

Antonio Junqueira Tambasco

ASPECTOS DO PROCESSO REPRODUTIVO E DA CITOLOGIA DE  
FEMEAS DE MELIPONÍDEOS

Ribeirão Preto

1975

A minha mãe e irmãos

A Adriana e Daniella

Ao Prof. Dr. Warwick Estevam Kerr,  
nosso reconhecimento pela orienta-  
ção, incentivo, apoio e amizade.

## AGRADECIMENTOS

- Aos professores, colegas e funcionários do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, que contribuíram para a realização deste trabalho.
- A Profa. Dra. Catarina Satie Takahashi, pela orientação no início de nossa pesquisa.
- A Profa. Dra. Iris Ferrari, pelo apoio e incentivo.
- Aos professores Dr. Marcos Antonio Gianonni e Lilian Maria de Azevedo Moreira, pelas valiosas sugestões e colaboração.
- Aos acadêmicos Luiz Antonio Bezerra e Libertad Maria Naly, pela programação e cálculos efetuados na fase final deste trabalho.
- A Nayde de Faria, pelo serviço de datilografia.
- A Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, por nos ter proporcionado condições para a realização deste trabalho.
- A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, que nos concedeu bolsas de Mestrado I e II (Proc. Biol. 71/134).
- A seguintes Instituições, pela doação do material e equipamentos utilizados: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES); Fundação Rockefeller e Organização dos Estados Americanos (OEA).

## ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	5
2.1 - MATERIAL .....	5
2.2 - MÉTODOS .....	5
2.2.1 - Escolha do Material .....	5
2.2.2 - Mapeamento dos favos de cria e pesagem dos espécimes .....	6
2.2.3 - Colheita do Material .....	7
2.2.4 - Identificação do sexo nas pupas .....	7
2.2.5 - Obtenção dos ovários .....	8
2.2.6 - Esquematização dos ovários .....	9
2.2.7 - Estudo morfológico do ovário .....	9
2.2.8 - Preparo das lâminas .....	9
2.2.9 - Microscopia e Fotomicrografia .....	11
2.2.10- Estudo quantitativo .....	12
2.2.11- Estudo da Meiose .....	13
2.2.12- Montagem dos cariótipos .....	13
2.2.13- Descrição das bandas-G .....	13
3. RESULTADOS .....	14
3.1 - Idade e peso de pupas .....	14
3.1.1 - Idade e peso das operárias de <u>Melipona quadrifasciata anthidioides</u> .....	14
3.1.2 - Idade e peso de operárias de <u>Melipona rufiventris rufiventris</u> .....	15
3.1.3 - Pesos de rainhas, operárias e machos de <u>Melipona quadrifasciata anthidioides</u> .....	15
3.1.4 - Pesos de operárias de <u>Melipona rufiventris rufiventris</u> .....	17
3.2 - Desenvolvimento morfológico do ovário .....	17
3.2.1 - <u>Melipona quadrifasciata anthidioides</u> .....	18
3.2.2 - <u>Melipona rufiventris rufiventris</u> .....	21
3.2.3 - <u>Scaptotrigona postica</u> .....	22

3.2.4 - <u>Plebeia (Plebeia) droryana</u> .....	23
3.2.5 - <u>Frieseomelitta varia</u> .....	24
3.3 - Número de células em divisão (metáfase somática e prófase I meiótica), nas diversas fases do desenvolvimento de pupa .....	24
3.4 - Análise dos diferentes estágios de prófase meiótica .....	33
3.5 - Estudo cariotípico .....	42
3.5.1 - <u>Melipona quadrifasciata anthidioides</u> .....	42
3.5.2 - <u>Melipona rufiventris rufiventris</u> .....	44
3.5.3 - <u>Scaptotrigona postica</u> .....	47
3.6 - Padrões de formação de bandas-G .....	51
3.7 - Porcentagem de ovos postos por rainha e por operária e cálculo da População Geneticamente Ativa.	62
3.8 - Sequência de nascimentos de rainhas e operárias ..	63
4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES .....	65
4.1 - Idade e peso, segregação e nascimento das fêmeas de <u>Melipona quadrifasciata anthidioides</u> e <u>Melipona rufiventris rufiventris</u> .....	65
4.2 - Desenvolvimento morfológico do ovário e número de células em divisão nos diversos estágios de pupa .....	67
4.3 - Estudo citológico .....	73
4.3.1 - Meiose .....	73
4.3.2 - Cariótipos e formação de bandas-G .....	78
4.4 - População Geneticamente Ativa .....	84
5. RESUMO .....	86
6. SUMMARY .....	89
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	92

## 1. INTRODUÇÃO

Um dos primeiros trabalhos no campo da citogenética dos himenópteros, foi realizado por Alexander Petrunkevitch (1900) que, com a finalidade de investigar o mecanismo da determinação do sexo nas abelhas, estudou, entre outros aspectos, a oogênese.

Uma revisão ampla do assunto foi feita por J.F. Manning (1949), no trabalho "Sex Determination in the Honey Bee", onde também abordou aspectos da oogênese. Nele, o autor descreve todos os estágios pelos quais o óvulo passa dentro do ovariolo da rainha adulta, ou seja, os estágios da prófase I até diplonema, que é o estágio em que o ovo é posto (Snodgrass, 1956; Cruz Landim, 1966). Também estudou a maturação do ovo e fez observações sobre a meiose.

O processo de desenvolvimento do ovo de Apis foi descrito por Paulke (1901). O estudo completo da embriologia desta abelha foi feito por Nelson (1915) que descreveu, detalhadamente, o ovo da rainha e todas as divisões de maturação pelas quais ele passa até a eclosão da larva. Na larva foram observados, pela primeira vez, os ovários como rudimentos formados por duas massas alongadas de células.

Segundo Zander (1916), os ovariolos de uma rainha de Apis começam a ser formados logo no início do estágio de larva. A princípio, são como pequenas protuberâncias que aumentam durante o estágio larval até formarem uns 150 ovariolos em cada ovário. Segundo Brian (1954), em pré-pupa e nos estágios de pupa, os ová-

rios se desprendem e aumentam de tamanho como nas formigas, sendo vistos os filamentos terminais.

Nos meliponídeos, foi determinado o início da formação dos ovários, que é em embrião de 50 a 54 horas, somente para a espécie S. postica (Beig, 1972).

Nos himenópteros, de um modo geral, a formação dos ovários é variável (Brian, 1954), mas, em todos os casos descritos, a formação se dá na fase larval.

Em Apis, nas colônias onde a rainha está presente, as operárias não possuem ovários desenvolvidos. Apesar de serem encontrados alguns estágios da formação do ovo nas operárias, nenhum estágio final foi visto (Velthuis, 1970). O processo de desenvolvimento do ovo de operária foi descrito por Velthuis (1970), porém o trabalho se preocupa apenas com a classificação de desenvolvimento e dos fatores que influenciam este desenvolvimento.

Em estudo do desenvolvimento de ovário de operárias de meliponídeos, Sakagami e col. (1963), relataram que, esse processo em abelhas sem ferrão, é histologicamente comum a todas as espécies em que foi estudado, entre as quais incluem-se as espécies Melipona quadrifasciata anthidioides, Melipona rufiventris rufiventris, Scaptotrigona postica e Plebeia (Plebeia) droryana. Sakagami e col. (1963), fizeram um estudo histológico do ovário de operárias adultas em colônias normais. Ao contrário do que ocorre em Apis, nos meliponídeos, com algumas exceções, mesmo na presença da rainha, as operárias desenvolvem ovários. Um estudo mais detalhado na espécie S. postica, revelou que nunca se observa mais

que um oócito maduro em seus ovários. Beig (1972) descobriu que, 95% dos machos produzidos em uma colônia de S. postica, eram filhos de operárias. Recentemente, Terada (1974) mostrou que em Leurotrigona muelleri há inibição dos ovários das operárias pela rainha e que em Frieseomelitta varia, tudo indica que operárias não desenvolvem ovários na presença ou ausência da fêmea fisogástrica.

Nosso trabalho, teve como objetivo principal, o estudo do comportamento cromossômico, no processo da meiose, nas fêmeas de meliponídeos. Não existindo na literatura publicações sobre o desenvolvimento morfológico do ovário das rainhas e operárias nos diversos estágios do desenvolvimento de pupa, propuzemo-nos, também, a desenvolver este aspecto, pois sabemos que é nestes estágios que se inicia a gametogênese nas abelhas. Isto nos daria informações, principalmente sobre a oogênese nas operárias, já que nos meliponídeos a maioria delas possuem os ovários desenvolvidos e põem ovos. Além disto, poderíamos determinar, para cada espécie estudada, o estágio exato onde se inicia a meiose. Outra contribuição, seria a comparação entre os oócitos encontrados nos ovários das rainhas com os encontrados nas operárias, já que na determinação das castas destas abelhas, além de fatores genéticos, influem fatores ambientais (Kerr e Nielsen, 1966; Kerr, Stort e Montenegro, 1966).

Os estudos adicionais, realizados neste trabalho, tais como: estudo quantitativo das células em divisão; mapeamento de posturas; tabelas de idade e peso; estudo cariotípico e bandeamen

to cromossômico, foram feitos com a finalidade de conhecermos melhor as espécies com que trabalhamos.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 - MATERIAL

Foram utilizados ovários de rainhas e operárias das seguintes espécies de abelhas pertencentes a sub-família Meliponinae:

1. Melipona quadrifasciata anthidioides, Lepeletier procedente de Pocinhos do Rio Verde (MG).
2. Melipona rufiventris rufiventris, Lepeletier procedente de Cajuru (SP).
3. Scaptotrigona postica, Latreille procedente de Piracicaba (SP).
4. Plebeia (Plebeia) droryana, Friese procedente de Ribeirão Preto (SP).
5. Frieseomelitta varia, Lepeletier procedente de São Joaquim da Barra (SP).

Estas espécies são mantidas no Apiário do Departamento de Genética e Matemática Aplicada à Biologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Dentre os vários sistemas taxonômicos propostos na literatura, optamos pelo proposto por Tarelho (1973).

### 2.2 - MÉTODOS

#### 2.2.1 - Escolha do Material

Foram selecionadas pupas em seis fases do desenvolvimento

to baseadas na coloração do olho e na pigmentação do corpo. Estas fases foram:

- a) Pupa de corpo branco e olho branco
- b) Pupa de corpo branco e olho rosa
- c) Pupa de corpo branco e olho marrom
- d) Pupa de corpo branco e olho preto
- e) Pupa de corpo amarelo e olho preto
- f) Adultos não emergidos.

Estas fases foram as escolhidas porque é conhecido que, nas abelhas, a meiose, masculina e feminina, se processa a partir da fase de pré-pupa.

#### 2.2.2 - Mapeamento dos favos de cria e pesagem dos espécimes

Para a construção de tabelas de idade e peso das espécies de M. quadrifasciata anthidioides e M. rufiventris rufiventris, foi feito um "mapeamento" que é a determinação de um alvéolo e do momento (tempo) em que a rainha nele põe um ovo.

As colmeias foram colocadas em "caixas de observação de meliponídeos", desenvolvida por Sakagami e Zucchi (1963) e Sakagami (1966), o que possibilitou observar, internamente, uma colônia em condições praticamente normais. Constitui-se de uma caixa de 58 cm x 48,5 cm que contém um reostato para manter a temperatura em torno de 27°C a 30°C, e uma outra caixa de 40 cm x 33 cm x 6cm em seu interior, onde se coloca a colmeia, que tem um tubo para comunicação com o exterior. As duas caixas são cobertas por tam-

pas de vidro.

O mapeamento foi feito da seguinte maneira: coloca-se sobre a tampa da caixa maior, uma placa de vidro e, com o auxílio de uma lâmpada, é possível observar as posturas, que foram marcadas sobre um pequeno pedaço circular de esparadrapo colado sobre esta placa em direção do alvéolo onde o ovo foi posto. Desta maneira foi possível produzir todo favo em um mapa, o que possibilitou saber a idade exata do material quando da dissecação. Após a retirada de cada espécime do alvéolo, este era pesado em uma balança de precisão 0,01 mg Mettler.

### 2.2.3 - Colheita do Material

Os favos de cria eram retirados das colmeias, colocados em placas de Petri e deles os espécimes eram retirados ao acaso. Depois de cada sessão, devolvíamos à colmeia as crias restantes.

### 2.2.4 - Identificação do sexo nas pupas

A identificação do sexo foi feita, em um microscópio estereoscópico Zeiss, depois de retirada a pupa do alvéolo.

As fêmeas (operárias e rainhas) apresentam, na parte posterior, um ovipositor com características semelhantes nas espécies estudadas.

Um fator que muito ajudou neste trabalho foi a facilidade de obtenção de operárias, visto que nas abelhas elas compõem a maioria das crias. Por outro lado, a obtenção de rainhas foi mais difícil, principalmente nas espécies S. postica e P.(P) droryana,

onde a determinação das castas é feita por alimentação específica de um alvéolo. Isto não ocorre com as espécies do gênero Melipona (Kerr, 1948, 1969), pois as rainhas e as operárias nascem de alvéolos iguais.

#### 2.2.5 - Obtenção dos Ovários

As pupas foram dissecadas com o auxílio de um microscópio estereoscópico Zeiss, em uma placa de Petri com o fundo de cera escura, cheia de água "natural".

Com dois alfinetes o espécime era preso pelo torax sem que estes o perfurassem. Isto evitava o extravasamento de corpo gorduroso e conseqüentemente o desprendimento do espécime da placa de dissecção. Com uma tesoura oftalmológica iniciava-se a dissecção pela parte posterior do abdome dividindo ao meio todos os tergitos. Feito isto, separavam-se as duas partes dos tergitos que eram presas na cera por quatro alfinetes permitindo assim observar dentro do abdome. Para a localização e separação dos ovários, foram utilizados estiletes e pinças bem finos. A dificuldade nesta etapa foi maior quando se tratava de pupa jovem, pois nas primeiras fases do desenvolvimento pupal até pupa de olho rosa a parte terminal dos dois ovários se acham fortemente ligadas sobre o ventrículo, tornando difícil uma dissecção do órgão inteiro. Nestas fases, os ovidutos são tubos finos e longos que se quebram facilmente com a manipulação. A partir da fase de pupa de olho rosa, a dissecção tornou-se mais fácil pois os ovários já se encontram separados e os ovidutos mais grossos e curtos.

Como os ovários eram de tamanho muito reduzido e de manipulação difícil, eram transportados para esquematização e confecção de lâminas, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur.

#### 2.2.6 - Esquematização dos Ovários

Feita a dissecação, para o estudo do desenvolvimento morfológico, os ovários eram esquematizados com o auxílio de uma câmara clara Zeiss acoplada ao microscópio estereoscópico. Os esquemas eram feitos com os ovários submersos na água onde foram dissecados.

#### 2.2.7 - Estudo Morfológico do Ovário

Para o estudo do desenvolvimento morfológico, foram utilizadas para cada estágio do desenvolvimento de pupa 10 espécimes, dos quais foi escolhido um esquema que representasse a média de todos.

#### 2.2.8 - Preparo das lâminas

Foram quatro as técnicas usadas para o preparo das lâminas. Para todas empregamos a técnica de esmagamento do material entre lâmina e lamínula.

Para o estudo quantitativo e da meiose, usamos as seguintes técnicas:

A) Fixação do órgão em Carnoy e coloração de Feulgen com 10 minutos de hidrólise em HCl 1N. O esmagamento foi feito em ácido acético 45%.

B) Coloração com orceína-lacto-acética e esmagamento em ácido acético 45%.

C) Esmagamento em ácido acético 45%. (O estudo destas lâminas foi feito em microscópio de contraste de fase).

Para a obtenção de metáfases a serem cariotipadas, foi utilizada a técnica B, descrita acima.

Para as observações imediatas, as lâminas foram lutadas com esmalte ou cera.

A preparação das lâminas permanentes para as técnicas A, B e C foi feita da seguinte maneira:

- a) deslocamento da lamínula após congelamento em nitrogênio líquido;
- b) banho rápido em metanol;
- c) secagem ao ar;
- d) montagem em Euparal.

Outra técnica também usada para o preparo das lâminas permanentes, na falta de nitrogênio, foi a seguinte:

- a) desidratação lenta com incubação das lâminas contendo material esmagado, em câmara hermeticamente fechada com vapores de álcool 95% (24 horas);
- b) imersão em cuba de vidro com álcool 95%;
- c) deslocamento da lamínula;
- d) montagem em Euparal.

#### D) Técnica de formação de bandas G

Para a formação de bandas G cromossômicas, foi utiliza-

da a técnica de Scheres (1972) com algumas modificações. Este método consiste na digestão proteolítica do cromossomo pela tripsina e posterior coloração com Giemsa, tamponado com pH 6,8.

As etapas da técnica foram as seguintes:

- a) fixação do material em 3:1 (metanol:ácido-acético);
- b) esmagamento do material em ácido-acético 45%;
- c) deslocamento das lâminulas em nitrogênio líquido;
- d) banho rápido em metanol a 10°C;
- e) incubação das lâminas em uma solução de tripsina (B. D.H.) a 1% em tampão Sørensen pH 6,8 a 37°C, por 4 minutos;
- f) colocação das lâminas horizontalmente, deixando uma película da solução fosfato pH 6,8, recobrimo o material;
- g) homogeneização da solução tampão, com 10 gotas de Giemsa, sobre o material durante 10 minutos;
- h) lavagem em água destilada;
- i) desidratação em álcool;
- j) clarificação em xilol;
- k) montagem em bálsamo do Canadá.

Para controle, usamos esta mesma técnica e na etapa e, fizemos incubação em tampão Sørensen sem a tripsina. As lâminas do controle também serviram para o estudo da meiose.

#### 2.2.9 - Microscopia e Fotomicrografia

A microscopia do material foi realizada em Fotomicroscó

pio Zeiss de óptica comum e de contraste de fase, com objetivas Neofluar e condensador VZ.

A localização do material na lâmina foi feita com a objetiva de aumento 16x e o exame da mesma, realizado com objetiva de aumento 40x.

As lâminas foram fotomicrografadas com objetiva de aumento 100x. O filme utilizado foi o Panatomic-X de 35 mm da Kodak.

### 2.2.10 - Estudo Quantitativo

Foram preparadas 15 lâminas para cada fase do desenvolvimento de pupa, perfazendo um total de 360 lâminas para as quatro espécies estudadas. De cada 15, foram escolhidas 5 ao acaso, para que nelas fossem contadas as células que se encontrassem em divisão. Cada lâmina foi preparada com os dois ovários. Sendo o ovário muito pequeno, depois de esmagado ocupando cerca de 1/100 da lâmina, foi possível examinar e contar todas as células que se encontravam em divisão.

Como a maioria das células que estavam em prófase I, apresentavam cromossomos com características de duas fases, foi sempre escolhida a fase mais adiantada para a classificação da célula. Por exemplo, quando um núcleo apresentava cromossomos leptótenos e zigótenos, a célula foi considerada em zigonema. A contagem foi feita com o auxílio de um "Laboratory Counter" Clay Adams.

Os gráficos das figuras 5, 6, 7 e 8 foram obtidos através de um programa específico para a calculadora Hewlett Packard, modelo 9810 A. Cada gráfico apresenta os números médios de célu-

las nos diversos estágios de divisão e seus respectivos erros padrões das médias, que foram calculados pela fórmula  $\frac{S}{n}$ , onde

$$S = \sqrt{\frac{\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n}}{n - 1}} \quad \text{e} \quad \bar{X} = \frac{\sum X}{n}$$

#### 2.2.11 - Estudo da Meiose

O estudo da meiose foi feito através de esquemas e fotografias das lâminas usadas para o estudo quantitativo.

#### 2.2.12 - Montagem dos Cariótipos

Para a montagem dos cariótipos, foram utilizadas para cada espécie, as 10 melhores metáfases de 10 espécimes, esquematizadas e fotomicrografadas em aumento 100x.

A classificação dos cromossomos foi feita com base no critério usado para o cariótipo humano (Chicago, 1966), que consiste em uma classificação em grupos, levando-se em conta o tamanho dos cromossomos e a posição dos centrômeros, embora sem termos feito medida dos mesmos. A descrição dos cromossomos foi feita baseado no trabalho de Levan e col. (1965).

#### 2.2.13 - Descrição das Bandas G

Foram utilizadas para esta descrição, 10 metáfases especialmente tratadas, de 5 espécimes. As bandas foram classificadas e descritas de acordo com a nomenclatura proposta pela Conferência de Paris (1971) para o cariótipo humano.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 - Idade e Peso de Pupas

##### 3.1.1 - Idade e peso das operárias de M. quadrifasciata anthidioides

Na tabela I temos as idades e pesos de operárias desta espécie, tomados em 2 períodos (maio-junho, 1970 - período 1 e agosto-outubro, 1970 - período 2).

TABELA I

Idade (dias) e Peso (mg) de operárias de M. quadrifasciata anthidioides, tomados nos períodos de maio-junho de 1970 (Período 1) e agosto-outubro de 1970 (Período 2). Temperatura: 28°C

Estágio do desenvolvimento	Período		X	$\Sigma^2$	s	n
Pré-pupa	1	Idade	-	-	-	-
		Peso	-	-	-	-
	2	Idade	20,68	0,90	0,95	4
		Peso	95,40	7,84	2,80	3
Pupa de corpo branco e olho branco	1	Idade	21,50	-	-	1
		Peso	96,80	-	-	1
	2	Idade	20,90	1,01	1,00	18
		Peso	86,90	110,38	10,51	17
Pupa de corpo branco e olho rosa	1	Idade	23,40	0,34	0,58	8
		Peso	62,10	30,68	5,54	8
	2	Idade	25,30	10,21	3,20	18
		Peso	89,80	60,13	7,75	17
Pupa de corpo branco e olho marrom	1	Idade	24,00	0,75	0,87	5
		Peso	60,80	276,91	16,70	5
	2	Idade	30,90	3,04	1,74	11
		Peso	87,80	245,40	19,67	11
Pupa de corpo branco e olho preto	1	Idade	26,30	1,50	1,22	17
		Peso	84,60	15,58	3,95	17
	2	Idade	31,80	1,85	1,36	10
		Peso	90,50	10,88	3,30	10
Pupa de corpo amarelo e olho preto	1	Idade	30,60	1,40	1,18	9
		Peso	68,10	99,06	9,95	9
	2	Idade	34,60	4,66	2,16	14
		Peso	85,00	194,12	13,93	10
Adulto não emergido	1	Idade	-	-	-	-
		Peso	55,10	151,38	12,30	2
	2	Idade	39,40	0,89	0,94	7
		Peso	77,60	21,21	4,61	5

### 3.1.2 - Idade e peso de operárias de M. rufiventris rufiventris.

Na tabela II temos as idades e pesos das operárias desta espécie, tomados somente em um período.

TABELA II

Idade (dias) e peso (mg) de operárias de M. rufiventris rufiventris, tomados no período de agosto-outubro de 1971. Temperatura: 28°C.

Estágio do desenvolvimento		X	S <sup>2</sup>	S	n
Pupa de corpo branco e olho branco	Idade	28,50	0	0	6
	Peso	80,70	22,94	4,79	6
Pupa de corpo branco e olho rosa	Idade	29,21	0,16	0,40	7
	Peso	83,79	10,34	3,22	7
Pupa de corpo branco e olho marrom	Idade	31,50	0,22	0,47	10
	Peso	76,76	5,14	2,27	10
Pupa de corpo branco e olho preto	Idade	35,19	5,49	2,34	23
	Peso	81,08	10,03	3,17	23
Pupa de corpo amarelo e olho preto	Idade	43,70	0,29	0,54	10
	Peso	81,74	4,82	2,20	10
Adulto não emergido	Idade	47,71	0,16	0,40	7
	Peso	71,10	13,19	3,63	7

### 3.1.3 - Pesos de rainhas, operárias e machos de M. quadrifasciata anthidioides

Pelo histograma da Fig. 1, é possível ver que a frequên

cia maior, tanto para operárias como para rainhas, está entre 85 e 90 mg. Para os machos a frequência maior está entre 80 e 85 mg. Foi obtida uma pupa de rainha de olho preto e corpo branco com 69,4 mg. A rainha de menor peso na fase de pupa de olho branco, pesava 84,7 mg e a mais pesada nesta mesma fase, pesava 110,6 mg havendo 3 com pesos superiores a 100 mg. Obtivemos 2 rainhas, quase nascidas, que pesaram 70 e 55 mg.

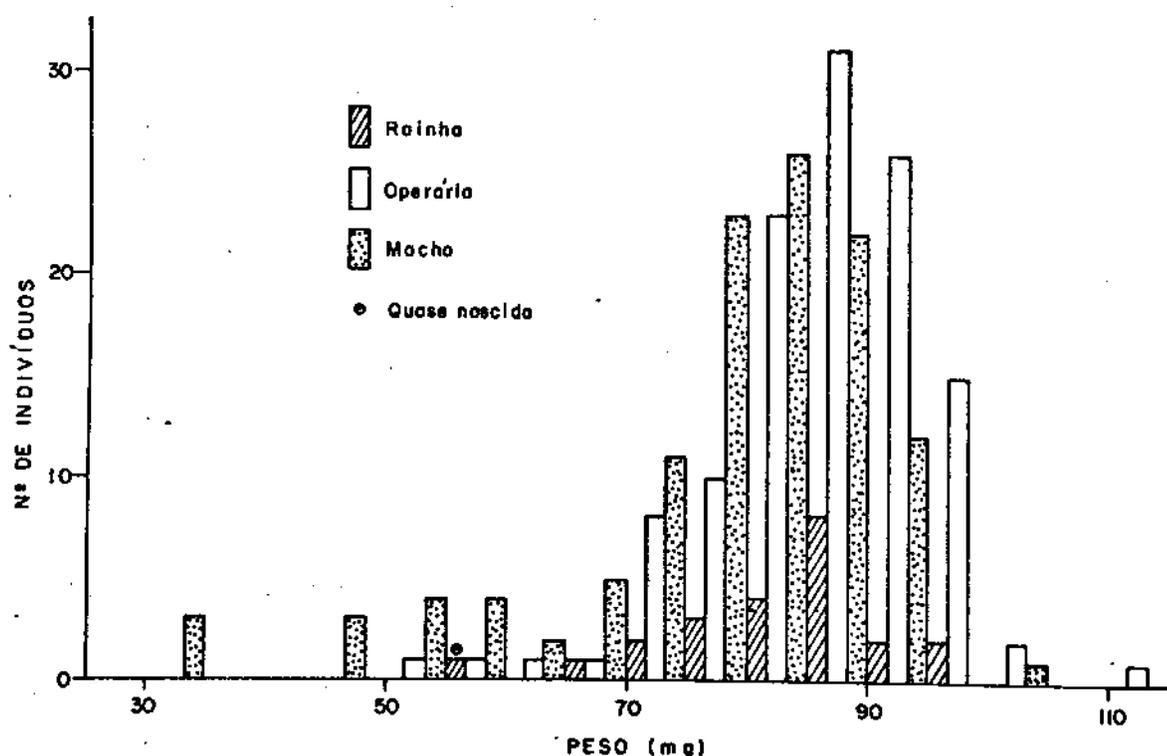


Fig. 1 - Pesos (mg) de todas rainhas, operárias e machos de M. quadrifasciata anthidioides, tomados nos períodos de maio-junho de 1970 (período 1) e agosto-outubro de 1970 (período 2). Temperatura: 28°C.

### 3.1.4 - Pesos de operárias de M. rufiventris rufiventris

O histograma da Fig. 2 mostra os pesos das operárias de M. rufiventris rufiventris. As frequências maiores estão entre 75 e 85 mg.

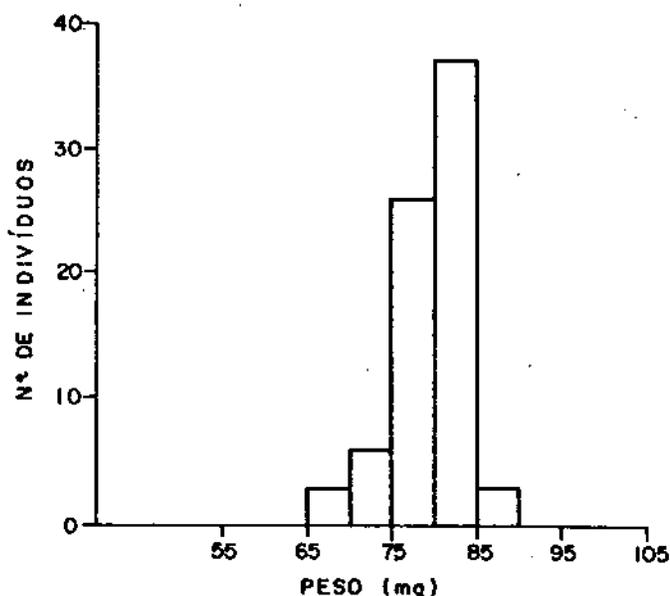


Fig. 2 - Pesos (mg) de todas operárias de M. rufiventris rufiventris, tomados no período de agosto-outubro de 1971. Temperatura: 28°C.

### 3.2 - Desenvolvimento Morfológico do Ovário

Nas cinco espécies estudadas, nas duas castas, rainhas e operárias, o número de ovariolos é constante e igual a quatro. Esses quatro ovariolos são facilmente distinguíveis em todos os estágios do desenvolvimento, desde a pupa de olho branco até o

adulto (Figs. 3 e 4).

### 3.2.1 - M. quadrifasciata anthidioides

Nas rainhas, a parte terminal dos dois ovários, nos primeiros estágios do desenvolvimento até pupa de olho rosa, se acham fortemente ligados sobre o ventrículo (Fig. 3-A a,b,c,d,e) e os ovidutos são tubos finos e longos. Nas operárias isto também ocorre, mas esta ligação já é mais fraca no estágio de pupa de olho rosa (Fig. 4-A i,j,k). Há portanto uma mudança no aspecto do ovário da fase de pupa de olho branco para a de pupa de olho rosa.

Nas rainhas, os ovários sofrem uma segunda mudança, aumentando de tamanho e mudando sua forma, do estágio de pupa de olho rosa para o de pupa de olho marrom. No estágio de pupa de olho rosa, os ovaríolos aumentam de tamanho e começam a se enrolar, seguindo uma separação de suas extremidades (Fig. 3-A c,d,e, f). Os ovidutos, neste estágio, começam a se encurtar (Fig. 3 A f) até o estágio de pupa de olho marrom (Fig. 3 A g). Os ovaríolos neste estágio já se acham bem desenvolvidos e com aspecto dos ovaríolos de uma rainha adulta. Nas operárias, o mesmo ocorre neste período (de pupa de olho rosa para pupa de olho marrom) sem entretanto haver enrolamento dos ovaríolos (Fig. 4-A k,l,m).

A rainha que está para nascer, já apresenta os ovários bastante desenvolvidos e que preenchem quase todo o abdome (Fig. 3 A h). Isto não acontece com as operárias, pois estas possuem os ovários pouco desenvolvidos (Fig. 4 A n).

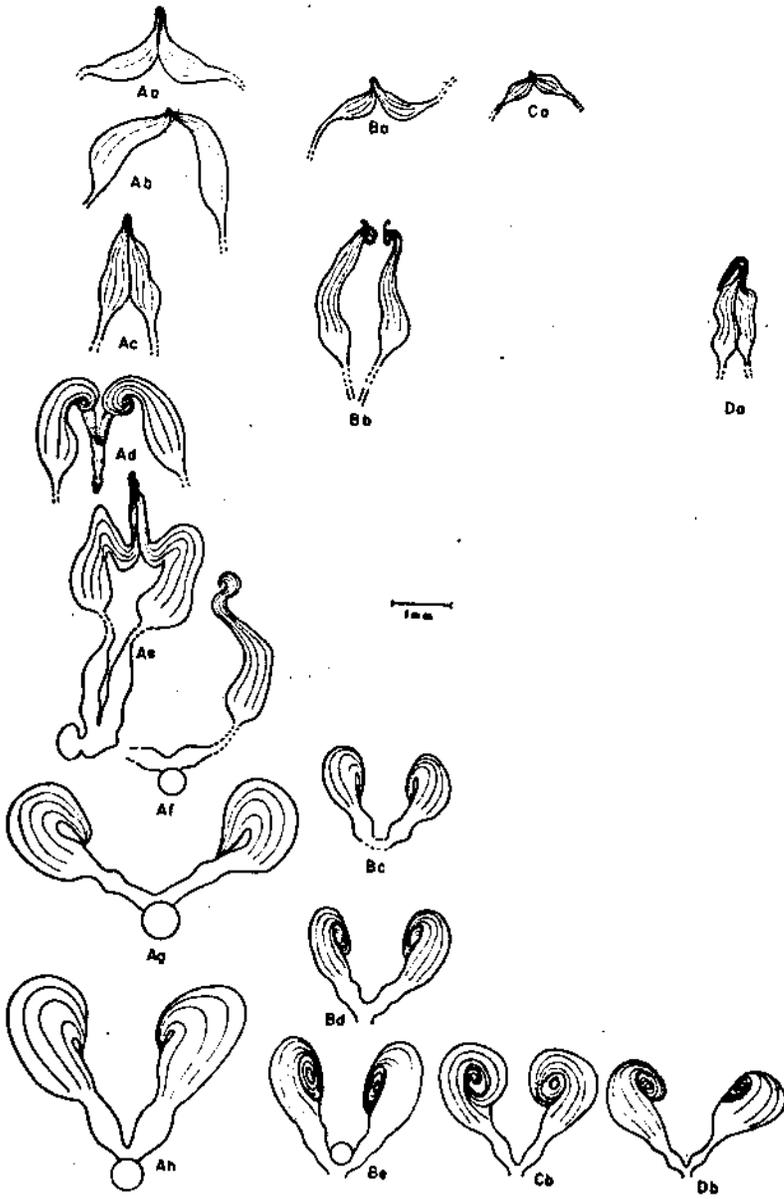


Fig. 3 - Esquemas dos ovários de rainhas nas diversas fases do desenvolvimento.

A) M. quadrifasciata anthidioides

- a - rainha olho branco
- b - rainha olho branco
- c - rainha olho rosa
- d - rainha olho rosa
- e - rainha olho rosa
- f - rainha olho rosa
- g - rainha olho marrom
- h - rainha adulta não emergida

B) M. rufiventris rufiventris

- a - rainha olho branco
- b - rainha olho rosa
- c - rainha olho marrom
- d - rainha olho preto e corpo amarelo
- e - rainha adulta não emergida

C) S. postica

- a - rainha olho branco
- b - rainha adulta não emergida

D) P. (P.) aroryana

- a - rainha olho rosa
- b - rainha adulta não emergida



Ai



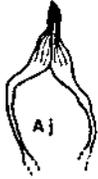
Bf



Cc



Dc



Aj



Cd



Dd



Ak



Bg



Ce



De



Al



Am



Bh



Cf



Df



Bi



Cg



Bj



An



Bk



Ch



Dg

Fig. 4 - Esquemas dos ovários de operárias nas diversas fases do desenvolvimento:

A) N. quadrifasciata anthidioides

- i - operária olho branco
- j - operária olho branco
- k - operária olho rosa
- l - operária olho rosa
- m - operária olho marrom
- n - operária adulta não emergida

B) N. rufiventris rufiventris

- f - operária olho branco
- g - operária olho rosa
- h - operária olho marrom
- i - operária olho preto
- j - operária olho preto e corpo amarelo
- k - operária adulta não emergida

C) S. postica

- c - operária olho branco
- d - operária olho branco
- e - operária olho rosa
- f - operária olho marrom
- g - operária olho preto
- h - operária adulta não emergida

D) P. (P.) droryana

- c - operária olho branco
- d - operária olho rosa
- e - operária olho rosa
- f - operária olho marrom
- g - operária adulta não emergida

### 3.2.2 - M. rufiventris rufiventris

As poucas rainhas dissecadas (2 pupas de olho branco, 2 pupas de olho rosa, 1 pupa de olho marrom, 1 pupa de olho preto e corpo amarelo e 2 adultas não emergidas), indicam que o desenvolvimento do ovário segue o mesmo padrão da espécie anterior (Fig. 3 B a,b,c,d,e).

As duas pupas de olho branco apresentaram os ovários ligados fortemente por suas extremidades (Fig. 3 B a) e os ovidutos eram tubos finos e longos que se romperam com a manipulação. As duas pupas de olho rosa apresentaram os ovários já separados, os ovaríolos em início de enrolamento e bem maiores que no estágio de pupa de olho branco (Fig. 3 B b). Os ovidutos nesta fase já estavam mais curtos e menos quebradiços.

A pupa de olho marrom apresentou os ovários bem separados, os ovaríolos quase que totalmente enrolados e os ovidutos bem curtos e grossos (Fig. 3 B c). A partir deste estágio, pelas três rainhas dissecadas (1 pupa de olho preto e corpo amarelo e duas adultas não emergidas) podemos inferir que há somente crescimento em espessura e comprimento dos ovaríolos (Fig. 3 B d,e), pois não houve modificação no aspecto dos ovidutos.

As duas rainhas que estavam para nascer, apresentaram os ovários como duas grandes massas preenchendo quase todo o abdome.

Nas operárias, os ovários no estágio inicial do desenvolvimento de pupa (pupa de olho branco), como na espécie M. qua-

drifasciata anthidioides, se acham fortemente ligados por suas extremidades (Fig. 4 B f). Este aspecto é mudado quando a pupa atinge o estágio de olho rosa. Aí os ovários já se encontram separados e os ovidutos mais curtos e grossos (Fig. 4 B g). Deste estágio até o de pupa de olho marrom, ocorre a segunda mudança na forma do ovário; os ovidutos diminuem de tamanho, tornando-se mais grossos e o ovário se apresenta como um ovário adulto porém em tamanho menor (Fig. 4 B h). Do estágio de pupa de olho preto até o de adulto não emergido ocorre somente um maior encurtamento dos ovidutos e um pequeno aumento no comprimento dos ovaríolos (Fig. 4 B i,j,k).

As operárias de M. rufiventris rufiventris e as de M. quadrifasciata anthidioides, apresentam antes de nascer os ovários com os mesmos aspectos morfológicos porém, nas primeiras, os ovários são menores.

### 3.2.3 - S. postica

Desta espécie conseguimos esquematizar os ovários de somente quatro rainhas (2 pupas de olho branco, 1 adulta não emergida e 1 adulta emergida). As pupas de olho branco apresentaram os ovários, como nas espécies anteriores, fortemente unidos por suas extremidades (Fig. 3 C a). Seus ovidutos foram rompidos com a manipulação. As outras duas rainhas, apresentaram os ovários bem desenvolvidos com os ovaríolos muito compridos e enrolados. Os ovidutos eram curtos porém não muito grossos (Fig. 3 C b). Estes ová

rios como nas espécies anteriores preenchem quase todo abdome.

Nas operárias, o desenvolvimento do ovário apresenta, como nas operárias de M. quadrifasciata anthidioides e M. rufiventris rufiventris, um padrão bem característico. No estágio de pupa de olho branco, os ovários se acham bem aderidos pelos seus ovariolos (Fig. 4 C c,d) separando-se na fase de pupa de olho rosa, quando os ovidutos que anteriormente eram longos, começam a se encurtar (Fig. 4 C e). A partir do estágio de pupa de olho marrom, os ovariolos já estão no seu desenvolvimento máximo, ocorrendo até o estágio de adulto, somente um encurtamento e engrossamento dos ovidutos (Fig. 4 C f,g,h).

#### 3.2.4 - P. (P.) droryana

Para o estudo desta espécie, conseguimos somente duas rainhas, uma pupa de olho rosa e uma adulta recém-emergida. A pupa de olho rosa, apresentou os ovários bem aderidos e com início de enrolamento (Fig. 3 D a). A rainha adulta, apresentou os ovários bastante desenvolvidos, os ovariolos bem enrolados formando uma massa que ocupava quase todo abdome (Fig. 3 D b).

As operárias desta espécie apresentaram o mesmo padrão de desenvolvimento que as anteriormente estudadas. A primeira mudança ocorre do estágio de pupa de olho branco para pupa de olho rosa, quando há separação dos ovários (Fig. 4 D c,d,e). A segunda mudança ocorre do estágio de pupa de olho rosa (Fig. 4 D e) para pupa de olho marrom (Fig. 4 D f). O estágio de pupa de olho marrom, como na espécie S. postica, apresenta os ovidutos um pouco a

longados (Fig. 4 D f, Cf). Nas espécies M. quadrifasciata anthidioides e M. rufiventris rufiventris, neste estágio os ovidutos já se apresentam como no estágio adulto (Fig. 4 A m, B h).

### 3.2.5 - F. varia

Nesta espécie fizemos somente o estudo das operárias, visto que, pupas de rainhas não ocorreram durante nosso trabalho. O desenvolvimento ovariano dessas operárias foi muito semelhante aos já descritos, embora esses ovários tenham se apresentado em tamanho muito reduzido quando comparados com as outras espécies. Os esquemas dos ovários não foram feitos devido a dificuldade em manipulá-los. Os ovaríolos são bem rudimentares, porém os ovidutos são do tamanho dos encontrados em P.(P.) droryana.

### 3.3 - Número de células em divisão (metáfase somática e prófase I meiótica), nas diversas fases de desenvolvimento de pupa

As tabelas III, IV, V e VI, contém os dados das espécies M. quadrifasciata anthidioides, M. rufiventris rufiventris, S. postica e P.(P.) droryana, escolhidas para o estudo quantitativo. Utilizamos, para cada espécie, cinco pupas para cada estágio, num total de 30.

A partir dos dados das tabelas III, IV, V e VI, com uma programação especial para a calculadora Hewlett Packard (Modelo 9810 A), obtivemos os gráficos das figuras 5, 6, 7 e 8 que mostram o número médio de células em divisão, com respectivo erro pa

drão da média, durante as diversas fases do desenvolvimento. Não há correspondência contínua entre coordenada e absissa. A linha que une as médias, representa somente a variação sofrida de uma fase a outra.

TABELA III

Número de células em divisão (metáfase somática e prófase I da meiose) nas diversas fases do desenvolvimento da pupa da espécie *M. quadrifasciata anthidioides*, com respectivas médias e desvios padrões

Fase do desenvolvimento	Espécimen	FASES DA DIVISÃO CELULAR						Total
		Metáfase somática	Leptonema	Zigonema	Paquinema	Diplonema	Diacinese	
PUPA de OLHO BRANCO	1	13	9	6	1	0	0	29
	2	45	27	24	1	0	0	97
	3	54	4	0	0	0	0	58
	4	241	20	19	4	0	0	284
	5	61	245	132	16	2	0	476
	Total	434	305	181	22	2	0	944
	X	86,80	61,00	36,20	4,40	0,40	-	
	S	89,55	103,25	54,41	6,65	0,89	-	
PUPA de OLHO ROSA	1	45	30	48	6	0	0	129
	2	17	1	1	0	0	0	19
	3	27	36	17	0	0	0	80
	4	9	43	7	1	0	0	60
	5	130	98	52	2	0	0	282
	Total	228	208	125	9	0	0	570
	X	45,60	41,60	25,00	1,80	-	-	
	S	49,05	35,34	23,56	2,48	-	-	
PUPA de OLHO MARRON	1	33	0	0	0	0	0	33
	2	21	48	70	0	0	0	139
	3	19	19	2	0	0	0	40
	4	9	13	5	1	0	0	28
	5	47	4	2	0	0	0	53
	Total	129	84	79	1	0	0	293
	X	25,80	16,80	15,80	0,20	-	-	
	S	14,60	18,96	30,35	0,44	-	-	
PUPA de OLHO PRETO	1	9	21	16	9	2	0	57
	2	9	19	32	7	4	0	71
	3	4	30	61	25	0	0	120
	4	1	75	111	10	0	0	197
	5	0	28	33	1	0	0	62
	Total	23	173	253	52	6	0	507
	X	4,60	34,60	50,60	18,40	1,20	-	
	S	4,27	23,04	37,44	8,87	1,78	-	
PUPA de OLHO PRETO e CORPO AMARELO	1	14	18	20	1	0	0	53
	2	2	3	0	0	0	1	6
	3	5	2	2	0	0	0	11
	4	0	4	1	0	0	0	5
	5	5	7	4	0	0	0	23
	Total	26	34	27	1	0	1	100
	X	5,20	6,80	5,40	0,20	-	0,20	
	S	5,35	6,53	8,29	0,44	-	0,44	
ADULTO não EMERGIDO	1	18	6	6	2	2	0	34
	2	20	3	10	2	0	1	36
	3	5	12	13	1	1	0	32
	4	15	3	18	1	2	0	39
	5	3	1	0	2	3	0	9
	Total	61	25	47	8	6	1	150
	X	12,20	5,00	9,40	1,60	1,60	0,20	
	S	7,72	4,30	6,84	0,54	1,14	0,44	

TABELA IV

Número de células em divisão (metáfase somática e prófase I da meiose) nas diversas fases do desenvolvimento da pupa da espécie *M. rufiventris rufiventris*, com respectivas médias e desvios padrões

Fase do desenvolvimento	Espécimes	FASES DA DIVISÃO CELULAR						Total
		Metáfase somática	Leptonema	Zigonema	Paquinema	Diplonema	Diacinese	
PUPA BRANCO	1	26	29	31	3	0	0	89
	2	5	81	16	0	0	0	102
	3	32	67	11	1	1	0	112
	4	17	23	15	1	1	0	57
	5	208	23	28	2	0	0	261
	Total	288	223	101	7	2	0	621
	X	57,60	44,60	20,20	1,40	0,40	-	
	S	84,68	27,40	8,75	1,14	0,54	-	
PUPA ROSA	1	191	39	18	0	0	0	298
	2	313	96	13	0	1	0	423
	3	6	118	41	0	0	0	165
	4	112	47	19	1	0	0	179
	5	255	24	8	1	1	0	289
	Total	877	324	149	2	2	0	1.354
	X	175,40	64,80	29,80	0,40	0,40	-	
	S	120,65	40,15	24,79	0,54	0,54	-	
PUPA MARRON	1	16	285	39	0	0	0	340
	2	103	119	86	3	0	0	311
	3	5	161	84	0	0	0	250
	4	0	65	61	11	1	0	138
	5	3	14	22	8	2	0	49
	Total	127	644	292	22	3	0	1.088
	X	25,40	128,80	58,40	4,40	0,60	-	
	S	43,79	103,41	27,95	4,92	0,89	-	
PUPA PRETO	1	0	11	9	0	0	0	20
	2	2	17	25	2	3	0	49
	3	13	5	21	1	2	0	42
	4	0	81	32	3	0	0	116
	5	2	43	59	21	0	1	126
	Total	17	157	146	27	5	1	353
	X	3,40	31,40	29,80	5,40	1,00	0,20	
	S	5,45	11,28	18,63	8,79	1,41	0,44	
PUPA CORPO AMARELO	1	18	96	115	16	5	0	250
	2	4	39	91	0	2	0	136
	3	0	5	12	18	1	1	37
	4	8	3	2	4	0	2	19
	5	2	0	0	6	2	0	10
	Total	32	143	220	44	10	3	442
	X	6,40	28,60	44,00	8,80	2,00	0,60	
	S	7,12	40,86	54,71	7,82	1,87	0,89	
ADULTO não EMERSIDO	1	3	21	0	2	0	0	26
	2	0	7	3	16	1	0	27
	3	1	15	10	0	0	0	26
	4	2	4	9	5	1	2	23
	5	0	5	0	3	0	0	8
	Total	6	52	22	26	2	2	110
	X	1,20	10,40	4,40	5,20	0,40	0,40	
	S	1,30	7,33	4,82	6,30	0,54	0,89	

TABELA V

Número de células em divisão (metáfase somática e prófase I da meiose) nas diversas fases do desenvolvimento de pupa da espécie *S. postica*, com respectivas médias e desvios padrões

Fases do desenvolvimento	Espécimen	FASES DE DIVISÃO CELULAR						Total
		Metáfase somática	Leptonema	Zigonema	Paquinema	Diplonema	Diacinese	
BRANCO	1	57	36	5	0	0	0	98
	2	82	45	24	0	0	0	151
	3	136	38	35	2	0	0	211
	4	25	23	12	0	0	0	60
	5	107	145	8	0	0	0	260
	Total	407	287	84	2	0	0	780
	X	81,40	57,40	16,80	0,40	-	-	
	S	43,04	49,61	12,47	0,89	-	-	
ROSA	1	20	47	39	0	0	0	106
	2	15	7	20	1	0	0	43
	3	33	34	18	0	0	0	83
	4	25	105	73	1	0	0	204
	5	37	128	97	0	0	0	262
	Total	128	321	247	2	0	0	698
	X	25,60	64,20	49,40	0,40	-	-	
	S	8,70	50,53	34,57	0,54	-	-	
MARROM	1	3	86	38	1	0	0	128
	2	2	106	77	2	0	0	187
	3	4	96	109	0	0	0	209
	4	0	81	135	0	0	0	216
	5	1	55	69	0	0	0	125
	Total	10	424	428	3	0	0	865
	X	2,00	84,80	85,60	0,60	-	-	
	S	1,58	19,22	37,42	0,89	-	-	
PRETO	1	16	3	0	0	0	0	19
	2	9	34	27	12	3	0	85
	3	5	16	40	36	8	0	105
	4	0	93	12	18	5	0	128
	5	11	33	17	10	0	0	71
	Total	41	179	96	76	16	0	408
	X	8,20	35,80	19,20	15,20	3,20	-	
	S	6,05	34,46	15,15	15,31	3,42	-	
AMARELO	1	0	8	2	0	3	0	13
	2	0	0	15	4	7	0	26
	3	2	17	6	7	10	0	42
	4	3	6	3	0	7	0	19
	5	4	3	3	2	6	0	18
	Total	9	34	29	13	33	0	118
	X	1,80	6,80	5,80	2,60	6,60	-	
	S	1,78	6,45	5,35	2,96	2,50	-	
EMERGIDO	1	0	6	2	2	1	0	11
	2	2	2	1	0	3	0	8
	3	1	3	1	1	0	0	6
	4	0	2	0	0	0	0	2
	5	0	2	0	1	2	0	5
	Total	3	15	4	4	6	0	32
	X	0,60	3,00	0,80	0,80	1,20	-	
	S	0,89	1,73	0,83	0,83	1,30	-	

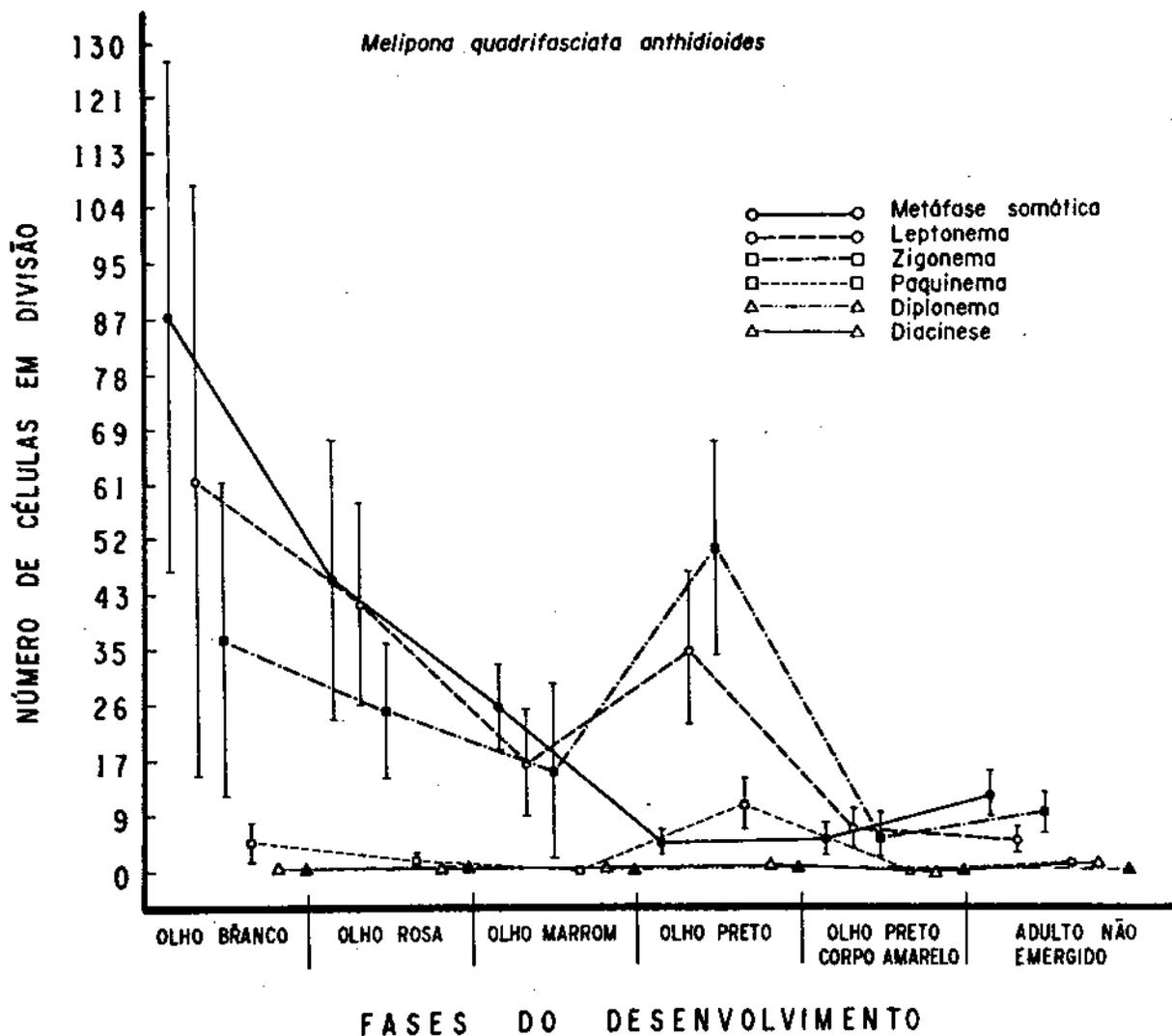


Fig. 5 - Número médio de células em divisão, com respectivo erro padrão, nas diversas fases do desenvolvimento da *M. quadrifasciata anthidioides*. Não há correspondência contínua entre coordenada e absissa. A linha que une as médias, representa somente a variação sofrida de uma fase a outra.

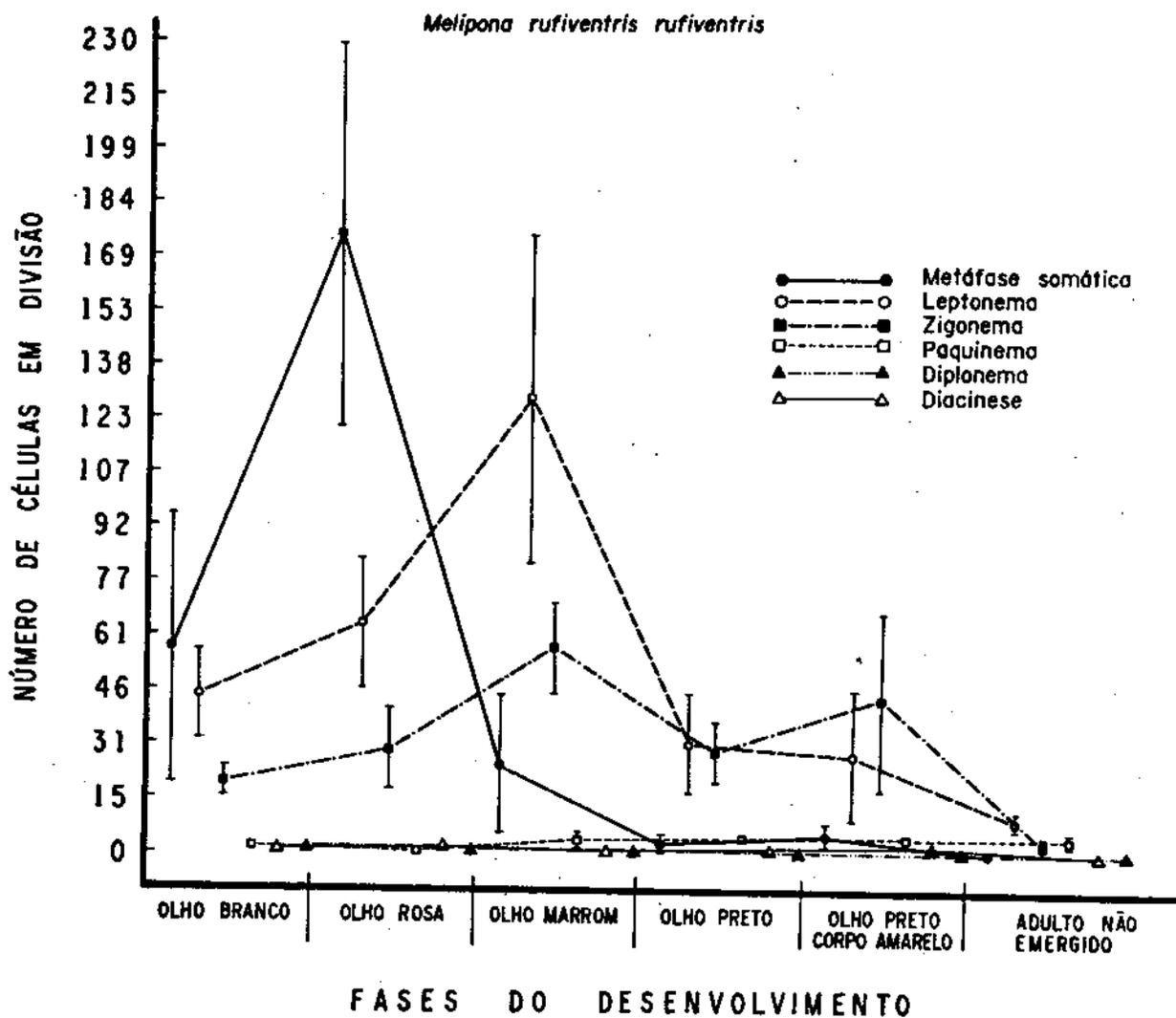


Fig. 6 - Número médio de células em divisão, com respectivo erro padrão, nas diversas fases do desenvolvimento da *M. rufiventris rufiventris*. Não há correspondência contínua entre coordenada e absissa. A linha que une as médias, representa somente a variação sofrida de uma fase a outra.

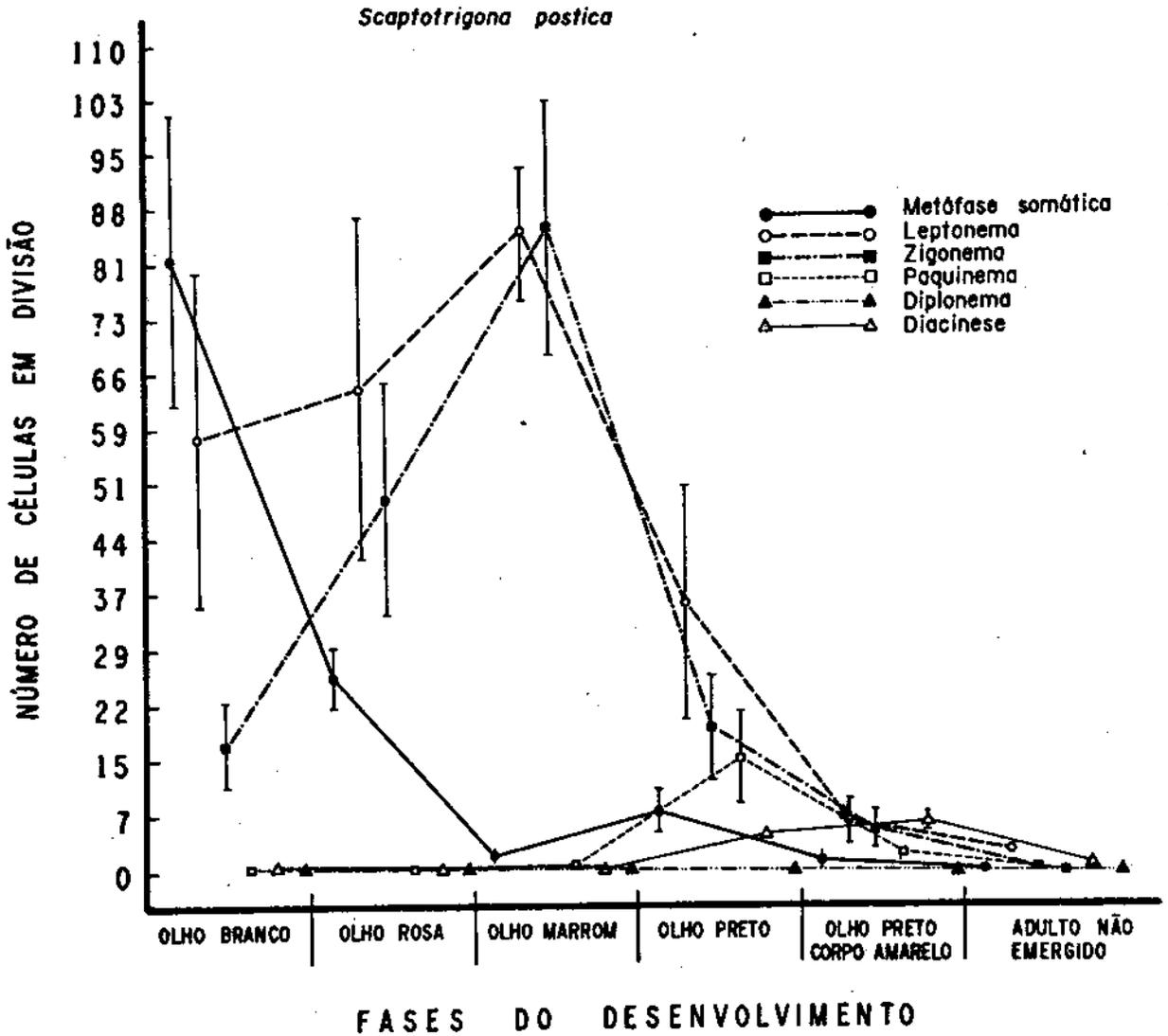


Fig. 7 - Número médio de células em divisão, com respectivo erro padrão, nas diversas fases do desenvolvimento da *S. postica*. Não há correspondência contínua entre coordenada e absissa. A linha que une as médias, representa somente a variação sofrida de uma fase a outra.

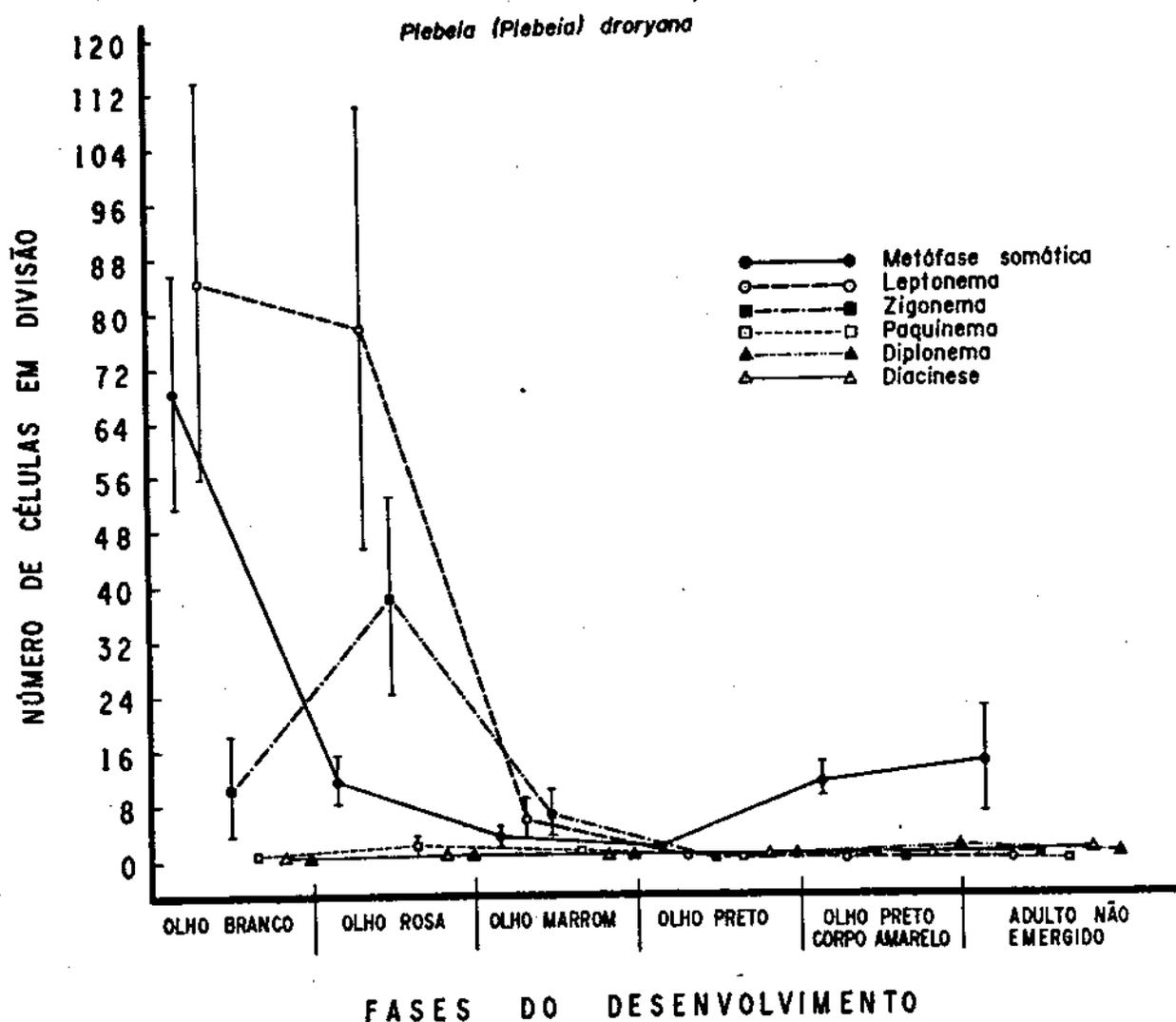


Fig. 8 - Número médio de células em divisão, com respectivo erro padrão, nas diversas fases do desenvolvimento da *P. (P.) droryana*. Não há correspondência contínua entre coordenada e absissa. A linha que une as médias, representa somente a variação sofrida de uma fase a outra.

### . 3.4 - Análise dos diferentes estágios da prófase meiótica

Nosso estudo sobre o processo da meiose nas fêmeas, foi feito somente até o estágio em que o ovo é botado e que achamos ser diacinese. Analizamos, portanto, óocitos I em prófase nos estágios de leptonema, zigonema, paquinema, diplonema e diacinese. Nossas observações foram as seguintes:

Leptonema: - Um estágio pré-leptóteno é evidenciado por uma cromatina pouco densa, distribuída em todo o núcleo, e com alguns pontos heteropicnóticos (Fig. 9 I seta pequena). Nota-se, nos núcleos das espécies M. quadrifasciata anthidioides, S. postica e P.(P.) droryana, uma estrutura heteropicnótica quase na periferia (Fig. 9 G seta pequena, 9 I seta grande). Os núcleos em leptonema foram muito frequentes nas quatro espécies estudadas. O início deste estágio é evidenciado por um princípio de delineamento dos filamentos cromossômicos (Fig. 9 A, B, C). A cromatina se distribui, regularmente, em todo o núcleo como pequenas regiões heteropicnóticas (Fig. 9 B, 9 C seta grande). Os cromossomos vão se tornando mais evidentes porém muito longos e delgados, sendo impossível segui-los em toda a sua extensão (Fig. 9 C seta pequena). Observa-se, neste estágio, nas espécies M. quadrifasciata anthidioides e P.(P.) droryana, que os cromossomos se agrupam, provavelmente por suas extremidades, formando uma figura em "bouquet". A região central, cromocentro, apresenta-se bastante corada (Fig. 9 D seta grande, 9 E, 9 G seta grande, 9 H). Os núcleos em leptone ma mais adiantado, mostram aproximação de alguns homólogos (Fig.

9 D setas convergentes), um início de pareamento entre outros (Fig. 9 F setas pequenas) e alguns já pareados, restando apenas as extremidades (Fig. 9 I setas convergentes). Não existe local específico para o início do pareamento.

As Figs. 9 E, F, G, H e I, mostram núcleos em leptozigonema, ou seja, em transição do estágio leptóteno para o estágio zigóteno.

Zigonema: - Como no estágio anterior, as células em zigonema foram muito frequentes nas espécies estudadas. Este estágio é caracterizado pelo pareamento dos cromossomos homólogos, sendo que estes já se apresentam mais condensados (Fig. 10 A, B, C). Alguns núcleos neste estágio, apresentam-se com os homólogos totalmente pareados (Fig. 10 A), porém na maioria dos oócitos I zigótenos observados, alguns cromossomos ainda estavam para completar a sinapse (Fig. 10 B seta).

Os cromômeros são bastante evidentes neste estágio. Observa-se, nos oócitos da espécie M. quadrifasciata anthidioides, cromossomos com regiões que se paream inespecificamente (Fig. 10 C seta pequena).

Nos estágios de zigonema mais adiantados já se observam nas sinapses os cromômeros de cada homólogo pareados (Fig. 10 C setas convergentes). Neste estágio, raramente foi observado ao microscópio, uma estrutura semelhante a nucléolo e que se localizava entre os cromossomos. Não nos foi possível determinar quantos cromossomos estavam ligados a esta estrutura.

Paquinema:- Células em paquinema foram observadas em menor número que nos estágios anteriores. Neste, todos os homólogos já estão totalmente pareados, e, como no estágio de zigonema, os cromossomos parecem estar em número haplóide (Fig. 10 D,E,F,G,H). Os cromossomos já mais espiralizados, em algumas preparações, podem ser vistos como dois fios intimamente ligados (Fig. 10 G setas convergentes). A observação de bivalentes apresentando 4 cromátides é muito difícil, porém na Fig. 10 H (seta pequena) é possível verificar que um dos cromossomos apresenta duas cromátides.

Observam-se com nitidez os cromômeros homólogos pareados (Fig. 10 E,F,G). Em alguns núcleos com os cromossomos paquítenos, verifica-se um par com pareamento incompleto (Fig. 10 D seta). Nas observações ao Microscópio com contraste de fase certos núcleos apresentaram os cromossomos em aspecto plumuloso. Isto pode ser visto, porém não muito nitidamente na Fig. 10 H (seta grande à direita). Muitos núcleos paquítenos apresentaram um nucléolo ligado a um ou dois cromossomos sendo que um dos pontos de contato dos cromossomos apresenta-se sem coloração (Fig. 10 H seta maior a esquerda).

Diplonema:- Foram observadas células em diplonema em número bem mais reduzido que nos dois primeiros estágios. Os cromossomos homólogos que, anteriormente, estavam completamente ligados, apresentam-se, neste estágio, com figuras de quiasmas. O número destes varia de 3 a 6 nos cromossomos maiores e nos menores apresentam pelo menos 1 (Fig. 11 A, B).

Diacinese: - Os núcleos em diacinese foram bastante raros nas nossas preparações. Somente nas espécies M. rufiventris rufiven-  
tris e P.(P.) droryana observamos este estágio (Fig. 11 C, D, E). Em uma operária de S. postica observamos alguns núcleos com cromossomos bivalentes característicos da diacinese e em número haplóide (Fig. 11 E).

Neste estágio (Fig. 11 C), os homólogos geralmente estão unidos uns aos outros pelas suas extremidades (seta maior) que se apresentam heteropicnóticas; os centrômeros são as regiões mais claras dos cromossomos (seta menor). Observamos também muitas células em que aparecem pontos amorfos de cromatina (Fig. 11 F, G, H seta menor). O número destes pontos corresponde ao número haplóide da espécie. Sugerimos que estas células estejam em um estágio pós-diacinese e nelas observamos uma estrutura semelhante ao nucléolo observado nos estágios de zigonema e paquinema (Fig. 11 F setas maiores; H seta maior). Ligados a esta estrutura sempre aparecem dois cromossomos, sendo um deles maior que o outro. Raramente foi observado 3 cromossomos (Fig. 11 F seta grande acima). Observamos também células maiores, com os cromossomos bastante condensados e que provavelmente são os oócitos que estão em fase de aumento da massa citoplasmática (Fig. 11 I).



Fig. 9 A a E: - Oócitos I. Esmagamento.

- A) pré-leptonema. Operária de S. postica (n = 17), olho marrom. Ácido acético. Contraste de fase x 1480.
- B) pré-leptonema. Operária de S. postica (n = 17), olho marrom. Feulgen x 1520.
- C) pré-leptonema e leptonema. Operária de M. quadrifasciata anthidioides (n = 9), olho rosa. Giemsa x 1600. A seta grande mostra uma pequena região heteropicnótica da cromatina em um núcleo pré-leptóteno. A seta pequena mostra o início de delineamento de um filamento cromossômico.
- D) Leptonema. Operária de M. quadrifasciata anthidioides (n = 9), olho marrom. Giemsa x 1600. A seta grande mostra o cromocentro. As setas pequenas mostram a aproximação dos homólogos.
- E) Lepto-zigonema. Operária de M. quadrifasciata anthidioides (n = 9), olho branco. Giemsa x 1600. As setas indicam os cromocentros.



Fig. 9 F a I: - Oócitos I. Esmagamento.

- F) Lepto-zigonema. Operária de M. quadrifasciata anthidioides (n = 9), olho marrom. Giemsa x 1600. As setas mostram o início de pareamento entre os homólogos.
- G) Pré-leptonemas e lepto-zigonema. Operária de P.(P.) droryana (n = 18), olho preto. Orceína-lacto-acética x 1894. A seta pequena mostra uma região heteropicnótica (cromocentro?). A seta grande mostra o cromocentro.
- H) Início de leptonema (2 núcleos) e lepto-zigonema. Rainha de M. quadrifasciata anthidioides (n = 9), olho marrom. Giemsa x 1600. A seta indica o cromocentro.
- I) Pré-leptonema (4 núcleos) e lepto-zigonema. Operária de M. quadrifasciata anthidioides (n = 9), olho rosa. Giemsa x 1600. A seta grande mostra a região heteropicnótica localizada quase na periferia do núcleo. As setas pequenas mostram uma terminalização não pareada de 2 homólogos pareados.



Fig. 10 - Oócitos I. Esmagamento:

- A) Zigonema. Operária de S. postica (n = 17), adulta não emergida. Feulgen x 1440.
- B) Zigonema. Operária de S. postica (n = 17), olho marrom. Orceína-lacto-acética. Contraste de fase x 1440. A seta indica dois homólogos ainda não pareados.
- C) Zigo-paquinema. Rainha de M. quadrifasciata anthidioides (n = 9), olho preto. Giemsa x 1600. As setas convergentes mostram os cromômeros de cada homólogo pareados. A seta à direita mostra pareamento inespecífico entre cromossomos não homólogos.
- D) Paquinema. Operária de M. quadrifasciata anthidioides (n = 9), olho preto. Giemsa x 1600. A seta mostra um par de homólogos com pareamento incompleto.
- E) Paquinema. Operária de S. postica (n = 17), olho marrom. Ácido acético. Contraste de fase x 2300. A seta mostra os cromômeros homólogos pareados.
- F) Paquinema. Operária de S. postica (n = 17), adulta não emergida. Feulgen x 1480. A seta mostra os cromômeros homólogos pareados.
- G) Paquinema. Operária de S. postica (n = 17), olho marrom. Ácido acético. Contraste de fase x 2300. As setas indicam o pareamento dos cromômeros homólogos.
- H) Paquinema. Operária de M. quadrifasciata anthidioides (n = 9), olho preto. Orceína-lacto-acética x 1440. A seta pequena ao centro mostra as cromátides de um componente de um bivalente. A seta maior à direita, mostra o aspecto plumuloso dos cromossomos neste estágio. A seta maior à esquerda, mostra um nucléolo e a região cromossômica não corada aderente a ele.

Fig. 11 A e B - Oócitos I. Esmagamento:

A) Diplonema, Operária de S. postica (n = 17), adulta não emergida. Feulgen  
x 1440.

B) Diplonema, Operária de S. postica (n = 17), adulta não emergida. Orceína  
-lacto-acética. x 1440.



Fig. 11 C a I - Oócitos I. Esmagamento:

- C) Diacinese. Operária de P.(P.) droryana (n = 18), olho preto. Giemsa x 1945. A seta grande indica o ponto de união entre os homólogos. A seta pequena mostra a região do centrômero.
- D) Diacinese. Operária de P.(P.) droryana (n = 18), olho marrom. Giemsa x 1945.
- E) Diacinese. Operária de S. postica (n = 17), adulta não emergida. Orceína-lacto-acética x 1480.
- F) Diacinese. Operária de M. rufiventris rufiventris (n = 9), olho preto. Orceína-lacto-acética x 2112. As setas maiores indicam estruturas semelhantes a nucléolos com dois cromossomos aderidos a elas. A seta pequena mostra uma estrutura amorfa de cromatina (bivalente).
- G) Diacinese. Operária de P.(P.) droryana (n = 18), olho preto. Orceína-lacto-acética x 2048. A seta indica um ponto amorfo de cromatina (bivalente).
- H) Diacinese. Operária de M. rufiventris rufiventris (n = 9), olho preto. Orceína-lacto acética x 1440. A seta maior mostra uma estrutura semelhante a nucléolo, na qual estão aderidos dois cromossomos. A seta menor mostra um ponto amorfo de cromatina (bivalente).
- I) Diacinese. Operária de P.(P.) droryana (n = 18), olho preto. Orceína-lacto-acética x 1894.

### 3.5 - Estudo Cariotípico

#### 3.5.1 - M. quadrifasciata anthidioides

Na Fig. 12 são apresentados os cromossomos metafásicos de uma operária da espécie M. quadrifasciata anthidioides.

Fig. 12 - Operária de M. quadrifasciata anthidioides.  $2n = 18$ .  
Número fundamental de braços cromossômicos (NF) = 34.

Os cromossomos da M. quadrifasciata anthidioides foram classificados da seguinte maneira:

Par cromossômico nº 1: - os cromossomos desse par são sub-metacêntricos e são os maiores do complemento. Um dos cromossomos desse par, apresenta uma grande constrição secundária entre o centrômero e os seus braços curtos.

Par cromossômico nº 2: - os cromossomos que constituem este par são os segundos em tamanho da série cromossômica e possuem centrômero sub-mediano.

Pares cromossômicos nºs 3, 4, 5, 6 e 7: - os cromossomos que constituem este grupo apresentam todos centrômero sub-terminal e seus tamanhos decrescem do par nº 3 para o nº 7.

Par cromossômico nº 8: - os cromossomos que constituem este par apresentam o centrômero em posição quase mediana.

Par cromossômico nº 9: - este par é formado por cromossomos acrocêntricos.

Na tabela VII é apresentado um resumo da classificação e descrição dos cromossomos da M. quadrifasciata anthidioides.

TABELA VII

Classificação e descrição morfológica dos cromossomos da M. quadrifasciata anthidioides

Pares	Posição do Centrômero	Constricção	Cromossomo c/satélite
1	sub-mediana	Grande constricção secundária em um dos cromossomos	-
2	sub-mediana		-
3	sub-terminal		-
4	sub-terminal		-
5	sub-terminal		-
6	sub-terminal		-
7	sub-terminal		-
8	quase mediana		-
9	terminal		-

### 3.5.2 - M. rufiventris rufiventris

Na Fig. 13 são apresentados os cromossomos metafásicos de uma operária de M. rufiventris rufiventris.

Fig. 13 - Operária de M. rufiventris rufiventris.  $2n = 18$ . Número fundamental de braços cromossômicos (NF) = 34.

Os cromossomos da N. rufiventris rufiventris foram classificados da seguinte maneira:

Pares cromossômicos nºs 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7: - os cromossomos que constituem estes pares são os maiores do complemento. Os pares 2, 4 e 6 possuem o centrômero em posição subterminal e os de nºs 1, 3, 5 e 7 possuem o centrômero em posição submediana. Os cromossomos que constituem o par nº 7 são menores que os anteriores e possuem satélites nos braços curtos.

Par cromossômico nº 8: - os cromossomos que constituem este par são menores que os do par nº 7, são sub-metacêntricos possuindo o centrômero em posição quase mediana.

Par cromossômico nº 9: - é formado por cromossomos acrocêntricos.

Na tabela VIII é apresentado um resumo da classificação e descrição dos cromossomos da N. rufiventris rufiventris.

TABELA VIII

Classificação e descrição morfológica dos cromossomos da M.  
rufiventris rufiventris

Pares	Posição do Centrômero	Constricção	Cromossomos com satélites
1	sub-mediana	-	
2	sub-terminal	-	
3	sub-mediana	-	
4	sub-terminal	-	
5	sub-mediana	-	
6	sub-terminal	-	
7	sub-mediana	-	satélites nos braços curtos
8	quase mediana	-	
9	terminal	-	

### 3.5.3 - S. postica

Os cromossomos metafásicos de uma operária da espécie S. postica são apresentados na figura 14.

Fig. 14 - Operária S. postica.  $2n = 34$ . Número fundamental de braços cromossômicos (NF) = 54.

Os cromossomos da S. postica foram classificados da seguinte maneira:

GRUPO A: Pares cromossômicos nºs 1, 2 e 3 - todos os cromossomos que constituem este grupo são sub-metacêntricos e decrescem do nº 1 para o nº 3.

GRUPO B: Pares cromossômicos nºs 4, 5, 6, 7 e 8 - os cromossomos que constituem este grupo possuem centrômero sub-terminal. O par cromossômico nº 4 corresponde em tamanho ao imediatamente anterior.

GRUPO C: Pares cromossômicos nºs 9, 10, 11 e 12 - os cromossomos que constituem este grupo são acrocêntricos e o exame microscópico revela a presença de rudimentos dos braços curtos. O par cromossômico nº 9 corresponde em tamanho ao par nº 4 do GRUPO B. O par nº 10 possui tamanho bastante próximo ao anterior e os nºs 11 e 12 decrescem bastante em tamanho em relação aos pares anteriores e apresentam porte semelhante entre si.

GRUPO D: Pares cromossômicos nºs 13, 14 e 15 - estes pares são acrocêntricos, muito semelhantes em tamanho e podem ser ordenados em ordem decrescente do nº 13 ao 15.

GRUPO E: Pares cromossômicos nºs 16 e 17 - o par cromossômico nº 16 é um sub-metacêntrico pequeno e possui o centrômero na região quase mediana e o par nº 17 é constituído por cromossomos metacêntricos e que são os menores do complemento.

Na tabela IX é apresentado um resumo de classificação e descrição dos cromossomos da S. postica.

TABELA IX

Classificação e descrição morfológica dos cromossomos da espécie  
S. postica

Grupos	Pares	Posição do centrômero	Cónstricção	Cromossomos c/ satélites
A	1	sub-mediana	-	-
	2	sub-mediana	-	-
	3	sub-mediana	-	-
B	4	sub-terminal	-	-
	5	sub-terminal	-	-
	6	sub-terminal	-	-
	7	sub-terminal	-	-
	8	sub-terminal	-	-
C	9	terminal	-	-
	10	terminal	-	-
	11	terminal	-	-
	12	terminal	-	-
D	13	terminal	-	-
	14	terminal	-	-
	15	terminal	-	-
E	16	"quase"mediana	-	-
	17	mediana	-	-

### . 3.6 - Padrões de Formação de Bandas-G

Os cromossomos da M. quadrifasciata anthidioides apresentando as bandas G são mostrados na Fig. 15.

Fig. 15 - Cromossomos metafásicos de operária M. quadrifasciata anthidioides ( $2n = 18$ ;  $NF = 34$ ), apresentando bandas G.

Na Fig. 16 são apresentados, esquematicamente, os padrões de formação das bandas G dos cromossomos da N. quadrifasciata anthidioides. Nos esquemas estão representados, aproximadamente, os tamanhos e as localizações das bandas G, pelo fato de não termos feito medidas das mesmas. Pelo mesmo motivo, os tamanhos dos cromossomos e as localizações dos centrômeros foram esquematizados sem estabelecermos rigorosamente suas proporções.

As bandas G dos cromossomos da espécie N. quadrifasciata anthidioides (Fig. 16 à pág. 53), foram descritas de acordo com a conferência de Paris (1971) sendo que os braços curtos e longos foram denominados pelas letras p e q, respectivamente, de acordo com o estabelecido pela Conferência de Chicago (1966).

#### Par cromossômico nº 1

(p) - Os braços curtos dos cromossomos deste par foram divididos em duas regiões (1 e 2). A primeira se estende do centrômero à banda positiva 1 p 2 1, a segunda ocupa a área definida por esta banda e a extremidade distal do braço do cromossomo.

#### Bandas da região p 1

a) 1 p 1 1 - negativa e ocupa a região adjacente ao centrômero.

#### Bandas da região p 2

a) 1 p 2 1 - positiva, bem definida e longa

b) 1 p 2 2 - negativa, curta e ocupa a extremidade distal do braço do cromossomo.

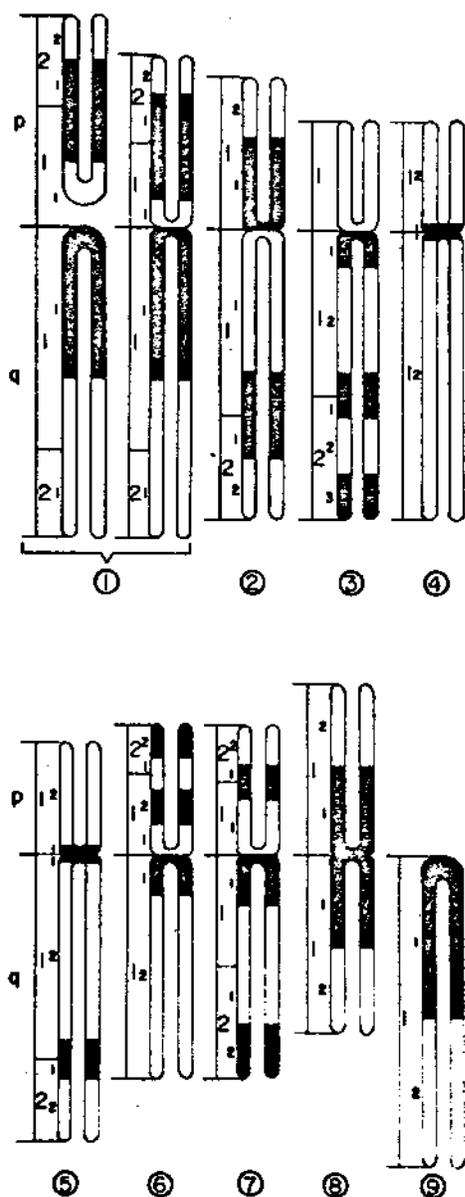


Fig. 16 - Esquema dos padrões de formação de bandas G dos cromossomos da M. quadrifasciata anthidioides. As letras p e q representam, respectivamente, os braços curtos e longos.

(q) - Os braços longos dos cromossomos que constituem o par nº 1, foram divididos em duas regiões (1 e 2). A região número 1 fica compreendida entre o centrômero e a banda negativa 1 q 2 1. A região número 2 se estende desse ponto até a extremidade distal do braço cromossômico.

Bandas da região q 1

a) 1 q 1 1 - positiva, bem definida, longa, colocada adjacente à região centromérica.

Bandas da região q 2

a) 1 q 2 1 - negativa, longa e ocupa a região distal do braço cromossômico.

Par cromossômico nº 2

(p) - Os braços curtos desses cromossomos contem uma região que compreende a área localizada entre o centrômero e a extremidade distal do braço do cromossomo.

Bandas da região p 1

a) 2 p 1 1 - positiva, bem definida, longa e ocupa a região adjacente ao centrômero.

b) 2 p 1 2 - negativa, bem definida e se estende até a extremidade distal do braço cromossômico.

(q) - Os braços longos dos cromossomos do par nº 2 foram divididos em duas regiões (1 e 2). A região número 1 se estende da área compreendida pelo centrômero e a banda positiva 2 q 2 1 e a região número 2 se prolonga desta

banda à extremidade distal do cromossomo.

Bandas da região q 1

a) 2 q 1 1 - negativa, longa e ocupa a região adjacente ao centrômero.

Bandas da região q 2

a) 2 q 2 1 - positiva, bem definida e localizada próxima a extremidade do braço cromossômico.

b) 2 q 2 2 - negativa, curta e colocada junto a extremidade distal do cromossomo.

Par cromossômico nº 3

(p) - Os braços curtos dos cromossomos que constituem esse par, contem uma região que se estende do centrômero à extremidade final do cromossomo.

Bandas da região p 1

a) Esta região não apresenta formação de bandas G,

(q) - Os braços longos dos cromossomos deste par foram divididos em duas regiões (1 e 2). A região número 1 se prolonga do centrômero à banda positiva 3 q 2 1 e a região número 2 se estende desta à extremidade distal do braço cromossômico.

Bandas da região q 1

a) 3 q 1 1 - positiva, curta e ocupa a região adjacente ao centrômero.

- b) 3 q 1 2 - negativa, de comprimento médio e ocupa a porção quase mediana do braço cromossômico.

Bandas da região q 2

- a) 3 q 2 1 - positiva, bem definida e colocada na região mediana do braço longo do cromossomo.  
b) 3 q 2 2 - negativa e curta.  
c) 3 q 2 3 - positiva, bem definida, longa e localizada na extremidade distal do braço cromossômico.

Par cromossômico nº 4

- (p) - Os braços curtos dos cromossomos que formam esse par contem uma só região.

Bandas da região p 1

- a) 4 p 1 1 - positiva e ocupa a região centromérica  
b) 4 p 1 2 - negativa e se prolonga da região do centrômero até a extremidade distal dos braços cromossômicos.

- (q) - Os braços longos dos cromossomos desse par possuem uma só região.

Bandas da região q 1

- a) 4 q 1 1 - positiva e localizada na região centromérica  
b) 4 q 1 2 - negativa e se localiza na região compreendida entre o centrômero e a extremidade

distal do braço cromossômico.

Par cromossômico nº 5

(p) - Os braços curtos dos cromossomos desse par contem uma região que se prolonga da região centromérica à extremidade distal dos braços cromossômicos, mantendo-se não corada.

Bandas da região p 1

- a) 5 p 1 1 - positiva e localizada na região centromérica
- b) 5 p 1 2 - negativa e ocupa todo o braço curto do cromossomo.

(q) - Os braços longos dos cromossomos que formam esse par foram divididos em duas regiões (1 e 2). A de número 1 se estende da região centromérica à banda positiva 5 q 2 1 e a número 2, desta à extremidade distal do cromossomo.

Bandas da região q 1

- a) 5 q 1 1 - positiva, bem definida e ocupa a região do centrômero
- b) 5 q 1 2 - negativa, bem definida e longa.

Bandas da região q 2

- a) 5 q 2 1 - positiva, bem definida e de comprimento médio
- b) 5 q 2 2 - negativa, longa e se prolonga até a extremidade distal do braço cromossômico.

Par cromossômico nº 6

(p) - Os braços curtos dos cromossomos que constituem esse par apresentam duas regiões ( 1 e 2). A região número 1 fica compreendida entre o centrômero e a banda negativa 6 p 2 1 e a de número 2 se prolonga desta à extremidade do cromossomo.

Bandas da região p 1

- a) 6 p 1 1 - negativa, curta e adjacente ao centrômero.
- b) 6 p 1 2 - positiva, bem definida

Bandas da região p 2

- a) 6 p 2 1 - negativa, curta e pouco nítida
- b) 6 p 2 2 - positiva, curta, nítida e localizada na extremidade distal do braço cromossômico.

(q) - Os braços longos dos cromossomos do par nº 6 possuem uma região.

Bandas da região q 1

- a) 6 q 1 1 - positiva, curta e localizada na região centromérica
- b) 6 q 1 2 - negativa, longa, bem definida e se prolonga da região adjacente ao centrômero até a extremidade distal do braço cromossômico.

Par cromossômico nº 7

(p) - Os braços curtos dos cromossomos que constituem este par foram divididos em duas regiões (1 e 2). A região

número 1 fica compreendida entre o centrômero e a banda positiva 7 p 2 1 e a número 2 se prolonga desta à extremidade distal do cromossomo.

Bandas da região p 1

a) 7 p 1 1 - negativa, longa, distinta e localizada na região adjacente ao centrômero.

Bandas da região p 2

a) 7 p 2 1 - positiva, curta e localizada na região mediana do braço cromossômico

b) 7 p 2 2 - negativa, de comprimento médio e ocupa a extremidade distal do braço cromossômico.

(q) - Os braços longos dos cromossomos que constituem o par nº 7, foram divididos em duas regiões (1 e 2). A região 1 fica limitada pelo centrômero e pela banda negativa 7 q 2 1 e a região número 2 se prolonga desta à extremidade distal do cromossomo.

Bandas da região q 1

a) 7 q 1 1 - positiva, bem definida e localizada na área adjacente ao centrômero

Bandas da região q 2

a) 7 q 2 1 - negativa, longa e bem definida

b) 7 q 2 2 - positiva, curta e ocupa a extremidade final do cromossomo.

Par cromossômico nº 8

(p) - Os braços curtos dos cromossomos que constituem este par contem uma região.

Bandas da região p 1

- a) 8 p 1 1 - positiva, bem definida, localizada na região adjacente à centromérica
- b) 8 p 1 2 - negativa, de comprimento médio, bem definida e localizada na extremidade distal do braço cromossômico.

(q) - Os braços longos dos cromossomos que constituem este par, mostram uma região.

Bandas da região q 1

- a) 8 q 1 1 - positiva, bem definida seguindo-se à região centromérica.
- b) 8 q 1 2 - negativa, bem definida, longa e estende-se até a extremidade final do cromossomo.

Par cromossômico nº 9

(q) - Os braços longos dos cromossomos que formam este par apresentam uma região.

Bandas da região q 1

- a) 9 q 1 1 - positiva, bem definida, longa e ocupa a região centromérica.
- b) 9 q 1 2 - negativa, longa, bem definida e localiza-se na extremidade distal do cromossomo.

Na tabela X é apresentado um resumo do número de bandas G dos cromossomos da espécie N. quadrifasciata anthidioides.

TABELA X

Número de bandas G dos cromossomos da N. quadrifasciata anthidioides

Nº do cromossomo	Braços cromossômicos	Nº de regiões	Nº de bandas positivas	Nº de bandas negativas
1	curto	2	1	2
	longo	2	1	1
2	curto	1	1	1
	longo	2	1	2
3	curto	1	indistinto	indistinto
	longo	2	3	2
4	curto	1	1	1
	longo	1	1	1
5	curto	1	1	1
	longo	2	2	2
6	curto	2	2	2
	longo	1	1	1
7	curto	2	1	2
	longo	2	2	1
8	curto	1	1	1
	longo	1	1	1
9	longo	1	1	1

3.7 - Porcentagem de ovos postos por rainha e por operária e cálculo da População Geneticamente Ativa

Através dos mapeamentos feitos em M. quadrifasciata anthidioides, anotamos também as posturas feitas por operárias. Isso nos levou a investigar qual a contribuição dessas operárias poedeiras na População Geneticamente Ativa.

Observamos, no período de agosto a setembro que, de 36 posturas observadas, 32 ovos foram postos pela rainha (26 desenvolveram-se em fêmeas e 6 em machos) e, 4 foram postos por operárias (todos se desenvolveram em machos). Portanto, 60% dos machos obtidos foram filhos da rainha e 40% filhos de operárias, neste período de observação, nesta colônia.

Supondo a área de reprodução de M. quadrifasciata anthidioides igual a de M. rufiventris rufiventris, que achamos ser cerca de 1000 m (houve troca de rainha na colônia de M. rufiventris rufiventris, e a colônia mais próxima dessa espécie se encontra a uma distância de 1000 m), e, tendo o dado de Kerr (1951), que encontrou 4,5 colmeias por 1000 m<sup>2</sup>, teremos 1413,72 colmeias numa área de reprodução densamente povoada. Sabe-se que uma rainha de M. quadrifasciata anthidioides é fecundada por um só macho (Kerr e Krause, 1950; Kerr e col., 1962; Kerr e Nielsen, 1966).

Pela fórmula  $N = \frac{9 N_f N_m}{2(N_m + N_f)}$ , onde  $N_f = n^2$  de fêmeas e  $N_m = n^2$  de machos, podemos calcular o número efetivo da população ou população geneticamente ativa. (Kerr, 1967).

A rainha neste período analisado, pôs ovos que deram 100% das fêmeas e 60% dos machos; 40% dos machos foram provenientes de ovos de operárias. Logo a rainha pôs 80% dos ovos da população geneticamente ativa e as operárias 20%. Portanto,  $N_f = (4 \cdot 0,20 + 1 \cdot 0,80) 1413,72 = 2261,95$ .

$$N_m = 1413,72$$

$$N = \frac{9 \cdot 2261,95 \cdot 1413,72}{2(2 \times 1413,72 + 2261,95)} = 2827,44$$

Se a M. quadrifasciata anthidioides não tivesse sistema de operárias poedeiras (que são mães de 40% dos machos), sua população efetiva seria:

$$N = \frac{9 \times 1413,72 \times 1413,72}{2(2 \times 1413,72 + 1413,72)} = 2120,58$$

O fato de existirem operárias poedeiras em M. quadrifasciata anthidioides, fez com que sua população geneticamente ativa se elevasse de 33%.

### 3.8 - Sequência de Nascimento de Rainhas e Operárias

Nos três favos de uma colônia de M. quadrifasciata anthidioides, que foram mapeados para a realização deste trabalho, obtivemos, de um total de 308 indivíduos, 27 rainhas, 144 operárias e 137 machos.

Na tabela XI mostramos a sequência em que apareceram as

rainhas e operárias, subdividida em 5 grupos. O primeiro grupo corresponde às primeiras 34 posturas, e assim sucessivamente.

TABELA XI

Sequência de aparecimento de rainhas e operárias resultantes de lotes sucessivos de 34 posturas (num total de 171) e relação com a proporção esperada entre castas nesta colônia de M. quadrifasciata anthidioides

OPERÁRIA		RAINHA		$\chi^2$		
Obs.	Esp.	Obs.	Esp.	Posturas	Operária	Rainha
25	28,63	9	5,37	34	0,46	2,45
29	28,63	5	5,37	34	0,00	0,03
30	28,63	4	5,37	34	0,07	0,35
30	28,63	4	5,37	34	0,07	0,35
30	29,48	5	5,52	35	0,01	0,05
144	144,00	27	27,00	171	$\chi^2$ total = 3,84 P = 0,43 não significante ao nível de 5%. ( $\chi^2 = 9,5$ ; nf = 4)	

Executando um teste de contingência ( $\chi^2 = 9,5$ ), podemos ver que as rainhas e operárias aparecem ao acaso, não havendo aglomeração ou posição preferencial de células reais.

As células de onde nascem rainhas são exatamente iguais às células de onde nascem operárias (Kerr, 1948).

#### 4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

##### 4.1 - Idade, peso, segregação e nascimento das fêmeas de M. quadrifasciata anthidioides e M. rufiventris rufiventris

Kerr e col. (1966) relatam que, o peso da pupa de olho branco (logo no primeiro dia de pupação), indica a quantidade total de alimento ingerido na fase larval. Afirnam que não se consegue obter rainhas pesando menos que 72 mg, e que acima de 84 mg, o máximo de rainhas que se obtém é 25%, indicando uma segregação genética 3:1, dando apoio à hipótese de Kerr (1948) de que as rainhas são duplo heterozigotas ( $xa^1/xa^2$ ,  $xb^1/xb^2$ ) e as operárias são homozigotas para qualquer dos genes ou para ambos ( $xa^1xa^1$ ;  $xb^1xb^2$ ,  $xa^1xa^2$ ;  $xb^1xb^1$  ou  $xa^1/xa^1$ ,  $xb^1/xb^1$ ). Em nossas observações, na espécie M. quadrifasciata anthidioides, a rainha na fase de pupa de olho branco, mais leve, pesava 84,7 mg, e a mais pesada 96,2 mg; a operária mais pesada nesta mesma fase, pesava 110,6 mg havendo 3 com peso superior a 100 mg. Obtivemos uma pupa de rainha de olho preto e corpo branco, com 69,4 mg. Estes dados, assemelham-se aos de Kerr e col. (1966), onde a rainha de olho branco, mais leve, pesava 80 mg, a mais pesada, 105 mg, a operária mais pesada, 107 mg e havendo 4 com peso superior a 100 mg. Em nossa amostra, obtivemos duas rainhas, quase nascidas, que pesaram 70 e 55,9 mg. A frequência maior, tanto para rainhas como para operárias, está entre 85 e 90 mg (Fig. 1), e os machos, entre 80 e 85

mg. Para as operárias de M. rufiventris rufiventris, as frequências maiores estão entre 75 e 85 mg (Fig. 2), o que não aconteceu com as operárias de M. quadrifasciata anthidioides.

Obtivemos, para a espécie M. quadrifasciata anthidioides (a colônia de M. rufiventris rufiventris apresentou pouca produção de rainhas), uma produção de 15,79% de rainhas, devendo estar influenciando outro fator ambiental, já que nossos dados quanto ao peso, estão de acordo com os de Kerr e col. (1966). Esse fator, possivelmente, tenha sido as épocas em que foi estudada a colônia (2 períodos do ano), pois em uma prévia verificação da segregação, quando além da alimentação natural, colocávamos xarope enriquecido com vitaminas, proteínas e sais minerais, a segregação foi de 3:1. Mesmo assim, com um período de alimentação reforçada e um de alimentação natural, obtivemos 15,79% de rainhas.

As rainhas de M. quadrifasciata anthidioides, durante o seu desenvolvimento, perdem peso mais rapidamente que as operárias, e os machos perdem peso mais rapidamente que as fêmeas. As operárias de M. rufiventris rufiventris parecem apresentar a mesma variação em peso que as operárias de M. quadrifasciata anthidioides. Estas últimas, durante o desenvolvimento de pupa pesam, em média, 10 mg a mais que as primeiras. Nossos resultados confirmam os de Kerr e col. (1966), quanto ao peso das rainhas e operárias em estágios distintos de desenvolvimento e quanto à perda de peso à medida que estas se tornam adultas. Vimos também que os ma

chos perdem peso mais rapidamente que as fêmeas. Podemos inferir que as operárias de M. rufiventris rufiventris, durante o seu desenvolvimento, apresentam a mesma variação em peso que as operárias de M. quadrifasciata anthidioides.

As operárias das duas espécies citadas, parecem ter o mesmo tempo para o desenvolvimento de pupa (mais ou menos 19 dias); pelos nossos dados, as operárias de M. rufiventris rufiventris atingem o estágio de pupa em média 7,6 dias depois que as operárias de M. quadrifasciata anthidioides e o estágio de adulto em média 8,3 dias depois.

Kerr (1948), estudando o gênero Melipona, mostrou que células de onde nascem rainhas são do mesmo tamanho que as células de onde nascem operárias. Pelos nossos dados do Quadro I à página 64, com os quais realizamos um teste de contingência ( $X^2$ ), vimos que as 171 fêmeas (144 operárias e 27 rainhas) nasceram ao acaso; as células de onde elas saíram eram todas iguais. Estes dados confirmam as afirmações de Kerr (1948), que demonstrou que a posição das células de onde nascem rainhas é ao acaso e que se fosse a alimentação de uma célula específica o método de determinação de castas em Melipona, deveria haver, como em Apis e Trigona, aglomerações ou posição preferencial de células reais.

#### 4.2 - Desenvolvimento morfológico do ovário e número de células em divisão nos diversos estágios de pupa

As cinco espécies com que trabalhamos possuem 4 ovario-

los nas duas castas (Kerr, 1948, 1966; Sakagami e col., 1963). Desde o momento em que a larva entra no estágio de pré-pupa, já observamos os 4 ovariolos fortemente unidos em cada ovário, e os 2 ovários também aderidos um ao outro sobre o ventrículo. Esses 4 ovariolos, desde essa fase, são facilmente distinguíveis até a fase adulta.

Ao contrário do gênero Melipona e dos meliponídeos de um modo geral, o gênero Apis, apresenta uma grande variabilidade no número de ovariolos, no seu comprimento e na produção final de um ovo com quantidades diferentes de vitelo (Kerr, 1948; Kerr, in formação pessoal). Nas rainhas de Apis mellifera, existem de 160 a 180 ovariolos (Snodgrass, 1956) e, nas operárias, de 2 a 12 finos ovariolos (Meier, 1916, in Snodgrass, 1956); cerca de 13% das operárias possuem uma média de 4 a 8 ovariolos (Hess, 1942, in Kapil, 1962). As rainhas de Apis mellifera adansonii, possuem de 140 a 150 ovariolos (Socsek, 1965; Woike, 1967). Em Apis indica, os ovariolos de operárias variam de 3 a 30 (Sakagami e Akahira, 1958) e, nas rainhas, cada ovário é constituído de 73 ovariolos (Kapil, 1962). Os ovários das operárias da maioria dos meliponídeos são distintamente maiores que os das operárias de Apis, mesmo quando em estágios rudimentares (Sakagami e col., 1963).

Durante os estágios de pupa, o desenvolvimento dos ovários das rainhas e operárias apresentou o mesmo padrão entre as espécies estudadas (Figs. 3 e 4, páginas 19 e 20). Uma primeira

modificação, ocorreu quando as fêmeas, do estágio de pupa de olho branco, passaram para o estágio de pupa de olho rosa. Aí, nas duas castas, houve separação dos ovários e encurtamento simultâneo dos ovidutos. Nas rainhas houve um aumento considerável no comprimento dos ovaríolos que iniciaram um certo enrolamento nas suas extremidades. Nas operárias, o tamanho dos ovaríolos permaneceu mais ou menos constante em todo o decorrer dos estágios de pupa, aumentando um pouco quando no estágio de pupa de olho marrom.

A segunda mudança no aspecto do ovário, se dá do estágio de pupa de olho rosa para pupa de olho marrom. Aí, os ovários se apresentam como ovários adultos, porém em tamanhos menores.

Das cinco espécies estudadas, a M. quadrifasciata anthidioides foi a que apresentou, nas duas castas, os ovários maiores. As rainhas de M. rufiventris rufiventris, S. postica e P.(P.) droryana, no início da fase adulta apresentaram os ovários do mesmo tamanho, sendo estes bem menores que os da rainha de M. quadrifasciata anthidioides. As operárias de M. quadrifasciata anthidioides e M. rufiventris rufiventris, no início da fase adulta, apresentaram seus ovários bastante semelhantes e eram bem maiores que os das operárias de S. postica e P.(P.) droryana, nesta mesma fase.

Convém ressaltar aqui, que no final do nosso trabalho, incluímos em nosso material, operárias da espécie Frieseomelitta varia (estudada por Terada, 1974). O fato de não termos colocado

os esquemas dos ovários dessa espécie, foi devido ao pouco desenvolvimento ovariano que ela apresenta, tornando-se difícil a sua manipulação. Mesmo assim, apesar dos ovários se apresentarem, em todo o desenvolvimento de pupa até adulto, como estruturas rudimentares muito pequenas, o seu padrão de desenvolvimento se assemelhou muito aos ilustrados na Fig. 4 à página 20.

Concluindo, o padrão de desenvolvimento do ovário, apresentado pelas cinco espécies estudadas foi muito semelhante. Uma exceção foi a espécie P. (P.) droryana que, pelos nossos dados, parece apresentar um desenvolvimento retardado em relação às outras espécies, principalmente nos primeiros estágios de pupa. É como se o ovário aguardasse terminar a prófase meiótica para completar-se.

Em M. quadrifasciata anthidioides (Fig. 5 à página 29), muito possivelmente a divisão começa na fase de pré-pupa muito jovem, pois em olho branco, mais ou menos 40% das células estão em leptonema. Isto significa que antes da fase de olho branco já existiam metáfases. Em olho branco, encontramos o maior número de metáfases. As células somáticas não indicam necessariamente células germinativas podendo também indicar células alimentares. Não sabemos explicar porque depois de ter havido um pico em olho branco, há novo pico na fase de olho preto.

Em S. postica (Fig. 7 à página 31), o mesmo fenômeno é observado; todavia parece que a fase de leptonema é mais demorada.

já que a de metáfase somática cai bruscamente, e tanto leptone-  
ma como zigonema se mantêm em nível alto.

A espécie P. (P.) droryana (Fig. 8 à pág. 32), apresen-  
tou nas suas metáfases somáticas, o seguinte: vai caindo até olho  
marrom e sobe em frequência até adulto não emergido. Podemos indi-  
car com segurança que as metáfases somáticas após olho preto são  
na maioria de células alimentares e possivelmente nenhuma seja cé-  
lula meiótica.

Tanto a frequência de células somáticas como a frequên-  
cia de leptonema e zigonema são mais atrasadas em M. rufiventris  
rufiventris do que em M. quadrifasciata anthidioides, ou seja, o  
pico de M. quadrifasciata anthidioides (Fig. 5 à página 29) se dá  
no início de olho branco enquanto que o da M. rufiventris rufi-  
ventris (Fig. 6 à página 30), se dá em olho rosa. Não ocorre em  
M. rufiventris rufiventris o segundo pico de zigonemas e paquine-  
mas que se observa em M. quadrifasciata anthidioides.

Para M. quadrifasciata anthidioides, de pupa de olho  
branco até adulto não emergido, o número de células do ovário que  
diretamente estavam ou podiam estar envolyidos com o processo da  
meiose cai de uma média de 189 em pupa de olho branco para 30 em  
adulto não emergido. O pico de 101 em pupa de olho preto não é  
muito significativo pois a distância em dias entre pupa de olho  
branco e pupa de olho preto é apenas de 7.

Para M. rufiventris rufiventris confirma-se o verifica-

do nos gráficos que o pico de maior proliferação celular de células relacionadas com o processo meiótico ocorre em olho rosa quando temos uma média de 271 células por operária diminuindo até o adulto não emergido quando temos apenas 22 células em média por operária.

Em S. postica a fase também de maior proliferação se dá de pupa de olho branco a pupa de olho marrom, sendo que o pico é em olho marrom com uma média de 173 células por operária e cai drasticamente para o adulto prestes a emergir quando tem 6,4 células meióticas por inseto.

A espécie P. (P.) droryana foi a única em que aconteceu um fato para o qual ainda não existe explicação; o máximo de proliferação das células meióticas se dá em pupa de olho branco com uma média de 163 células meióticas por inseto. Este cai drasticamente até pupa de olho preto onde temos apenas 1,8 células por operária e daí sobe novamente até adulto não emergido com uma média de 15 células por ovário.

Nas várias lâminas examinadas, da espécie F. varia, nenhum oócito foi encontrado e nem mesmo metáfases somáticas. Estes achados estão de acordo com o trabalho de Terada (1974), que não encontrou desenvolvimento do ovário em operárias de colônias normais desta espécie.

Tarelho (1973) mostrou que, para os machos das espécies M. quadrifasciata anthidioides, M. rufiventris rufiventris, S. pos-

tica e P.(P.) droryana, as divisões meióticas ocorriam quando as pupas estavam nas fases de olho branco, olho rosa e olho marrom. Possivelmente a secreção de substâncias que provoca a entrada dos óócitos na divisão meiótica seja a mesma que atua nos machos.

A grande quantidade de células em metáfase encontrada nos primeiros estágios de pupa deve ser também responsável pelo aumento dos ovários.

#### 4.3 - Estudo citológico

##### 4.3.1 - Meiose

Em todos os casos de estudos da meiose nas fêmeas, foram observadas diferenças claras e importantes quando comparadas com a meiose nos respectivos machos (John & Lewis, 1965). Além da quantidade de espermatócitos ser muito maior que a quantidade de óócitos, a presença de grande número de células nutritivas circundando os óócitos, faz com que as técnicas de estudo nas fêmeas tornem-se mais difíceis, principalmente pelo método de esmagamento (John & Lewis, 1965).

O fato de que nas fêmeas a meiose só se completa depois do ovo ser posto, não nos permitiu elucidar o comportamento cromossômico durante toda a oogênese. Logo depois da ovulação, o óócito é um típico óócito I (Bonhag, 1958). Segundo John & Lewis (1965), a condição comum em todos os insetos é a de que o óócito, na ocasião de ser posto, esteja em metáfase da primeira divisão

meiótica, depois de uma perda de visualização dos cromossomos no fim de paquinema. Nas abelhas, o ovo é posto no estágio de diplomema (Snodgrass, 1956; Cruz Landim, 1966). Em nossas preparações encontramos células em diacinese típica.

Embora encontramos na literatura muitos estudos sobre a meiose em várias ordens de insetos, não foi encontrado nenhum trabalho completo em fêmeas de abelhas. Nossas lâminas, preparadas com esmagamento do ovário de pupas, nos deu excelentes informações sobre o processo da meiose durante a prófase I.

Nos machos a meiose foi estudada por Kerr (1972a,b), Tarelho (1973) e Kerr e Silveira (1974).

Greel (1965), estudando a meiose em Drosophila melanogaster, levantou a hipótese de que nas fêmeas os cromossomos se paream duas vezes durante a oogênese. Não observamos nenhum pareamento em estágios pré-meióticos. Em Melanoplus femur-rubrum, Church (1972) não observou nenhum pareamento entre homólogos e nem formações de quiasmas, considerando que a sinapse e o crossing-over deva ter ocorrido no estágio pré-leptóteno, logo depois do início da espiralização.

A visualização clara de pareamento entre os homólogos se dá no estágio de zigonema e é iniciado em qualquer ponto do cromossomo. Uma observação feita por Southern (1967), em Metrioptera brachyptera, foi que o pareamento entre os homólogos começa terminalmente no leptonema e, no zigonema já está completo.

As estruturas heterocromáticas observadas nos núcleos pré-leptótenos das espécies M. quadrifasciata anthidioides, S. postica e P.(P.) droryana, interpretamos como sendo um início de pareamento entre os cromossomos não homólogos. Esta mesma interpretação foi dada por Ohno e col. (1963) e Ohno e Smith (1964). Conforme os cromossomos vão se tornando mais evidentes, essa região heterocromática, cromocentro, formada também por heterocromatina pericentromérica (Dupraw, 1972), se mostra em forma de "bouquet", o que é visto somente nas espécies M. quadrifasciata anthidioides e P.(P.) droryana. Figuras de "bouquet" são comuns na meiose da maioria das espécies (Swanson, 1957, Shaw, 1970). O cromocentro, formado por regiões heterocromáticas de cada cromossomo às vezes aparece como aglomerações amorfas nas quais os seus componentes não são identificáveis (Brown, 1966). Smith (1969), em Chilocorus orbus, concluiu que o principal responsável pela formação do cromocentro era a fusão dos micronucléolos múltiplos e a manutenção dele, associada com os braços heterocromáticos. Não observamos nenhuma estrutura semelhante aos micronucléolos. Portanto, nas abelhas, pelas nossas observações, concluimos que as regiões heterocromáticas dos cromossomos são as responsáveis pela formação do cromocentro.

Um fato foi observado nos estágios seguintes, quando alguns cromossomos não homólogos permanecem ligados inespecificamente. Southern (1967), observou no paquinema, associações não homó-

logas entre regiões heterocromáticas. Um pareamento de regiões não homólogas também no paquinema foi observado por Newman (1967) e o autor sugere que isto seja devido a translocações. White (1961) foi o primeiro a dizer que todo o caso de múltipla associação po de ser devido a translocações. As nossas observações de pareamento inespecífico no início de paquinema, interpretamos como sendo alguns cromossomos que tardaram em se separar depois da regressão do cromocentro.

Tarelho (1973), observou também um forte pareamento secundário em P.(P.) droryana, já descrito por Kerr (1952, 1972a); em seu trabalho observou o mesmo em P.(F.) schrottkyi. Segundo Kerr (1972a) e Kerr e Silveira (1972), estas espécies são poliploides e cada cromossomo em duplicata se comporta na meiose do macho, como homólogo, permanecendo em pareamento. Tarelho (1973) diz que embora estas conclusões acima mereçam restrições, observou em algumas espécies com  $n=15$  e  $n=17$ , 3 cromossomos pareados no fim da prófase, um maior com dois menores. Em P.(P.) droryana, observou no fim da prófase, 9 grupos de dois cromossomos cada, com forte pareamento secundário. Nos nossos achados, observamos também em diacinese, pareamentos secundários entre os bivalentes. Em M. rufiventris rufiventris por exemplo, encontramos 2 grupos de 2 bivalentes aderidos, cada grupo, a uma estrutura semelhante a nucléolo. Em poucas células somente um grupo de dois cromossomos bivalentes é visto aderido a esta estrutura.

Ferguson-Smith (1964), mostrou no paquinema da meiose humana, que o nucléolo principal está associado com os cromômeros terminais de certos bivalentes. Ele sugere que estes bivalentes são os cinco pares de cromossomos satelitados do idiograma mitótico humano. Apesar de na espécie M. rufiventris rufiventris termos encontrado, geralmente, em diacinese, duas estruturas semelhantes a nucléolos, observamos nos cromossomos metafásicos somente um par cromossômico com satélites visíveis. Não pudemos relacionar o número de nucléolos com o número de cromossomos satelitados, na espécie M. rufiventris rufiventris, onde encontramos um par cromossômico com satélites e observamos, como já descrito, duas estruturas semelhantes a nucléolos ligadas cada uma a dois bivalentes.

Na espécie M. quadrifasciata anthidioides, foi observado um grande nucléolo associado a um ou a dois cromossomos no paquinema. A região da constrição secundária no braço curto de cromossomo do par número 1, sugerimos que seja a principal responsável pela formação deste nucléolo. A possível associação de outros cromossomos, talvez tenha sido casual.

Narang e col. observaram que o nucléolo desaparece durante o fim de paquinema ou em diplonema. Observamos nucléolos, claramente, até paquinema e em diacinese algumas estruturas semelhantes a eles.

Com a técnica de esmagamento não foi possível determinar a posição do nucléolo no núcleo. Estudos feitos em cortes his

tológicos, na espécie humana, revelaram que a posição do nucléolo era variável, apresentando-se às vezes central e mais frequentemente periférica (Luciani, 1970).

Segundo John & Lewis (1965), nas fêmeas dos insetos, no fim do estágio paquíteno, os cromossomos atingem a forma plumulosa mais extrema das observadas em vários organismos. Os autores afirmam que há uma completa perda de visualização dos cromossomos até a organização da primeira placa metafásica, pouco antes do ovo ser botado. Em nossas observações, os cromossomos se mantiveram visualizáveis durante toda prófase I da meiose; somente em paquinema foram vistos cromossomos com aspecto plumuloso.

A presença de figuras de quiasmas, em número relativamente elevado, sugere que nas espécies estudadas ocorre permutação gênica.

Não encontramos diferenças entre os oócitos de operárias e de rainhas, com o uso da técnica de esmagamento.

#### 4.3.2 - Cariótipos e formação de bandas-G

Estudando a meiose, foram encontradas muitas células em metáfase. Conforme a preparação da lâmina, foi verificado que essas células se encontravam na parte terminal dos ovaríolos (germarium), o que sugeria serem células germinativas primordiais (Sakagami e col., 1963). Em outras preparações, entretanto, os ovaríolos eram totalmente destruídos, e estas células eram encontradas

em toda a lâmina. Isto dificultou a identificação das mesmas e a dúvida permaneceu entre se eram oogônias ou células nutritivas em divisão.

Os cariótipos foram montados, sem a preocupação da localização da metáfase no ovariolo.

A vantagem da cariotipagem de fêmeas de organismos haplo-diplóides, está na possibilidade que estas oferecem de pareamento de homólogos, o que não acontece com os machos que apresentam somente um cromossomo de cada par.

M. quadrifasciata anthidioides (Fig. 12, página 42).

A contagem do número de cromossomos para esta espécie ( $2n = 18$ ), foi feita por Kerr (1948). O número fundamental de braços cromossômicos (NF), pela nossa classificação, foi de 34.

Nossos dados não concordam com os de Tarelho (1973), que encontrou, para esta espécie, 7 cromossomos metacêntricos e dois acrocêntricos. Pela nossa classificação (Tabela VII, pág. 44), os cromossomos dessa espécie se apresentam como 2 pares "submetacêntricos" (pares 1 e 2 - centrômeros em posição sub-mediana), 5 pares "sub-telocêntricos" (pares 3, 4, 5, 6, 7 - com centrômeros em posição sub-terminal), 1 par metacêntrico (par 8 - centrômero em posição quase mediana) e 1 par acrocêntrico (par 9 - com centrômero terminal).

Foi encontrado nesta espécie um cromossomo marcador no par nº 1. Este cromossomo se apresentou em todas as metáfases de

cerca de 20 operárias, todas da mesma colméia, com uma grande constricção secundária em seu braço curto. Nossa interpretação provisória é que as operárias desta colméia sejam heterozigotas para este dimorfismo. Na meiose, entretanto, nada foi constatado em relação a esse cromossomo.

M. rufiventris rufiventris (Fig. 13, pág. 45)

A contagem do número de cromossomos desta espécie foi feita primeiramente por Kerr. (1952) que encontrou 18 cromossomos em células somáticas. O número fundamental de braços cromossômicos (NF), pela nossa classificação, foi de 34, como para a espécie anterior.

A classificação dos cromossomos da M. rufiventris rufiventris pode ser vista na tabela VIII à pág. 46. O cariótipo desta espécie é muito semelhante ao da M. quadrifasciata anthidioides, com algumas variações quanto à posição do centrômero. Na tabela XIII (pág. 80) podemos ver as semelhanças entre as duas espécies.

Pela nossa classificação, baseados na de Levan (1964), os dois cariótipos apresentam semelhança, quanto à posição do centrômero, entre os pares 1, 4, 6 e 9. As duas espécies possuem 8 pares cromossômicos atelocêntricos e 1 par telocêntrico. As grandes diferenças encontradas nos cariótipos dessas duas espécies foram quanto ao cromossomo do par nº 1 da M. quadrifasciata anthidioides, que apresentou uma constricção secundária grande nos bra

TABELA XIII

Comparação entre os cariótipos das espécies M. quadrifasciata anthidioides e M. rufiventris rufiventris, quanto à posição do centrômero (segundo Levan, 1964). Os pares cromossômicos marcados com um § são os concordantes quanto à posição do centrômero

Pares cromossômicos Nºs	Posição do Centrômero		Designação cromossômica	
	<u>M. quadrifasciata anthidioides</u>	<u>M. rufiventris rufiventris</u>	Mqa	Mrr
§ 1	sub-mediana	sub-mediana	sm	sm
2	sub-mediana	sub-terminal	sm	st
3	sub-terminal	sub-mediana	st	sm
§ 4	sub-terminal	sub-terminal	st	st
5	sub-terminal	sub-mediana	st	sm
§ 6	sub-terminal	sub-terminal	st	st
7	sub-terminal	sub-mediana	st	sm
8	"quase"mediana	"quase"mediana	m	sm
§ 9	terminal	terminal	t	t

ços curtos, e quanto aos satélites nos braços curtos do par nº 7 da M. rufiventris rufiventris.

O cariótipo proposto por Tarelho (1973), difere do proposto neste trabalho, pois no macho, a autora classificou 5 cromossomos de metacêntricos, 1 de acrocêntrico e 3 de telocêntricos. Tarelho (1973) também encontrou, nesta espécie, um cromossomo classificado como nº 3, com satélites nos braços curtos.

S. postica (Fig. 14, pág. 47)

O número de cromossomos para esta espécie foi determinado em 1971 por Silveira e Kerr (Kerr & Silveira, 1972), e consta de 17 pares. Pela nossa classificação, achamos o valor de 54 para o NF. Para esta espécie foi possível fazermos uma classificação em grupos (Tabela IX, pág. 50), devido ao fato dos cromossomos apresentarem tamanhos bem diversos. O cariótipo que apresentamos é constituído de 5 grupos ( Fig. 14 , pág. 48 ). Nossa classificação, discorda das duas propostas por Tarelho (1973), em machos de origens diferentes - Aragarças (GO) e Piracicaba (SP), que apresentam, respectivamente, 16 acrocêntricos e 1 metacêntrico, e 8 metacêntricos, 1 sub-metacêntrico e 8 acrocêntricos.

Esta diversificação entre nossos dados e os de Tarelho (1973), é explicada por Kerr (1960), para a espécie S. postica. Kerr diz que, diferenças nos cariótipos desta espécie poderá ser devido ao sistema de comunicação que elas apresentam e que é por trilha de cheiro. A distância entre dois odores é em torno de 1 a 2 metros, o que isolaria geograficamente, por um rio que tivesse mais de 2 metros de largura, colônias bem próximas. Concordamos então com Tarelho (1973) que, baseado em seus achados, explica que tais variações inter-específicas seriam adaptações a regiões geográficas diferentes.

Crozier (1969), estudando formigas da espécie Iridomyrmex detectus de regiões geográficas diferentes, observou varia-

ções nas posições dos centrômeros e definiu como sendo uma diferenciação inter-populacional e não um polimorfismo verdadeiro.

Crozier (1970) considera, como polimorfismo real, seus achados na formiga Tapinoma sessile ( $2n = 16$ ) onde os machos apresentaram três variações quanto à posição do centrômero para o cromossomo nº 8 (a - acrocêntrico, sa - sub-acrocêntrico e m - metacêntrico). As fêmeas apresentaram cariótipos a/m (heterozigota), sa/sa (homozigota) e m/m (homozigota). Das 6 colônias estudadas, 5 eram originadas de uma mesma região geográfica. Baseado nestes dados, sugerimos que, a nossa colônia de M. quadrifasciata anthidioides, apesar de não apresentar variações quanto à posição do centrômero, esteja apresentando um dimorfismo quanto ao par nº 1. Usando a técnica de Scheres (1972) para formação de bandas-G (Figuras 15 e 16), modificada por nós neste trabalho, vimos que, todos os pares cromossômicos nº 1, apresentavam o mesmo padrão de bandeamento nos braços curtos. O que diferenciava cada elemento do par era a constrição secundária.

O fato de todas as fêmeas estarem apresentando "heterozigose" para o par nº 1, significa que a rainha é "homozigota" para qualquer dos dois cromossomos, e o macho, pai das operárias, apresenta o outro componente do par. Sabemos que uma rainha de Melipona é fecundada por um só macho, pelas observações de Kerr e Krause (1950), em M. quadrifasciata anthidioides. Estudos nos machos, filhos dessa rainha, deverão apresentar somente um tipo de

cromossomo nº 1, com ou sem a constrição secundária.

#### 4.4 - População geneticamente ativa

Pelos nossos cálculos da página 63, concluímos que o fato de existirem operárias poedeiras em colônias de meliponídeos, devido a um fator evolutivo, eleva sua população geneticamente ativa. Aos nossos dados, em M. quadrifasciata anthidioides, onde vimos que essa população foi elevada de 33%, existem restrições: a) o pequeno número de observações. Todavia, o fato das operárias desta espécie porém 40% dos ovos (no período de agosto a setembro), está dentro do encontrado por Contel & Kerr (1975, no prelo) para Nelipona subnitida, nesta mesma época do ano; b) A possibilidade de em época de maior número de enxameação ou de vôos nupciais, as operárias terem uma contribuição maior para a população de machos. c) A possibilidade de operárias porém ovos em alvéolos onde a rainha já havia botado, ou seja, machos que achamos serem filhos de rainha e na realidade serem filhos de operárias. Silva (1973), observou em colônias de M. nigra schencki, M. quadrifasciata e M. quadrifasciata anthidioides, posturas de operárias após a postura da rainha. Beig (1972) e Camilo (1971) mostraram, respectivamente, que em S. postica e P.(F.) schrottkyia, a produção de machos é devida, principalmente, a posturas das operárias. Entretanto, estes fatos só ampliariam o valor de Ne (Número efetivo = População geneticamente ativa). Em outra época do ano, de 27

observações, das quais 206 sem a preocupação de observar o fenômeno total da postura e 31 com essa preocupação, nenhuma substituição de ovo de rainha por ovo de operária foi observado. Silva (1973) encontrou 50% de machos filhos de rainha em colônias mistas de P.(F.) schrottkyi (rainha) com Nannotrigona testaceicornis (operárias) e P.(P.) droryana (rainha) com Nannotrigona testaceicornis (operárias).

Concluimos portanto, que mesmo sendo as operárias as principais responsáveis pela produção de machos em uma colônia de meliponídeos, a contribuição da rainha com seus óvulos também ocorre. Esta diversificação de dados encontrados na literatura, deve ser devido a fatores ainda não conhecidos e que poderão ser tanto genéticos como ambientais, ou ambos.

## 5. RESUMO

O presente trabalho visou principalmente o estudo da meiose nas fêmeas de abelhas (Meliponidae). Para conhecermos melhor o comportamento reprodutivo das espécies com que trabalhamos, realizamos estudos adicionais, tais como: estudo quantitativo das células em divisão; mapeamentos de posturas; tabelas de idade e peso; estudo cariotípico e de formação de bandas-G.

Nossas principais conclusões foram as seguintes:

- a) O pareamento entre os homólogos se dá em leptonema-zigonema e é iniciado em qualquer ponto do cromossomo.
- b) Um início de pareamento inespecífico, ocorre no estágio pré-leptóteno, através de uma região heterocromática. Esta região se transforma no cromocentro. Este é evidenciado nas espécies M. quadrifasciata anthidioides e P.(P.) droryana. Depois da regressão do cromocentro, alguns cromossomos permanecem pareados inespecificamente até diacinese.
- c) Os nucléolos são vistos claramente no estágio zigóteno e permanecem até diacinese.
- d) Não houve relação entre número de nucléolos e de cromossomos satelitados na espécie M. rufiventris rufiventris.
- e) O estágio paquíteno apresenta cromossomos, com aspecto plumuloso; deve haver um índice alto de permuta gênica, devido ao

grande número de quiasmas.

- f) O ovo é posto no estágio de diacinese, e não há diferenças entre oócitos de rainha e de operária.
- g) Na espécie N. quadrifasciata anthidioides, foi encontrado um cromossomo marcador do par nº 1. Desde que todas as operárias da colônia examinada, possuíam o par nº 1 com um dos cromossomos com uma grande constrição secundária no braço curto, sugere-se que, o macho que acasalou com a rainha apresentava um tipo de cromossomo, a rainha o outro tipo, e as operárias eram híbridas. Esta constrição poderia ser a organizadora do único nucléolo observado nesta espécie.
- h) Os ovários apresentam, durante o desenvolvimento de pupa, duas mudanças na forma; do estágio de pupa de olho branco para pupa de olho rosa e deste para pupa de olho marrom. A P.(P.) droryana apresenta um desenvolvimento ovariano retardado, em comparação com as outras espécies estudadas.
- i) A meiose deve ser iniciada em pré-pupa, pois no estágio de pupa de olho branco, existe grande número de oócitos em leptoneuma. A espécie S. postica é a que apresenta o estágio leptóteno mais demorado em relação às outras espécies.
- j) Em P.(P.) droryana, as metáfases somáticas que aparecem após o estágio de pupa de olho preto, são na maioria de células alimentares, pois após este estágio não foram observadas células

em leptonema.

- k) É observado um grande número de células em metáfase quando os ovários estão aumentando em tamanho.
- l) De acordo com os nossos dados, as operárias contribuem com 33% para a população geneticamente ativa.
- m) No trabalho é proposto a classificação para os cromossomos das espécies M. quadrifasciata anthidioides, M. rufiventris rufiventris e S. postica. Para a espécie M. quadrifasciata anthidioides a classificação foi também baseada no padrão de formação de bandas-G.
- n) O número fundamental de braços cromossômicos para essas 3 espécies foi determinado como sendo, respectivamente, 34, 34 e 54.

## 6. SUMMARY

The objectives of this work was to obtain data on the meiosis in females of bees (Meliponidae). The following approaches were utilized: quantitative analyses of cells in division in different developmental phases; localization in a "map" of the alveoli with eggs recently laid; record of age and weight; number and banding of chromosomes.

The main conclusions are:

- a) Pairing of homologues, in the interfase leptotene-zigotene, is carried out in any section of the chromosomes.
- b) A kind of inespecific pairing occurs in pre-leptotene stage at heterochromatic regions of the chromosomes. This forms, usually, a chromocenter. This is conspicuous in M. quadrifasciata anthidioides and P.(P.) droryana. After the chromocentric mass become discrete chromosomes some of them maintain the inespecific pairing; some chromosomes become in this circumstance until late diakinesis.
- c) Nucleoli are easily seen from zygotene until diakinesis.
- d) No relation was found between number of nucleoli and number of satellites (in M. rufiventris rufiventris).
- e) Pachitene chromosomes are lumpbrush like; the number of crossing over must be large, since there is quite a number of chias

mata.

- f) Egg is laid in diakinesis, and no difference between worker and queen oocytes was found.
- g) A marker-chromosome was found in M. quadrifasciata anthidioides, namely, chromosome number 1; since all workers of own colony had chromosome 1 and 1' (larger secondary constriction in the short arm), it is suggested that the one drone that inseminated the queen had one type, the queen the other and the workers were hybrids. This constriction could be considered the nucleolus organizer. In this species was observed just one nucleolus.
- h) Ovaries change of shape twice: from white eyed pupa to pink eyed one, and from pink to dark eye. P.(P.) droryana is late in ovary development when compared to the other species used.
- i) Meiosis begun at prepupa, since there are in white eyed pupal stage a great number of oocytes in leptotene. Otherwise, S. postica is the fastest of own set of species.
- j) Somatic metaphases which appear after the black eyed pupal stage are of alimentary cells, since no more oocytes in leptotene are seen (in P.(P.) droryana).
- k) when ovary is enlarging a great number of metaphase cells are seen.
- l) According to own data the workers of M. quadrifasciata anthidioides contribute with 33% to the genetically active popula-

.tion.

- m) A classification for the chromosomes of M. quadrifasciata anthidioides, M. rufiventris rufiventris and S. postica is submitted. For M. quadrifasciata anthidioides the classification was helped with G-banding pattern.
- n) Arm Fundamental Number for the chromosomes of the three species was respectively determined by 34, 34 and 54.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEIG, D. - The production of males in queenright colonies of Trigona (scaptotrigona) postica. J. Apicul. Res. 11(1): 33-39 ,
- BONHAG, P.F. - Ovarian structure and vitellogenesis in insects. Ann. Rev. Ent. 3: 137-160, 1958.
- BRIAN, M.V. - Studies of caste differentiation in Myrmica rubra L.1. The growth of Queens and Males. Insectes Sociaux 1(2): 101-122, 1954.
- BROWN, S.W. - Heterochromatin. Science 151(3709): 417-425, 1966.
- CAMILO, D. - Estudos adicionais sobre os zangões de Trigona (Friesella) schrottkyi (Hym., Apidae). Ciência Cult. suppl. 23:273, 1971.
- CHICAGO CONFERENCE - Standardization in human cytogenetics. Birth defects: Original articles series II:2, 1966. The National Foundation, New York.
- CHURCH, K. - Meiosis in the grasshopper. II. The preleptotene spiral stage during oogenesis and spermatogenesis in Melanoplus femur-rubrum. Can. J. Genet. Cytol. 14: 397-401, 1972
- CONTEL, E.P.B. & Kerr, W. E. - Origin of males in Melipona subnitida estimated from data of an isosymic polymorphic system. Genetica (The Netherlands Journal of Genetics), no prelo, 1975.
- CROZIER, R.H. - Chromosome number polymorphism in an Australian ponerinae ant. Can. J. Genet. Cytol. 11: 33-339, 1969.
- CRUZ-LANDIN, D. da - Alguns dados sobre o desenvolvimento de Melipona (hymenoptera:Apoides). Rev. Bras. Biol. 26(2): 165-174,
- DENVER STUDY GROUP 1960 - A proposed standard system of nomenclature of human mitotic chromosomes. Acta Gen. 10: 322-328, 1960
- DUPRAW, E.J. - Advances in Cell and Molecular Biology. Academic Press, p. 427, 1972.
- FERGUSON-SMITH, M.A. - The sites of nucleolus formation in human pachytene chromosomes. Cytogenetics 3: 124-134, 1964.
- GRELL, R.F. - Chromosome pairing, crossing over and segregation in Drosophila melanogaster. Nat. Cancer Inst. Monogr. 18:215-242, 1965.

- JOHN, B. & LEWIS, K.R. - The meiotic system. Springer-Verlag, wien, 1965, p. 322.
- KAPIL, K.P. - Anatomy and histology of the female reproductive system of Apis indica F. (Hymenoptera: Apidae). Insectes Sociaux 9(2): 145-163, 1962.
- KERR, W.E. - Estudos sobre o gênero Melipona. An. Esc. Sup. Agr. Luiz de Queiroz 5(88): 72-286, 1948.
- KERR, W.E. - Bases para o estudo da genética de populações dos Hymenoptera em geral e dos Apinae sociais em particular. An. Esc. Sup. Agr. Luiz de Queiroz 8(140): 219-354, 1951.
- KERR, W.E. - A variação do número de cromossomos na evolução dos Hymenoptera. Scientia Genetica 4(3): 182-190, 1952.
- KERR, W.E. - Evolution of communication in bees and its role in speciation. Evolution 14(3): 386-387, 1960.
- KERR, W.E. - Multiple alleles and genetic load in bees. J. Apic. Res. 6(2): 61-64, 1967.
- KERR, W.E. - Some aspects of the evolution of social bees (Apidae). Evol. Biol. 3: 119-175, 1969.
- KERR, W.E. - Number of chromosomes in some species of bees. J. Kansas Ent. Soc. 45: 111-122, 1972 a.
- KERR, W.E. - Effect of low temperature on male meiosis in Melipona marginata. J. Apic. Res. 11(2): 95-99, 1972 b.
- KERR, W.E. & KRAUSE, W. - Contribuição para o conhecimento da bionomia dos Meliponini. Fecundação da rainha de Melipona quadrifasciata Lepelletier (Hymenoptera-Apoidea). Dusenía 1(5): 276-282, 1950.
- KERR, W.E. & NIELSEN, R.A. - Evidences that genetically determined Melipona queens can become workers. Genetics 54(3): 859-866, 1966.
- KERR, W.E. & SILVEIRA, Z.V. da - Karyotypic evolution of bees and corresponding taxonomic implications. Evolution 26(2): 197-202, 1972.
- KERR, W.E. & SILVEIRA, Z.V. da - A note of the formation on the bee sperm. J. Apic. Res. 13(2): 121-126, 1974.
- KERR, W.E.; STORT, A.C.; MONTENEGRO, M.J. - Importância de alguns fatores ambientais na determinação das castas do gênero Melipona. An. Acad. Brasil. Cien. 38(1): 149-168, 1966.

- KERR, W.E.; ZUCCHI, R.; NAKADAIRA, J.T. & BUTOLO, J.E. - Reproduction in the social bees (Hymenoptera : Apidae). J. N. Y. Ent. Soc. 70: 265-276, 1962.
- LEVAN, A.; FREDGA, K. & SANDBERG, A.A. - Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas 52: 201-220, 1965
- LUCIANI, J.M. - Les chromosomes méiotiques de l'homme. II. Le nucléole. Les Chiasmas. III. La stérilité masculine. Ann. Génét. 13(3): 169-182, 1970.
- MANNING, J.F. - Sex determination in the Honey Bee. Maio 1949, p. 92.
- NARANG, N.; NARANG, S. & KITZMILLER, J. B. - Kariological studies on four species of Anopheles subgenus Cellia. Caryologia 25(3): 259-274, 1972.
- NELSON, J.A. - The Embryology of the Honey Bee. Princeton University Press, London 1915, p. 282.
- NEWMAN, L.J. - Meiotic chromosomal aberrations in wild Population of Podophyllum peltatum. Chromosoma 22: 258-273, 1967.
- OHNO, S.; CHRISTIAN, L.C. & STENIUS, C. - Significance in mammalian oogenesis of the non-homologous association of bivalents. Exp. Cell. Res. 32: 590-621, 1963.
- OHNO, S. & SMITH, J.B. - Role of fetal follicular cells in meiosis of mammalian oocytes. Cytogenetics 3(5): 324-333, 1964.
- PARIS CONFERENCE 1971 - Standardization in human cytogenetics Original article series Editor: DANIEL BERSMA, M.D., M.P.H.
- PAULKE, W. - Ueber die Differenzierung der Zellelemente im ovarium der Bienenkönigin (Apis mellifica ♀). Zool. Jb. Morph. 14 177-202, 1901.
- PETRUNKEWITSCH, A. - Die Richtungskörper und ihr Schicksal im befruchteten und unbefruchteten Bienenei. Zoll. Jahrbucher Abth. F. Morph. 14: 573-608, 1900.

- SAKAGAMI, S.F. - Techniques for the observation of behavior and social organization of stingless bees by using a special hive. Papéis Avulsos Zool. S.Paulo 19: 151-162, 1966.
- SAKAGAMI, S.F. & AKAHIRA, Y. - Comparison of the ovarian size and number of ovarioles between the worker bees of Japanese and European honeybees. Kontyú 26: 103-109, 1958.
- SAKAGAMI, S.F.; BEIG, D.; ZUCCHI, R. & AKAHIRA, Y. - Occurrence ovary-developed workers in queenright colonies of stingless bees. Rev. Brasil. Biol. 23(2) 115-129, 1963.
- SAKAGAMI, S.F. & ZUCCHI, R. - Oviposition process in a stingless bee, Trigona (Scaptotrigona) postica Latr. (Hym.). Studia Ent. 6(1-4): 497-510, 1963.
- SCHERES, J.M.J.C. - Human chromosome banding. Lancet 1:849, 1972.
- SHAW, D.D. - Pseudomultiple production in Ageneotettix deorum deorum. Chromosoma 31: 421-433, 1970.
- SILVA, D.L.N. da - Estudos bionômicos em colônias mistas de Meliponinae (Hymenoptera : Apoidea). Tese de Doutorado F. F.C.L. Ribeirão Preto, 1973, p. 136.
- SMITH, S.G. - Nucleolar organization and chromocenter formation in Chilocorus. In: DARLINGTON, C.D. & LEWIS, K.R., eds. Chromosomes Today. Edinburgh, Oliver and Boyd, 1969, p. 41-43.
- SNODGRASS, R. - Anatomy of the Honey Bee. Comstock Publishing Association. Ithaca, N.Y. 1956, p. 334.
- SOCSEK, Z. - Wpływ Niektórych Metod Wychowu Matek Pszczelich na Liczbe Ich Rurek Jajnikowych. Pszcz. Zesz. Naukowe 9(1-2) : 63-76, 1965.
- SOUTHERN, D.I. - Pseudo-multiple formation as a consequence of prolonged nonhomologous chromosome association in Metrioptera brachyptera. Chromosoma 21: 227-284, 1967.
- SWANSON, C.P. - Cytology and Cytogenetics. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, 1957, p. 496.
- TARELHO, Z.V. das - Contribuição ao estudo citogenético dos Apoidea. Dissertação de Mestrado, FMRP, USP, 1973. 98p.
- TERADA, Y. - Contribuição ao estudo da regulação social em Leurotrigona muelleri e Frieseomelitta varia (Hymenoptera, Apidae). Dissertação de Mestrado, FMRP, USP, 1974. 88p.

- VELTHUIS, H.H.W. - Ovarian development in Apis mellifera. worker bees. Ent. Exp. & Appl. 13: 377-394, 1970.
- WHITE, M.J.D. - The role of chromosomal translocations in Urodele evolution and speciation in the light of work on grasshoppers. Amer. Natur. 95: 315-321, 1961.
- WOIKE, J. - Rearing conditions and the number of sperm reaching the queens spermatheca. Apimondia. XXI Internal Apicult. Congr. Summary 93: 84-85, 1967.
- ZANDER, E. - Die Ausbildung des geschlechtes bei der Honigbiene. Z. Angew. Ent. 3: 1-74, 1916.