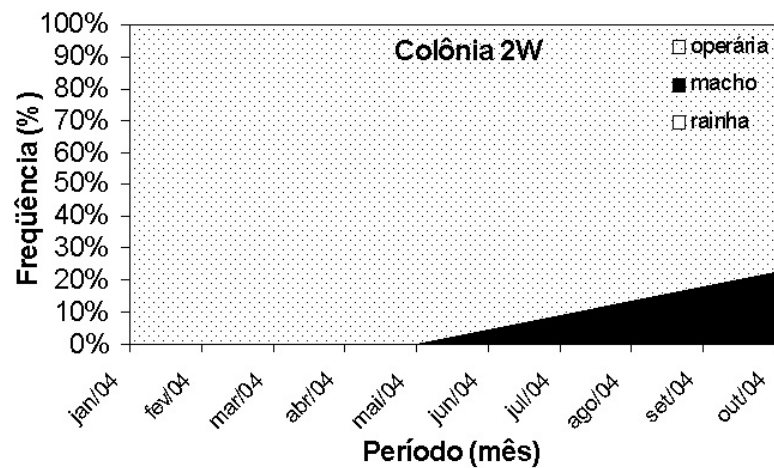


Figura 29 - Colônia 2W: Ocorrência do nascimento de operárias, machos e rainhas nos favos de *M. quadrifasciata*. Dados apresentados mensalmente. Existe uma correlação positiva entre a temperatura e o nascimento de operárias ($p=0,0333$). Não há correlação entre UR (operárias, $p=0,490$), insolação (operárias, $p=0,259$) e precipitação (operárias, $p=0,0374$). Os demais indivíduos não apresentaram números suficientes para serem destacados (teste de correlação de Pearson).

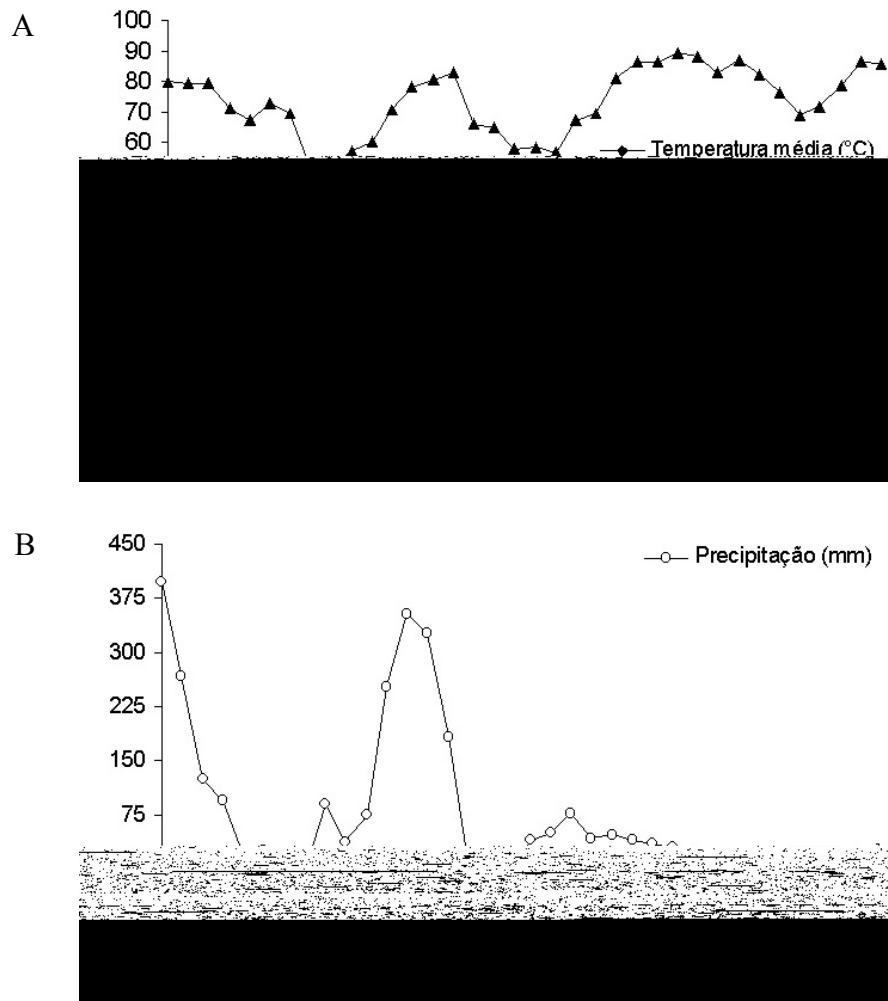


Figura 30 - Condições ambientais durante o período amostral de janeiro de 2002 a dezembro de 2004, na cidade de Ribeirão Preto - SP. Fonte: CIAGR II - IAC. A: temperatura média mensal (°C); umidade relativa média - UR (%); insolação média mensal (horas de luz). B: Precipitação média mensal (mm).

5. DISCUSSÃO

5.1. PER

Deve-se salientar que as abelhas não respondem ao PER imediatamente após serem contidas. A resposta gustativa só foi obtida após os indivíduos contidos permanecerem por um período de aproximadamente 60 minutos em estufa (28°C e UR de 80%). A não reação inicial destas abelhas está, provavelmente, associada ao estresse provocado e à sensibilidade destas ao aprisionamento, sendo comumente observado o comportamento de regurgitação o alimento contido no papo. Contudo podemos deixar claro a capacidade que as operárias e machos de *M. quadrifasciata* apresentam em responder ao teste do PER.

Os limiares de resposta variam dependendo da idade do indivíduo, experiência prévia e genótipo, sendo *M. quadrifasciata* muito plástica nas respostas às mudanças das condições da colônia (Waldschmidt *et al.*, 1998). Não esquecendo que a habilidade de aprender é a chave determinante para o sucesso ecológico e evolucionário dos insetos sociais (Page & Erber, 2002). A resposta gustativa a menores concentrações de sacarose aumenta com o aumento da idade nas operárias e nos machos, sendo esta constatação correlacionado com a melhor aquisição ou percepção pelos receptores da antena das abelhas (Pankiw & Page, 1999). Acredita-se que, tal aquisição esteja relacionada ao comportamento adquirido em resposta às condições internas da colônia, estando adequado ao contexto de divisão de trabalho, não fazendo sentido que indivíduos muito jovens apresentem limiar de respostas gustativa semelhantes a abelhas forrageiras.

Os machos de *Melipona* são capazes de realizar algumas tarefas no interior da colônia, como recepção e desidratação de néctar (Van-Veen *et al.*, 1997). Estes saem da colônia e não mais retornam, vivendo do néctar das plantas; bem como apresentam uma

capacidade de identificarem os odores de marcação existentes em colônias novas de enxameação, que receberão a rainha virgem, formando agregados, que comumente são relatados na literatura (Engels & Engels, 1984). Portanto, é de se esperar que respondam mais facilmente a concentrações de sacarose menores com o aumento da idade e haja um aumento na capacidade inata de reconhecimento e aprendizado.

Já as respostas crescentes ao PER em operárias com idades maiores, deve-se à presença de receptores adequadamente mais sensíveis ou mais eficientes, fisiologicamente falando, tornando-as capazes de melhor identificar e reconhecer situações compatíveis com a idade/função que lhe são necessárias à execução de tarefas dentro e fora da colônia. Operárias só iniciam o trabalho com as crias, no qual são requeridos a produção de secreção glandular e também o regurgitamento de uma mistura de pólen e mel nas células, entre doze e vinte um dias de vida (Kerr & Santos-Neto, 1956). Nesta idade as operárias possuem maior contato direto com os alimentos, não somente através da trofalaxe.

Operárias apresentam determinados comportamentos relacionados ao aprendizado, tendo em vista, que uma experiência prévia ou seja, o contato com diferentes alimentos, neste caso, possibilite às operárias mais velhas mais respostas positivas ou respostas mais eficientes a concentrações menores de sacarose, estando a performance associada ao aprendizado como o observado em *A. mellifera* (Pankiw & Page, 1999; Scheiner *et al.*, 1999).

As abelhas nutridoras possuem capacidade de percepção próxima ao de operárias forrageiras, demonstrando que a divisão de trabalho está associada com diferentes desempenhos decorrentes do aprendizado e com capacidades sensoriais inatas, possibilitando respostas cognitivas semelhantes, como também verificado em *A. mellifera* (Ben-Shahar & Robinson, 2001). Assim, é de se esperar que operárias forrageiras de *M. quadrifasciata*, bem como operárias de doze dias de vida, supostamente nutridoras, possuam uma resposta ao PER semelhantes.

A semelhança no limiar de resposta gustativa entre forrageiras e nutridoras, possivelmente está relacionado à baixa concentração dos méis dos Meliponini, que está por volta de 55% e 70% (Cortopassi-Laurino & Gelli, 1991; Souza *et al.*, 2006; Bijlsma *et al.*, 2006). Entretanto, forrageiras apresentam uma resposta à solução de sacarose a concentração de 50% em torno de 66%, muito inferior à resposta gustativa de 95%

verificada em *A. mellifera* (Cabe *et al.*, em preparo). Operárias campeiras de *M. fasciata* tomam a decisão de escolher entre fontes de sacarose, preferindo aquela que apresenta a maior concentração de açúcar, mas não abandonando totalmente fontes mais pobres em sacarose (Biesmeijer & Ermers, 1999). Esta decisão de iniciar, parar ou manter o forrageamento em determinada fonte também é devido à experiência externa e não somente às concentrações maiores de sacarose encontradas (Biesmeijer *et al.*, 1998). Tal comportamento esclarece que a capacidade cognitiva está associada a aspectos ecológicos como reconhecer concentrações menores de solução de sacarose no nicho destas abelhas e que o aprendizado ou experiências prévias apresentam grande influência sobre o comportamento de forrageamento.

5.2. Relação entre o *status* ovariano e os títulos de Vg e HJ na hemolinfa de operárias de *M. quadrifasciata*

Uma das características diferenciais, a capacidade vitelogênica, não é observada no momento da emergência em *M. quadrifasciata* e demais Meliponini já estudados (Dallacqua *et al.*, 2007), sendo o oposto verificado em *A. mellifera* (Barchuk *et al.*, 2002) na qual, a quantidade de Vg é praticamente nula em operárias recém emergidas e forrageiras, concomitantemente ao aumento de HJ nestas últimas (significativamente distintos).

Os maiores níveis de Vg foram detectados nas operárias de *M. quadrifasciata* com função de nutridora. O estabelecimento do perfil de acúmulo de Vg na hemolinfa e o *status* ovariano das operárias de *M. quadrifasciata* deixam claro a relação desta proteína com a atividade de operária nutridora e com a produção de ovos tróficos e/ou reprodutivos durante o POP, comumente observado nos Meliponini, demonstrando que a alta síntese de Vg está relacionada à incorporação desta pelos ovócitos em crescimento também observado em *M. scutellaris* e *S. postica* (Dallacqua *et al.*, 2007). Em *A. mellifera* a Vg também é encontrada como uma reserva protéica endógena, tendo em vista a presença desta proteína nas glândulas hipofaríngeas observada em abelhas com função de nutridora e ovários inativos (Amdam *et al.*, 2003a), bem como em *F. varia* (Dallacqua *et al.*, 2007).

Aparentemente a proteína Vg é um fator integrante no processo de divisão de trabalho em *M. quadrifasciata*, tendo em vista a correlação desta proteína com a oviposição nos Meliponini e a importância da oviposição de operárias no POP (Zucchi *et al.*, 1999). Contudo é relatado na literatura que a Vg assume vários papéis na fisiologia de *Apis*, como, por exemplo, ajudar na resposta imune e senescência (Amdam *et al.*, 2004a), é tida como uma proteína de reserva (Amdam & Omholt, 2002), integrante de mudanças comportamentais (Amdam *et al.*, 2006) e responsável diretamente ou em sinergia com outros fatores fisiológicos (Amdam *et al.*, 2003a). Contudo, em *M. quadrifasciata*, esta proteína está intimamente relacionada ao *status* ovariano e à função de nutridora.

Aparentemente o título de Vg constitui o fator indicativo do comportamento das operárias de *M. quadrifasciata*, por que não dizer, participante nas mudanças comportamentais, sendo que títulos maiores implicam em tarefas de operárias nutrizas e/ou poedeiras (ver item 5.5).

Em um contexto mais amplo podemos vislumbrar uma ação basal desta proteína na mudança das características comportamentais de indivíduos não reprodutivos para indivíduos reprodutivos, onde operárias poedeiras são comumente encontradas (Sakagami & Zucchi 1966). Soma-se a este a interação social, no qual a exigência local determina a tarefa executada pela abelha no ninho, o acesso a diferentes dietas e consequente mudança comportamental, fato este não limitado pela ação inibitória de altos títulos de HJ na hemolinfa destes indivíduos.

Fica claro que o HJ não assumiu uma função moduladora do comportamento em *M. quadrifasciata* como encontrada em *A. mellifera*, devido às diferenças não significativas entre os títulos de HJ na hemolinfa de operárias com funções distintas, entretanto ainda apresenta uma ação inibitória na transcrição genética, neste caso a expressão do *vg* (ver item 5.3). Acreditamos também que a Vg seja um dos agentes responsáveis pela modulação da plasticidade e da divisão de trabalho em *Melipona*, atuando, possivelmente, em sinergia com outro fator fisiológico ainda não pesquisado.

A síntese desta proteína deve-se a um processo mediado por neuormônios e aminas biogênicas produzidos pelo cérebro e o HJ dos *corpora allata* (Barchuk *et al.*, 2002; Hartfelder & Engels, 1998). Já os ecdisteróides, aparentemente parecem não apresentar, na vida adulta de abelhas altamente eusociais, uma função moduladora da

reprodução (Hartfelder *et al.*, 2002) e em *M. quadrifasciata* seus níveis são muito baixos (Santana, 2002).

Podemos destacar que o título de HJ aumenta com a mudança de função de nutridora (atividade interna) para a função de forrageira (atividade externa) nas operárias de *M. quadrifasciata*. Contudo este aumento não é significativamente alto, não negativamente correlacionado com o *status* ovariano e quantidade relativa de Vg na hemolinfa. Tal constatação abre uma lacuna. Qual o agente regulador da mudança comportamental em *M. quadrifasciata* (ver item 5.4 e 5.5)? Tal semelhança entre os títulos de HJ entre operárias nutrizas e forrageiras permitiria às operárias a mudança de função de acordo com o contexto social. Acreditamos que o contexto social regula ou mantém as operárias engajadas em determinadas funções, “permitindo” ou “explicando” a grande plasticidade e amplitude comportamental associados as oscilações nos títulos de HJ. Podemos até mesmo especular que as operárias são capazes de executar todas as tarefas necessárias dentro da colônia independentes das idades que apresentam.

Alguns autores verificaram que os títulos de HJ, Vg e lipídios estão relacionados à mudança comportamental em *Apis*, agindo em separado ou todos estes em conjunto ou em cascata na fisiologia das abelhas melíferas. Ao meu ver, tais propostas só reafirmam a forte relação entre a alimentação, o *status* fisiológico e o comportamento nas abelhas. Muito pouco ainda é conhecido sobre a regulação endócrina e a plasticidade comportamental em *Melipona*, mas podemos salientar que a síntese e o título de Vg estão envolvidos neste processo.

Após a constatação por Santana (2002) que os títulos de HJ parecem não estar envolvidos com a divisão de trabalho em *M. quadrifasciata*, podemos hoje confirmar tal hipótese, tendo em vista que operárias forrageiras, bem como nutrizas não apresentam títulos de HJ estatisticamente distintos, contudo apresentam diferenças dos títulos de HJ associadas ao *status* reprodutivo e ao título de Vg em relação à função exercida pelas operárias na colônia. Neste caso, em especial, *M. quadrifasciata* se constitui um objeto de estudo desafiador por não apresentar uma relação direta entre os títulos de HJ e a divisão de trabalho, como encontrado em operárias de *Apis* (Robinson, 1992) ou o título de ECD como observado em operárias de *Bombus* (Geva *et al.*, 2005).

O título de ECD parece não estar relacionado com o *status* reprodutivo em *M. quadrifasciata* tendo em vista os baixos títulos na hemolinfa encontrados por Santana

(2002). Este fato leva-nos a eleger uma nova possibilidade de modulador do comportamento em *Melipona*, que possivelmente está associado ao título de Vg na hemolinfa. A quantidade de Vg na hemolinfa está associada ao *status* ovariano nas operárias, nas quais, títulos maiores, estão relacionados a ovários ativos (estágio III e IV) e tarefas nutridoras e/ou de postura de ovos, e menores a ovários inativos ou em início de ativação (estágio I e II) e forrageiras e recém-emergidas.

Estes resultados abrem novas possibilidades para se discutir o papel evolutivo da Vg e principalmente as perspectivas de trabalhos futuros envolvendo esta proteína nas abelhas sem ferrão. O uso de RNAi possibilitaria o teste necessário a esta confirmação, onde a tradução do gene desta proteína seria inibida e poderíamos observar as mudanças comportamentais esperadas (Amdam et al., 2003b; Guidugli *et al.*, 2005). Em *Apis* a repressão da síntese de Vg como uso de RNAi proporcionou a mudança de limiar de resposta gustativa a menores concentrações de sacarose (Amdam *et al.*, 2006), caracterizando, assim, a existência da ação de um duplo repressor responsável pela dinâmica comportamental em *A. mellifera* (Amdam & Omholt, 2003a). Em *Melipona*, certamente, a síntese e o título de Vg estão envolvidos neste processo, principalmente, no que se refere ao comportamento de enxameação comumente observado em Meliponini (ver item 5.5).

Muito ainda é necessário ser elucidado na fisiologia de abelhas, principalmente dos Meliponini. Os trabalhos com *Apis* norteiam nossos objetivos, contudo *Melipona* apresenta particularidades muito distintas à *A. mellifera*.

5.3. Efeitos do análogo do HJ Pyriproxifen (PPN) sobre a expressão do mRNA de *vg* e título de Vg

O HJ e os ecdisteróides são hormônios que atuam no processo de iniciação, manutenção ou inibição da síntese de Vg em vários insetos (para revisão Raikhel *et al.*, 2004). A aplicação de altas doses de análogos do HJ em operárias inibe a síntese de Vg em *M. quadrifasciata* com também ocorre em *A. mellifera* (Bitondi *et al.*, 1994; Pinto *et al.*, 2000). Destacando que o gene para Vg é reprimido no genoma das operárias, inclusive pela ação do solvente do PPN (Metanol).

Expressão de *vg* e o título de Vg na hemolinfa de operárias de *M. quadrifasciata* estão relacionados ao processo de ativação dos ovários e não aos títulos de HJ apresentados, contudo a síntese desta proteína é fortemente influenciada por este hormônio.

Operárias que receberam doses de PPN não realizaram postura e não participaram como operárias nutridoras ressaltando a Vg como uma proteína essencial à função de nutridora. Contudo o AHJ não resultou em forrageamento precoce nas abelhas experimentais, as quais apresentaram-se como operárias guardas no tubo de entrada da colônia aos $29,8 \pm 3,09$ dias. Tais dados sugerem que a dose aplicada de AHJ não foi suficiente ou que outro agente esteja participando do processo de regulação endócrina da divisão de trabalho em *M. quadrifasciata*.

Apesar dos inúmeros avanços obtidos no conhecimento do controle da expressão de *vg* em *A. mellifera*, ainda há muito a se estudar sobre os mecanismos moleculares envolvidos na regulação e expressão deste gene em abelhas, principalmente em Meliponini.

5.4. Efeito de diferentes dietas sobre a expressão de *vg*, título de Vg, HJ e proteína total na hemolinfa de operárias adultas de *M. quadrifasciata*

Os maiores níveis do mRNA de *vg* são detectados nas operárias com alimentação protéica concomitantemente com maiores títulos de Vg nestas mesmas operárias. Podemos sugerir que o aumento dos níveis do mRNA de *vg* pode estar relacionado com a necessidade de uma maior incorporação da Vg pelos ovócitos em crescimento presentes nos ovários ativadas, como em *A. mellifera*, onde os níveis de transcritos do *vg* aumentam rapidamente em operárias órfãs com os ovários ativos (Guidugli-Lazzarini, 2006), além disso, a dieta também tem função na síntese normal de Vg nas abelhas adultas jovens (Bitondi & Simões, 1996).

Ao analisarmos os experimentos sobre dieta, as operárias que receberam até o sétimo dia uma alimentação rica em pólen, apresentaram altos valores de síntese e elevados títulos de Vg na hemolinfa (ver item 5.4). Aparentemente, nossos dados reforçam a idéia que a função exercida pelas operárias é o fator que se relaciona com o perfil hormonal, com o título de Vg na hemolinfa e o *status* ovariano, devendo ao

contexto social, ou até mesmo a interação individual operária-operária, a regulação das mudanças de função. Segundo Koedam (1999) há uma dominância de operárias poedeiras dentro da colônia de *Melipona*, permanecendo por 20 dias realizando tal função (Koedam et al, 2005). Esta mudança comportamental, certamente, está relacionada ao acesso a dieta mais rica em proteína e a altos títulos de Vg na hemolinfa, como verificamos em operárias nutridoras e forrageiras em enxameação (estágio III e IV) (ver item 5.5).

Parece-nos que a dieta rica em proteína e/ou o acesso a esta, é o fator determinante da função exercida pelas operárias e constitui um componente decisivo na tarefa que a operária está exercendo na colônia, tendo em vista que o título de HJ não difere, significativamente, entre operárias forrageiras e nutridoras (ver item 5.2 e 5.5). Assim operárias, supostamente forrageiras, durante a enxameação, localizam um novo local para a nova colônia e se tornam, novamente, capazes de realizar todo o aparato comportamental de uma operária nutridora, inclusive reativando os ovários (*status* III e IV) com respectivos perfis de Vg e HJ destas (ver item 5.5), bem como reativar as glândulas hipofaríngeas e atuar como nutridora em colônias sem operárias jovens (Sakagami, 1982).

O papel da dieta e o acesso a diferentes quantidades de alimento estabelecem possibilidades de estudos relacionados ao papel desta proteína no envelhecimento em insetos, menos significativo nos Meliponini e em uma plasticidade comportamental mais ampla (Waldschmidt *et al.*, 1998) (para detalhe ver item 5.5). Fatos estes que podem sugerir que a Vg, como nas abelhas melíferas, esteja envolvida em vários outros processos biológicos além da reprodução, como longevidade, imunidade, transporte de zinco e síntese de alimento larval (Amdam & Omholt, 2002; Amdam *et al.*, 2003a; Amdam & Omholt, 2003; Amdam *et al.*, 2004b; Amdam *et al.*, 2005). Dentro deste contexto alimentar, a presença e a síntese de lipídios também apresenta uma modulação do comportamento como apresentado pela Vg, em *A. mellifera* (Tóth *et al.*, 2005).

5.5. Status ovariano, título de HJ e Vg na hemolinfa de operárias de *M. quadrifasciata* em enxameação

A plasticidade comportamental na divisão de trabalho em *M. quadrifasciata* parece ser regulada por dois fatores que atuam em tempos diferentes na vida das operárias: Primeiramente por fatores envolvidos no desenvolvimento, ou seja, larvas de operárias que receberam mais alimento, mas em quantidades incapazes de torná-las rainhas ou devido a fatores genéticos envolvidos que as inibam; fatores estes já enfocados por diversos autores sobre a determinação de castas em *Melipona*. Posteriormente na vida adulta das operárias há condições sociais, nas quais as operárias assumem tarefas dentro e fora da colônia com as mundaças comportamentais e fisiológicas adequadas a determinada função. Assim, é consenso que as operárias

possibilitam tal drástica reversão. Este fator é o acesso a uma alimentação mais rica em

enxameação, regridem novamente ao *status* de operárias nutridoras, tendo em vista a ativação ovariana com os devidos perfis hormonais e de Vg.

Podemos especular sobre a longevidade maior nos Meliponini, tendo em vista a plasticidade comportamental que é permitida pelos médios títulos de HJ e o título de Vg na hemolinfa relacionado à dieta protéica (item 5.4). Assim poderíamos esperar que títulos maiores de Vg na hemolinfa por mais tempo na fisiologia de operárias de Meliponini, possibilitariam uma sobrevida maior nas abelhas como verificado em *A. mellifera* (Amdam & Page, 2005).

O título de Vg está associado a médios títulos de HJ na hemolinfa, tanto em operárias nutrizas quanto forrageiras com ovários ativos (estágio III e IV) durante a enxameação, em oposição a altos títulos de HJ que acarretam uma ação inibitória a síntese de Vg, como observado em operárias forrageiras com ovários inativos ou parcialmente ativos (estágio I e II). Esta diminuição do título de Vg é explicada pela ação inibitória que o HJ apresenta sobre a síntese de Vg, fato este demonstrado no item 5.3.

Um fato que podemos especular é que a enxameação, a produção de machos e a maior longevidade das operárias durante o inverno estão relacionados à dieta diferencial mais rica em proteína e conseqüentemente aos altos títulos de Vg na hemolinfa apresentados nas operárias nutrizas ou forrageiras em enxameação, especificamente aquelas com ovários ativos (estágio III e IV).

5.6. Efeito da dieta protéica sobre o nascimento de machos em colônias de *M. quadrifasciata*

A produção de machos em *M. quadrifasciata* na cidade de Ribeirão Preto pôde ser intensificada pela alimentação suplementar de pólen nas colônias em campo (Figura 23, 24, 25, 26, e 27) quando comparado com as condições naturais (Figura 28 e 29).

No presente trabalho, podemos observar que a produção de machos está relacionada à disponibilidade de alimento (pólen) dentro das colônias, corroborando os trabalhos de Roubik (1982), Moo-Valle *et al* (2001), Morais (2003) e Pereira (2003), pois conseguimos induzir a produção de machos durante todo o ano, fato não

relacionado diretamente as condições ambientais externas da colônia durante este período, já que no inverno também foi verificado o nascimento dos machos. Tais dados reforçam as informações obtidas na literatura sobre a relação entre a produção de machos e os estoques de pólen na colônia.

As operárias de Meliponini tendem a realizar postura de machos por ser vantajoso em certos momentos (Wenseleers & Ratnieks, 2004), gerando uma competição pela reprodução entre as operárias e rainha, (Tóth *et al.*, 2004), ou entre as próprias operárias, pois todas possuem condições fisiológicas de realizar posturas durante certo período da vida. Contudo alguns indivíduos mantêm uma dominância reprodutiva sobre as outras operárias, mesmo na presença da rainha fisogástrica (Sommeijer *et al.*, 1999; Koedam, 1999). Assim explica-se porque, durante períodos do ano com condições favoráveis de disponibilidade de alimento, ocorre a postura de ovos que darão origem a machos por operárias em *Melipona* (Contel & Kerr, 1976; Tambasco, 1971; Velthuis *et al.*, 2005; Koedam *et al.*, 2005).

Podemos constatar que o alimento protéico é capaz de propiciar um título maior de Vg na hemolinfa, associado ao *status* ovariano (item 5.2 e 5.4). A produção cíclica de machos nos Meliponini está relacionada com a fisiologia das operárias poedeiras, já que estas possuem ovários ativos mesmo na presença da rainha fisogástrica (Sakagami & Zucchi, 1966). Contudo, para que esta condição seja desencadeada, faz-se necessário um fator externo, a disponibilidade de alimentos, principalmente do pólen que lhes possibilita executar a postura de ovos. Tal processo deve-se ao fato destas abelhas acumularem alimentos, principalmente o pólen, durante os períodos de abundância de recursos alimentares, que coincidem com a primavera e verão. Este aumento na quantidade de pólen estocado proporciona disponibilidade de alimento para as abelhas, principalmente para operárias nutridoras/poedeiras, com até 15 dias de vida (Cruz-Landim, 2000), possibilitando uma nutrição mais rica, e assim, promovendo mudanças hormonais e a ativação ovariana, que lhes permitem a produção de ovos tróficos e/ou reprodutivos, bem como o aumento na construção de células de crias, provisionamento e postura da rainha como observado por Pereira (2003) e Moraes *et al.*, (2006).

A partir deste ponto, as operárias são estimuladas a realizar postura de machos, chegando, em certas espécies de *Melipona*, a 100% dos machos que emergem serem filhos das operárias (Sommeijer *et al.*, 1999). Com o consumo gradativo do alimento e

principalmente do pólen, os estoques destes caem e, em contrapartida, o número de crias e o tamanho dos favos aumentam, bem como a emergência de machos. Como o período de desenvolvimento das crias está entre 30 e 37 dias, aproximadamente (Kerr, 1948; Cruz-Landim, 1966), os machos só nascerão no início do inverno e/ou verão, como já observado na literatura para certas regiões (Camargo, 1976; Bezerra, 1995). Grande número dos indivíduos que emergem são machos; tal fato, possivelmente, possa explicar porque estes realizam algumas tarefas no interior da colônia, como recepção, desidratação do néctar e produção de cera (Imperatriz-Fonseca, 1973; Van-Veen *et al*, 1997). Contudo, os machos só permanecem na colônia até a sua maturidade sexual, entre 12 e 18 dias (Camargo, 1984; Van-Veen *et al*, 1997), quando saem e não retornam, vivendo do néctar das flores e formando agregados próximos às colônias em enxameação ou das novas colônias (Engels *et al.*, 1990; ver item 5.4).

Com o excesso de pólen no interior da colônia ocorreu uma super produção de machos durante todo o ano. Estes machos seriam, em sua maioria, filhos da rainha; esta responde a um aumento na construção de células de cria e oferta de ovos tróficos realizando mais posturas. Segundo Koedam *et al* (2005) a produção de machos é mais intensa em períodos curtos do ano e a rainha, devido a sua grande capacidade reprodutiva, sobrepuja o número de postura de operárias. Entretanto, no presente trabalho, a quantidade de machos que emergiram na colônia chegou a 100% em certos meses. Indicando que, possivelmente, a rainha perde a vantagem reprodutiva quando o número de operárias poedeiras se torna excessivo e a quantidade de posturas destas seja alta, como observado por Darakjian (1991) que relatou condições de desequilíbrio e desintegração do comportamento de POP em relação à postura de operárias.

Com a emergência de grande quantidade de machos, com o consumo dos alimentos durante a produção destes e a chegada do outono/inverno, onde os recursos alimentares são menos abundantes, a colônia tende a diminuir o número de indivíduos ativos (operárias) e a quantidade de alimento estocado, levando a colônia a um estado de baixa atividade e a uma fragilidade ao ataque de parasitas (Phoridae) e ou ataque de cleptobionte (*Lestrimelitta limao*) com uma menor capacidade de coletar mais alimentos. Ao estarem em um período de inverno, esta colônia agora mais fraca, sofre a ação da temperatura, diminuindo a área de cria, ou até mesmo entrando em “diapausa reprodutiva”, como encontrado em *Plebeia remota* (Ribeiro, *et al*, 2003). Explicando-

se, assim, o porquê da morte de ninhos sem causa aparente ou a suscetibilidade ao ataque de *Lestrimelitta limao*.

Devemos ressaltar que tal condição é ruim para a colônia pela perda de células que poderiam estar sendo alocadas para o desenvolvimento de operárias. Levando em consideração o nascimento dos machos, que saem da colônia com poucos dias de vida, corroborando as idéias levantadas por Koedam *et al.* (2005) e Tóth *et al.* (2001), propomos um modelo esquemático no qual o excesso de machos, quando muito intenso, levaria ao enfraquecimento da colônia de *Melipona*, com a saída destes; e até mesmo a possibilidade de morte da colônia pela diminuição no número de indivíduos ativos (operárias).

O acesso a uma dieta rica em proteínas possibilitou uma explosão reprodutiva dentro das colônias, no qual um maior número de indivíduos, tendo acesso ao alimento, possibilita uma ativação ovariana mais intensa e um número maior de indivíduos que assumiriam uma função reprodutiva. Certamente o contexto social estabelece um mecanismo de controle sobre estes comportamentos ou interações ainda pouco discutidos. Uma dieta rica em proteína implicaria em um título mais alto de Vg, propiciando um estímulo fisiológico à produção de machos, tanto de operárias quanto da rainha (ver item 5.2, 5.4 e 5.5). Quanto maior a quantidade de alimento estocado, maiores são os estímulos a produção de sexuais, principalmente de machos e por fim, menor a população de operárias ativas ao final deste ciclo. Com a saída dos machos da colônia, a colônia se torna menos populosa e mais suscetível às condições adversas.

A partir destes entendimentos se propôs um modelo esquemático que pode explicar a relação entre a alimentação protéica (pólen) e a produção de sexuais, principalmente pela postura de ovos de machos por operárias e as possíveis implicações ecológicas na demografia populacional na colônia de abelhas sem ferrão (Figura 28).

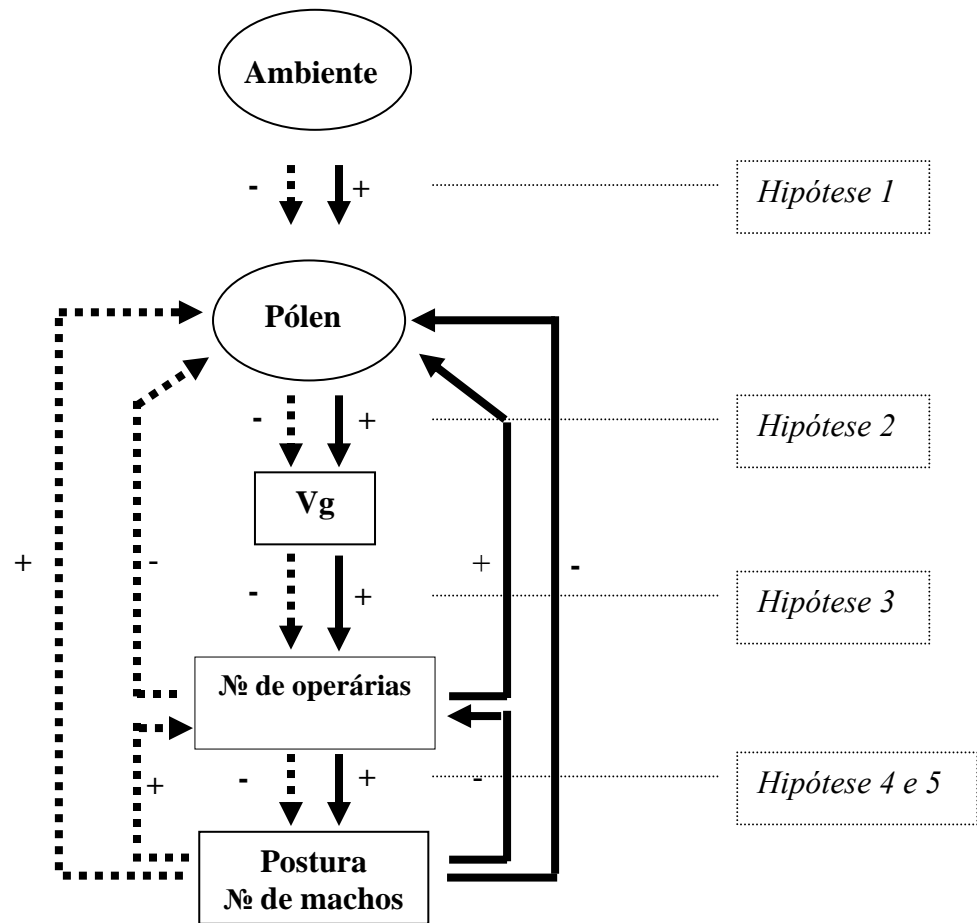


Figura 28: Modelo de regulação das condições internas da colônia e do número de indivíduos sob duas condições ambientais, favoráveis (linha escura) ou desfavoráveis (linha tracejada).

Tal modelo baseia-se na inter-regulação entre as partes a partir das quais foram postuladas hipóteses que determinam as relações de ativação e/ou inibição dos mecanismos que controlam a produção de machos em *M. quadrifasciata*, podendo ser estendido aos demais Meliponini.

Hipótese 1: Ocorre a postura de machos em certos períodos do ano pelas operárias.

Validação:

Os machos ocorrem de modo cíclico nos meliponíneos (Beig, 1972; Silva, 1977; Roubik, 1982) e em *M. quadrifasciata*, as posturas de ovos de machos não são distribuídas ao acaso, mas agrupados no centro do favo (Bezerra, 1995). Em certas épocas, as operárias realizam posturas após a rainha, sendo que este ovo posto pela

operária dará origem a um macho, com fases embrionárias mais curtas, portanto eclodindo mais cedo e matando a larva originária da rainha (Sakagami & Zucchi, 1966; Sakagami et al, 1965; Koedam et al., 1999).

A probabilidade dos machos serem filhos das operárias em *M. quadrifasciata* é de 40% (Tambasco, 1971), de 61% em *M. subnitida* (Contel & Kerr, 1976) e de 94,5% em *M. favosa* (Sommeijer, 1984).

A época de emergência dos machos é variável de região para região, devido a condições ambientais locais, como, por exemplo, na região de Viçosa - MG, onde machos ocorrem, principalmente, nos meses de junho a agosto e em outubro (Bezerra, 1995). Já para a região de Ribeirão Preto - SP, o período de nascimento de machos é de janeiro a fevereiro, julho a agosto e em novembro (Camargo, 1976b).

As condições ambientais de temperatura, pluviosidade, intensidade luminosa e a umidade relativa que afetam a produção de machos e/ou o processo de provisionamento e oviposição (POP) estão relacionado à atividade das abelhas, principalmente relacionadas a disponibilidade de flores e fotoperíodo das plantas.

Hipótese 2: Dieta rica em proteína (pólen), está diretamente associada ao aumento de vitelogenina (Vg) na hemolinfa de operárias.

Validação:

A produção de machos está diretamente correlacionada a densidade populacional e principalmente com as reservas de pólen armazenadas no interior das colônias em *M. scutellaris*, na qual as operárias realizavam postura de machos (Pereira, 2003).

Abelhas *S. postica*, que receberam uma alimentação ausente de uma fonte protéica adequada, praticamente não desenvolvem as glândulas hipofaríngea e os ovócitos (Penedo et al, 1976; Silva & Zucoloto, 1990).

O título de Vg na hemolinfa de operárias de *M. quadrifasciata* está diretamente relacionado ao nível protéico da alimentação semelhante ao que ocorre em *A. mellifera*, (Bitondi & Simões, 1996; Guidugli-Lazzarini, 2006) (para detalhe ver item 5.4). Sendo que os ovários de operárias de meliponínios estão ativos mesmo na presença da rainha (Sakagami et al., 1965), ocorrendo o oposto com operárias de *A. mellifera*, geralmente não ativos na presença da rainha. Assim, ao fornecermos quantidades suplementares de pólen às colônias, este alimento estará suficientemente disponível para as operárias,

possibilitando que estas realizem postura posterior a postura da rainha fisogástrica (Beig, 1972).

Hipótese 3: Maior título de Vg na hemolinfa permite ou estimula a postura de machos pelas operárias.

Validação:

Em *S. postica*, o título de Vg apresenta-se alto (30 e 40 % da proteína total da hemolinfa) em operárias com idades entre 10 e 20 dias. Operárias de 35 a 55 dias de vida não apresentam vitelogenina na hemolinfa; já idades entre 5 e 10 dias de vida possuem 10% de Vg da proteína total (Engels & Engels, 1977). Os ovários em *S. postica* tendem a serem maiores em operárias entre 10 a 20 dias de vida adulta. A partir de 20 dias até 25 dias apresentam tamanho mediano e, de 25 a 30 dias, ainda menores. Em abelhas de 35 dias em diante e em recém emergidas até 1 dia, os ovários são pequenos (Engels & Engels, 1977).

Portanto, o título de Vg na hemolinfa é um indicativo da ativação ovariana observada nas idades correspondentes às tarefas de operárias nutridoras e aprovisionadoras, idades nas quais também verificam-se a postura de ovos tróficos/reprodutivos por operárias de abelhas *Melipona* (Koedam 1999; Koedam *et al.*, 2005).

Em operárias de *M. quadrifasciata*, o perfil do título de Vg apresenta-se como 50% da proteína total da hemolinfa em operárias entre 7 e 16 dias de vida adulta e 40% com 20 dias de vida; entre 28 e 37 dias de vida possuem 20 e 10% de Vg, respectivamente. Abelhas com 7 dias possuem 20% de vitelogenina em média. Recém emergidas não apresentam Vg na hemolinfa (Engels & Engels, 1977). Em operárias nutridoras o *status* ovariano acompanha o título de Vg na hemolinfa (para detalhe ver item 5.2 e 5.4).

Assim sendo, o título de Vg na hemolinfa de operárias de *M. quadrifasciata*, permite-nos inferir sobre a ativação ovariana em operárias e possibilitam a estas realizar postura. Sendo, portanto, um ótimo indicativo do *status* reprodutivo em operárias em *Melipona* (para detalhe ver item 5.2).

Hipótese 4: Produção de machos que consomem os alimentos implica em menor número de fêmeas.

Validação:

Em *M. favosa* e *M. fulva* foi observado uma correlação entre a quantidade de pólen estocado na colônia e a produção de crias (Roubik, 1982), sendo natural esperar que seja assim, tendo em vista que o pólen é a única fonte de proteína para as abelhas.

Estudos com *M. beechii*, verificaram que a ocorrência de machos é influenciada pelo período do ano (fatores sazonais), em função da disponibilidade de recurso para as abelhas (Van-Veen *et al.*, 1992). Tais variações na produção de machos foram observadas com a manipulação dos estoques de alimento nas colônias, comprovando que este é extremamente importante na produção de sexuais, nas quais as colônias com pouco alimento armazenado praticamente não produziram machos (Moo-Valle *et al.*, 2001). No item 4.6 obtivemos o nascimento de machos durante todo o período experimental, mesmo durante os meses de inverno, corroborando tal relação.

A abundância de alimento armazenado modifica o processo de aprovisionamento e oviposição (POP), aumentando a frequência do número de células construídas, aprovisionadas e de postura da rainha (Morais, 2003 e Pereira, 2003).

Os dados nos sugerem que a dieta protéica, pólen fermentado (para detalhe ver item 5.4), constitui um alimento adequado às abelhas operárias, pois a alimentação pobre em proteína para as abelhas adultas, acarretaria problemas para a colônia, já que afetaria a produção de ovos tróficos pelas operárias e a postura da rainha fisogástrica, processo muito dispendioso nutritivamente (Velthuis *et al.*, 2001), diminuindo a postura e a não ocorrência de nascimento de machos. Ao nos referirmos a fase jovem, a alimentação só de mel não é suficiente para o crescimento larval, que requer alta taxa de componentes nitrogenados para seu desenvolvimento (Cruz-Landim & Akahira, 1966).

Hipótese 5: Menor número de fêmeas ativas implica em colônias mais fracas e susceptíveis.

Validação:

Machos de *M. quadrifasciata* possuem diferenças comportamentais relacionadas à função exercida por cada indivíduo. Machos de *Melipona*, durante o início de sua vida na colméia, executam certas tarefas, como por exemplo, a produção e trabalho com cera, recepção e desidratação de néctar (Imperatriz-Fonseca, 1973; Van-Veen *et al.*, 1997), sendo que entre 12 e 18 dias, aproximadamente, saem do ninho e não mais

retornam, alimentando-se do néctar das flores. Esta diminuição do número de indivíduos acarretaria a suscetibilidade da colônia pela incapacidade de uma manutenção adequada das condições internas da colônia, defesa e coleta de alimento (Nogueira-Neto, 1999).

Portanto, teremos um modelo matemático complexo a partir de uma equação diferencial e seus respectivos parâmetros de variáveis que os regulam.

6. CONCLUSÕES

Fatores nutricionais influenciam a expressão de *vg*, uma vez que a oferta de uma dieta sem proteínas promove uma diminuição dos títulos de Vg na hemolinfa e dos níveis do mRNA de *vg* no corpo gorduroso de operárias adultas. Dietas ricas em proteínas alteraram os níveis do mRNA de *vg* e os títulos de Vg presentes na hemolinfa de operárias adultas.

O aumento dos títulos de Vg na hemolinfa de operárias com ovários ativados está relacionado com um aumento dos níveis do mRNA de *vg* no corpo gorduroso destas abelhas.

A aplicação de análogo de hormônio juvenil Pyriproxifen (PPN) resultou num decréscimo no RNAm de *vg* no corpo gorduroso, mas não causou um declínio nos títulos da proteína Vg na hemolinfa.

Os títulos de HJ na hemolinfa de operárias recém-emergidas, nutridoras e forrageiras não mostraram diferenças significantes, indicando que este hormônio não está intimamente relacionado ao polietismo etário em operárias adultas de *M. quadrifasciata*.

As altas taxas de Vg na hemolinfa das operárias apresentam uma correlação positiva com o *status* ovariano das operárias nutridoras e forrageiras em enxameação.

A Vg está envolvida na dinâmica hormonal das abelhas operárias adultas de *M. quadrifasciata*. Títulos baixos e/ou ausência de Vg na hemolinfa das operárias estão relacionados à função de forrageadora e abelhas recém emergidas e com ovários parcial ou totalmente inativos.

As funções de operária nutridora durante a enxameação podem ser decorrentes da modulação desta proteína, que é um dos fatores envolvidos na plasticidade e no polietismo etário/divisão de trabalho em *M. quadrifasciata*.

Quando colônias foram suplementadas com pólen adicional, notamos que estas foram capazes de produzir crias de machos continuamente, independentemente da variação na disponibilidade de alimento no ambiente. Uma vez que os machos são oriundos de ovos haplóides não fertilizados, muitas desses machos podem ser filhos de operárias, significando que as operárias podem ajustar seus componentes do fitness de acordo com o recurso de pólen disponível e, podem assim, alterar a razão sexual na colônia.

Esses resultados indicam um alto grau de plasticidade comportamental em operárias *M. quadrifasciata*, que é, aparentemente, relacionada às condições sociais, por um lado, e pela disponibilidade de dieta de pólen, por outro. Nossos resultados contribuem para clarear a relação entre disponibilidade de pólen, regulação hormonal e polietismo etário em espécies nativas, e podem contribuir para estudos comparativos em outras espécies de abelhas sem ferrão.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aidar DS** (1996). *A manducaia-Biologia de abelhas, manejo e multiplicação artificial de colônias de Melipona quadrifasciata Lep. (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae)*. Série Monografia, 4. Ribeirão Preto-SP. 104pp.
- Amdam GV & Omholt SW** (2002). The regulatory anatomy of honeybee lifespan. *Journal of Theoretical Biology*, 216: 209-228.
- Amdam GV & Omholt SW** (2003). The hive bee to forager transition in honeybee colonies: the double repressor hypothesis. *Journal of Theoretical Biology*; 223: 451-464.
- Amdam GV, Aase AL, Seehuus SC, Fondrk MK, Norberg K & Hartfelder K** (2005). Social reversal of immunosenescence in honey bee workers. *Experimental Gerontology*, 40 (12):939-947.
- Amdam GV, Norberg K, Hagen A & Omholt SW** (2003a). Social exploitation of vitellogenin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100 (4): 1799-1802.
- Amdam GV, Simões ZLP, Guidugli KR, Norberg K & Omholt SW** (2003b). Disruption of vitellogenin gene function in adult honeybees by intra-abdominal injection of double-stranded RNA. *BMC Biotechnology*, 3:1.
- Amdam GV, Norberg K, Fondrk MK & Page RE** (2004a). Reproductive ground plan may mediate colony-level selection effects on individual foraging behavior in honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101 (31): 11350: 11355.
- Amdam GV, Simões ZLP, Hagen A, Norberg K, Schroder K, Mikkelsen O, Kirkwood TBL & Omholt SW** (2004b). Hormonal control of the yolk precursor

vitellogenin regulates immune function and longevity in honeybees. *Experimental Gerontology*, 39: 767: 773.

Amdam GV, Norberg K, Page RE, Erber J & Scheiner (2006). Downregulation of *vitellogenin* gene activity increases the gustatory responsiveness of honey bee workers (*Apis mellifera*). *Behavioural Brain Research*, 169: 201-205.

Bahagavan S, Benatar S, Cobey S & Smith BH (1994). Effect of genotype but not of age or caste on olfactory learning performance in the honey bee, *Apis mellifera*. *Animal Behavior*, 48: 1357-1369.

Barchuk AR, Bitondi MMG & Simões ZLP (2002). Effects of juvenile hormone and ecdysone on the timing of vitellogenin appearance in hemolymph of queen and worker pupae of *Apis mellifera*. *Journal of Insect Science*, 2:1. Available online: insectscience.org/2.1.

Beetsma J (1979). The process of queen-worker differentiation in honeybee. *Bee world* 60: 24-39.

Beetsma J & Houten T (1974). Effects of juvenile hormone analogues in the food of honeybee colonies. *Zeitschrift fuer Angewandte Entomologie*, 77: 292-300.

Bego LR (1990). On social regulation in *Nannotrigona (Scaptotrigona) postica* Latreille, with special reference to productivity of colonies (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Revista Brasileira de Entomologia*, 34: 721-738.

Beig D (1972). The production of males in queenright colonies of *Trigona (Scaptotrigona) postica*. *Journal of Apicultural Research*, 11: 33-39.

Beig D, Bueno OC & Müller TJ (1985). Características dos alvéolos de cria e postura de operárias em *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Naturalia*, 10: 75-81.

Bellés X (2004). Vitellogenesis directed by juvenile hormone. In: Raikhel AS, Sappington TW, editors. Reproductive biology of invertebrates, Vol. 12, Part B: Progress in vitellogenesis. Enfield, USA: Plymouth. p 157-198.

- Ben-Shahar Y & Robinson GE** (2001). Satiation differentially affects performance in a learning assay by nurse and forager honey bees. *Journal of Comparative Physiology A Sensory Neural and Behavioral Physiology*, 187: 891-899.
- Bezerra JMD** (1995). *Aspectos da reprodução de Melipona quadrifasciata (Hymenoptera, Apidae)*. Dissertação de Mestrado. Viçosa, Minas Gerais.
- Biesmeijer JC, van-Nieuwstadt MGL, Lukács S & Sommeijer MJ** (1998). The role of internal and external information in foraging decisions of *Melipona* workers (Hymenoptera: Meliponinae). *Behavior Ecology and Sociobiology*, 42: 107-116.
- Biesmeijer JC & Ermers MCW** (1999). Social foraging in stingless bees: how colonies of *Melipona fasciata* choose among nectar sources. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 46: 129-140.
- Bijlsma L, Bruijn LLM, Martens EP & Sommeijer MJ** (2006). Water content of stingless bee honeys (Apidae, Meliponini): interspecific variation and comparison with honey of *Apis mellifera*. *Apidologie*, 37: 480-486.
- Bitondi MMG, Simões ZLP, Nascimento AM & Garcia SL** (1994). Variation in the haemolymph protein composition of confined *Apis mellifera* and partial restoration of vitellogenin titer by juvenile hormone analogue treatment. *Journal of Hymenoptera Research*, 3: 107-117.
- Bitondi MMG & Simões ZLP** (1996). The relationship between level of pollen in the diet, vitellogenin and juvenile hormone titers in Africanized *Apis mellifera* workers. *Journal of Apicultural Research*, 35: 27-36.
- Block G, Hefetz A & Hartfelder K** (2000). Ecdysteroid titer covary *status* and dominance in adult worker and queen Bumble bees (*Bombus terrestris*). *Journal of Insect Physiology*, 46: 1033-1040.
- Bradford M** (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.

- Cabe SIM, Santana WC, Hartfelder K & Farina WM** (no prelo). Odor discrimination in classical conditioning of proboscis extension in stingless bees. *Apidologie*.
- Calderone NW & Page RE** (1988). Genotypic variability in age polyethism and task specialization in the honey bee, *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 22: 17-25.
- Calderone NW & Page RE** (1991). Evolutionary genetics of division-of-labor in colonies of the honey-bee (*Apis-mellifera*). *American Naturalist*, 138: 69-92.
- Calderone NW** (1998). Proximate mechanisms of age polyethism in the honey bee, *Apis mellifera* L.. *Apidologie*, 29: 127-158.
- Camargo CA** (1972). Determinação de Castas em *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera, Apoidea). *Revista Brasileira de Biologia*, 32: 133-138.
- Camargo CA** (1976a). Dieta semi-artificial para abelhas da subfamília Meliponinae (Hymenoptera, Apidae). *Ciência e Cultura*, 28(4): 430-431.
- Camargo CA** (1976b). Determinação do sexo e controle de reprodução em *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera, Apidae). Tese de Doutorado. FMRP, Universidade São Paulo, Ribeirão Preto. 140pp.
- Camargo CA** (1984). Spermatozoa numbers and migration to the seminal vesicles in haploid and diploid males of *Melipona quadrifasciata* Lep. *Journal Apicultural Research*. 23: 15-17.
- Camargo JMF & Pedro SRM** (1992). Systematics, phylogeny and biogeography of the Meliponinae (Hymenoptera, Apidae): A mini-review. *Apidologie*, 23:509-522.
- Cameron SA & Robinson GE** (1990). Juvenile-hormone does not affect division of labor in bumble bee colonies (Hymenoptera, Apidae). *Annals of the Entomological Society of América*, 83: 626-631.
- Campos LAO** (1975). *Determinação de castas no gênero Melipona (Hymenoptera, Apidae): papel do hormônio juvenil*. Dissertação de Mestrado. Faculdade de

Medicina de Ribeirão Preto, São Paulo, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 48p.

Campos LAO (1978). Sex determination in bees. VI. Effects of hormone analogue in males and females of *Melipona quadrifasciata* (Apidae). *Journal of Kansas Entomological Society*, 51(2): 228-234.

Campos LAO (1979). Determinação do sexo nas abelhas. XIV. Papel do hormônio juvenil na diferenciação das castas na subfamília Meliponinae. *Revista Brasileira de Biologia*, 39: 965-971.

Cepeda OI (2006). Division of labor during brood production in stingless bees with special reference to individual participation. *Apidologie*, 37:175-190.

Contel EPB & Kerr WE (1976). Origin of males in *Melipona subnitida* estimated from data of an isozymic polymorphic system. *Genetica*, 46: 271-277.

Contrera FAL (2004). *Trofaláxis e contatos sociais em abelhas-sem-ferrão do gênero Melipona Illiger, 1806 (Apidae, Meliponini)*. Tese (Doutorado) - Departamento de Ecologia Instituto de Biociências, USP. 195 pp.

Contrera FAL, Imperatriz-Fonseca VL & Koedam D (2006). Age-dependent mass variation in the stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Apidae, Meliponini). *Brazilian Journal of Morphology Science*, 23: 321-324.

Corona M, Hughes KA, Weaver DB & Robinson G (2005). Gene expression patterns associated with queen honey bee longevity. *Mechanisms of Ageing and Development*, 126: 1230-1238.

Cortopassi-Laurino M & Gelli DS (1991) Analyse pollinique, propriétés physico-chimiques et action antibactérienne des miels d'abeilles africanisées *Apis mellifera* et de Méliponinés du Brésil. *Apidologie* 22: 61-73.

Crozier RH & Pamilo P (1996). *Evolution of Social Insect Colonies. Sex Allocation and Kin Selection*. Oxford University Press, Oxford.

- Cruz-Landim C & Akahira Y** (1966). Influência da Alimentação no Desenvolvimento de Glândulas de *Trigona (Scaptotrigona) postica* Latreille (Hymenoptera, Apoidea). *Papéis Avulsos de Zoologia*, 19: 63-78.
- Cruz-Landim C** (1966). Alguns dados sobre o desenvolvimento de *Melipona*. *Revista Brasileira de Biologia*, 26: 165-174.
- Cruz-Landim C** (2000). Ovarian development in Meliponine bees (Hymenoptera: Apidae): the effect of queen presence and food on worker ovary development and egg production. *Genetics and Molecular Biology*, 23: 83-88.
- Dallacqua RP, Simões ZLP & Bitondi MMG** (2007). Vitellogenin gene expression in stingless bee workers differing in egg-laying behavior. *Insectes Sociaux*, 54: 70-76.
- Darakjian P** (1991). *Aspectos da variabilidade do comportamento de postura nas células de cria em Melipona quadrifasciata Lepeletier (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae)*. Dissertação de Mestrado em Ecologia. IB/USP.78pp.
- Elekovich MM & Robinson GE** (2000). Organizational and activational effects of hormones on insect behavior. *Journal of Insect Physiology*, 46: 1509-1515.
- Elekovich MM, Jez K, Ross AJ & Robinson GE** (2003). Larval juvenile hormone treatment affects pre-adult development, but not adult age at onset of foraging in worker honey bee (*Apis mellifera*). *Journal Insect Physiology*, 49: 359-366.
- Elekovich MM, Schulz DJ, Bloch G & Robinson GE** (2001). Juvenile hormone levels in honey bee (*Apis mellifera* L.) foragers: foraging experience and diurnal variation. *Journal of Insect Physiology*, 47: 1119-1125.
- Engelmann F** (1979). Insect vitellogenins: Identification, biosynthesis and role in vitellogenesis. *Advances in Insect Physiology*, 14: 49-108.
- Engels E & Engels W** (1984). Drone aggregations near the nest of the stingless bee, *Scaptotrigona postica*. *Apidologie* 15: 315-328.
- Engels W & Engels E** (1977). Vitellogenin und fertilität bei stachellosen bienen. *Insectes Sociaux*, 24: 71-94.

- Engels W** (1974). Occurrence and significance of vitellogenin in female castes of social Hymenoptera. *American Zoologists* 14: 1229-1237.
- Engels W, Kaatz H, Zillikens A, Simões ZLP, Trube A, Braun R & Dittrich F** (1990). Honey bee reproduction: vitellogenin and caste-specific regulation of fertility. In: Hoshi M & Yamashita O (Editors), *Advances in Invertebrate Reproduction* 5. Elsevier, Amsterdam.
- Erber J** (1981). Neural correlates of learning in the honeybee. *Trends in Neurosciences*, 4: 270-273.
- Erber J, Kierzek S, Sander E & Grandy K** (1998). Tactile learning in the honeybee. *Journal of Comparative Physiology A-Sensory Neural and Behavioral Physiology*,

- Guidugli KR, Nascimento AM, Amdam GV, Barchuk AR, Omhold S, Simões ZLP & Hartfelder K** (2005). Vitellogenin regulates hormonal dynamics in the worker caste of a eusocial insect. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 579: 4961-4965.
- Guidugli-Lazzarini KR** (2006). *Expressão gênica das proteínas vitelogenina e lipoforina e seus receptores nas fases vitelogênicas e não vitelogênicas de Apis mellifera*. Tese (Doutorado), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / USP. 159pp.
- Hagedorn HH & Kunkel JG** (1979). Vitellogenin and vitellin in insects. *Annual Review of Entomology*, 24: 475-505.
- Hamilton WD** (1964). The genetical evolution of social behaviour, I & II. *Journal of Theoretical Biology*, 7: 1-52.
- Hart AG & Ratnieks FL** (2002). Task-partitioned nectar transfer in stingless bees: work organisation in a phylogenetic context. *Ecological Entomology*, 27: 163-168.
- Hartfelder K & Emlen DJ** (2005). Endocrine control of insect polyphenism. In: **Gilbert LI, Iatrou K & Gill SS** (eds). *Comprehensive molecular insect science*. Elsevier, Oxford. Vol. 3, p 651-703.
- Hartfelder K & Engels W** (1989). The composition of larval food in stingless bees: Evaluation nutritional balance by chemosystematic methods. *Insectes Sociaux*, 36: 1-14.
- Hartfelder K & Engels W** (1998). Social insect polymorphism: Hormonal regulation of plasticity in development and reproduction in the honeybee. In: *Current Topics in Developmental Biology*, 40: 45-77.
- Hartfelder K & Rembold H** (1991). Caste-specific modulation of juvenile hormone III content and ecdysteroid titer in postembryonic development of the stingless bee, *Scaptotrigona postica depilis*. *Journal of Comparative Physiology B Biochemical Systemic and Environmental Physiology*, 160: 617-620.
- Hartfelder K** (2000). Insect juvenile hormone: from “status quo” to high society. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 33: 157-177.

- Hartfelder K, Bitondi MMG, Santana WC & Simoes ZLP** (2002). Ecdysteroid titer and reproduction in queens and workers of the honey bee and of a stingless bee: loss of ecdysteroid function at increasing levels of sociality? *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32: 211-216.
- Hebling NJ, Kerr WE & Kerr FS** (1964). Divisão de trabalho entre operárias de *Trigona (Scaptotrigona) xanthotrica* Moure. *Papeis Avulsos de Zoologia, USP*, 16: 115-127.
- Huang ZY, Robinson GE & Borst DW** (1994). Physiological correlates of division of labor among similarly aged honey bees. *Journal of Comparative Physiology A*, 174: 731-739.
- Huang ZY, Robinson GE, Tobe SS, Yagi KJ, Strambi C, Strambi A & Stay B** (1991). Hormonal-regulation of behavioral-development in the honeybee is based on changes in the rate of juvenile-hormone biosynthesis. *Journal of Insect Physiology*, 37: 733-741.
- Imperatriz-Fonseca VL** (1973). Miscellaneous observations on the behavior of *Schwarziana quadripunctata* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Boletim de Zoologia, Biologia Marinha*, 30: 633-640.
- Jaycox ER** (1976). Behavioral changes in worker honey bee (*Apis mellifera* L.) after injection with synthetic juvenile hormone (Hymenoptera, Apidae). *Journal of the Kansas Entomological Society*, 49:165-170.
- Jaycox ER, Skawronek W & Guynn G** (1974). Behavioral changes in worker honey bee (*Apis mellifera* L.) induction by injection of a juvenile hormone mimic. *Annals of the Entomological Society of America*, 67: 529-534.
- Keller L & Nonacs P** (1993). The role of queen pheromones in social insects - queen control or queen signal. *Animal Behaviour*, 45: 787-794.
- Kerr WE & Nielsen RA** (1966). Evidences that genetically determined *Melipona* queens can become workers. *Genetics*, 54: 859-866.

- Kerr WE & Santos-Neto GR** (1956). Contribuição para o conhecimento da bionomia dos Meliponini. V. Divisão de trabalho entre as operárias de *Melipona quadrifasciata* Lep. *Insectes Sociaux*, 3: 423-430.
- Kerr WE** (1946). Formação de castas do gênero *Melipona* (Illiger, 1806). *Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"*, 3: 299-312.
- Kerr WE** (1948). Estudos sobre o gênero *Melipona*. *Anais Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"*, 5: 181-276.
- Kerr WE** (1950). Genetic determination of castes in the genus *Melipona*. *Genetics*, 35: 143-152.
- Kerr WE** (1969). Some aspects of the evolution of social bees (Apidae). *Evolutionary Biology*, 3: 75-119.
- Kerr WE, Stort AC & Montenegro MJ** (1966). Importância de alguns fatores ambientais na determinação de casta no gênero *Melipona*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 38: 149-168.
- Koedam D** (1999). Production of queens, workers and males in the stingless bee *Melipona favosa* (Apidae, Meliponinae). *Netherlands Journal of Zoology*, 49: 289-302.
- Koedam D, Contrera FAL & Imperatriz-Fonseca VL** (1999). Clustered male production by workers in the stingless bee *Melipona subnitida* Ducke (Apidae, Meliponinae). *Insectes Sociaux*, 46: 387-391.
- Koedam D, Contrera FAL, Fidalgo AO & Imperatriz-Fonseca** (2005). How queen and workers share in male production in the stingless bee *Melipona subnitida* Ducke (Apidae, Meliponini). *Insectes Sociaux*, 52: 114-121.
- Laemmler, UK** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Laloi D, Gallois M, Roger B & Pham-Delegue MH** (2001). Changes with age in olfactory conditioning performance of worker honey bees (*Apis mellifera*). *Apidologie*, 32: 231-242.

- Lamy M** (1984). Vitellogenesis, vitellogenin and vitellin in the males of insects – a review. *International Journal of Invertebrate Reproduction and Development*, **7**: 311-321.
- Machado MFPS, Contel EPB & Kerr WE** (1984). Proportion of males sons of the queen and sons of workers in *Plebeia droryana* (Hymenoptera, Apidae) estimated from data of an MDH isozymic polymorphic system. *Genetica*, **65**: 193-198.
- Martinho MR** (1975). *Contribuição ao estudo da digestão do grão de pólen em Melipona quadrifasciata anthidioides Lepeletier (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae)*. Dissertação de Mestrado em Ciências. FMRP, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 67p.
- Melo GAR & Campos LAO** (1987). Variação do padrão de faixas na população de *Melipona quadrifasciata* Lepeletier, 1936 no Estado de Minas Gerais (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). In: *Congresso Brasileiro de Zoologia*, 14, Juiz de Fora-MG. Anais do 14º Congresso Brasileiro de Zoologia, Juiz de Fora-MG.
- Menzel R & Muller U** (1996). Learning and memory in honey bees: From behavior to neural substrates. *Annual Review Neuroscience*, **19**: 379-404.
- Menzel R** (1999). Memory dynamics in the honeybee. *Journal Comparative Physiological A*, **185**: 323-340.
- Michener CD** (1974). *The Social Behavior of the Bees*. Press of Harvard University. Cambridge, Massachusetts. 404 pp.
- Michener CD** (2000). *The bees of the world*. Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD. 913pp.
- Moo-Valle H, Quezada-Euán JJG & Wenseleers T** (2001). The effect of food reserves on the production of sexual offspring in the stingless bee *Melipona beecheii* (Apidae, Meliponini). *Insectes Sociaux*, **48**: 398-403.
- Morais MM** (2003). *Regulação social em Melipona compressipes fasciculata com especial referência à produção e produtividade das colônias (Hymenoptera, Apidae)*. Dissertação de Mestrado. FFCLRP – USP, Ribeirão Preto. 83p.

Morais MM, Nascimento FS, Pereira RA & Bego LR (2006). Colony internal conditions related to caste production in *Melipona compressipes fasciculata* (Apidae, Meliponini). *Insectes Sociaux*, 53: 1-4.

Moure JS & Kerr WE

- Phamdelegue MH, Bailez O, Blight MM, Masson C, Picardnizou AL & Wadhams LJ** (1993). Behavioral Discrimination of Oilseed Rape Volatiles by the honeybee *Apis mellifera* L. *Chemical Senses*, 18: 483-494 OCT.
- Phamdelegue MH, Dejong R & Masson C** (1990). Age-dependency of the conditioned proboscis extension response in honeybees. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences Serie III Sciences de la Vie*, 310: 527-532.
- Pinto LZ** (1997). *Alterações na ultra-estrutura e síntese de proteínas do corpo gorduroso de Apis mellifera após tratamento com "pyriproxyfen", um análogo de hormônio juvenil*. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, São Paulo, Universidade de São Paulo. 84p.
- Pinto LZ, Bitondi MMG & Simoes ZLP** (2000). Inhibition of vitellogenin synthesis in *Apis mellifera* workers by a juvenile hormone analogue, pyriproxyfen. *Journal of Insect Physiology*, 46: 153-160.
- Pinto LZ, Hartfelder K, Bitondi MMG & Simões ZLP** (2002). Ecdisteroid titers in pupae of highly social bees relate to distinct modes of caste development. *Journal of Insect Physiology*, 48: 783-790.
- Piulachs MD, Guidugli KR, Barchuk AR, Cruz J, Simões ZLP & Bellés X** (2003). The vitellogenin cDNA of the honeybee, *Apis mellifera*. Structural analysis and expression studies. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33: 459-465.
- Postlethwait JH & Giorgi F** (1985). Vitellogenesis in insects. In: Browder LW (Editor), *Developmental Biology. A comprehensive synthesis*, Vol. 1, Oogenesis, Plenum Press, NY.
- Raikhel AS & Dhadialla TS** (1992). Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. *Annual Review of Entomology*, 37: 217-251.
- Raikhel AS, Brown MR & Bellés X** (2004). Hormonal control of reproductive processes. In: Gilbert LI, Iatrou K, Gill SS, editors. *Comprehensive molecular insect science*, Vol. 3. Oxford: Elsevier. p 433-491.

- Ratnieks FLW, Reeve HK** (1992). The structure of conflict in hymenoptera societies: processes that reduce conflict in advanced eusocial species. *Journal of Theoretical Biology*, 158: 33-65.
- Ratnieks FLW** (2001). Heirs and spares: Caste conflict and excess queen production in *Melipona* bees. *Behavior Ecology and Sociobiology*, 50: 467-473.
- Ray S & Ferneyhough B** (1997). The effects of age on olfactory learning and memory in the honey bee *Apis mellifera*. *Neuroreport*, 8: 789-793.
- Ray S & Ferneyhough B** (1999). Behavioral development and olfactory learning in the honeybee (*Apis mellifera*). *Developmental Psychobiology*, 34: 21-27.
- Ribeiro MF, Imperatriz-Fonseca VL & Filho PSS** (2003). A interrupção da construção de células de cria e postura em *Plebeia remota* (Holmberg) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). In: Melo GAR & Alves-dos-Santos I (Eds). *Apoidea Neotropical: Homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure*. p177-188.
- Robinson GE & Vargo EL** (1997). Juvenile hormone in adult eusocial hymenoptera: Gonadotropin and behavioral pacemaker. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 35: 559-583.
- Robinson GE** (1985). Effects of a juvenile-hormone analog on honey bee foraging behavior and alarm pheromone production. *Journal of Insect Physiology*, 31: 277-282.
- Robinson GE** (1987). Regulation of honey-bee age polyethism by juvenile-hormone. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 20:329-338.
- Robinson GE** (1992). Regulation of division of labor in insect societies. *Annual Reviews Entomological*, 37: 637-665.
- Robinson GE, Page RE, Strambi C & Strambi A** (1989). Hormonal and genetic-control of behavioral integration in honey bee colonies. *Science*, 246: (4926) 109-111.

- Robinson GE, Strambi C, Strambi A & Huang ZY** (1992). Reproduction in worker honey-bees is associated with low juvenile titers and rates of biosynthesis. *General and Comparative Endocrinology*, 87: 471-480.
- Röseler PF** (1977). Juvenile hormone control of oogenesis in bumblebee workers, *Bombus terrestris*. *Journal of Insect Physiology*, 23: 985-992.
- Röseler PF, Röseler I & Honk V** (1981). Evidence for inhibition of corpora allata activity in workers of *Bombus terrestris* by a pheromone from the queens mandibular glands. *Experientia*, 37: 348-351.
- Roubik DK** (1982). Seasonality in colony food storage, brood production and adult survivorship: Studies on *Melipona* in tropical forest (Hymenoptera: Apidae). *Journal Kansas Entomological Societies*, 55 :789-800.
- Roubik DW** (1989). *Ecology and natural history of tropical bees*. New York, Cambridge University Press.
- Rutz W, Gerig L, Wille H & Lücher M** (1974). A bioassay for juvenile hormone (JH) effects of insect growth regulators (IGR) on adult worker honeybees. *Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft*, 47: 307-313.
- Rutz W, Gerig L, Wille H & Lügedorn HH** (1976). The function of juvenile hormone in adult worker honeybees, *Apis mellifera*. *Journal Insect Physiology*, 22: 1485-1491.
- Sakagami SF & Zucchi R** (1966). Estudo comparativo do comportamento de várias espécies de abelhas sem ferrão, com especial referência ao processo de provisionamento e postura das células. *Boletim de Zoologia*, Universidade de São Paulo, 2:7-106p.
- Sakagami SF** (1982). Stingless bees. In: Hermann HR (ed). *Social Insects III*. Academic Press, New York. pp 361-424.
- Sakagami SF, Montenegro MJ & Kerr WE** (1965). Behavioral studies of the stingless bees with special reference to the oviposition process. V. *Melipona*

quadrifasciata anthidioides Lep. *Journal of Faculty of Science of Hokkaido University* (VI, Zoology), 15: 578-607.

Sakagawa H, Sasaki M & Okada I (1986). Experimental induction of the division of labour in worker *Apis mellifera* L. by juvenile hormone (JH) and its analog. In: *30th International Congress of Apiculture, Nagoya, Japan Apimondia Publishing House*. Bucharest, Romania. 140-143.

Sambrook J, Fritsch EF, & Maniatis T (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd Ed. New York: *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, v. 1-3.

Santana WC (2002). *Hormônio juvenil e ecdisteróides na vida adulta de machos, rainhas e operárias de Melipona quadrifasciata Lep. (Apidae, Meliponinae): Relação com a reprodução e divisão de trabalho*. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. 84pp.

Santos GRM (2006). *Genética da determinação de castas em Melipona quadrifasciata (Hymenoptera: Apoidea)*. Tese de Doutorado em Genética. FMRP-USP. Ribeirão Preto. 110p.

Scheiner R, Erber J & Page RE (1999). Tactile learning and the individual evaluation of the reward in honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Comparative Physiology A-Sensory Neural And Behavioral Physiology*, 185: 1-10.

Scheiner R, Page RE & Erber J (2001a). Responsiveness to sucrose affects tactile and olfactory learning in preforaging honey bees of two genetic strains. *Behavioural Brain Research*, 120: 67-73.

Scheiner R, Page RE & Erber J (2001b). The effects of genotype, foraging role, and sucrose responsiveness on the tactile learning performance of honey bees (*Apis mellifera* L.). *Neurobiology of Learning and Memory*, 76: 138-150.

Scheiner R, Page RE & Erber J (2004). Sucrose responsiveness and behavioral plasticity in honey bees (*Apis mellifera*). *Apidologie*, 35: 133-142.

Scheiner R, Page RE & Erber J (2004). Sucrose responsiveness and behavioral plasticity in honey bees (*Apis mellifera*). *Apidologie*, 35: 133-142.

- Silva DLN** (1973). *Estudos bionômicos em colônias mistas de Meliponinae (Hymenoptera, Apoidea)*. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP. 144p.
- Silva DLN** (1977). Estudos bionômicos em colônias mistas de Meliponinae (Hymenoptera, Apoidea). *Boletim de Zoologia*, Universidade de São Paulo, 2:7-106p.
- Silva DLN, Zucchi R & Kerr WE** (1972). Biological and behavioral aspects of the reproduction in some species of *Melipona* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Animal Behaviour*, 20: 123-132.
- Silva FA** (2003). *Clonagem e seqüenciamento do cDNA da vitelogenina em operárias de Melipona quadrifasciata*. Monografia de Biologia. FFCLRP, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 48pp.
- Silva PGF & Serrão JE** (2000). Nutritive value and apparent digestibility of bee-collected and bee-stored pollen in the stingless bee, *Scaptotrigona postica* Latr. (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Apidologie*, 31: 39-45.
- Silva PGF & Zucoloto FS** (1990). A semi- artificial diet for *Scaptotrigona depilisi* Moure (Hymenoptera, Apidae). *Journal Apiculture Research*. 29: 233-235.
- Silva PGF, Muccilo G & Zucoloto FS** (1993). Determination of Minimum Quantity of Pollen and Nutritive Value of Different Carbohydrates for *Scaptotrigona depilis* Moure (Hymenoptera, Apidae). *Apidologie* 24, 74-79.
- Silveira FA, Melo GAR & Almeida EAB** (2002). *Abelhas Brasileiras – Sistemática e identificação*. Belo Horizonte – MG. 253pp.
- Sommeijer MJ & Bruijn LLM** (1994). Intranidal feeding, trophallaxis and sociality in Stinglees bees. In: **Hunt JH & Nalepa CA** (ed) *Nourishment and Evolution in Insect Societies*. 13. Westview Press. San Francisco, Oxford. 391-418.
- Sommeijer MJ** (1984). Distribution of labour among workers of *Melipona favosa* F.: Age-polyethism and worker oviposition. *Insectes Sociaux*, 31 (2): 171-184.

- Sommeijer MJ, Beuvens FT & Verbeek HJ** (1982). Distribution of labor among workers of *Melipona-favosa* f - Construction and provisioning of brood cells. *Insectes Sociaux* 29: 222-237.
- Sommeijer MJ, Bruijn LLM & Van de Guchte C** (1985). The social food-flow within the colony of a stingless bee *Melipona favosa* (F). *Behaviour* 92: 39-58
- Sommeijer MJ, Bruijn LLM, Meeuwsen FJAJ & Strassmann JE** (1999). Behavioural data on the production of males by workers in the stingless bee *Melipona favosa* (Apidae, Meliponinae). *Insectes Sociaux*, 46: 92-93
- Sommeijer MJ, Houtekamer JL & Bos W** (1984). Cell construction and egg-laying in *Trigona nigra* var. *paupera* Prov. With notes on the adaptative significance of typical behavior of stingless bees. *Insectes Sociaux*, 31:199-217.
- Souza B, Roubik D, Barth O, Heard T, Enríquez E, Carvalho C, Villas-Bôas J, Marchini L, Locatelli J, Persano-Oddo L, Almeida-Muradian L, Bogdanov S & Vit P** (2006). Composition of stingless bee honey: Setting quality standards. *Interciencia*, 31 (12). Available online: scielo.ve.
- Sullivan JP, Jassim O, Fahrbach SE & Robinson GE** (2000). Juvenile hormone paces behavioral development in the adult worker honey bee. *Hormones and Behavior*, 37:1-14.
- Tambasco AJ** (1971). Processo reprodutivo em *Melipona quadrifasciata* e seu impacto na população geneticamente ativa. *Ciência e Cultura*, 23: 104-105.
- Testa PR, Silva AN & Zucoloto FS** (1981). Nutricional Value of Different Pollen Mixtures for *Nannotrigona (Scaptotrigona) postica*. *Journal of Apiculture Research*., 20: 94-96.
- Tóth AL, Kantarovich S, Meisel AF & Robinson GE** (2005). Nutritional status influences socially regulated foraging ontogeny in honey bees. *The Journal of Experimental Biology*, 208: 4641-4649.
- Tóth E, Queller DC, Dollin A & Strassmann JE** (2004). Conflict over male parentage in stingless bees. *Insectes Sociaux* 51: 1-11.

- Tóth E, Strassmann JE, Nogueira-Neto P, Imperatriz-Fonseca VL & Queller DC** (2002). Male production in stingless bees: Variable outcomes of queen-worker conflict. *Molecular Ecology*, 11: 2661-2667.
- Trautman KH, Masner P, Schuler A, Suchy M & Wipf HK** (1974). Evidence of juvenile-hormone methyl (2e,6e)-10, 11-epoxy-3,7,11-trimethyl-2,6-dodecadienoate (jh-3) in insects of 4 orders. *Zeitschrift Fur Naturforschung CA Journal of Biosciences*, C 29: 757-759.
- Trenczek TA, Zillikens A & Engels W** (1989). Developmental patterns of vitellogenin haemolymph titre and rate of synthesis in adult drone honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology*, 14: 253-267.
- Trowell SC** (1992). High affinity juvenile hormone carrier proteins in the hemolymph of insects. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 103: 795-807.
- Van-Veen JW, Arce H & Sommeijer MJ** (1992). Brood production of *Melipona beechii* relation to the season foraging. In: BILLED, J. (EDS). *Biological and Evolution of Social Insects*. Leuven University Press, Leuven (Belgium). p81-87.
- Van-Veen JW, Sommeijer MJ & Meeuwsen F** (1997). Behaviour of drone in *Melipona* (Apidae, Meliponinae). *Insectes Sociaux*, 44: 435-447.
- Velthuis HHW, Koedam D & Imperatriz-Fonseca VL** (2005). The males of *Melipona* and other stingless bees, and their mothers. *Apidologie* 36: 169-185.
- Velthuis HHW, Roeling A & Imperatriz-Fonseca VL** (2001). Repartition of reproduction among queens in the polygynous stingless bee *Melipona bicolor*. *Proceedings of the Experimental and Applied Entomology* 12: 45-49
- Waldschmidt AM** (1995). Aspectos genéticos da divisão do trabalho em *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). Dissertação de Mestrado. UFV. Viçosa. 71p.
- Waldschmidt AM, Campos LAO & Marco PJr** (1998). Behavioral plasticity of *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Meliponinae). *Revista Brasileira de Biologia*, 58: 25-31.

- Wenseleers T & Ratnieks FLW** (2004). Tragedy of the commons in *Melipona* bees. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 271: S310-S312 Suppl. 5.
- Wheeler DE & Kawooya JK** (1990). Purification and characterization of honey bee vitellogenin. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **14**: 253-267.
- Wilson ED** (1971). *The insect societies*.
- Wyatt GR & Davey KG** (1996). Cellular and molecular actions of juvenile hormone. II. Role of juvenile hormone in adult insects. *Advances in Insect Physiology*, 26: 1-154.
- Zerbo AC, Moraes RLMS & Braga MRB** (2001). Protein requirements in larvae and adults of *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae): midgut proteolytic activity and pollen digestion. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 129: 139-147.
- Zillikens A, Simões ZLP & Engels W** (1998). Higher fertility of queenless workers in the Africanized honey bee. *Insectes Sociaux*, 45: 473-476.
- Zucchi R** (1993). Ritualized dominance, evolution of queen-worker interactions and related aspects in stingless bees (Hymenoptera, Apidae). In: Inoue T & Yamane S. *Evolution of insect societies*. Tokyo, Hakunin-sha, p. 207-249.
- Zucchi R, Silva-Matos EV, Nogueira-Ferreira FH & Azevedo GG** (1999). On the cell provisioning process (POP) of the stingless bees – Nomenclature reappraisal and evolutionary considerations (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) *Sociobiology*, 34: 65-85.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)