

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DE SAÚDE DEPARTAMENTO DE
GENÉTICA E EVOLUÇÃO**

MARIANA MAYUMI YAMASHIRO DELFINO

**COMPARAÇÃO MORFOLÓGICA DO OVÁRIO DE RAINHAS E OPERÁRIAS DE
Frieseomelitta varia E *Apis mellifera* AO LONGO DO DESENVOLVIMENTO**

SÃO CARLOS -SP

2025

MARIANA MAYUMI YAMASHIRO DELFINO

**COMPARAÇÃO MORFOLÓGICA DO OVÁRIO DE RAINHAS E OPERÁRIAS DE
Frieseomelitta varia E *Apis mellifera* AO LONGO DO DESENVOLVIMENTO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado junto
à Universidade Federal de São Carlos como
requisito para obtenção do título de Bacharel em
Biotecnologia.

Orientadora: Prof.^a. Dr.^a Flávia Cristina de Paula
Freitas

São Carlos-SP

2025

AGRADECIMENTO

À minha mãe Sandra, minha bá e meus irmãos Pedro e Eloiza, por serem minha motivação diária, por incentivarem meus sonhos e darem o apoio prático e emocional necessário durante toda graduação, principalmente nos momentos que estive ausente e pouco amigável.

Ao meu companheiro Marcos, por me acompanhar na reta final desta jornada, compreender minhas necessidades e me apoiar nos meus estudos.

À minha orientadora Prof^a. Flávia Freitas por confiar este trabalho a mim, me mostrar a beleza das abelhas e me lembrar como é incrível fazer ciência.

À minha coorientadora (de coração) e amiga, Izabella Silva, por me ensinar a engatinhar no mundo das abelhas e da bioinformática, seu companheirismo, apoio e amizade foram imprescindíveis nessa jornada.

Às minhas amigas de vida Tatiany, Sarah, Grazielle, Carol e Francielle por me acompanharem desde o ensino médio, compreenderem as mudanças da nova rotina e minha ausência, sem nunca me abandonarem. E às amigas da graduação Laísa e Ana Carolina, que tornaram vida acadêmica mais leve e divertida.

Aos colegas do Laboratório de Genética de Sistemas e Laboratório de Genômica Comparativa do Desenvolvimento, por compartilharem conhecimentos, angústias e alegrias.

Ao Prof. Francis Nunes, por ceder espaço em seu laboratório e estar sempre presente para conversas, cafés e docinhos. Ao Prof. Marco Del Lama e a Mariana Bisio pelo auxílio no início deste trabalho.

Aos colegas e técnicos do Laboratório de Biologia do Desenvolvimento de Abelhas Maria, Patrick, Jairo, Rogério e Vera. À Prof^a. Marcia por ceder seu tempo e conhecimento nas disseções. À Fernanda Dalarmi pela ajuda nas primeiras disseções e por estar sempre disposta a colaborar e discutir sobre ovários e ciência.

Em especial à Prof^a Zilá Simões, por ceder o espaço e os equipamentos necessários para

realização deste trabalho, e por seu tempo em discussões, leituras e conselhos; e ao Thiago Depintor, por toda ajuda, orientação e conversas que foram além do âmbito acadêmico, foi um prazer conhecer você nessa aventura.

Ao Clérison, da Meliponário da Paz, Alfenas/MG, sempre disposto a tirar dúvidas sobre nossas colônias.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro ao Projeto de Iniciação Científica (Processo 2023/11435-0) e ao Auxílio Jovem Pesquisador (Processo 2020/13719-7).

Por fim, agradeço a Deus, pois sem Ele nada seria possível.

RESUMO

A abelha sem ferrão *Frieseomelitta varia* e a abelha exótica *Apis mellifera* são espécies eussociais em que o trabalho reprodutivo é dividido entre duas castas femininas com morfofisiologias distintas. As rainhas são responsáveis pelas funções reprodutivas, ao passo que as operárias cuidam da manutenção da colônia. Em *F. varia*, as operárias são incapazes de se reproduzir, enquanto as operárias de *A. mellifera* guardam potencial reprodutivo. Para compreender os mecanismos por trás da diferença na capacidade reprodutiva estas abelhas, este trabalho teve como objetivo caracterizar o desenvolvimento dos ovários de rainhas e operárias de abelhas *Frieseomelitta varia*, comparando com o desenvolvimento de rainhas e operárias de abelhas africanizadas *Apis mellifera*. Para isso, foi implementado um protocolo de criação in vitro de rainhas de *F. varia* e posturas controladas de rainhas de *A. mellifera* para obtenção de espécimes nas fases desejadas. Os ovários de rainhas e de operárias de ambas as espécies foram dissecados e marcados com corantes fluorescentes para visualização dos núcleos e dos filamentos de actina. O tempo do desenvolvimento de rainhas de *F. varia* foi determinado a partir do momento da transferência de larvas recém eclodidas, as quais emergem após $31,92 \pm 1,03$ dias. Aqui também fizemos a caracterização morfológica dos ovários de rainhas de *F. varia* nas fases larval pré-defecante, pupa de olho branco e pupa de olho marrom sem pigmentação e com pigmentação leve e escura no corpo; e de operárias naturais em fase larval defecante, adultas recém-emergida e forrageira, além de uma fase adulta intermediária entre a emergência e o forrageamento. Para a espécie *A. mellifera*, foram obtidas as seguintes fases de rainhas: pupa de pigmentação marrom nos olhos e diferentes intensidades de pigmentação corporal; e operárias naturais no último ínstar larval e em estágios pupais sem pigmentação nos olhos, com pigmentação marrom nos olhos e diferentes níveis de pigmentação corporal, além de uma fase adulta recém-emergida. Nossos resultados indicam que ambas as espécies apresentam um processo de desenvolvimento dos ovários semelhante em operárias e rainhas em que a estrutura inicial encontrada em larvas se alonga e atinge a conformação vista em adultos ainda na fase pupal. A diferença parece estar na organização do citoesqueleto das membranas que revestem os ovários (bainha peritonela). Enquanto estas membranas permanecem organizadas ao longo do desenvolvimento de rainhas de *A. mellifera* e *F. varia* e de operárias de *A. mellifera*, estas parecem desorganizadas em adultas de *F. varia*. Este trabalho produziu um catálogo de imagens do desenvolvimento dos ovários de rainhas e operárias de *F. varia* e de *A. mellifera*. Além disso, contribuímos com informações sobre a biologia reprodutiva das abelhas, organismo cujos serviços ecológicos e econômicos são inestimáveis.

Palavras-chave: abelhas sem ferrão, abelhas melíferas, desenvolvimento do ovário, morfologia, *Frieseomelitta varia*, *Apis mellifera*.

ABSTRACT

The stingless bee *Frieseomelitta varia* and the exotic bee *Apis mellifera* are eusocial species in which the reproductive work is divided between two female castes with distinct morphophysiology. Queens are responsible for the reproductive task, while workers take care of the colony maintenance. In *F. varia*, workers are incapable of reproduction, while workers of *A. mellifera* retain reproductive potential. To understand the mechanisms behind the difference in reproductive capacity of these bees, this study aimed to characterize the development of the ovaries of queens and workers of *Frieseomelitta varia* bees, comparing them with the development of queens and workers of Africanized bees *Apis mellifera*. For this purpose, an in vitro rearing protocol of *F. varia* queens and controlled egg-laying of *A. mellifera* queens were implemented to obtain specimens at the desired stages. The ovaries of queens and workers of both species were dissected and marked with fluorescent components to visualize the nuclei and actin filaments. The development time of *F. varia* queens was determined from the moment of transfer of newly hatched larvae, which emerge after 31.92 ± 1.03 days. Here, we also performed the morphological characterization of the ovaries of *F. varia* queens in the pre-defecating larval phase, white-eyed pupa and brown-eyed pupa without pigmentation and with light and dark pigmentation on the body; and of natural workers in the defecating larval phase, newly emerged and foraging adults, in addition to an intermediate adult phase between emergence and foraging. For the species *A. mellifera*, the following queen phases were obtained: pupa with brown pigmentation on the eyes and different intensities of body pigmentation; and natural workers in the last larval instar and in pupal stages without eye pigmentation, with brown eye pigmentation and different levels of body pigmentation, in addition to a newly emerged adult phase. Our results indicate that both species present a similar process of ovarian development in workers and queens in which the initial structure found in larvae elongates and reaches the conformation seen in adults while still in the pupal phase. The difference seems to be in the organization of the cytoskeleton of the membranes that cover the ovaries. While these membranes remain organized throughout the development of *A. mellifera* and *F. varia* queens and *A. mellifera* workers, they appear disorganized in *F. varia* adults. This work produced a catalog of images of the development of the ovaries of *F. varia* and *A. mellifera* queens and workers. In addition, we contributed with information on the reproductive biology of bees, an organism whose ecological and economic services are invaluable.

Keyword: stingless bees, honey bees, ovary development, morphology, *Frieseomelitta varia*,

Apis mellifera.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Organização das colônias de <i>Frieseomelitta varia</i>	15
Figura 2: Espécie <i>Frieseomelitta varia</i>	16
Figura 3: Representação das células de cria de um ninho de <i>Frieseomelitta varia</i>	16
Figura 4: Espécie <i>Apis mellifera</i>	18
Figura 5: Ultraestrutura do ovaríolo de uma rainha da espécie <i>Apis mellifera</i>	21
Figura 6: Modelo proposto por Cullen (2024) para explicar a formação dos fusomas e polifusomas durante o desenvolvimento dos ovários de abelhas <i>Apis mellifera</i>	22
Figura 7: Sistema para criação <i>in vitro</i> de rainhas da espécie <i>Frieseomelitta varia</i>	25
Figura 8: Esterilização dos materiais utilizados com radiação ultravioleta.....	26
Figura 9: Postura controlada de rainhas de <i>Apis mellifera</i>	27
Figura 10: Larvas de rainha de <i>Frieseomelitta varia</i> criadas <i>in vitro</i> em placa de 96 poços com alimento larval.....	30
Figura 11: Desenvolvimento pupal de rainhas de <i>Frieseomelitta varia</i> criadas <i>in vitro</i>	30
Figura 12: Fotografias de rainhas de <i>Frieseomelitta varia</i> criadas <i>in vitro</i> no desenvolvimento pupal.....	31
Figura 13: Fotografia de rainhas e operárias adultas recém-emergidas da espécie <i>Frieseomelitta varia</i>	32
Figura 14: Variação do peso de rainhas de <i>Frieseomelitta varia</i> criadas <i>in vitro</i> em diferentes etapas do desenvolvimento.....	32
Figura 15: Microscopia de fluorescência de ovários de rainhas de <i>Frieseomelitta varia</i> criadas <i>in vitro</i> em fase larval pré-defecante.....	33
Figura 16: Microscopia de fluorescência de ovários de rainhas de <i>Frieseomelitta varia</i> criadas <i>in vitro</i> em fase larval pré-defecante tardio.....	34
Figura 17: Microscopia de fluorescência de ovários de rainhas de <i>Frieseomelitta varia</i> criadas <i>in vitro</i> em fase de pupa de olho branco.....	35
Figura 18: Microscopia de fluorescência de ovários de rainhas de <i>Frieseomelitta varia</i> criadas <i>in vitro</i> em fase de pupa de olho marrom.....	36
Figura 19: Microscopia de fluorescência de ovários de rainhas de <i>Frieseomelitta varia</i> criadas <i>in vitro</i> em fase de pupa de pigmentação corporal leve.....	37
Figura 20: Microscopia de fluorescência de ovários de rainhas de <i>Frieseomelitta varia</i> criadas <i>in vitro</i> em fase de pupa com pigmentação corporal escura.....	38
Figura 21: Estrutura dos ovaríolos de rainhas de <i>Frieseomelitta varia</i>	39

Figura 22: Microscopia de fluorescência de ovários de operárias naturais de <i>Frieseomelitta varia</i> em fase larval defecante.	40
Figura 23: Microscopia de fluorescência de ovários de operárias naturais de <i>Frieseomelitta varia</i> recém- emergidas.	41
Figura 24: Microscopia de fluorescência de ovários de operárias naturais de <i>Frieseomelitta varia</i> em fase de forrageamento.	42
Figura 25: Microscopia de fluorescência de ovários de operárias naturais de <i>Frieseomelitta varia</i> adulta de idade desconhecida.	43
Figura 26: Microscopia de fluorescência de ovários de rainhas de <i>Apis mellifera</i> em fase de pupa de olho marrom.	44
Figura 27: Microscopia de fluorescência de ovários de rainhas de <i>Apis mellifera</i> em fase de pupa de pigmentação corporal leve.	45
Figura 28: Microscopia de fluorescência de ovários de rainhas de <i>Apis mellifera</i> em fase de pupa de pigmentação corporal média.	46
Figura 29: Microscopia de fluorescência de ovários de rainhas de <i>Apis mellifera</i> em fase de pupa de pigmentação corporal escura.	47
Figura 30: Microscopia de fluorescência de parte do ovário de rainha de <i>Apis mellifera</i> em fase de pupa de pigmentação corporal média.	48
Figura 31: Microscopia de fluorescência de ovários de operárias de <i>Apis mellifera</i> no último ínstar larval (L5).	49
Figura 32: Microscopia de fluorescência de ovários de operárias de <i>Apis mellifera</i> em fase de pupa de olho branco.	49
Figura 33: Microscopia de fluorescência de ovários de operárias de <i>Apis mellifera</i> em fase de pupa de pigmentação marrom nos olhos.	50
Figura 34: Microscopia de fluorescência de ovários de operárias de <i>Apis mellifera</i> em fase de pupa de pigmentação corporal leve.	51
Figura 35: Microscopia de fluorescência de ovários de operárias de <i>Apis mellifera</i> em fase de pupa de pigmentação corporal escura.	52
Figura 36: Microscopia de fluorescência de ovários de operárias de <i>Apis mellifera</i> em fase adulta recém-emergida.	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tempo em dias do desenvolvimento de rainhas de <i>Frieseomelitta varia</i> criadas <i>in vitro</i>	29
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

LD	Larva defecante
LPD	Larva pré-defecante
PE	Pupa de pigmentação corporal escura
PL	Pupa de pigmentação corporal leve
PM	Pupa de olho marrom
PMD	Pupa de pigmentação corporal média
PR	Pupa de olho rosa
RE	Adulta recém-emergida

SUMÁRIO

1.	Introdução	15
1.1.	A abelha sem ferrão <i>Frieseomelitta varia</i>	15
1.2.	A abelha <i>Apis mellifera</i>	17
1.3.	Morte celular programada.....	19
1.4.	Estrutura básica dos ovários de abelhas adultas.....	20
1.5.	Importância ecológica das abelhas.....	22
2.	Objetivos	24
2.1.	Objetivo geral.....	24
2.2.	Objetivos específicos	24
3.	Material e métodos	24
3.1.	Material biológico	24
3.2.	Rainhas de <i>Frieseomelitta varia</i>	24
3.2.1.	Coleta e estocagem de alimento larval.....	24
3.2.2.	Criação <i>in vitro</i> e determinação do tempo de desenvolvimento de rainhas de <i>Frieseomelitta varia</i>	25
3.2.3.	Parâmetros para validação da criação <i>in vitro</i> de rainhas <i>F. varia</i>	27
3.3.	Rainhas de <i>Apis mellifera</i>	27
3.3.1.	Postura controlada de rainhas de <i>Apis mellifera</i>	27
3.4.	Operárias naturais de <i>Frieseomelitta varia</i> e <i>Apis mellifera</i>	28
3.5.	Caracterização morfológica dos ovários de rainhas e operárias de <i>Frieseomelitta varia</i> e <i>Apis mellifera</i>	28
3.5.1.	Dissecção dos ovários	28
3.6.	Marcação das estruturas celulares	28
4.	Resultados	29
4.1.	Criação <i>in vitro</i> e determinação do tempo de desenvolvimento de rainhas de <i>Frieseomelitta varia</i>	29
4.2.	Caracterização morfológica do ovário de rainhas e operárias de <i>Frieseomelitta varia</i>	32
4.3.	Caracterização morfológica dos ovários de rainhas e operárias de <i>Apis mellifera</i>	43
4.4.	Comparação morfológica do desenvolvimento de ovários <i>Frieseomelitta varia</i> e <i>Apis mellifera</i>	53
5.	Discussão.....	54
5.1.	Criação <i>in vitro</i> e determinação do tempo de desenvolvimento de rainhas de <i>Frieseomelitta varia</i>	54

5.2.	Ovários de rainhas e operárias de abelhas melíferas e sem ferrão	56
5.3.	Considerações finais.....	58
6.	Referências bibliográficas	59
Anexo 1	64
Anexo 2	64

1. Introdução

1.1. A abelha sem ferrão *Frieseomelitta varia*

As abelhas sem ferrão, conhecidas como abelhas indígenas ou meliponíneos da tribo Meliponini são as mais diversificadas da família Apidae (Michener, 2007). Já foram descritas mais de 505 espécies, das quais mais de 400 ocorrem nas regiões neotropicais da América Central e do Sul (A.B.E.L.H.A., 2020), onde representavam a principal fonte de polinização natural antes da introdução da abelha melífera, *Apis mellifera*, no século XVIII. No Brasil, 244 destas podem ser encontradas, sendo reconhecidas pelos nomes dados pelos indígenas (como jataí, urucu e mombuca) (A.B.E.L.H.A., 2020).

Dentre as abelhas sem ferrão, o gênero *Frieseomelitta* é composto por 16 espécies, sendo dez brasileiras (Silveira et al., 2002). Em particular, a espécie *Frieseomelitta varia* ocorre nos estados de Minas Gerais, Bahia, Mato Grosso, São Paulo, Tocantins e Goiás, chegando até as regiões centrais da Bolívia. Seus ninhos são construídos em pequenas aberturas em troncos de árvores vivas ou mortas e as células de cria possuem formato de cacho. O mel é depositado em potes ovais e o pólen em tubos cilíndricos (Figura 1) (Nogueira-Neto, 1997; Silveira et al., 2002).



Figura 1: Organização das colônias de *Frieseomelitta varia*.

Na imagem, observam-se células de cria em formato de cacho posicionadas no canto inferior esquerdo e, na extremidade inferior direita, potes de mel ovais. Ao redor destes, na parte superior, visualiza-se potes de pólen, em formato cilíndrico e alongado. Fonte: Fototeca Cristiano Menezes. Disponível em <<https://sites.usp.br/jardimdabotanicausprp/marmelada-ou-mocinha-branca-frieseomelitta-varia/>>. Acesso em 27/12/2024.

As abelhas *F. varia* apresentam comportamento eussocial, caracterizado pela cooperação na criação da prole, sobreposição de gerações e divisão do trabalho reprodutivo entre as castas femininas, cuja morfofisiologia é bastante distinta (Wilson, 1971). As rainhas possuem função exclusivamente reprodutiva, sendo responsáveis pela cópula e pela postura de

ovos, estas apresentam abdômen volumoso e ausência de corbícula (Figura 2A). As operárias não apresentam capacidade reprodutiva, estando responsáveis pelas demais atividades de manutenção da colônia, como coleta de alimento, limpeza e defesa; sua principal característica morfológica é a presença de corbículas nas pernas traseiras (Figura 2B) (Michener, 2007).

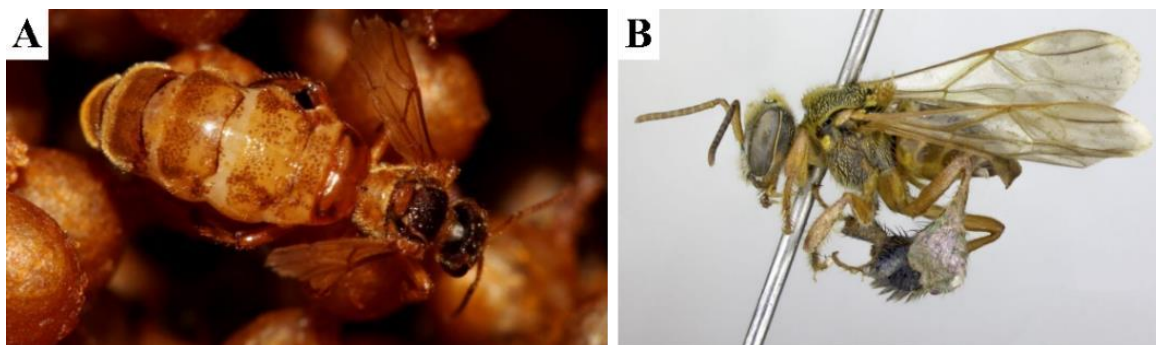


Figura 2: Espécie *Frieseomelitta varia*.

a) Rainha sobre células de cria no interior da colônia; b) Operária posicionada em alfinete entomológico. Fonte: Fototeca Cristiano Menezes. Disponível em <<https://sites.usp.br/jardimdabotanicausprp/marmelada-ou-mocinha-branca-frieseomelitta-varia/>>. Acesso em 27/12/2024.

As diferenças entre operárias e rainhas são disparadas pela quantidade de alimento consumida durante o desenvolvimento larval. As larvas destinadas a se tornarem rainhas comem cerca de duas vezes mais que as larvas destinadas a operárias (Baptistella et al., 2012; Faustino et al., 2002). Nos Meliponini, ocorre um processo de massificação do suprimento alimentar, ou seja, todo alimento é depositado nas células de cria antes da oviposição. Dessa forma, para criação de rainhas de *F. varia*, é realizada a construção de uma célula auxiliar que armazena uma segunda porção de alimento, o qual pode ser acessado pela larva por meio de canais que conectam ambas as células de cria (Figura 3) (observado por Faustino et al., 2002).

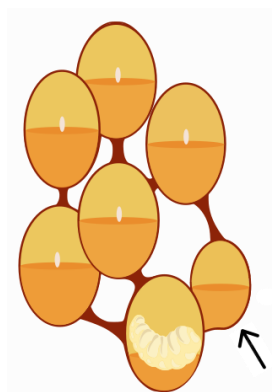


Figura 3: Representação das células de cria de um ninho de *Frieseomelitta varia*.

Representação das células de cria ovais com ovos postos sobre o alimento larval previamente depositado. Em destaque, uma célula de cria com larva destinada a rainha, na qual está anexa uma célula de cria com quantidade extra de alimento (apontada pela seta).

Como resultado dessa alimentação diferencial no início do desenvolvimento, durante o período pupal e início da fase adulta, os ovários das abelhas operárias de *F. varia* passam por um processo de morte celular programada, que os reduz a remanescentes sem a estrutura básica para produção de ovos (Boleli et al., 1999). De acordo com Boleli e colaboradores (1999), o processo de morte celular se encontra avançado no final do estágio pupal, com células em maior nível de degradação na região do germário e a perda dos filamentos terminais. Simultaneamente à morte celular, ocorre um processo de diferenciação e desenvolvimento celular, ocasionando a reorganização do tecido ovariano (Boleli et al., 2000).

Em outras espécies de Meliponini, comumente os ovários seguem seu desenvolvimento e formam órgãos funcionais no indivíduo adulto, de forma que as operárias põem ovos mesmo na presença da rainha (Bego, 1982; Kerr et al., 1996; Machado et al., 1984). Em *Melipona quadrifasciata*, por exemplo, outra espécie de abelha sem ferrão nativa, observa-se a mesma cronologia de desenvolvimento, estando presente a etapa de separação dos ovários e encurtamento dos ovidutos (Boleli et al., 2000). As operárias de *F. varia* representam um dos extremos da plasticidade fenotípica acerca da capacidade reprodutiva das espécies de abelhas. Durante o desenvolvimento pupal, os citócitos no germário de operárias de *F. varia* param de se diferenciar e os ovários sofrem uma degeneração progressiva, sendo substituídos por um tecido de reserva que impossibilita a maturação dos ovários e a vitelogênese, tornando as operárias definitivamente incapacitadas para reprodução (Boleli et al., 1999).

1.2. A abelha *Apis mellifera*

O gênero *Apis* possui 10 espécies, majoritariamente localizadas no continente asiático (revisado por Whitfield et al., 2006). A espécie *Apis mellifera* pode ser encontrada da África subsaariana à Ásia central, além do norte da Europa, representada por mais de duas dúzias de subespécies morfológica e geograficamente distintas (revisado por Whitfield et al., 2006). No Brasil, as abelhas melíferas foram introduzidas intencionalmente na década de 50, dispersando através das Américas Central, do Norte e do Sul, originando populações africanizadas, com alelos europeus e africanos (revisado por Whitfield et al., 2006).

As abelhas *Apis mellifera* (Apini) são espécies eussociais pertencentes à família Apidae (Michener, 2007). Suas colônias selvagens podem ser encontradas em cavidades de árvores, no solo e fendas de rochas (Figura 4A). Nestas, como na espécie *F. varia*, ocorre a divisão do trabalho reprodutivo entre as castas femininas, de modo que a rainha é responsável pelas funções de reprodução e as operárias, pelas atividades de manutenção da colônia (Michener, 2007). Características refletidas em suas morfologias externas, de modo que as rainhas

apresentam um abdômen volumoso que comporta ovários desenvolvidos e a espermateca, uma estrutura globular que armazena os espermatozoides depositados pelos machos na cópula. As operárias são menores e facilmente identificadas pela presença da corbícula, essencial para as atividades de forrageamento (Figura 4B e C) (Michener, 2007, revisado por Visick; Ratnieks, 2023).

a) Colônia selvagem em tronco de árvore (Visick; Ratnieks, 2023); b) Rainha na região central, posicionada sobre células de cria ao lado de operárias; c) Operária com pólen na corbícula. Disponível em <<https://pixabay.com/pt/images/search/apis%20mellifera/>>. Acesso em 11 de janeiro de 2025.

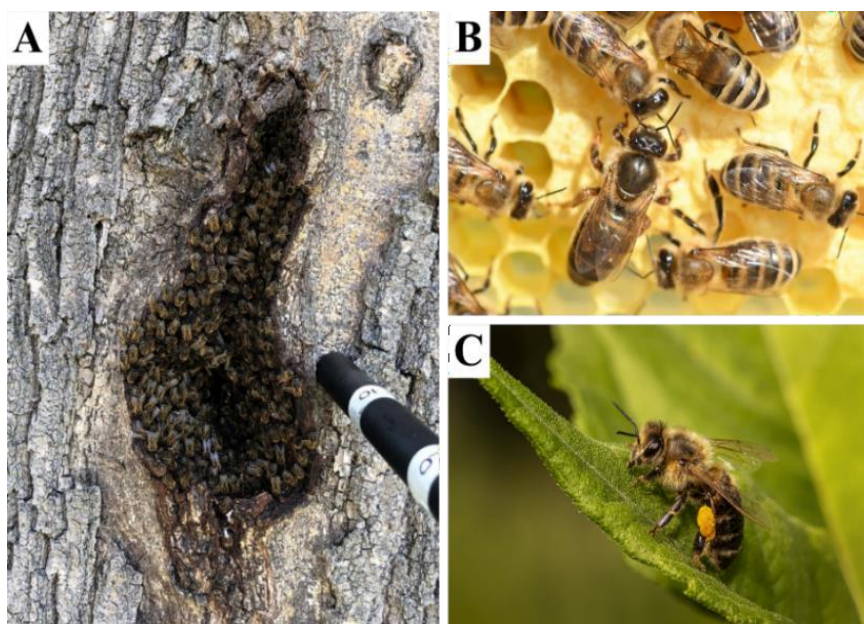


Figura 4: Espécie *Apis mellifera*.

Nas abelhas melíferas, a alimentação das larvas fêmeas é diferencial qualitativa e quantitativamente. Até o segundo ínstar larval, todas as larvas são alimentadas diariamente por operárias nutridoras com igual quantidade de geleia real. Contudo, a partir do terceiro ínstar, as larvas destinadas a operárias começam a receber, em menores quantidades, uma mistura de mel, pólen e geleia real, denominada geleia de operária. Por outro lado, as futuras rainhas seguem sendo alimentadas com geleia real em grande quantidade (Winston, 2003). Dessa forma, ao emergir, os ovários das rainhas são compostos por mais de 200 ovaríolos, enquanto as operárias apresentam de 2 a 10 ovaríolos por ovário, os quais mantêm um potencial reprodutivo, apesar de, comumente, não ovipor (Snodgrass, 1910; Winston, 2003).

A redução da capacidade reprodutiva das operárias dessa espécie também ocorre por meio do processo de morte celular programada. Nesta, contudo, ocorre a redução do número total de ovaríolos. Dos 120 a 160 ovaríolos primordiais presentes no início do quinto ínstar em todas as larvas, menos de 10 ovaríolos são mantidos nas futuras operárias e todos os ovaríolos são

mantidos nas futuras rainhas (Hartfelder; Steinbruck, 1997). As alterações celulares típicas do processo de morte celular foram observadas em *A. mellifera* (Hartfelder; Steinbruck, 1997; Reginato; Da Cruz-Landim, 2002), contudo, ainda não se sabe quais modificações e processos estão envolvidos na escolha e degradação de ovários inteiros.

1.3. Morte celular programada

O crescimento, desenvolvimento e manutenção dos organismos não depende apenas da formação de novas células. Muitos processos como a manutenção do tamanho de tecidos e as modificações oriundas das metamorfoses em diversas espécies necessitam da degradação de algumas estruturas (Carvalho; Recco-Pimentel, 2007; Tettamanti; Casartelli, 2019). Dessa forma, o processo de morte celular não está relacionado apenas à eliminação de células danificadas ou infectadas, sendo imprescindível para o correto desenvolvimento dos organismos (Carvalho; Recco-Pimentel, 2007). Neste último caso, a morte celular é dita “programada” (MCP), pois atua como um efector de programas fisiológicos visando desenvolvimento ou renovação tecidual (Galluzzi et al., 2016, 2018), ainda que não haja perturbações ambientais exógena.

De acordo com o Nomenclature Committee on Cell Death (em tradução livre Comitê de Nomenclatura sobre Morte Celular), o processo de morte celular se manifesta por meio de alterações morfológicas macroscópicas, permitindo sua classificação em apoptose, autofagia e necrose. A apoptose é caracterizada pelo encolhimento citoplasmático, condensação da cromatina (picnose), fragmentação nuclear (cariorrexe) e formação de bolhas na membrana plasmática, ocasionando a formação de pequenas vesículas conhecidas como corpos apoptóticos, as quais são absorvidas por células vizinhas com atividade fagocítica e degradadas dentro dos lisossomos. A autofagia exhibe extensa vacuolização citoplasmática, culminando na captação fagocítica e degradação lisossomal. Por fim, a necrose manifesta-se pela eliminação celular sem atividade lisossomal ou fagocítica (Carvalho; Recco-Pimentel, 2007; Galluzzi et al., 2007, 2018).

Nas abelhas, a redução na quantidade de ovários ou o encolhimento dos mesmos resultam do processo de apoptose, comumente identificado por meio das características celulares remanescentes (Boleli et al., 1999, 2000; Hartfelder; Steinbruck, 1997; Zavodskaja; Sehadova, 2023). Após o processo de morte celular apoptótica, podem ser observadas a presença de modificações morfológicas características, como o encolhimento da estrutura celular, o colapso do citoesqueleto, a extinção do envelope nuclear e a condensação da cromatina (Alberts et al., 2017). Tais alterações celulares foram anteriormente observadas em

A. mellifera (Hartfelder; Steinbruck, 1997; Reginato; Da Cruz-Landim, 2002) e em *F. varia* (Boleli et al., 1999, 2000).

1.4. Estrutura básica dos ovários de abelhas adultas

O aparelho reprodutor das fêmeas dos insetos é composto por um par de ovários, conectados a um par de ovidutos laterais, os quais se unem para a formação do oviduto mediano (Da Cruz Landim, 2009). Neste sistema, cada ovário é formado por ovários, unidade básica da produção de óvulos, cuja estrutura é alongada e afinada nas extremidades, contendo células germinativas em diferentes fases da ovôgenese e células somáticas de sustentação (Da Cruz Landim, 2009). As células do ovário produzem uma túnica própria, membrana acelular que envolve e delimita a superfície externa do ovário (Reginato; Cruz-Landim, 2001). Acima desta, há um envelope de células musculares planas, denominado bainha peritoneal (Cruickshank, 1973; Ronai et al., 2015). A estrutura do ovário, da extremidade distal à proximal, é dividida em filamento terminal, germário e vitelário (Cullen et al., 2023; Dearden, 2006).

Nas abelhas, os ovários são do tipo meroístico politrófico (Gutzeit et al., 1993; Tanaka; Hartfelder, 2004), no qual cada folículo no vitelário é composto por um ovócito e várias células nutridoras associadas (trofócitos) unidos por pontes citoplasmáticas (polifusomas e canais em anel) (Da Cruz Landim, 2009; Telfer, 1975). O número e o comprimento dos ovários é variável em *A. mellifera*, representando um fator de distinção entre rainhas e operárias (Da Cruz Landim, 2009). Nas demais espécies da família Apidae, o que inclui as abelhas sem ferrão da tribo Meliponini, mantem-se um padrão de quatro ovários por ovário (Ferreira Martins; Serrão, 2004).

O filamento terminal é uma continuação da membrana peritoneal, sendo formado por células somáticas achatadas de secção quadrada a retangular com núcleos achatados, em corte longitudinal. Sua estrutura é caracterizada por uma pilha de células únicas na extremidade mais distal e de células duplas, na transição com o germário (Cullen et al., 2023, Da Cruz Landim, 2009). Essa região não apresenta células de linhagem germinativa, fato revisto por Cullen e colaboradores (2023), que utilizaram marcadores de linhagem somática (castor) e germinativa (vasa e nanos) para caracterizar as células ao longo dos ovários de rainhas de *A. mellifera*. As células somáticas do filamento terminal fornecem os progenitores das células foliculares somáticas do ovário (Hartfelder; Steinbruck, 1997; Tanaka; Hartfelder, 2004).

O germário pode ser subdividido em distal e proximal, sendo composto por células germinativas - ovogônias primárias e secundárias - e somáticas - tecido pré-folicular (Da Cruz

Landim, 2009). No germário distal, distingue-se a transição entre células achatadas características do filamento terminal para células e núcleos arredondados com a presença de polifusomas, também conhecidos por rosetas (Cullen et al., 2023). Esses agrupamentos, ou rosetas, são compostos por oito células unidas por pontes citoplásticas e constituem os primeiros progenitores da linhagem germinativa, sendo capazes de se dividir de maneira síncrona, promovendo sua manutenção entre as estações de postura (Cullen et al., 2023). No germário proximal, os ovócitos tornam-se maiores que as células nutridoras circundantes e os polifusomas são substituídos por canais de anel (Cullen et al., 2023; Gutzeit et al., 1993). Nesta região, cromossomos potencialmente condensados são observados, sugerindo a ocorrência de divisões celulares (Cullen et al., 2023).

O vitelário também é subdividido em distal (anterior) e proximal (posterior). Neste, os aglomerados da linhagem germinativa originam o ovócito e as células nutridoras acompanhantes (Bastock; St Johnston, 2008; Cullen et al., 2023). Para isso, no vitelário distal, ocorre uma reorganização das rosetas, de modo que os canais em anel entre as células cessam e os ovócitos e as células nutridoras assumem uma posição ordenada ao longo do ovariolo (Cullen et al., 2023). No vitelário proximal, o ovócito e as células nutridoras efetivamente se separam, e as células foliculares formam um epitélio colunar ao redor do ovócito, o qual se expande (Cullen et al., 2023). Por fim, o ovócito cresce até que as células nutridoras entram em colapso e despejam seu citoplasma no ovócito, liberando-o para postura (Cullen et al., 2023).

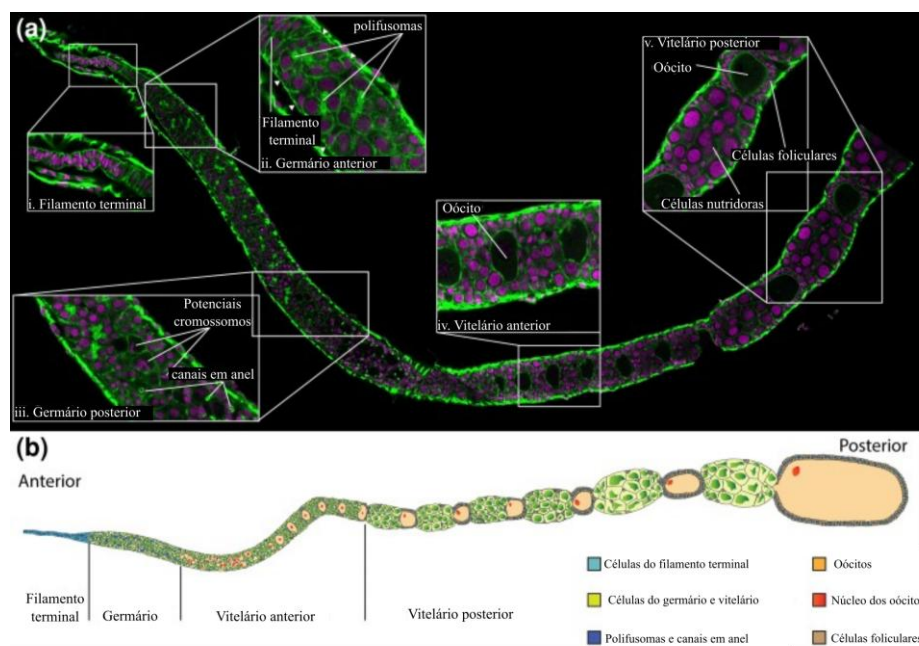


Figura 5: Ultraestrutura do ovariolo de uma rainha da espécie *Apis mellifera*.

a) Micrografia confocal de um ovariolo de rainha de *Apis mellifera*, marcado com DAPI para visualização dos núcleos (roxo) e faloidina para identificação dos filamentos de actina (verde). Destaque para as principais regiões

do ovaríolo, sendo i) Filamento terminal com células e núcleos achatados, ii) Germário distal, com a transição das células de morfologia achatadas para células de núcleos arredondados com a presença de polifusomas - as pontas de seta indicam células únicas na parte externa do germário, iii) Germário proximal, onde os polifusomas são substituídos por canais de anel, iv) Vitelário distal, no qual os espaços ociosos correspondem ao oócitos, e v) Vitelário proximal, representando pelo oócito, pelo grupo de células nutrízes e pelas células foliculares. b) Desenho da estrutura do ovaríolo (Cullen et al., 2023).

Em *A. mellifera*, os aglomerados de oito células ligados por polifusomas são o estoque de células germinativas (Cullen et al., 2023), sendo originados durante o desenvolvimento larval (Hartfelder; Steinbruck, 1997) e pupal à medida que o ovário se forma, presumivelmente a partir de células-tronco da linhagem germinativa primordial formadas no final da embriogênese (Dearden, 2006). Estes aglomerados apresentam duas características principais: (1) são compostos por células unidas por polifusomas e (2) dividem-se sincronizadamente (Cullen et al., 2023).

Durante o desenvolvimento pós-embriônico de *A. mellifera*, os agrupamentos surgem como fusomas e, posteriormente, polifusomas (Figura 4). Os primeiros fusomas surgem no estágio larval 2, ligando duas células e, no estágio 3, formando grupos de 4 células em divisão sincronizada. Estes, produzem polifusomas de 8 células no estágio larval 4 (Cullen et al., 2024). Essa organização é mantida durante os próximos estágios de desenvolvimento larval, pupal e adulto (Cullen et al., 2024).

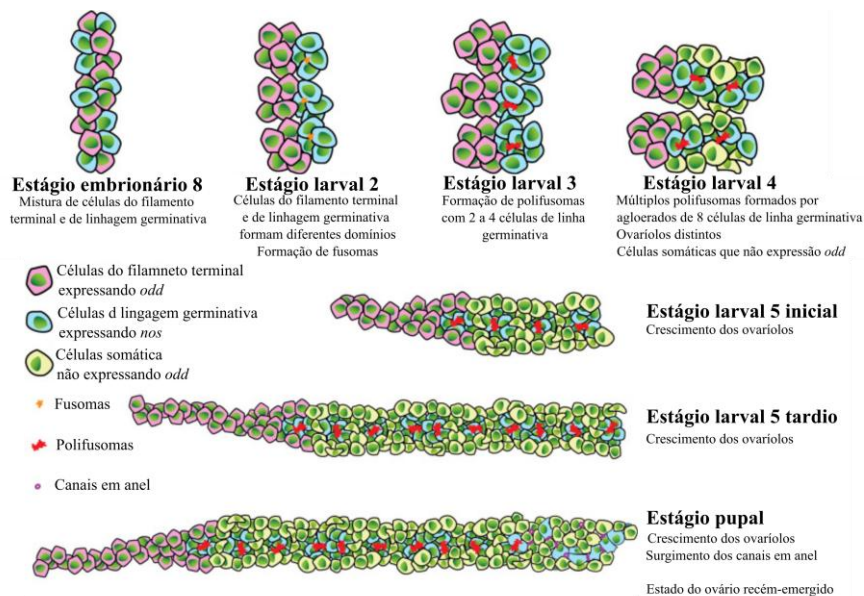


Figura 6: Modelo proposto por Cullen (2024) para explicar a formação dos fusomas e polifusomas durante o desenvolvimento dos ovários de abelhas *Apis mellifera*.

1.5. Importância ecológica das abelhas

A polinização é um serviço ecossistêmico fundamental para a manutenção de

comunidades biológicas e para o bem-estar humano, dada sua contribuição para agricultura global e segurança alimentar (revisado por Oliveira et al., 2024). Cerca de 90% de todas as plantas com flores são polinizadas por vetores bióticos (revisado por Oliveira et al., 2024) e um terço das culturas consumidas na alimentação diária dependem da polinização animal, principalmente via abelhas (Klein et al., 2007), que visitam mais de 90% dos 107 principais cultivos agrícolas já estudados no mundo (Gov.br, 2020).

O serviço ecossistêmico prestado pelos animais polinizadores à agricultura brasileira contribuiu com um valor econômico estimado em R\$ 43 bilhões em 2018 – dados do Relatório Temático sobre Polinização, Polinizadores e Produção de Alimento no Brasil, uma parceria entre a Plataforma Brasileira de Biodiversidade e Serviços Ecossistêmicos e a Rede Brasileira de Interações Planta-Polinizador (Gov.br, 2020). Além disso, as abelhas estão envolvidas com outro ponto economicamente importante: a produção de mel. De acordo com a Pesquisa da Pecuária Municipal, do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a produção de mel no Brasil foi de 42,35 mil toneladas em 2018, com valor de produção de R\$ 502,84 milhões. Em 2019, o Brasil exportou 30 mil toneladas de mel natural, com valor de US\$ 68,3 milhões. Já em 2020, as exportações subiram 35,7%, em comparação ao primeiro semestre de 2019 (Gov.br, 2020).

Apesar dos seus inestimáveis serviços ecológicos e da sua importância para a economia global (Khalifa et al., 2021), a negligência com que a população humana trata das questões ambientais tem causado intenso declínio populacional das abelhas (Araujo et al., 2016; Van Engelsdorp et al., 2008; Yang et al., 2023). Estas populações têm sofrido com ameaças parasíticas e virulentas (Kang et al., 2016; Warner et al., 2024), exposição a inseticidas (Manzoor et al., 2021; Stuligross; Williams, 2021) e redução de ecossistemas naturais em decorrência da agricultura, urbanização e desmatamento (Goulson et al., 2015).

Nesse contexto, a geração de conhecimento sobre a criação de rainhas, a reprodução das abelhas e possíveis métodos de otimização das suas condições devida podem nos ajudar a minimizar os efeitos das ameaças climáticas e antrópicas nas populações de abelhas. Ainda, a compreensão da biologia das abelhas, em especial de abelhas nativas como a *F. varia*, tão pouco estudadas, podem fundamentar programas de preservação e manejo de abelhas nativas e assim mitigar as consequências do intenso declínio das populações selvagens de abelhas sem ferrão dos últimos anos (Del Sarto et al., 2014; Jacob et al., 2013). Por fim, as abelhas eussociais oferecem uma oportunidade ímpar para desvendar os aspectos genômicos da plasticidade fenotípica, pois um mesmo ovo diploide, um genoma, é capaz de originar dois fenótipos, operária ou rainha, com morfologias bastante distintas.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Caracterizar o desenvolvimento dos ovários de rainhas e operárias de abelhas nativas sem-ferrão *Frieseomelitta varia* e comparar com o desenvolvimento de rainhas e operárias de abelhas africanizadas *Apis mellifera*.

2.2. Objetivos específicos

- a. Criação *in vitro* de rainhas de abelhas *Frieseomelitta varia* para a obtenção de larvas e pupas;
- b. Caracterizar o tempo de desenvolvimento e a duração dos ínstaes larvais e dos estágios pupais de rainhas de *Frieseomelitta varia* criadas *in vitro*;
- c. Caracterizar a morfologia dos ovários ao longo do desenvolvimento de rainhas e operárias de abelhas *Frieseomelitta varia* e *Apis mellifera*;
- d. Comparar o desenvolvimento dos ovários entre operárias e rainhas de *Frieseomelitta varia* e *Apis mellifera*.

3. Material e métodos

3.1. Material biológico

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biologia do Desenvolvimento de Abelhas (LBDA) do Departamento de Genética da Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) da Universidade de São Paulo (USP), coordenado pela Profa. Dra. Zilá Luz Paulino Simões. As amostras de *F. varia* e *A. mellifera* foram obtidas do Meliponário e Apiário Experimental, sendo selecionadas com base na saúde da colônia (quantidade de potes de alimento, no número de células de cria e no volume de operárias em atividade).

3.2. Rainhas de *Frieseomelitta varia*

3.2.1. Coleta e estocagem de alimento larval

O alimento larval foi coletado de células de cria recém-operculadas, identificadas pela coloração mais escura. Estas foram retiradas do ninho, levadas ao laboratório e desoperculadas sob condições assépticas com auxílio de uma pinça e instrumentos ortodônticos adaptados. O alimento foi retirado com uma micropipeta e armazenado em microtubos de 1,5 mL em freezer (4°C) até o momento da transferência (Baptistella et al., 2012).

3.2.2. Criação *in vitro* e determinação do tempo de desenvolvimento de rainhas de *Frieseomelitta varia*

O protocolo de criação *in vitro* de rainhas foi baseado na metodologia proposta por Baptistella e colaboradores (2012). Para isso, 52 μL de alimento larval previamente coletado foi depositado nos poços de uma placa acrílica de fundo redondo de 500 μL de 96 poços do tipo Elisa (*Tissue Culture Testplate, SPL Life Science*). Em seguida, larvas recém eclodidas (L1), padronizadas pelo tamanho observado, foram coletadas das células de cria e depositadas sobre o alimento com auxílio de uma pinça de ponta arredondada, tomando o cuidado para não perfurar a larva e posicioná-la sem alterar o lado em contato com o ar. O alimento remanescente na célula de cria original também foi transferido para os poços da placa acrílica, de modo que as larvas consumiram em média 78 μL de alimento larval.

Em seguida, a placa acrílica foi colocada em um recipiente plástico fechado com plástico PVC, contendo em seu interior um copo com água para manter a umidade entre 80 e 90% (Figura 7A). Um termo-higrômetro foi colocado na estufa para auxiliar no controle dos parâmetros (Figura 7B). Esse sistema foi mantido em estufa a 30° C. Ao atingir o estágio de larva defecante, foi adicionado NaCl (1:1) à água, visando criar uma solução saturada que reduz a umidade relativa para 75%, diminuindo a probabilidade de proliferação fúngica. Ao alcançarem a fase pupal, os espécimes foram transferidos para uma placa de Petri com papel filtro e mantidas no recipiente plástico a 30°C com 75% de umidade relativa.

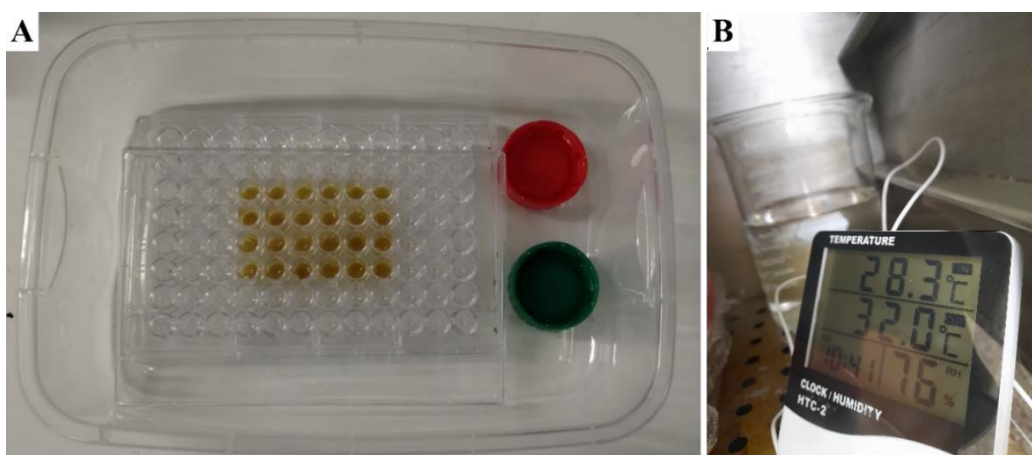


Figura 7: Sistema para criação *in vitro* de rainhas da espécie *Frieseomelitta varia*.

a) Recipiente plástico com a placa de Elisa e potes menores de água; b) Termo-higrômetro alocado na estufa para controle das condições experimentais.

Todo material utilizado para as transferências foi higienizado com álcool 70% e mantido 15 minutos sob radiação ultravioleta para esterilização (Figura 8). A manipulação das células de cria obtidas das colônias e o acompanhamento das criações foram realizados com a utilização de luvas e com os cuidados necessários para evitar contaminações.

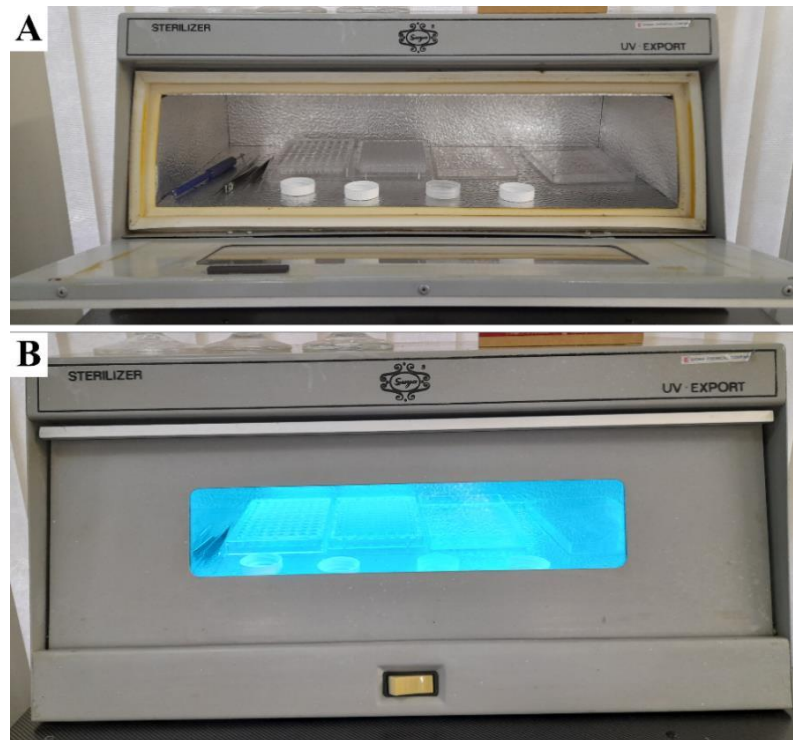


Figura 8: Esterilização dos materiais utilizados com radiação ultravioleta.

a) Instrumentos utilizados para a transferência das larvas sob esterilizador; b) Esterilizador *Suya* modelo *UV Export*, com lâmpada germicida de luz ultravioleta.

As criações eram examinadas diariamente ou semanalmente através de fotos, visando acompanhar o desenvolvimento das larvas, bem como delimitar o tempo de desenvolvimento total e a duração de cada fase até a emergência do indivíduo adulto. Para isso, foram criados parâmetros para padronizar as mudanças de fases. A fase larval pré-defecante, correspondente a última etapa de alimentação das larvas, caracterizada pelo consumo de quase todo alimento fornecido, sendo marcada pela presença de uma gota de alimento junto a larva. A fase de larva defecante, momento no qual a alimentação cessa e inicia-se a fase de defecação em preparação para metamorfose para a fase pupal, foi aferida pela presença das primeiras fezes. A fase seguinte, pré-pupa, foi determinada pelo surgimento de uma constrição separando a futura região do tórax do abdômen. As fases do desenvolvimento pupal foram determinadas pela alteração de pigmentação dos olhos, para rosa e marrom, e aquisição de pigmentação corporal em escala gradativa, leve, média e escura.

3.2.3. Parâmetros para validação da criação *in vitro* de rainhas *F. varia*

A distinção das castas ocorreu por meio da aferição do peso e da realização de fotos em estereomicroscópio óptico (*Discovery.V12 - ZEISS Microscopy*) em três posições para caracterização da morfologia externa (Linksvayer et al., 2011).

3.3. Rainhas de *Apis mellifera*

3.3.1. Postura controlada de rainhas de *Apis mellifera*

Para obter amostras com idades controladas, uma rainha foi confinada por quatro horas para oviposição em região específica no quadro de cria. Os ovos eclodem após 72 horas, momento no qual as larvas foram transferidas para células artificiais de rainhas contendo geleia real artificial. Em seguida, as realeiras foram realocadas nas colônias do tipo sobre-ninho, de modo que a rainha não tinha acesso às mesmas e as operárias nutrizas complementassem as células de cria com geleia real fresca. As amostras foram coletadas após os tempos de desenvolvimento descritos por Nunes-Silva e colaboradores (2006) e as fases foram determinadas pelas características morfológicas externas definidas pelo mesmo (Figura 9). As posturas controladas foram realizadas em colaboração com o pesquisador Thiago da Silva Depintor.

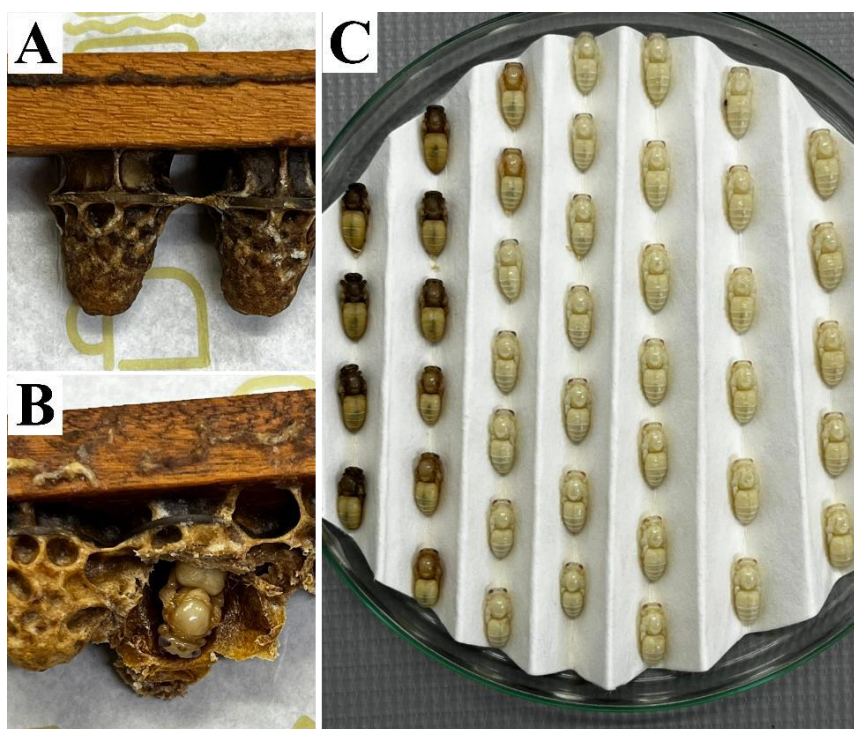


Figura 9: Postura controlada de rainhas de *Apis mellifera*.

a) Realeiras artificiais utilizadas para criação de rainhas; b) Realeira artificial expondo uma pupa de rainha de *A. mellifera*; c) Pupas de rainhas de *A. mellifera* em diversas as fases do desenvolvimento, organizadas de acordo com a pigmentação dos olhos (rosa para marrom, da direita para esquerda) e intensidade de pigmentação corporal

(mais próximo da emergência na extremidade esquerda).

3.4. Operárias naturais de *Frieseomelitta varia* e *Apis mellifera*

As amostras de operárias foram obtidas diretamente das colônias naturais mantidas nas dependências do LBDA, estas foram coletadas para dissecação e marcação dos ovários para estudo da morfologia. Para *F. varia*, foram coletadas células de cria mais velhas, de coloração clara com fácil visualização das pupas em seu interior. Para *A. mellifera*, as operárias foram coletadas de quadros de cria das colônias naturais. As pupas de operárias de ambas as espécies foram extraídas com o auxílio de pinças e classificadas de acordo com os parâmetros definidos para rainhas da espécie (item 3.2.2.).

3.5. Caracterização morfológica dos ovários de rainhas e operárias de *Frieseomelitta varia* e *Apis mellifera*

3.5.1. Dissecação dos ovários

Pupas de rainhas e operárias de *F. varia* e *A. mellifera* foram fixadas com alfinetes entomológicos em uma placa de Petri com cera. O abdômen foi aberto e fixado com alfinetes de modo a expor o interior. O espécime foi submerso em salina 0.09% e os ovários foram retirados com o auxílio de pinças e, posteriormente, transferidos para uma lâmina escavada para o processo de fixação e marcação dos núcleos e filamentos de actina.

3.6. Marcação das estruturas celulares

Dos marcadores selecionados para visualização das estruturas células do ovário, o DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) é um marcador fluorescente sintético de alta afinidade com o DNA, devido as cargas positivas em sua estrutura (Eriksson et al., 1993; Williamson; Fennell, 1975) e a faloidina é uma falotoxina oriunda do cogumelo venenoso *Amanita phalloides*, correspondendo a um peptídeo cíclico que interage com a actina polimerizada (actina F) (utilizada versão comercial Anti-NG2, anticorpo conjugado Alexa Fluor™ 488) (Faulstich et al., 1988).

Para marcação das estruturas em *F. varia*, os ovários dissecados foram dispostos em uma lâmina escavada e incubados, sucessivamente, com paraformaldeído 4% em volume suficiente para cobrir as amostras, 90 uL DAPI + Faloidina (nas proporções 1:1000 e 1:300, respectivamente, diluídos em PBS – em tradução livre Tampão Fosfato de Sódio) por períodos de 30 minutos no escuro e sob agitação. Após cada incubação, foram realizados três ciclos de lavagem de 5 minutos com solução de PBS com Tween 1% (PTW), no escuro e sob agitação. O mesmo protocolo foi aplicado para os ovários de *A. mellifera*, porém, com incubações de 50

minutos. Após a marcação das estruturas, os ovários foram transferidos cuidadosamente para uma lâmina com glicerol e selados com uma lamínula e esmalte nas laterais. As imagens foram obtidas em Microscópio de Fluorescência (*Zeiss com AxioCam MRc*).

4. Resultados

4.1. Criação in vitro e determinação do tempo de desenvolvimento de rainhas de *Frieseomelitta varia*

Com o sucesso na implementação do protocolo de criação in vitro foram realizadas, ao todo, 19 transferências, com material oriundo de 12 colônias diferentes. Após a transferência, a sobrevivência das larvas foi aferida com o auxílio de uma lupa (*Leica*) que permitia visualizar a movimentação e respiração dos indivíduos. Algumas larvas não sobreviviam ao processo de transferência, pois larvas jovens são sensíveis à manipulação ou afogavam no alimento depositado nos poços. A estufa permitiu mimetizar as condições ótimas de criação, não havendo ressecamento ou cristalização do alimento larval. Apenas 10 experimentos (transferências 1 a 9 e 11) foram utilizados para delimitar o tempo de desenvolvimento das rainhas (Tabela 1), pois próximo a troca de estação (meses de maio e junho/2024) as transferências tornaram-se inviáveis, primeiro pelo insucesso devido a alterações das características antes utilizadas para padronização das fases e, segundo, para não prejudicar as colônias que ficam mais fracas com a entrada das estações mais frias.

Tabela 1: Tempo em dias do desenvolvimento de rainhas de *Frieseomelitta varia* criadas in vitro.

Fases	LPD	LD	PB	PR	PM	PL	PMD	PE	RE
N ¹	137	16	51	34	49	34	21	23	13
Média ²	7,23 ± 1,84	10,35 ± 1,62	17,00 ± 2,11	20,68 ± 1,47	22,22 ± 2,18	26,24 ± 2,18	29,29 ± 1,35	31,09 ± 1,76	31,92 ± 1,03

¹Número de indivíduos; ²Média ponderada ± Desvio padrão em dias. LPD = Larva pré-defecante, LD = Larva defecante; PR = Pupa de olho rosa; PM = Pupa de olho marrom; PL = Pupa de pigmentação corporal leve; PMD = Pupa de pigmentação corporal média; PE = Pupa de pigmentação corporal escura; RE = Adulta Recém-emergida.

As larvas foram descritas como pré-defecantes, em estágio final de alimentação, com $7,23 \pm 1,84$ dias após a transferência (Figura 10A), restando apenas uma gota de alimento não consumido. Em seguida, no $10,35 \pm 1,62$ dia após a transferência, já eram possíveis observar os primeiros sinais de fezes, caracterizando a fase larval defecante (Figura 10B), quando a larva parou de se alimentar e passou a defecar, em preparação para metamorfose.

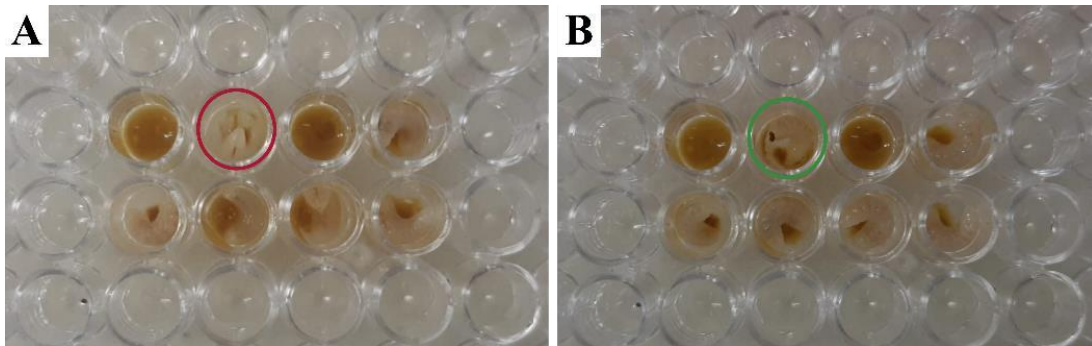


Figura 10: Larvas de rainha de *Frieseomelitta varia* criadas *in vitro* em placa de 96 poços com alimento larval. Observação fotográfica para caracterização dos íntares larvais. a) Destaque em vermelho para larva pré-defecante (LPD) caracterizada pelo consumo quase total do alimento, restando apenas uma gota ao fundo; b) Destaque em verde para larva defecante (LD), com a qual podem ser visualizadas as primeiras fezes.

A fase pupal teve início $17,00 \pm 2,11$ dias após o momento da transferência (Figura 11A). As pupas de olhos brancos foram realocadas para uma placa de Petri com papel filtro e mantidas em estufa nas mesmas condições anteriores (30°C e umidade relativa em 75%). A coloração dos olhos pode ser descrita como rosa no dia $20,68 \pm 1,47$ e marrom no dia $22,22 \pm 2,18$ a partir da transferência (Figura 11B-C). A aquisição de pigmentação corporal teve início com $26,24 \pm 2,18$ dias, sendo caracterizada como leve e, em seguida, como média e escura nos dias $29,29 \pm 1,35$ e $31,09 \pm 1,76$, respectivamente (Figura 11D-E). A emergência do indivíduo adulto ocorreu no dia $31,92 \pm 1,03$. Parte do desenvolvimento pupal está apresentado na Figura 12.

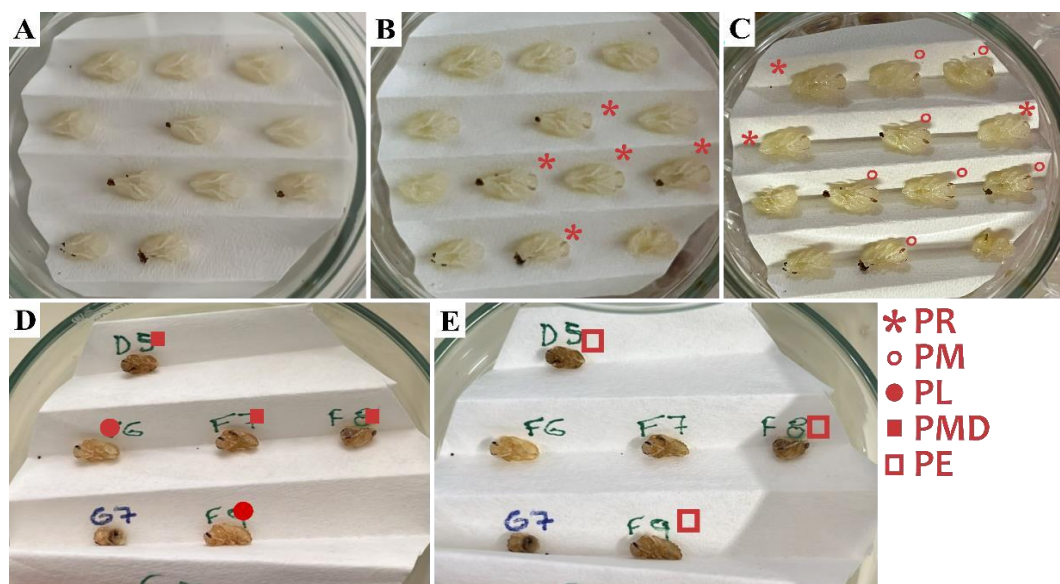


Figura 11: Desenvolvimento pupal de rainhas de *Frieseomelitta varia* criadas *in vitro*.

a) Pupas de olho branco; b) Pupas de olho branco e rosa; c) Pupas de olho marrom e rosa; d/e) Pupas com diferentes

níveis de pigmentação corporal. Legenda: PR = Pupa de olho rosa; PM = Pupa de olho marrom; PL = Pupa de pigmentação corporal leve; PMD = Pupa de pigmentação corporal média; PE = Pupa de pigmentação corporal escura.

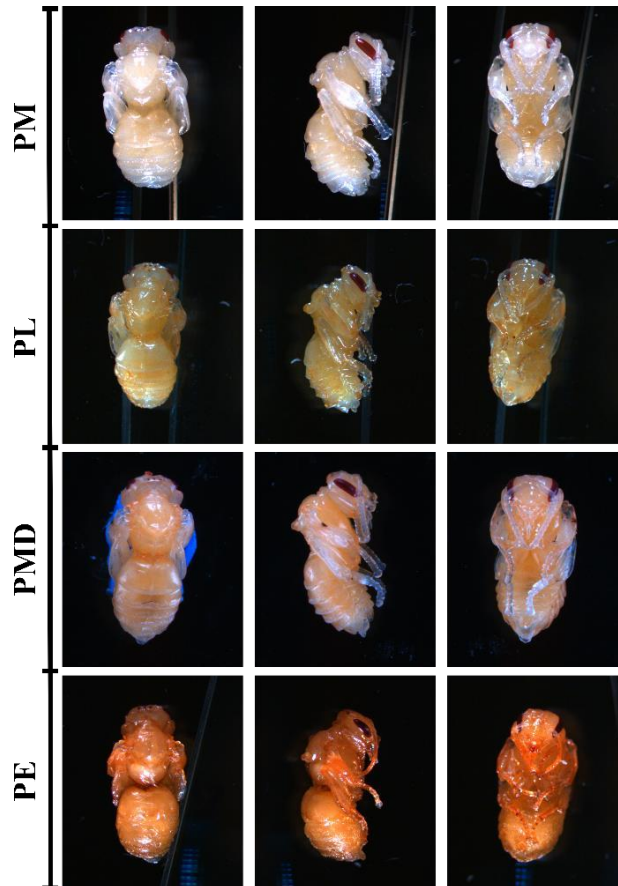


Figura 12: Fotografias de rainhas de *Frieseomelitta varia* criadas *in vitro* no desenvolvimento pupal.

PM = Pupa de olho marrom; PL = Pupa de pigmentação corporal leve; PE = Pupa de pigmentação corporal escura.

As rainhas obtidas apresentaram um abdômen maior em relação às operárias naturais observadas, além da ausência de corbícula, como esperado (Figura 13). O peso das rainhas foi aferido em diferentes fases do desenvolvimento, antes da dissecação. A Figura 14 apresenta, por meio de boxplot, a relação do peso aferido em diferentes fases do desenvolvimento. Neste, é possível visualizar qual o peso médio das rainhas, e a queda dos valores com o fim da fase de alimentação.



Figura 13: Fotografia de rainhas e operárias adultas recém-emergidas da espécie *Frieseomelitta varia*. RA = rainha; OP = operária; RE = recém-emergida.

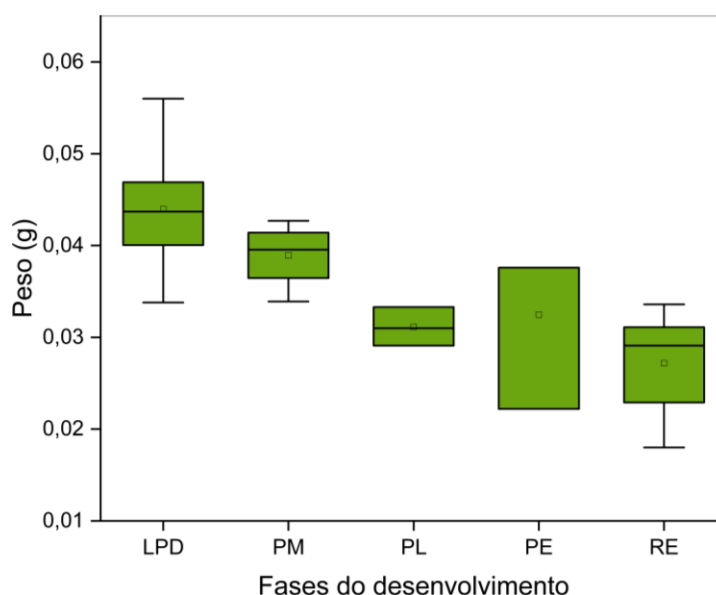


Figura 14: Variação do peso de rainhas de *Frieseomelitta varia* criadas *in vitro* em diferentes etapas do desenvolvimento.

Neste, as linhas horizontais são os limites superior e inferior, o box é delimitado pelo terceiro quartil (superior) e primeiro quartil (inferior), sendo a linha vertical central a mediana e o círculo a média. LPD = Larva pré-defecante; PM = Pupa de olho marrom; PL = Pupa de pigmentação corporal leve; PE = Pupa de pigmentação corporal escura; RE = Adulta Recém-emergida.

4.2. Caracterização morfológica do ovário de rainhas e operárias de *Frieseomelitta varia*

A descrição da morfologia dos ovários de rainhas criadas *in vitro* e operárias naturais coletadas das colônias foi obtida por meio do tratamento dos ovários com marcadores com corante fluorescente específicos que permitem a visualização dos núcleos (DAPI) e dos

filamentos de f-actina (Faloidina). O procedimento resultou em imagens de rainhas em fase larval pré-defecante, pupa de olho branco e pupa de olho marrom sem pigmentação e com pigmentação leve e escura; e operárias naturais em fase larval defecante, adulta recém-emergida e forrageira, além de uma fase adulta de idade desconhecida.

O ovário de larvas de rainhas criadas *in vitro* em estágio pré-defecante (Figura 15), apresentam quatro ovariólos, cuja estrutura assemelha-se a “dedos”, unidos por um longo filamento (Figura 15-B, seta). O corpo dos ovariólos parece ser composto por diversos agrupamentos de células unidos por polifusomas, os quais são fortemente marcados com faloidina, gerando um acúmulo central circundado por uma região delimitada pela actina cortical presente ao redor das células (Figura 15-B, círculo). Em uma das extremidades, ou “ponta do dedo”, há um agrupamento de células (núcleos e filamentos de actina visíveis) seguido por uma região em anel com escassez de núcleos e majoritariamente marcada por faloidina (Figura 15-A, círculo).

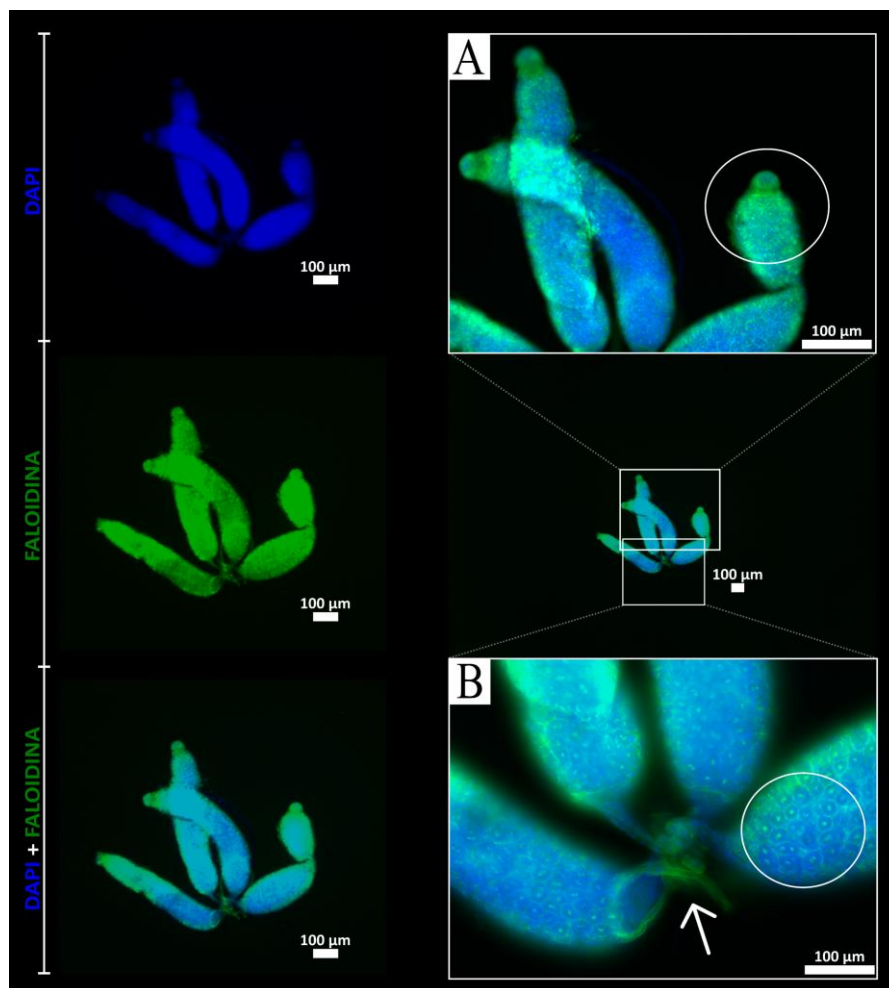


Figura 15: Microscopia de fluorescência de ovários de rainhas de *Frieseomelitta varia* criadas *in vitro* em fase larval pré-defecante.

Ovários de larva pré-defecante com quatro ovariolos unidos na porção proximal pelo filamento suspensório mediano (B, seta). Destaque para a extremidade distal (ou anterior) dos ovariolos (“ponta dos dedos”) que dará origem ao filamento terminal (A, círculo) e a presença de polifusomas (B, círculo).

Uma segunda estrutura foi encontrada ao dissecar espécimes de rainhas em estágio larval pré-defecante (Figura 16), na qual também é observada a presença de quatro ovariolos unidos (Figura 16-A, seta), porém, mais desenvolvidos, já com o filamento terminal afunilado na região mais extrema (Figura 16-B, seta). O corpo do ovariolo apresenta maior acúmulo de células na região distal (Figura 16-B, seta), ao passo que na região central encontram-se células possivelmente na conformação de rosetas, isto é, unidas por polifusoma fortemente marcado com faloidina (pontos mais fortes em verde, Figura 16-B, círculo). A faloidina também marca a actina cortical presente ao redor das células e na bainha peritoneal que recobre os ovariolos.

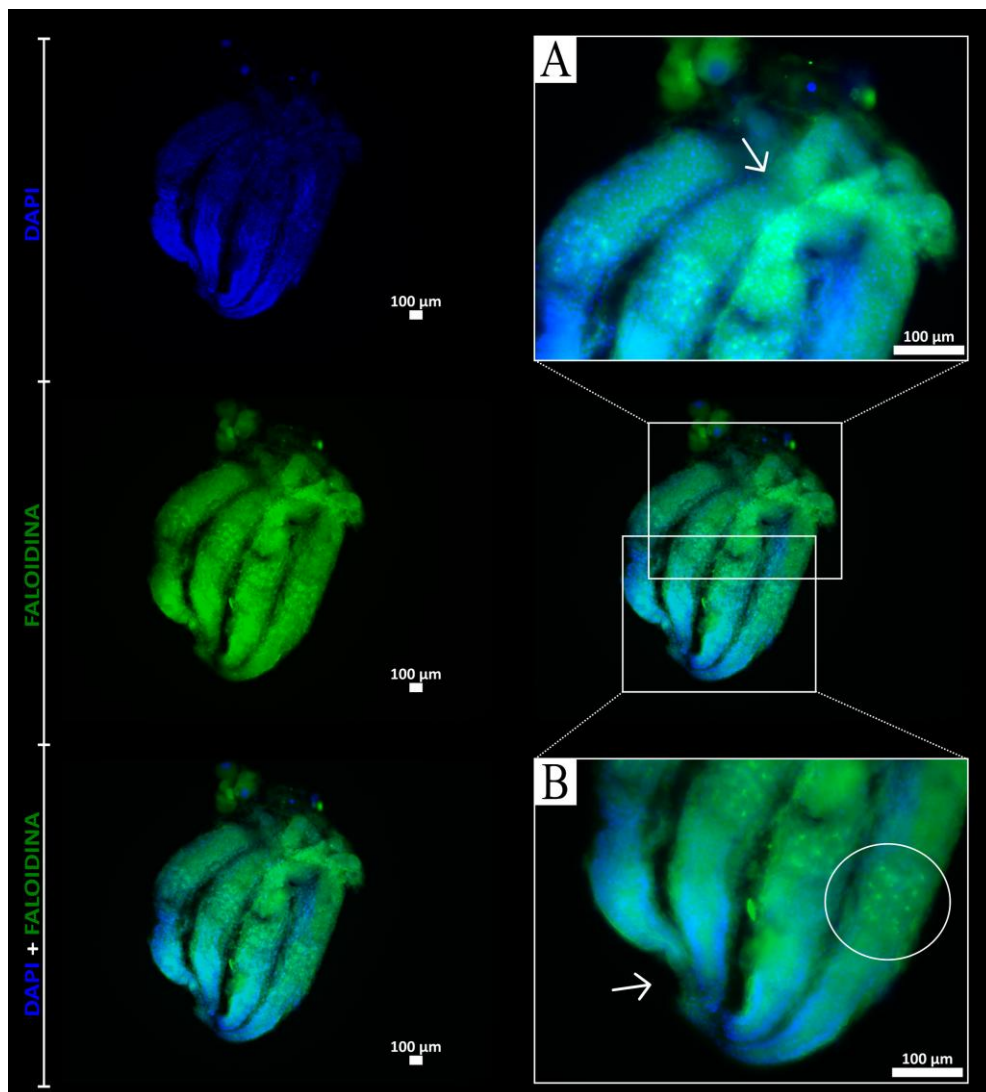


Figura 16: Microscopia de fluorescência de ovários de rainhas de *Frieseomelitta varia* criadas *in vitro* em fase larval pré-defecante tardio.

Ovários de larva pré-defecante em idade tardia, caracterizado por quatro ovaríolos unidos (A, seta) e que afinam na região distal no filamento terminal (B, seta). Também é observada a presença de polifusomas (círculos).

No início do estágio pupal, em pupa de olho branco, observa-se o alongamento da estrutura presente em larvas. Nesta fase, os quatro ovaríolos (Figura 17, *) estão alongados e unidos pelo cálice (Figura 17-C, seta), o qual possui um maior acúmulo de filamentos de actina. A faloidina marca a actina cortical entre as células e bainha peritoneal ao redor do ovaríolos (Figura 17-A e B, setas). Na extremidade distal, o filamento terminal está melhor definido, sendo identificado pelo afunilamento do ovaríolo (Figura 17- D).

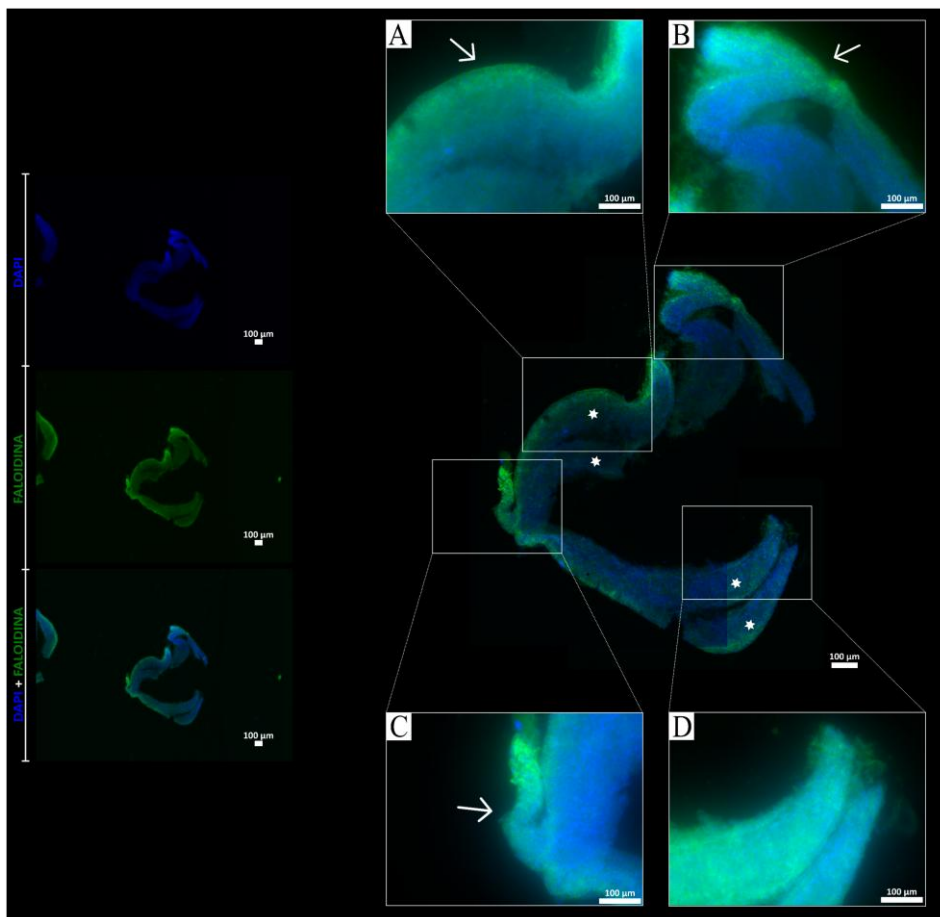


Figura 17: Microscopia de fluorescência de ovários de rainhas de *Frieseomelitta varia* criadas *in vitro* em fase de pupa de olho branco.

Ovário de pupa de olho branco, com quatro ovaríolos (*) unidos por um cálice (C, seta) envolto em filamentos de actina marcados com faloidina (A/B). Neste, os ovaríolos estão alongados e afunilados na extremidade distal, caracterizando o filamento terminal (D). Quadro construído a partir da sobreposição de imagens.

No estágio pupal com pigmentação marrom nos olhos (Figura 18), a morfologia dos ovários de rainhas criadas *in vitro* sofre um salto de desenvolvimento. A quantidade de

ovariolos se mantém (Figura 18-D, *), porém mais longos e ainda unidos pelo cálice na porção proximal (Figura 18-C), semelhantes ao observado na fase adulta. Nesta fase, mais uma vez é detectada a faloidina evidenciando a actina na actina cortical e o citoesqueleto das células que compõem a bainha peritoneal que envolve os ovariolos (Figura 18-A, seta).

Ovário de pupa de olho marrom com quatro ovariolos (D, *) unidos na região basal (C), envoltos pela bainha peritoneal (A, seta) e afinando até o filamento terminal (B, seta). Quadro construído a partir da sobreposição de imagens.

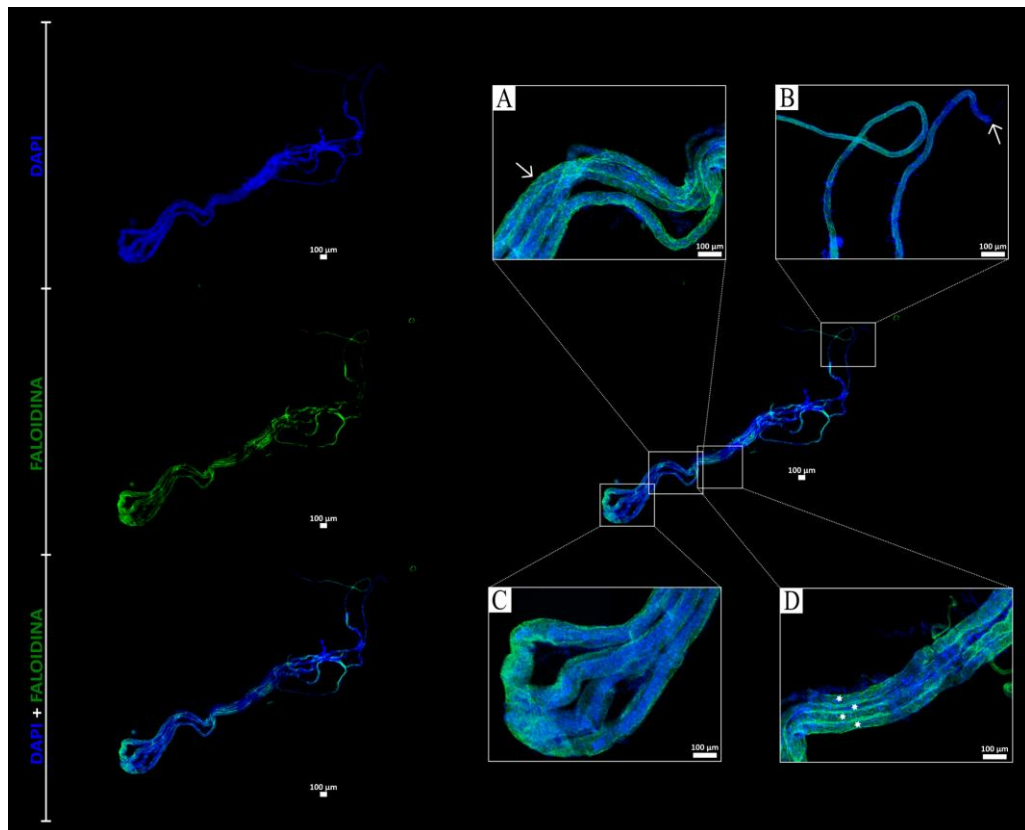


Figura 18: Microscopia de fluorescência de ovários de rainhas de *Frieseomelitta varia* criadas *in vitro* em fase de pupa de olho marrom.

A estrutura geral observada na fase de pupa de olho marrom é mantida até o final do desenvolvimento. Em pupas de pigmentação corporal leve (Figura 19) e escura (Figura 20), novamente, são visualizados quatro ovariolos unidos na região do cálice na porção proximal dos ovários (Figura 19-A e Figura 20-A). Nestes, a faloidina marca a actina cortical ao redor das células e na bainha peritoneal que envolve os ovariolos, onde apresenta um padrão organizado e homogêneo. Os ovariolos afinam conforme chegam à região do filamento terminal (Figura 19-D, seta e Figura 20-A, seta).

Contudo, os ovaríolos de pupa com pigmentação leve são mais longos, em comparação com a fase anteriormente descrita, encontrando-se enrolados na região central (Figura 19). Neste, também há presença de polifusomas (Figura 19-B/C, círculo) e canais em anel (Figura 19-A, círculo) ao longo da região proximal da estrutura. Em contraponto, nas condições utilizadas para capturar as imagens de pupa de pigmentação escura não foi possível observar polifusomas ou canais em anel (Figura 20). Ainda, por se tratar de uma fase mais avançada, é possível observar a presença de traqueias (Figura 19-D, seta) e o enovelamento dos ovaríolos na extremidade próxima ao filamento terminal o que dificulta a manipulação dos ovários nesta e em fases mais avançadas do desenvolvimento.

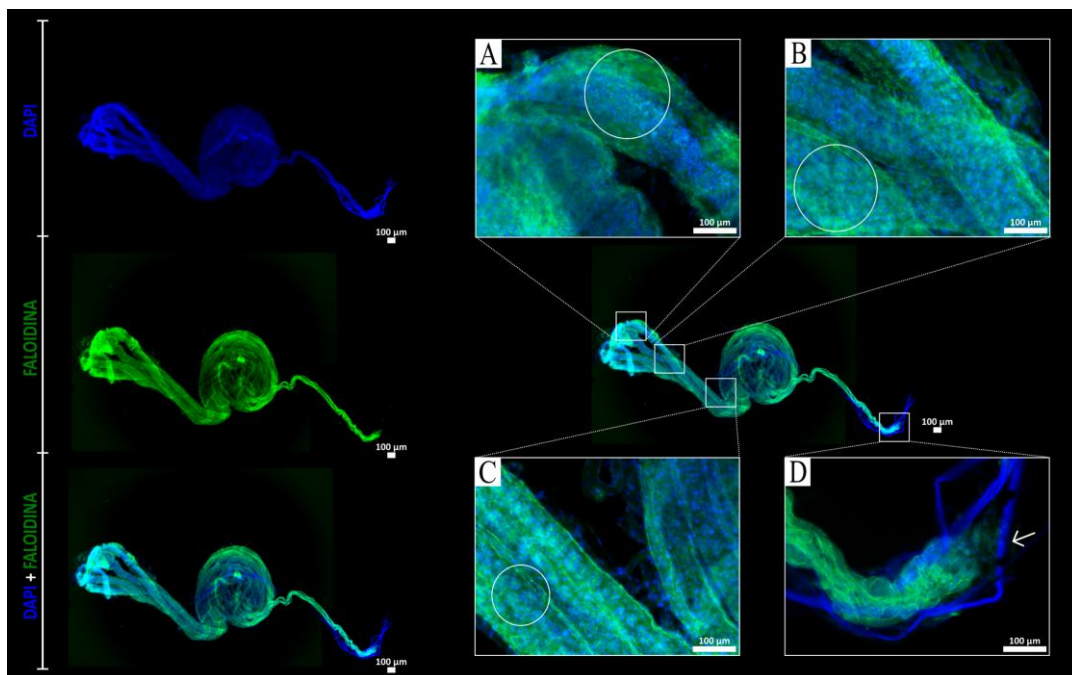


Figura 19: Microscopia de fluorescência de ovários de rainhas de *Frieseomelitta varia* criadas *in vitro* em fase de pupa de pigmentação corporal leve.

Ovário de pupa de pigmentação corporal leve, no qual observa-se a presença de agrupamentos celulares unidos por polifusomas (B e C, círculo) e canais em anel (A, círculo); além do filamento longo terminal (D, seta). Quadro construído a partir da sobreposição de imagens.

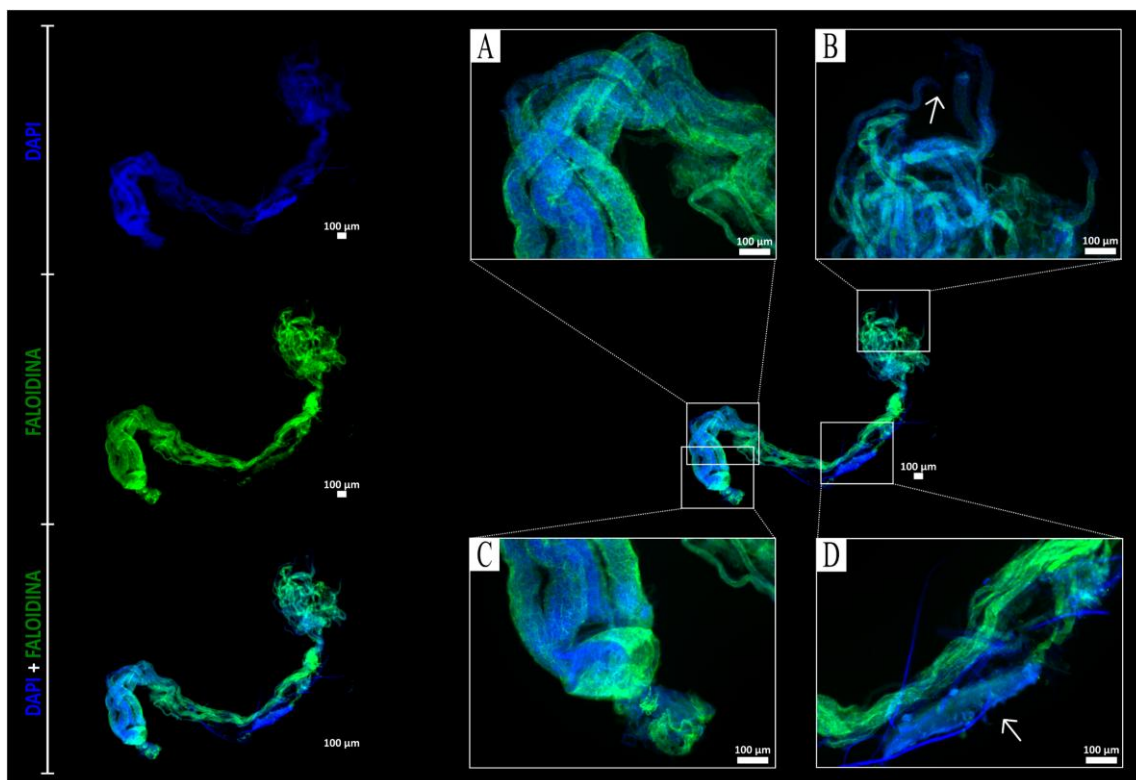


Figura 20: Microscopia de fluorescência de ovários de rainhas de *Frieseomelitta varia* criadas *in vitro* em fase de pupa com pigmentação corporal escura.

Ovário de pupa de pigmentação corporal escura, com destaque para presença de quatro ovaríolos (A) unidos pelo cálice (C), o filamento longo terminal (B, seta) e as traqueias (D).

Utilizando como exemplo a estrutura dos ovários de pupas com pigmentação corporal leve, observando os elementos presentes é possível segmentar as partes do ovaríolo. Como citado no item 1.4, o filamento terminal é caracterizado por células de núcleo achatado empilhadas (Figura 21-C, círculo). O germário distal (Figura 21-B) pode ser identificado pela presença de células arredondadas, na transição com o filamento terminal, e polifusomas, facilmente visualizados pela coloração da faloidina que marca as pontes citoplasmáticas entre as células. Por fim, no germário proximal, os polifusomas são substituídos por canais em anel, também facilmente visualizados pela marcação com faloidina (Figura 21-C).

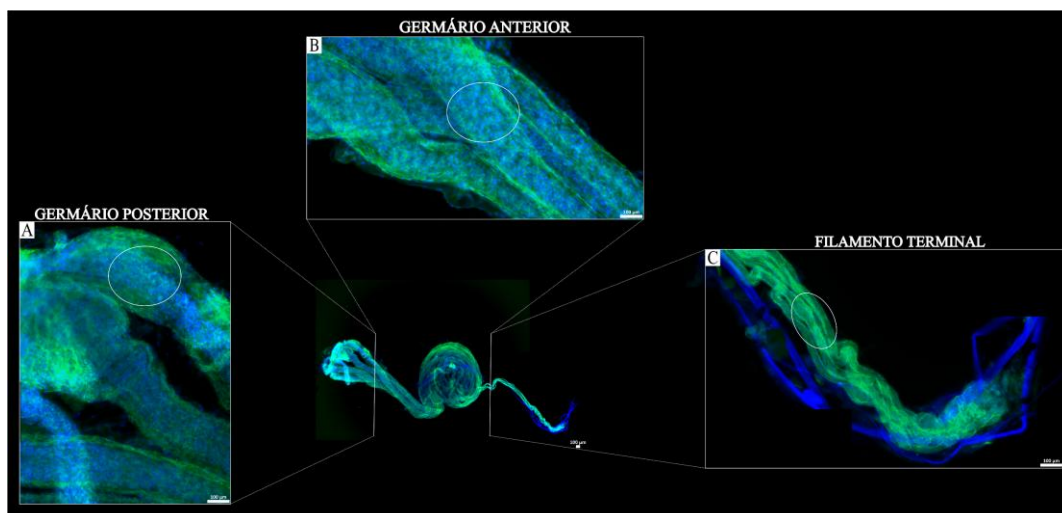


Figura 21: Estrutura dos ovaríolos de rainhas de *Frieseomelitta varia*.

Com destaque para germário proximal, caracterizado pela presença dos canais em anel (A, círculo); germário distal, caracterizado pela presença dos polifusomas (B, círculo); e filamento terminal, identificado pela presença de células com núcleos achatados parcialmente intercalados (C, círculo). Quadro construído a partir da sobreposição de imagens.

O estudo dos ovários de operárias se deu a partir de indivíduos coletados diretamente nas colônias nas fases desejadas. A Figura 22 apresenta um par de ovários unidos pelo ligamento suspensório mediano (Figura 22-B, seta), coletado de larvas de operárias naturais em estágio defecante, sem idade precisa. Cada ovário apresenta quatro ovaríolos (Figura 22-A e C, *) unidos e recobertos pela bainha peritoneal, percebida pela presença de núcleos diferentes ao redor da estrutura, mais próximo à musculatura. Na extremidade distal é possível observar o filamento terminal (Figura 22-A, seta), caracterizado pela presença de células de núcleo achatado parcialmente intercalada, como descrito anteriormente por Boleli e colaboradores (1999), que observou que em operárias de *F. varia* as células do filamento terminal não se apresentam perfeitamente sobrepostas. Além disso, observa-se a faloidina marcando a actina cortical ao redor das células, a estrutura muscular ao redor do ovário e possíveis polifusomas (Figura 22-A, círculo) formando uma espécie de cinturão.

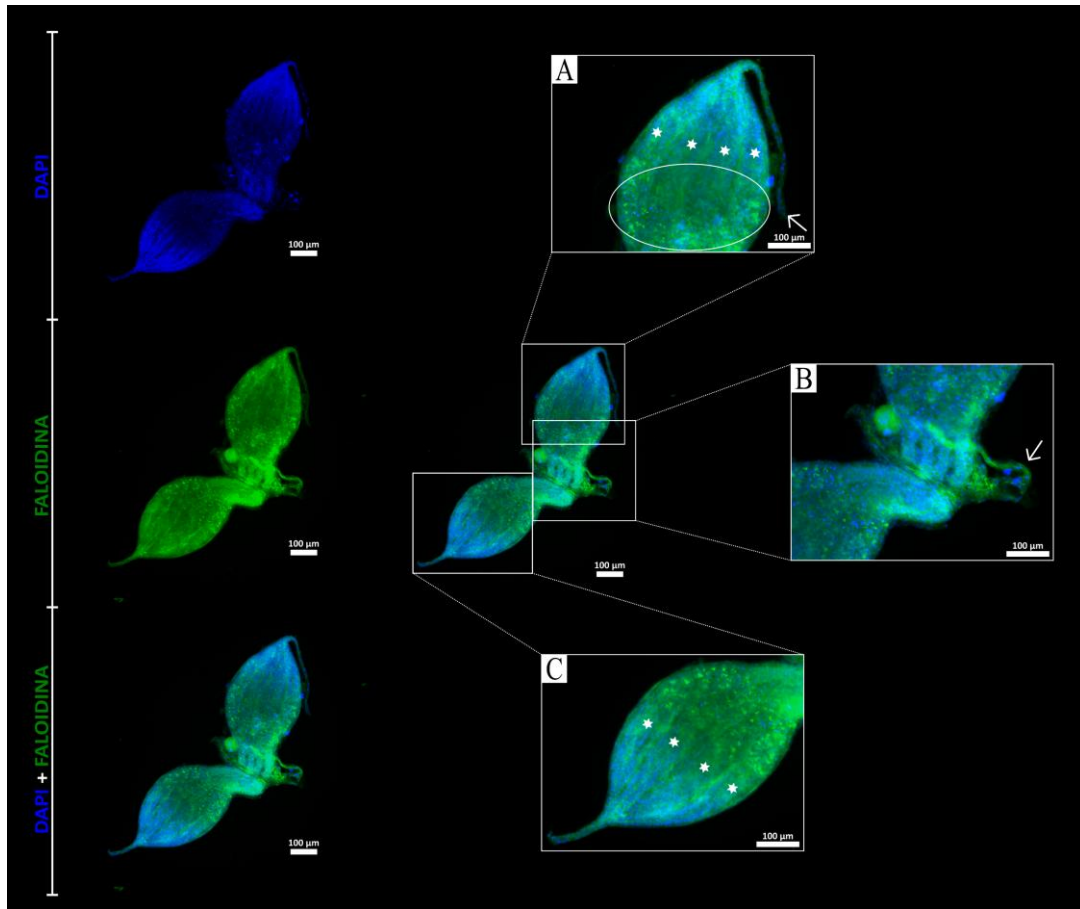


Figura 22: Microscopia de fluorescência de ovários de operárias naturais de *Frieseomelitta varia* em fase larval defecante.

Ovários de larva defecante, unidos pelo filamento suspensório mediano (B, seta), com quatro ovaríolos (A e C, *) bem definidos que culminam em um filamento terminal (A, seta) e a presença de um cinturão de células com acúmulo de faloidina (A, círculo).

No momento da emergência do indivíduo adulto, o processo de morte celular programada já está bastante evoluído. Ainda se observam quatro ovaríolos (Figura 23, *), porém pouco delimitados e assimétricos. Nestes, a distribuição uniforme da marcação pela faloidina sugere a presença da bainha peritoneal ainda organizada (Figura 23-B, círculo). Além da deformação dos ovaríolos, o processo de morte celular também é identificado pela presença de núcleos fragmentados (Figura 23-A, círculo) e pelo acúmulo de filamentos de actina na região do cálice (Figura 23-A, círculo), onde a desorganização do citoesqueleto pode ser analisada.

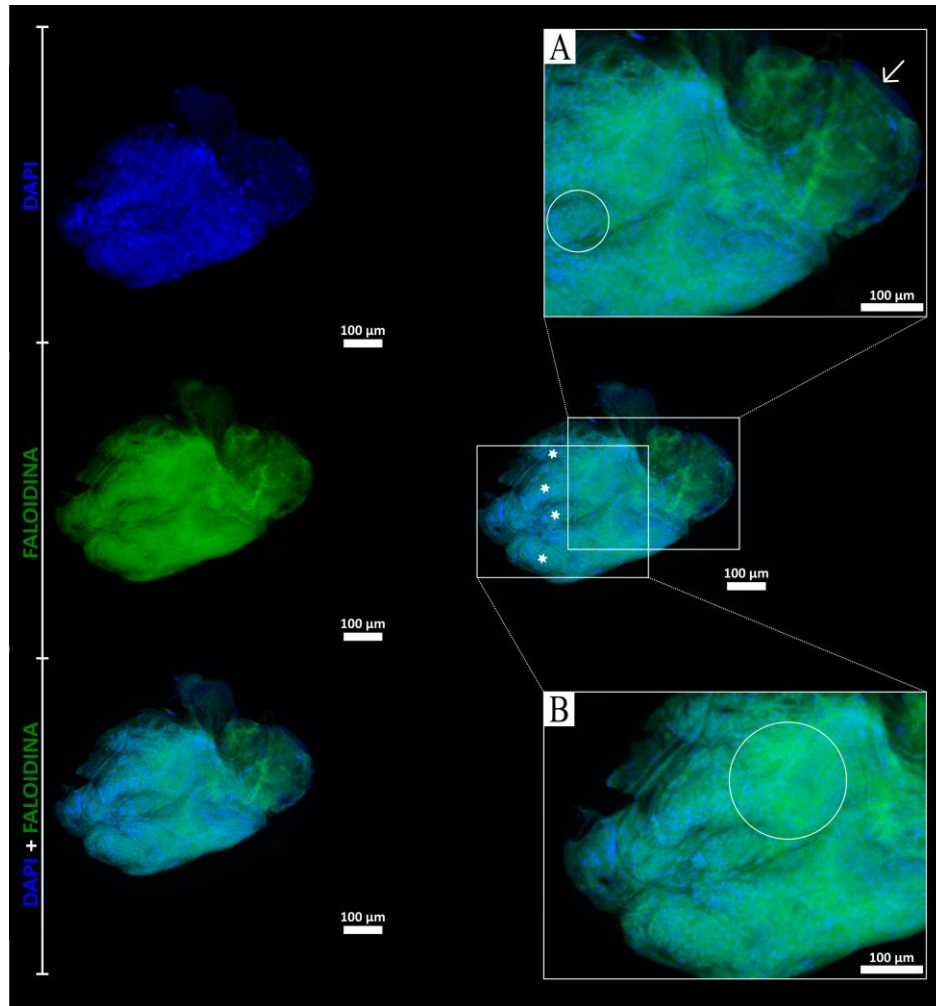


Figura 23: Microscopia de fluorescência de ovários de operárias naturais de *Frieseomelitta varia* recém-emergidas.

Ovário de operária natural adulta imediatamente após a emergência. Neste estão presentes quatro ovaríolos cuja assimetria (*) é consequência do processo de morte celular programada. A faloidina marca a musculatura ainda organizada (B, círculo) e os filamentos de actina acumulados na região do cálice. O DAPI permite a visualização de núcleos fragmentados (A, círculo) também característico do processo de morte celular.

Ao final do desenvolvimento pupal e nos ovários de forrageiras (Figura 24) não é mais possível discernir claramente os ovaríolos. A marcação da faloidina perdeu sua distribuição uniforme na bainha peritoneal ao redor dos ovaríolos. Portanto, observa-se uma desorganização deste tecido (Figura 24-A, seta), característica do processo de degeneração, podendo até mesmo ser visto um acúmulo de filamentos de actina no ovário direito (Figura 24-A, seta). Nestes casos, não é possível discernir se a túnica própria, mais interna, também se apresenta desorganizada, pois a estrutura dos ovaríolos não é claramente delimitada. Ainda, o processo de morte celular pode ser detectado por meio da fragmentação dos núcleos marcados com DAPI (Figura 24-B, círculo). Nos ovários de operária adulta com idade desconhecida, os ovários apresentam claros sinais de degeneração (Figura 25), com a desorganização do citoesqueleto celular que compõe

a bainha peritoneal, havendo acúmulo de filamentos próximo ao cálice e na região distal (Figura 25-B e C, seta); e pela fragmentação dos núcleos marcados com DAPI (Figura 25-C, círculo), em algumas regiões é possível notar núcleos "menores" próximo aos núcleos inteiros, além de lacunas sem estruturas celulares (Figura 25-A, círculo). Contudo, ainda é possível distinguir quatro ovaríolos (Figura 25-C, *).

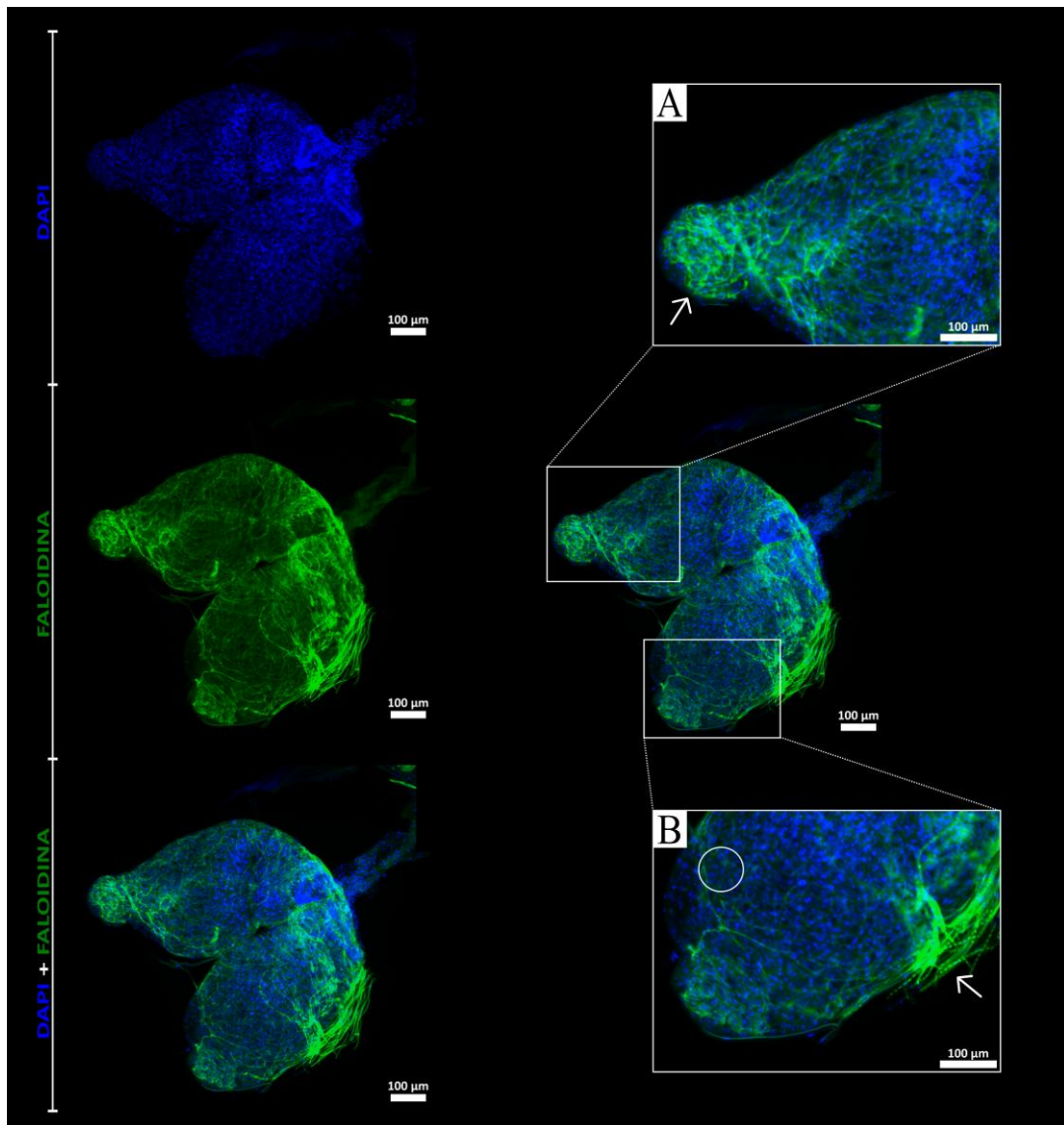


Figura 24: Microscopia de fluorescência de ovários de operárias naturais de *Frieseomelitta varia* em fase de forrageamento.

Ovários de adulta forrageira, com claros sinais de degeneração como acúmulo de filamentos de actina decorrentes da desorganização do citoesqueleto (A e B, setas) e fragmentação do núcleo (B, círculo).

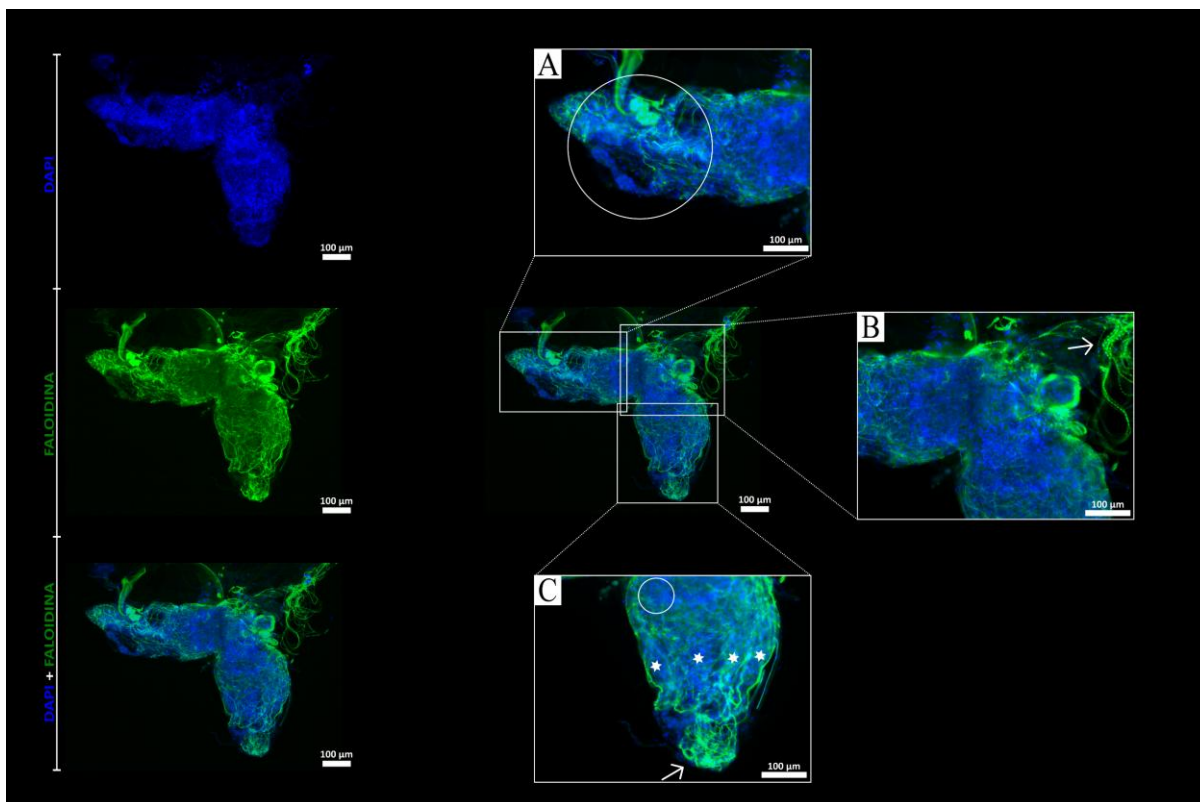


Figura 25: Microscopia de fluorescência de ovários de operárias naturais de *Frieseomelitta varia* adulta de idade desconhecida.

Ovários de adulta com idade desconhecida, com destaque para desorganização da musculatura (C, seta) e acúmulo próximo a região do cálice (B, seta), além de sinais de degradação pela presença de regiões com ausência de células (A, círculo) e núcleos em fragmentação (C, círculo).

4.3. Caracterização morfológica dos ovários de rainhas e operárias de *Apis mellifera*

A descrição da morfologia dos ovários de rainhas originadas de posturas controladas e operárias naturais obtidas diretamente das colônias foi realizada a partir do tratamento dos ovários com marcadores específicos que permitem a visualização dos núcleos (DAPI) e dos filamentos de f-actina (faloidina). O procedimento resultou em imagens de rainhas nas fases pupais de pigmentação marrom nos olhos (PM) e com diferentes intensidades de pigmentação corporal, sendo definidos como leve (PL), médio (PMD) e escuro (PE); e operárias naturais no último ínstar larval (L5F3, do inglês *feeding*), e estágios pupais de olho branco (PB), olho marrom (PM) e diferentes níveis de pigmentação corporal (PL e PE), além de uma fase adulta recém- emergida (RE).

No que diz respeito ao desenvolvimento pupal de rainhas de *A. mellifera*, em pupa com pigmentação marrom nos olhos, o ovário já apresenta a estrutura como observada na fase adulta (Figura 26), com grande volume de ovários unidos pelo cálice e afunilados na extremidade distal (Figura 26-A e F), onde visualizam-se células de núcleos achatados, caracterizando o

filamento terminal (Figura 26-B, círculo). A faloidina marca a actina cortical entre as células e a bainha peritoneal que recobre os ovaríolos (Figura 26-C e D). Esta última, notavelmente densa nos ovários de rainhas de *A. mellifera*, impede a visualização nítida dos polifusomas, que são identificados pela conformação de rosetas observada pela marcação em DAPI. Nos aumentos da Figura 26-B (seta) e D, é possível visualizar os núcleos das células que compõe a bainha peritoneal, os quais estão organizados perpendicularmente à estrutura dos ovaríolos. Ainda, nota-se que os ovaríolos organizam-se em grupos de menor volume que, posteriormente, unem-se na região do cálice originando a estrutura maior (Figura 26-E, círculo).

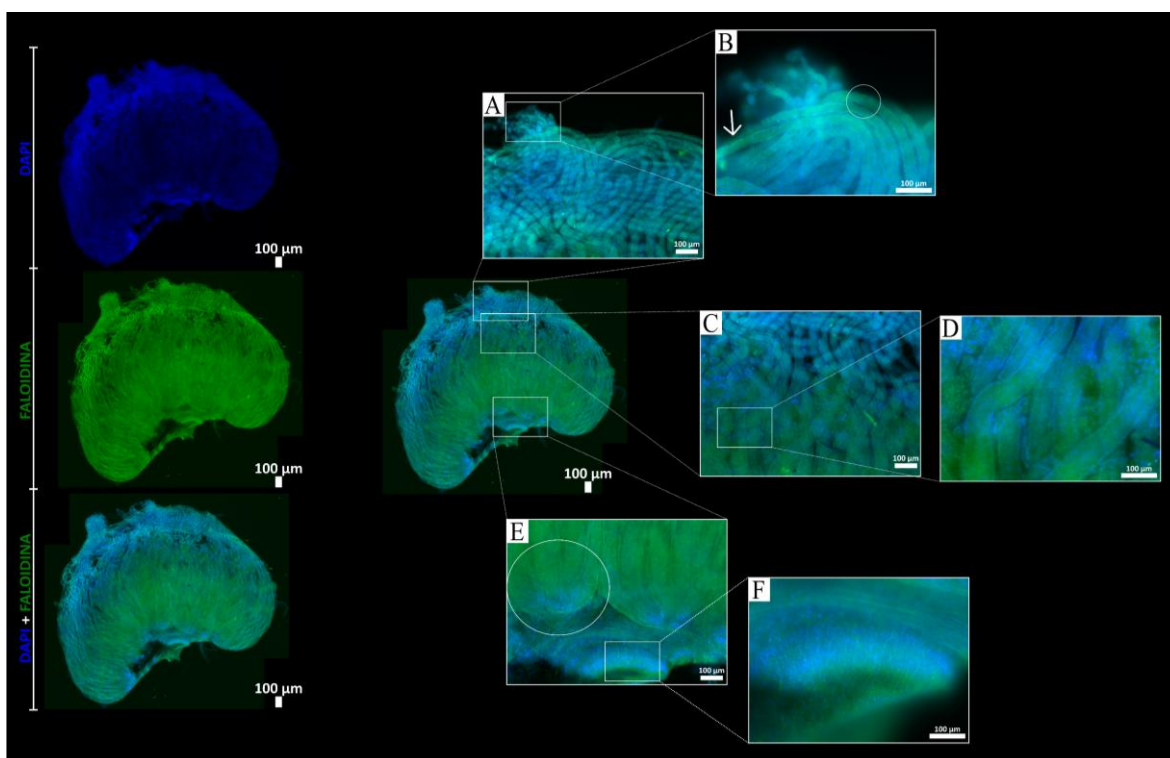


Figura 26: Microscopia de fluorescência de ovários de rainhas de *Apis mellifera* em fase de pupa de olho marrom. Ovário de rainha em fase PM apresenta grande número de ovaríolos que se organizam em subconjuntos (E, círculo). Os ovaríolos destes subconjuntos, se unem-se na região do cálice (F) e afunilam na extremidade distal, caracterizando o filamento terminal (A e B). A faloidina marca a actina cortical e presente na membrana densa que recobre os ovaríolos (B, círculo e C/D).

O padrão observado em PM é mantido ao longo do desenvolvimento pupal, estando presente nas fases tardias (Figura 27-PL, Figura 28-PMD e Figura 29-PE). Os ovaríolos são observados em grande número, organizados em grupos menores que se unem ao cálice dando origem ao ovário. Na região distal, os ovaríolos se afunilam, caracterizando o filamento terminal (Figura 26-B, seta). Em PMD, essa região do ovaríolo é também identificada pela presença de células de núcleos achatados (Figura 27-A e B, círculo). A faloidina marca a actina

cortical e também presente na bainha peritoneal, a qual é densa e dificulta a visualização de estruturas mais internas (Figura 27-A, C e D; Figura 28-D, seta). Quando analisamos apenas a marcação dos núcleos com DAPI, é possível identificar os agrupamentos organizados em rosetas, possivelmente configurando os polifusomas (Anexo 1).

Na última fase do desenvolvimento pupal, em PE, o órgão está intimamente entrelaçado com as demais estruturas presentes no abdômen da rainha. Na Figura 29 (A, B e C, setas), nota-se a presença de diversos túbulos ao redor do ovário, o que, junto à densa bainha peritoneal (círculos), dificulta o discernimento das estruturas internas. A priori, desconfiou-se que tais filamentos eram traqueias, como ocorre com rainhas de *F. varia* em estágios avançados de pupa e no indivíduo adulto. Contudo, as traqueais são auto fluorescentes, emitindo forte fluorescência nos comprimentos de onda utilizados para captura das imagens; neste caso, os filamentos são transparentes e não emitem fluorescência.

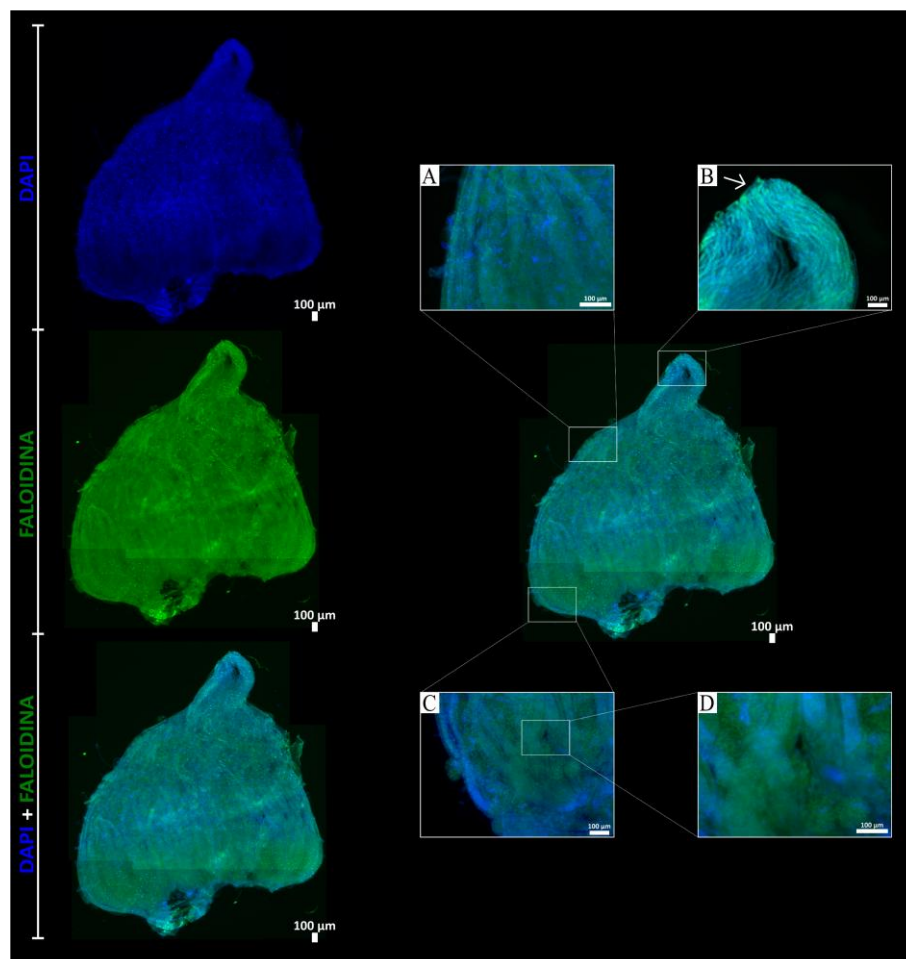


Figura 27: Microscopia de fluorescência de ovários de rainhas de *Apis mellifera* em fase de pupa de pigmentação corporal leve.

Ovário de rainha em fase PL, apresenta morfologia similar à de adultos, com grande quantidade de ovaríolos agrupados em grupos menores que, posteriormente, unem-se na região do cálice. Os ovaríolos afunilam na

extremidade distal, caracterizando o filamento terminal (B, seta). A faloidina marca a actina cortical (C e D) e presente na densa bainha peritoneal que recobre os ovariolos (A). Quadro construído a partir da sobreposição de imagens.

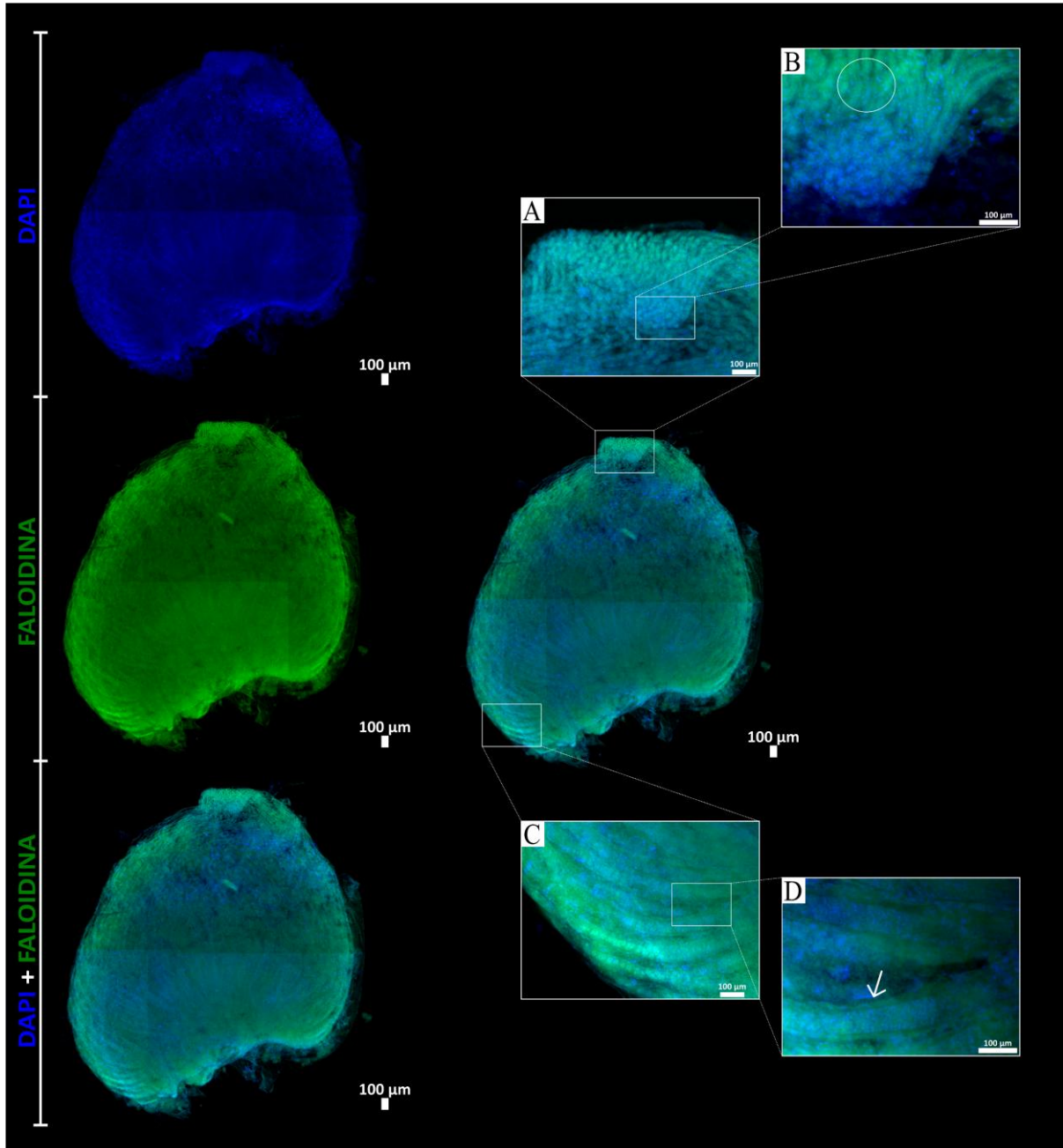


Figura 28: Microscopia de fluorescência de ovários de rainhas de *Apis mellifera* em fase de pupa de pigmentação corporal média.

Ovário de rainha em fase PMD, apresenta morfologia similar à de adultos, com grande quantidade de ovariolos unidos pelo cálice. Os ovariolos afinam na extremidade distal, onde apresentam células achatadas que caracterizam o filamento terminal (A e B, círculo). A faloidina marca a actina cortical e presente na bainha peritoneal densa que recobre os ovariolos (C e D, seta). Quadro construído a partir da sobreposição de imagens.

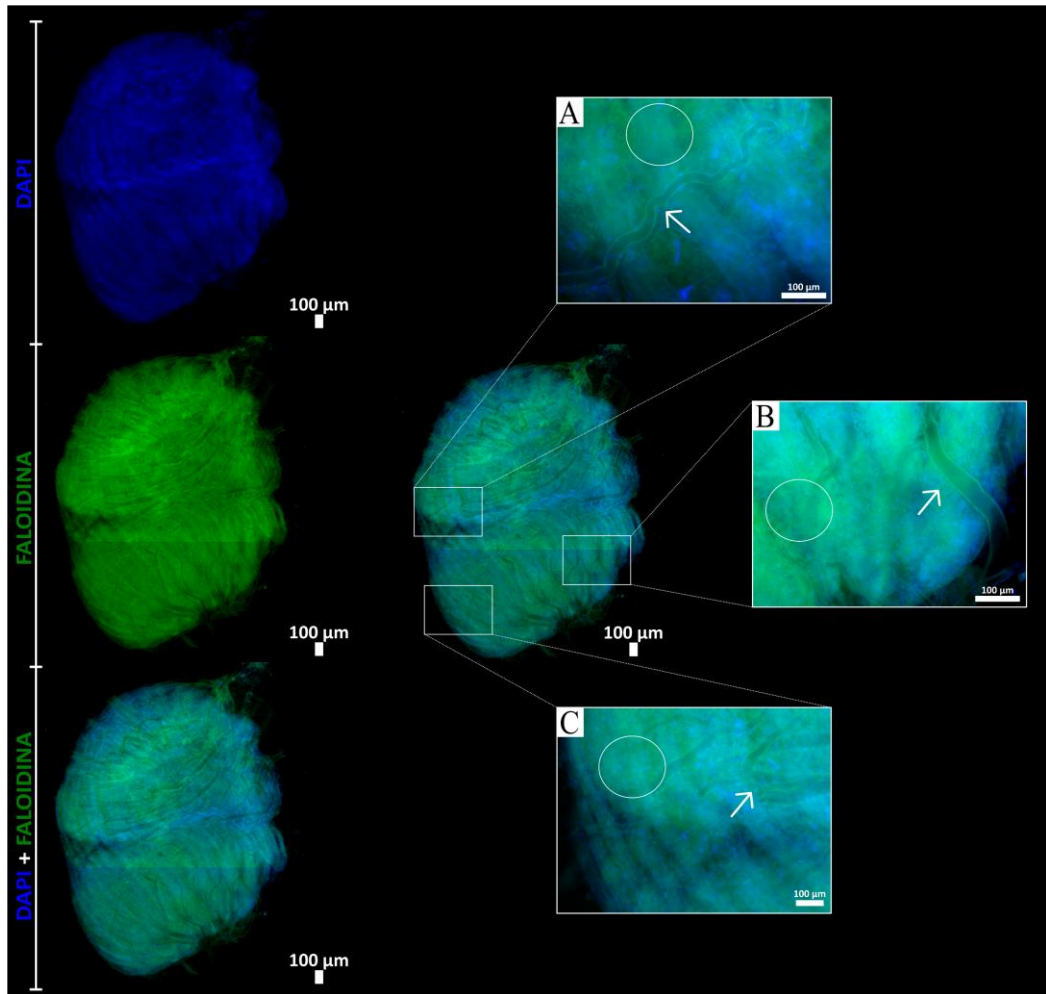


Figura 29: Microscopia de fluorescência de ovários de rainhas de *Apis mellifera* em fase de pupa de pigmentação corporal escura.

Ovário de rainha em fase PE, apresenta a morfologia similar à de indivíduos adultos, com grande quantidade de ovariolos unidos na região do cálice. A faloidina marca a actina cortical e presente na bainha peritoneal (círculos). Há também a presença de túbulos que envolvem o ovário (setas). Quadro construído a partir da sobreposição de imagens.

Ainda analisando o desenvolvimento pupal, um dos agrupamentos menores de ovariolos de PMD foi separado e visualizado individualmente (Figura 30), visando obter maior nitidez das estruturas internas. Neste, observa-se com mais detalhes a bainha peritoneal que recobre os ovariolos (Figura 30-A, seta), a qual é identificada pela presença de núcleos perpendicularmente posicionados, com referência aos núcleos que compõe as estruturas internas, e filamentos de actina bem organizados. Apesar da dificuldade imposta pela bainha peritoneal, é possível identificar os núcleos organizado em rosetas, possivelmente formando polifusomas próximos a extremidade proximal (Figura 30-C, círculo). Ainda, há um maior acúmulo de células na região que se ligará ao cálice (Figura 30-B, seta) e na região que, possivelmente, compreende o germário proximal (Figura 30-C, seta), devido à ausência de polifusomas, contudo, a não

identificação dos canais em anel inviabiliza a determinação exata.

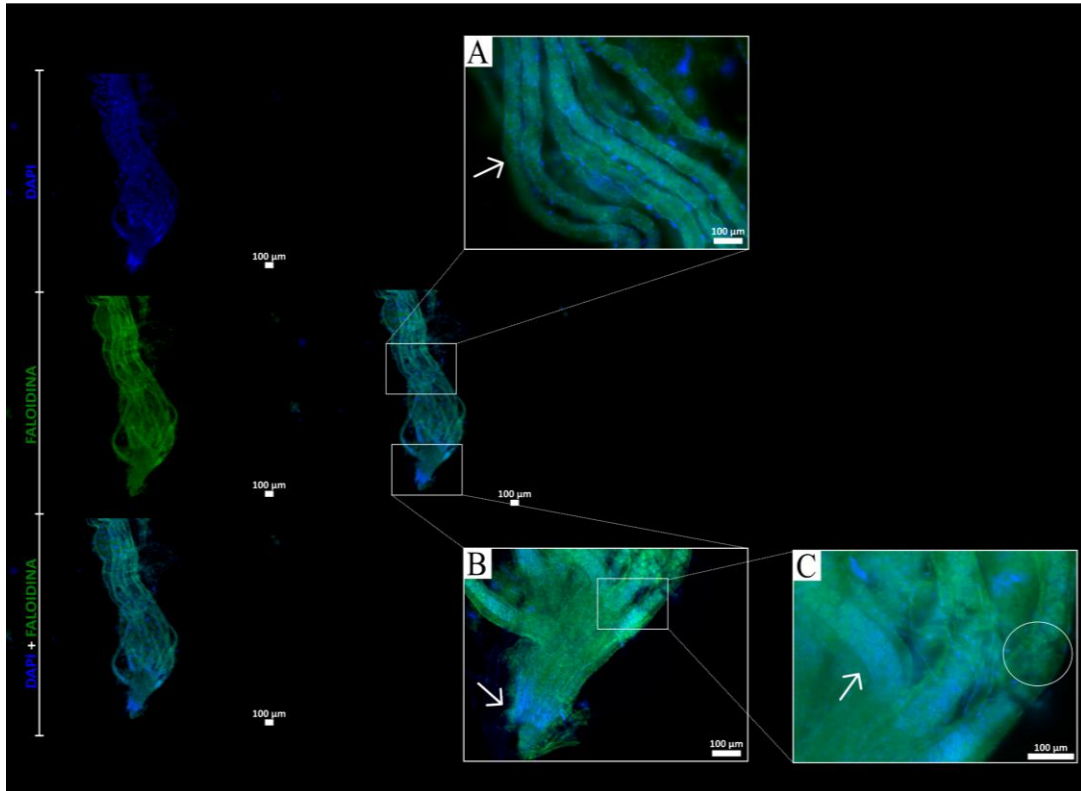


Figura 30: Microscopia de fluorescência de parte do ovário de rainha de *Apis mellifera* em fase de pupa de pigmentação corporal média.

Em destaque a região que se une ao cálice (B, seta) com maior acúmulo de células e a faloidina que marca a bainha peritoneal organizada que recobre os ovaríolos (A, seta). Com maior aumento, identifica-se os núcleos organizados em rosetas e um maior acúmulo na região que possivelmente configura o germário proximal.

Analisando o desenvolvimento de operárias de *A. mellifera* em fase larval, é possível discernir os ovaríolos (Figura 31, tracejado e *) presentes em grande volume, posicionados lado a lado. A estrutura geral assemelha-se a um grão de feijão (Figura 31), cujos ovaríolos são mantidos próximos por uma membrana (Figura 31, seta), que quando rompida, permite o discernimento dos ovaríolos separados. Durante o desenvolvimento pupal, a estrutura alonga-se, afinando na região distal, onde encontra-se o filamento terminal (Figura 32, seta) e organizando-se na estrutura vista em adultos, como observado em pupa de olho branco (PB) (Figura 32). Desde o início das fases pupais, em PB, nota-se que o processo de morte celular programada já está em curso, pois há um menor volume cada vez menor de ovaríolos, além da assimetria do par de ovários (Figura 32). A faloidina marca a actina cortical e presente na bainha peritoneal. Mesmo em operárias, a musculatura é bastante densa, dificultando a visualização de estruturas mais internas ao ovaríolo.

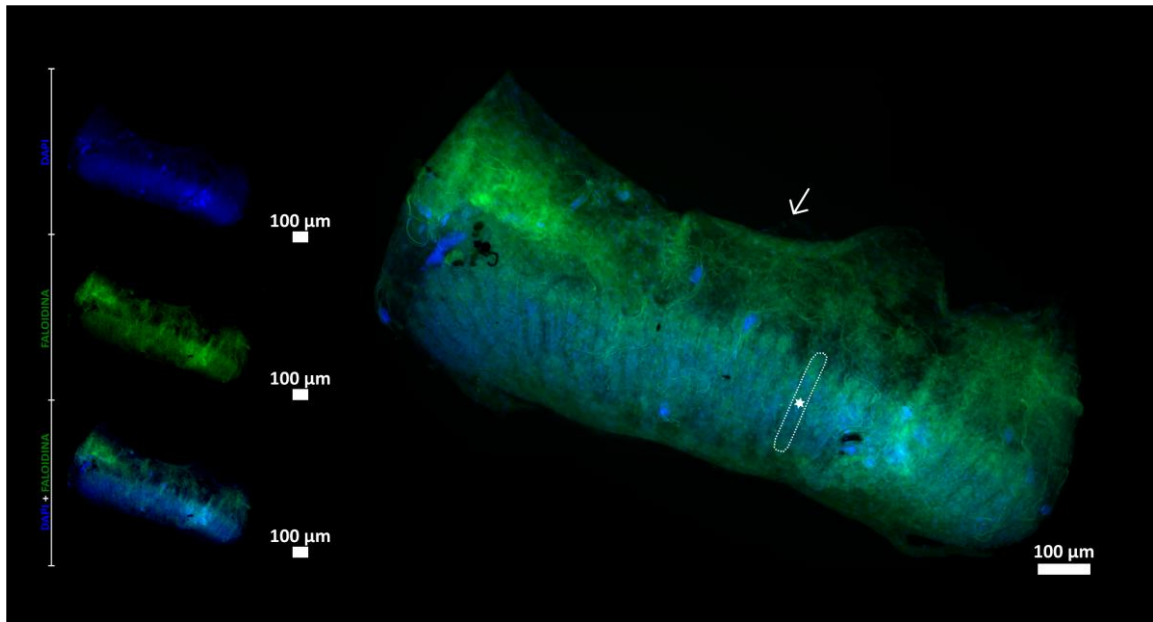


Figura 31: Microscopia de fluorescência de ovários de operárias de *Apis mellifera* no último ínstar larval (L5). Ovário de operária em L5F3, com grande volume de ovaríolos (tracejado e *) organizados paralelamente em formato análogo a um grão de feijão, envoltos por uma membrana que os mantém unidos (seta). Quadro construído a partir da sobreposição de imagens.



Figura 32: Microscopia de fluorescência de ovários de operárias de *Apis mellifera* em fase de pupa de olho branco. Ovário de operária em fase PB. Neste, observa-se o alongamento da estrutura de larva e a redução da quantidade de ovaríolos frente ao processo de morte celular, a qual é assimétrica no par de ovários. Os ovaríolos estão unidos pela região do cálice (círculo) e o filamento terminal apresenta-se na região mais distal (seta). Quadro construído a partir da sobreposição de imagens.

Em pupa de olho marrom, PM, o órgão já apresenta a conformação observado na fase adulta e no ovário direito, em destaque, contam-se seis ovaríolos (*). A estrutura básica é mantida, com ovaríolos unidos pelo cálice na região proximal. O cálice apresenta grande concentração de células, evidenciado pela intensidade de azul ocasionada pela presença de muitos núcleos (Figura 33-C, seta). Na região distal, a estrutura está afunilada, como é característico do filamento terminal, com células achadas, apesar de a organização em fila dupla e depois única não estar clara, devido ao enrolamento dos ovaríolos (Figura 33-B, seta). A faloidina está presente demarcando a actina cortical e a bainha peritoneal bem organizada ao redor os ovaríolos (Figura 33-A, seta), além de seu acúmulo no centro dos polifusomas e canais em anel (Figura 33-D, seta e círculo, respectivamente), discernindo o germário distal do proximal.

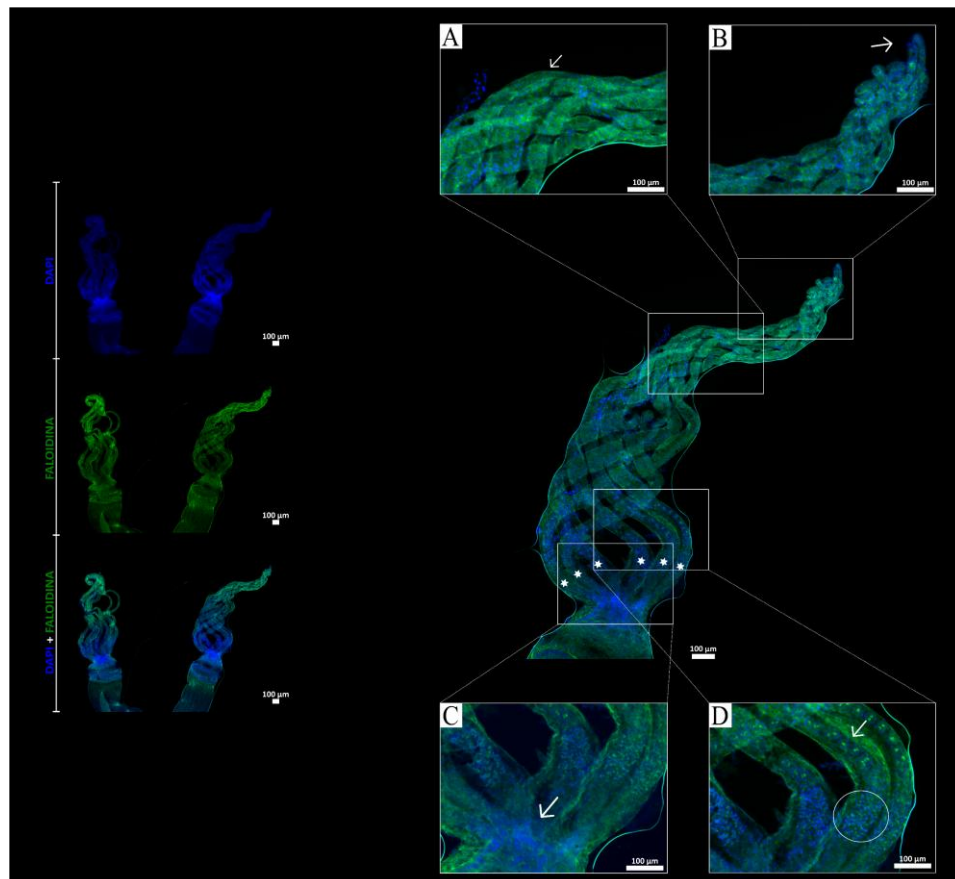


Figura 33: Microscopia de fluorescência de ovários de operárias de *Apis mellifera* em fase de pupa de pigmentação marrom nos olhos.

Ovário direito de PM em destaque, no qual conta-se seis ovaríolos (*) unidos pela região do cálice, onde há maior acúmulo de células (C, seta). A faloidina marca a bainha peritoneal que recobre os ovaríolos (A, seta), os polifusomas (D, seta) e canais em anel (D, círculo). O filamento terminal é mais afunilado que o restante da estrutura (B, seta). Quadro construído a partir da sobreposição de imagens.

Na fase PL, são visualizados cinco ovaríolos (Figura 34, *) unidos na região do pedúnculo, o qual apresentam grande acúmulo de células (Figura 34-D, seta). A bainha peritoneal densa (Figura 34-B) reduz a nitidez das estruturas internas. Apesar disso, na região distal é possível identificar a transição entre o germário distal e proximal, devido à presença de polifusomas unidos por pontes fortemente marcadas com faloidina (Figura 34-C, círculos) e canais em anel (Figura 34-C, seta). Como esperado, o filamento terminal apresenta-se afinado na extremidade distal (Figura 34-A).

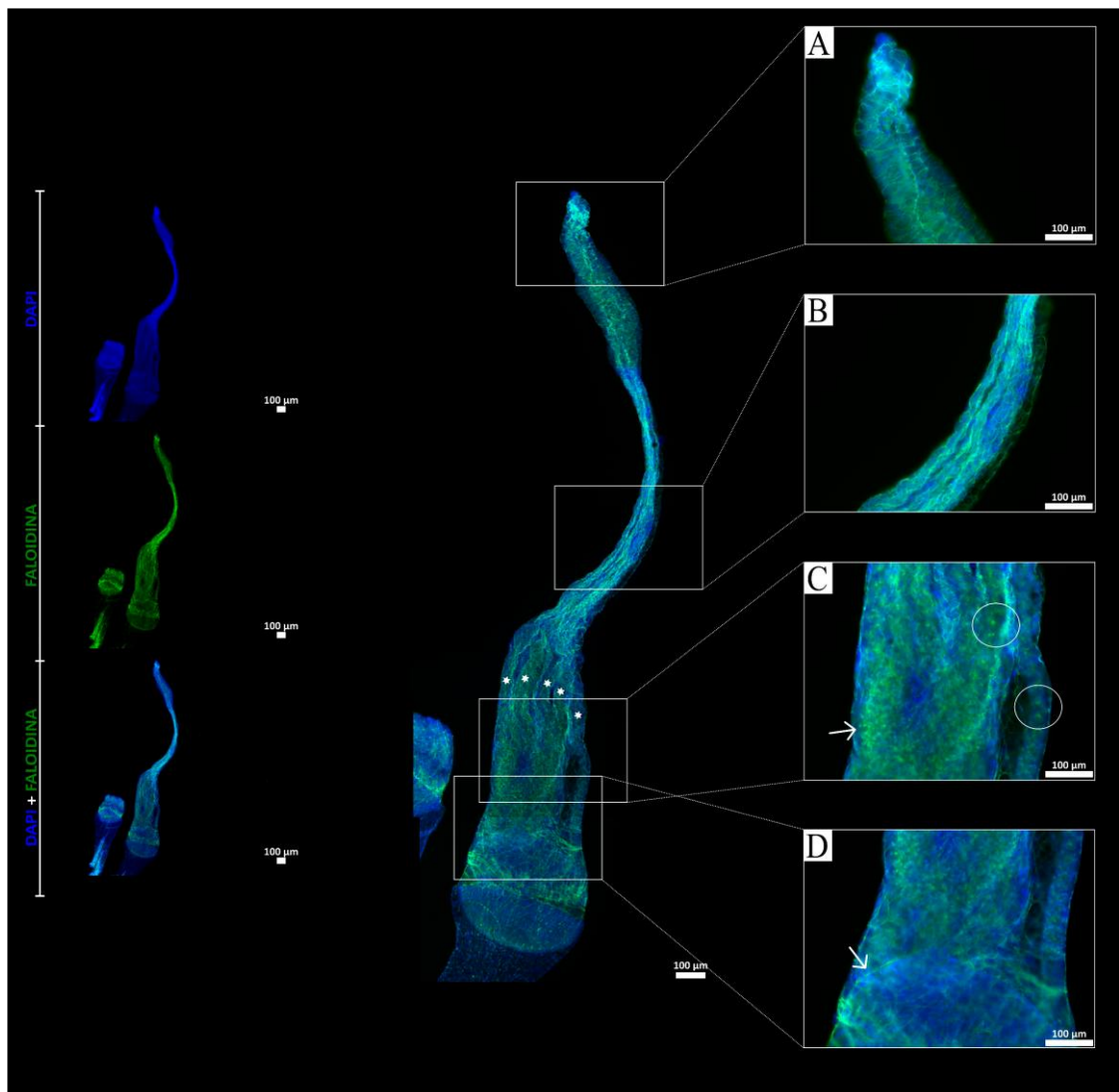


Figura 34: Microscopia de fluorescência de ovários de operárias de *Apis mellifera* em fase de pupa de pigmentação corporal leve.

Ovário de operárias em fase PL, com cinco ovaríolos (*) unidos pelo cálice (D, seta). A faloidina marca a actina cortical e presente na bainha peritoneal ao redor dos ovaríolos (B), os polifusomas (C, círculos) e canais em anel (C, seta). O filamento terminal é afinado na região distal (A). Quadro construído a partir da sobreposição de imagens.

A estrutura básica anteriormente descrita para PM e PL se mantém até o momento da emergência, com a redução da quantidade de ovariolos. Dessa forma, em PE (Figura 35) e adulta recém-emergida (RE) (Figura 36), são contabilizados dois a três ovariolos (*), evidenciando a ocorrência do processo de morte celular programada e sua assimetria. Os ovariolos remanescentes estão unidos entre si pelo cálice (Figura 35-D e Figura 36), apresentam a faloidina evidenciando a actina cortical e a densa bainha peritoneal (Figura 35- A, círculo e B, seta; e Figura 36-B, seta), além do filamento terminal afunilado na região mais distal (Figura 35-A e Figura 36-C). Apesar da alta densidade de filamentos de actina, é possível notar em ambas a presença dos polifusomas a partir da organização em rosetas dos núcleos (Figura 35-C, círculo e Figura 36-B, círculo).

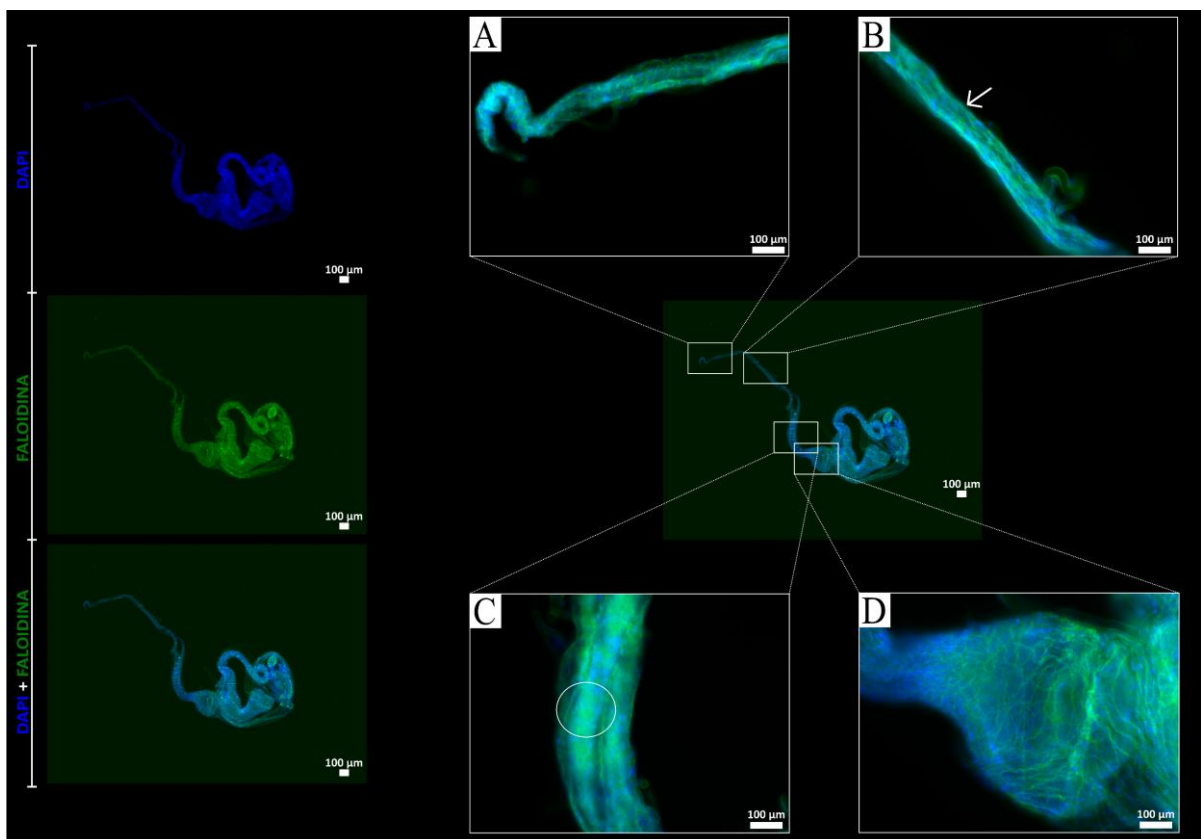


Figura 35: Microscopia de fluorescência de ovários de operárias de *Apis mellifera* em fase de pupa de pigmentação corporal escura.

Ovários de operária em fase PE com ovariolos pouco nítidos devido a presença da membrana que os une (B, seta), mas unidos na região do cálice (D). O filamento terminal está em destaque em (A), com estrutura mais fina e em (C) é possível discernir a presença de polifusomas. Quadro construído a partir da sobreposição de imagens.

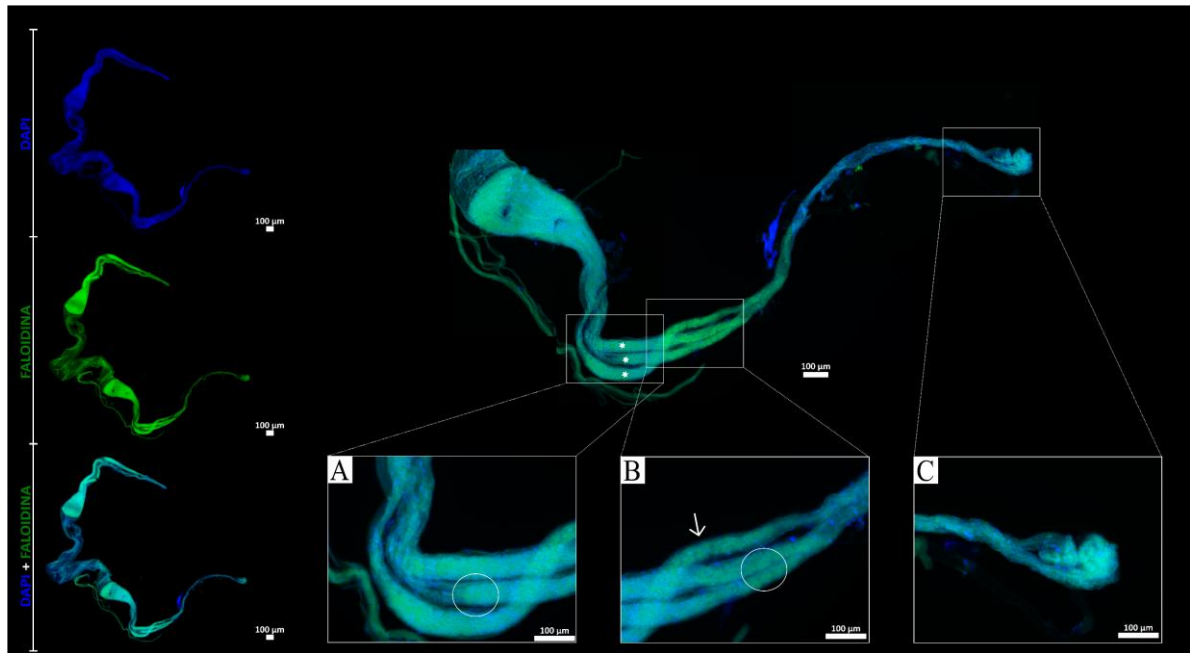


Figura 36: Microscopia de fluorescência de ovários de operárias de *Apis mellifera* em fase adulta recém-emergida. Ovário de operária adulta recém-emergida com três ovaríolos (*) unidos pelo cálice e afunilados na região do filamento terminal (C). A faloidina marca a actina presente na bainha peritoneal (B, seta) e o DAPI permite a visualização de células organizadas em rosetas (A e B, círculos). Quadro construído a partir da sobreposição de imagens.

4.4. Comparação morfológica do desenvolvimento de ovários *Frieseomelitta varia* e *Apis mellifera*

As espécies de abelhas *F. varia* e *A. mellifera* diferem sutilmente quanto ao sistema de determinação de castas. Nas abelhas sem ferrão, as larvas destinadas a se tornarem rainhas recebem o dobro do alimento ofertado às futuras operárias, ao passo que nas abelhas melíferas, as larvas destinadas a rainhas recebem maior quantidade de um alimento mais calórico (geleia real) (Faustino et al., 2002; Winston, 2003). A alimentação diferencial entre operária e rainha resulta em diferenças na morfofisiologia dos ovários. As rainhas de *F. varia* apresentam quatro ovaríolos longos e bem desenvolvidos por ovário (Figuras 15 a 20), ao passo que as operárias sofrem um intenso processo de morte celular programa, de modo que os quatro ovários destas são reduzidos a massas amorfas sem estrutura para reprodução (Figuras 22 a 25) (Boleli et al., 2000). Em *A. mellifera*, as rainhas apresentam mais de 200 ovaríolos por ovário (Figuras 26 a 30), enquanto as operárias possuem 2 a 10 ovaríolos que possuem potencial reprodutivo (Figuras 31 a 36). O restante dos ovaríolos formados no desenvolvimento inicial das operárias de *A. mellifera*, são degradados por completo pelo processo de morte celular (Hartfelder; Steinbruck, 1997).

Apesar dessas diferenças, o desenvolvimento dos ovários de rainhas das espécies *F. varia* e *A. mellifera* é semelhante. Nas rainhas de ambas as espécies, a estrutura inicial encontrada em larvas (Figuras 15 e 16) alonga-se e atinge a uma estrutura muito similar àquela das abelhas adultas na fase pupal. Os ovários das pupas de olhos brancos apresentam os primeiros indícios de alongamento e afunilamento terminal dos ovaríolos (Figura 17). Em pupas de olho marrom, a estrutura dos ovários já está completa e nas fases seguintes observa-se o amadurecimento dos ovaríolos (Figuras 18 e 26).

O desenvolvimento dos ovários de operárias diverge significativamente entre as duas espécies. Enquanto em *F. varia*, as operárias adultas apresentam uma massa amorfa sem função (Figura 24), as operárias de *A. mellifera* apresentam uma redução na quantidade de ovaríolos, de modo que os ovaríolos remanescentes apresentam as estruturas vistas em rainhas, como polifusomas, canais em anel e um longo comprimento afunilado na extremidade distal (Figura 33-D; Figura 34-C; Figura-35-C; e Figura 36-A e B, círculos).

A organização do citoesqueleto que forma os ovaríolos é distinta quando comparamos as castas de cada espécie. Em *F. varia*, os ovários das rainhas possuem uma bainha peritoneal organizada ao longo de todo o desenvolvimento (Figura 18-A, seta; Figura 19-A, círculo; Figura 20-A), enquanto as operárias adultas apresentam filamentos de actina aglomerados na região distal (Figura 24-A, seta e Figura 25-B, seta), onde estariam posicionados os filamentos terminais, e na região proximal próximo ao cálice (Figura 23-A, seta e Figura 25-B, seta). Nestas operárias adultas, os ovaríolos não são mais discerníveis e não é possível determinar os filamentos de actina marcados estão localizados na túnica própria, na bainha peritoneal ou em ambas. Já em *A. mellifera*, tanto rainhas (Figura 26 a 29) quanto operárias (Figura 33 a 36) é possível visualizar a bainha peritoneal densa, o que até mesmo dificulta a visualização das estruturas internas dos ovaríolos.

5. Discussão

5.1. Criação *in vitro* e determinação do tempo de desenvolvimento de rainhas de *Frieseomelitta varia*

Neste trabalho descrevemos o tempo de desenvolvimento larval e pupal de rainhas de *F. varia* a partir da transferência de larvas recém-eclodidas. A emergência das rainhas ocorreu em $31,92 \pm 1,03$ dias após a transferência de larvas recém-eclodidas. O ponto inicial de contagem culminou em resultados divergentes aos obtidos por Baptistela e colaboradores (2012), que transferiu larvas em estágio final de alimentação, antes do início da fase defecante e obteve rainhas adultas com $29,25 \pm 2,63$ dias de experimento. Tal experimento mimetizou

as condições observadas por Faustino e colaboradores (2002), o qual contabilizou o tempo de desenvolvimento de rainhas em colônia órfã, a partir da construção da célula auxiliar de alimento. Neste caso, a emergência da rainha adulta ocorreu em 25 dias. Se o período necessário para alcançar a fase larval pré-defecante utilizada por Baptistela e Faustino forem desconsiderados, o tempo de desenvolvimento encontrado é similar ao de Faustino e colaboradores (2002), contabilizando aproximadamente 24,6 dias.

Ainda que as larvas recém-eclodidas sejam muito sensíveis à manipulação, com a prática foi possível utilizá-las para criação *in vitro*. Nestes experimentos, a taxa de sobrevivência das larvas após a transferência foi de, aproximadamente, 70%. Realizamos também algumas tentativas de transferência de ovos. De acordo com Velthuis (1998), nas abelhas sem ferrão apenas um sétimo do comprimento e 5% do volume do ovo fica imerso no alimento, ao passo que o restante permanece exposto para efetuar trocas gasosas. Replicar a posição original exata na placa de criação *in vitro* se mostrou muito difícil, o que tornou a taxa de sucesso da transferência de ovos baixa. Portanto, os tempos de desenvolvimento foram calculados a partir do momento da transferência de larvas recém-eclodidas, padronizadas com base nas dimensões da larva. Como o tempo de vida prévio das larvas não era possível de determinar, observamos um intervalo de dias para a duração de cada fase. Ademais, a possível variação no tempo de desenvolvimento prévio à coleta das diferentes larvas poderia implicar em uma variação do alimento consumido das larvas que foram transferidas. Assim, além do volume de alimento colocado nos poços de cultivo *in vitro*, acrescentamos o alimento larval restante na célula de cria. Deste modo, aumentamos as chances de que todas as larvas tenham consumido a mesma quantidade de alimento ao final do período de alimentação.

Os experimentos de criação *in vitro* foram realizados entre janeiro e junho de 2024, estação com grande disponibilidade de alimento para as abelhas. A partir do final do mês de maio, observamos uma queda na qualidade do alimento e sem alterar qualquer parâmetro do protocolo de criação *in vitro*, as transferências deixaram de ter sucesso. O alimento larval depositado nas placas de 96 poços sofria alteração de densidade e coloração, tornando-se viscosos e escuros mesmo sem manipulação externa. Tais alterações interferiram na observação das características que determinavam as mudanças de fase larval, a exemplo da etapa defecante, pois não eram mais observadas a presença de fezes com as mesmas características, apesar da evolução do indivíduo para as fases pupais após alguns dias. Atribuímos essa mudança no alimento à chegada do inverno, que na região nordeste do estado de São Paulo é marcada pelo clima seco. Dessa forma, a partir do mês de junho de 2024, cessamos as coletas de abelhas.

Nestes casos, era possível observar o alimento escurecido no intestino das larvas e a

presença de hemolinfa melanizada, mesmo após alguns dias de desenvolvimento e nenhuma manipulação. A reação de melanização da hemolinfa resulta de fatores como a exposição prolongada ao ar, que pode ocorrer a partir do rompimento da cutícula das larvas; ou em decorrência da atividade do sistema imune do inseto, com reações moleculares e bioquímicas que ocasionam o escurecimento da hemolinfa pela produção de melanina (Cerenius et al., 2008; Leclerc; Reichhart, 2004; Li et al., 2019; Nappi; Vass, 1993). De maneira resumida, a melanina atua na defesa contra patógenos, contudo, a produção excessiva de compostos intermediários resulta em toxicidade e danos aos tecidos (Cerenius et al., 2008; Nappi; Vass, 1993). As condições descritas muitas vezes também culminavam na proliferação de fungos, apesar dos esforços de assepsia antes e após a transferência.

Outra dificuldade enfrentada na caracterização morfológica dos ovários de rainhas foi uma consequência do próprio desenvolvimento. Buscamos caracterizar os ovários de rainhas em todas as fases do desenvolvimento pupal, no entanto, quanto mais próximo da fase adulta, maior é o número de traqueias que se enovelam aos ovariolos. Com isto, tivemos pouco sucesso na remoção das traqueias sem que os ovariolos fossem danificados. Quando presentes nas amostras, as traqueias, que são auto fluorescentes, atrapalhavam a visualização dos marcadores celulares e impediam a elucidação das estruturas ovarianas. Portanto, apesar de termos obtidos rainhas adultas recém-emergidas ao final do protocolo de criação *in vitro*, não tivemos sucesso na aquisição de imagens dos seus ovários.

5.2. Ovários de rainhas e operárias de abelhas melíferas e sem ferrão

A morfologia que faz alusão ao formato de “dedos” separados foi observada em ovários de larvas L4 e L5 de operárias *A. mellifera* por Cullen e colaboradores (2024). No caso dos resultados apresentados para *F. varia*, os ovariolos apresentam-se bem separados. Quando rompemos a membrana ao redor do ovário de larvas de *A. mellifera*, pode ser observada a separação dos ovariolosm semelhantemente a *F. varia*, contudo em maior volume (Anexo 2).

A estrutura observada na extremidade dos ovariolos de rainhas de *F. varia* em fase larval pré-defecante (Figura 15-A, círculo) também foi descrita para os ovários de rainhas de abelhas melíferas durante o desenvolvimento larval (Cullen et al., 2024). Nesse trabalho, os autores observaram um acúmulo de células somáticas (marcadas por hibridização *in situ* com transcritos do gene *castor*) e características do filamento terminal (marcadas por hibridização *in situ* com transcritos do gene *odd*) na extremidade distal dos ovariolos no estágio larval L3. Seguindo o desenvolvimento, esta estrutura alonga-se e dá origem ao filamento terminal. Cullen e colaboradores (2024) também apontaram a presença de potenciais fusomas (cistos de 2-4

células) a partir da fase larval L3 de rainhas de *A. mellifera*, sendo observados polifusomas completos (8 células) a partir de L4. Dadas as semelhanças na organização dos ovários de rainhas de *A. mellifera* e de *F. varia*, acreditamos que as fortes marcações de filamentos de actina observadas nas Figuras 15-B (círculo) e 16-B (círculo) sejam polifusomas.

Neste trabalho, as imagens obtidas para os ovários de rainhas de *A. mellifera* não foram nítidas o suficiente para permitir a identificação de estruturas internas. Acreditamos que a causa disto tenha sido a presença da densa bainha peritoneal que recobre os ovários, pois em operárias de *A. mellifera* e em operárias e rainhas de *F. varia* obtivemos imagens nítidas seguindo o mesmo protocolo. Desta forma, a comparação do desenvolvimento dos ovários de rainhas de *F. varia* com rainhas de *A. mellifera* foi baseado nos resultados de Cullen e colaboradores (2024). Apesar da falta de nitidez das estruturas internas dos ovários de rainhas de *A. mellifera*, foi possível descrever o desenvolvimento geral deste órgão, que no desenvolvimento larval tem o formato da letra “C” e é formado por um grande número de ovários, os quais alongam-se e formam grupos menores unidos região do cálice.

As imagens que obtivemos dos ovários de operárias forrageiras de *F. varia* com marcação de núcleos e de filamentos de actina permitiram uma descrição morfológica compatível com a de Boleli e colaboradores (1999), feita a partir de imagens obtidas com microscopia de transmissão e eletrônica de varredura. Observamos um acúmulo de filamentos de actina na região do cálice, uma desorganização da bainha peritoneal ao redor do ovário e acúmulo de filamentos de actina na região do filamento terminal (Figuras 24 e 25). Já os ovários das rainhas de *F. varia* apresentam uma malha organizada formada pelos filamentos de actina que compõe a bainha peritoneal. Ainda, a estrutura dos ovários na Figura 25-C evidencia que o processo de morte celular programada é assimétrico entre ambos os ovários e continua após a emergência do indivíduo adulto (Boleli et al., 1999; Lucena, 2022).

Lucena (2022) pontuou a irregularidade do citoesqueleto como uma característica que culmina na perda da funcionalidade dos ovários de operárias da espécie *Scaptotrigona bipunctata* conforme envelhecem. Em contraponto, as operárias de *A. mellifera*, assim como as rainhas, apresentam uma bainha peritoneal densa e organizada, que até mesmo dificulta a visualização das estruturas internas do ovário. Nas abelhas melíferas, o processo de morte celular degrada ovários inteiros, de modo que os remanescentes permanecem íntegros, mantendo a organização do citoesqueleto, bem como os polifusomas e canais em anel. Como consequência, em casos de orfandade, as operárias de *A. mellifera* são capazes de ativar seus ovários (Snodgrass, 1910) e produzir machos haploides. Desta forma, a organização do citoesqueleto que compõem a bainha peritoneal que reveste os ovários parece ser uma

característica morfológica que distingue o potencial reprodutivo dos ovários das abelhas. Ainda, é interessante evidenciar as regiões que compõem os ovariolos e podem ser observadas na Figura 21. Como apresentado anteriormente, o germário proximal é caracterizado pela presença dos canais em anel (Figura 21-A, círculo) (Cullen et al., 2023; Gutzeit et al., 1993); enquanto o germário distal é povoado por células organizadas em polifusomas (Figura 21-B, círculo) (Cullen et al., 2023). O filamento terminal é identificado pela presença de células com núcleos achatados (Figura 21-C, círculo) (Cullen et al., 2023; Da Cruz Landim, 2009), parcialmente intercaladas (Boleli et al., 1999).

5.3. Considerações finais

O tempo de desenvolvimento de rainhas de *F. varia* criadas *in vitro* foi determinado pelos estágios larvais pré-defecante com $7,23 \pm 1,84$ dias e defecante com $10,35 \pm 1,62$ dias após a transferência. Os estágios pupais tiveram início com $17,00 \pm 2,11$ dias, caracterizando pupas de olhos brancos. Em seguida, houve aquisição de coloração dos olhos podendo ser descrita como rosa no dia $20,68 \pm 1,47$ e marrom no dia $22,22 \pm 2,18$; e aquisição de pigmentação corporal, caracterizada como leve com $26,24 \pm 2,18$ dias, média com $29,29 \pm 1,35$ e escura $31,09 \pm 1,76$ dias, contando a partir do momento da transferência. Por fim, a emergência do indivíduo adulto ocorreu no dia $31,92 \pm 1,03$.

A comparação morfológica dos ovários ao longo do desenvolvimento de operárias e rainhas de *A. mellifera* e *F. varia* sugere que a organização do citoesqueleto na bainha peritoneal que revestem externamente os ovariolos desempenha um importante papel na fertilidade das fêmeas. Em rainhas de *F. varia* e *A. mellifera* o citoesqueleto que envolve os ovariolos (bainha peritoneal) apresenta alto nível de organização, característica mantida nas operárias de *A. mellifera* que guardam o potencial reprodutivo em caso de orfandade. O mesmo não acontece com as operárias de *F. varia*, cujo citoesqueleto é organizado no início do desenvolvimento, podendo ser visualizada uma bainha peritoneal que recobre os ovariolos, ao passo que na fase adulta, a mesma estrutura apresenta alto nível de desorganização, encontrando-se acumulado em regiões específicas, refletindo a incapacidade reprodutivas da casta.

Dada a importância ecológica e econômica das abelhas, o conhecimento de sua biologia e desenvolvimento é de extrema importância para preservação e manejo. Neste trabalho foi apresentado o desenvolvimento de rainhas de *Frieseomelitta varia*, caracterizando o tempo de desenvolvimento total e a duração dos instares larvais e estágios pupais, a partir da transferência de larvas recém-eclodidas. A partir das rainhas obtidas por criação *in vitro* e das operárias coletadas diretamente das colônias, foi construído um catálogo de imagens do desenvolvimento

dos ovários da abelha *Frieseomelitta varia*. O desenvolvimento dos ovários de rainhas e operárias de *F. varia* foi comparado ao de *Apis mellifera*, organismo modelo nos estudos de abelhas, para a qual também foi construído um catálogo de caracterização morfológica do desenvolvimento dos ovários de rainhas e operárias.

6. Referências bibliográficas

- ALBERTS, Bruce et al. **Biologia molecular da célula**. Artmed Editora, 2017.
- AM, KLEIN. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences** *Royal Society*, v. 274, p. 303-313, 2007.
- ARAÚJO, Edilson D. et al. Risk of local extinction and genetic diversity of *Melipona quadrifasciata* (Apidae: Meliponini) in a possible Northeastern limit of its distribution in Brazil. **Sociobiology**, v. 63, n. 2, p. 804-812, 2016.
- BAPTISTELLA, Ana Rita et al. Techniques for the *in vitro* production of queens in stingless bees (Apidae, Meliponini). **Sociobiology**, v. 59, n. 1, p. 297-310, 2012.
- BASTOCK, Rebecca; ST JOHNSTON, Daniel. Drosophila oogenesis. **Current Biology**, v. 18, n. 23, p. R1082-R1087, 2008.
- BEGO, Luci Rolandi. On social regulation in *Nannotrigona (Scaptotrigona) postica* Latreille, with special reference to male production cycles (Hym., Apidae, Meliponinae). **Boletim de Zoologia**, v. 7, n. 7, p. 181-196, 1983.
- BOLELI, Isabel Cristina; PAULINO-SIMÕES, Zilá Luz; BITONDI, Márcia Maria Gentile. Regression of the lateral oviducts during the larval-adult transformation of the reproductive system of *Melipona quadrifasciata* and *Frieseomelitta varia*. **Journal of morphology**, v. 243, n. 2, p. 141-151, 2000.
- BOLELI, Isabel Cristina; PAULINO-SIMÕES, Zilá Luz; GENTILE BITONDI, Márcia Maria. Cell death in ovarioles causes permanent sterility in *Frieseomelitta varia* worker bees. **Journal of morphology**, v. 242, n. 3, p. 271-282, 1999.
- CERENIUS, Lage; LEE, Bok Luel; SÖDERHÄLL, Kenneth. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. **Trends in immunology**, v. 29, n. 6, p. 263-271, 2008.
- CRUICKSHANK, W. J. The ultrastructure and functions of the ovariole sheath and tunica propria in the flour moth. **Journal of Insect Physiology**, v. 19, n. 3, p. 577-592, 1973.
- CULLEN, Georgia et al. Germline progenitors and oocyte production in the honeybee queen ovary. **Genetics**, v. 225, n. 1, p. iyad138, 2023.
- CULLEN, Georgia; DELARGY, Erin; DEARDEN, Peter K. Development of germline

progenitors in larval queen honeybee ovaries. **Biology open**, v. 13, n. 9, 2024.

DA CRUZ LANDIM, Carminda. Abelhas. Unesp, 2009.

DA CRUZ-LANDIM, Carminda; ROAT, Thaisa Cristina; BERGER, Bruno. Fat body, hemolymph and ovary routes for delivery of substances to ovary in *Melipona quadrifasciata* anthidioides: differences among castes through the use of electron-opaque tracers. **Microscopy**, v. 62, n. 4, p. 457-466, 2013.

DE CARVALHO, Hernandes Faustino; RECCO-PIMENTEL, Shirlei Maria. **A célula**. Manole, 2019.

DEARDEN, Peter K. Germ cell development in the Honeybee (*Apis mellifera*); *vasa* and *nanos* expression. **BMC developmental biology**, v. 6, p. 1-14, 2006..

DEL SARTO, Mário César L. et al. Differential insecticide susceptibility of the Neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* and the honey bee *Apis mellifera*. **Apidologie**, v. 45, p. 626-636, 2014.

ERIKSSON, S. et al. for cytofluorometry (Brown & HitchcockBernheim & Miglie-rina. [s.l.] Williamson & Fennell, 1993. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/sharingguidelines>>.

FAULSTICH, Heinz et al. Fluorescent phallotoxins as probes for filamentous actin. **Journal of Muscle Research & Cell Motility**, v. 9, p. 370-383, 1988.

FAUSTINO, C. D. et al. First record of emergency queen rearing in stingless bees (Hymenoptera, Apinae, Meliponini). **Insectes Sociaux**, v. 49, p. 111-113, 2002.

FUCHS, Yaron; STELLER, Hermann. Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 16, n. 6, p. 329-344, 2015.

GALLUZZI, L. et al. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. **Cell Death & Differentiation**, v. 14, n. 7, 2007.

GALLUZZI, Lorenzo et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death & Differentiation**, v. 25, n. 3, p. 486-541, 2018.

GALLUZZI, Lorenzo et al. Regulated cell death and adaptive stress responses. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, p. 2405-2410, 2016.

GOULSON, Dave et al. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. **Science**, v. 347, n. 6229, p. 1255957, 2015.

GOV.BR. Ministério da Agricultura e Pecuaria. In: **Polinização pode aumentar a produtividade de culturas de grande importância agrícola no Brasil**. [S. l.], 6 ago. 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/polinizacao-pode->

aumentar-a-produtividade-de-culturas-de-grande-importancia-agricola-no-brasil. Acesso em: 20 jan. 2025.

GUTZEIT, H. O.; ZISSLER, D.; FLEIG, R. Oogenesis in the honeybee *Apis mellifera*: cytological observations on the formation and differentiation of previtellogenic ovarian follicles. **Roux's archives of developmental biology**, v. 202, p. 181-191, 1993..

HARTFELDER, Klaus; STEINBRÜCK, Günther. Germ cell cluster formation and cell death are alternatives in caste-specific differentiation of the larval honey bee ovary. **Invertebrate Reproduction & Development**, v. 31, n. 1-3, p. 237-250, 1997..

JACOB, Cynthia Renata Oliveira et al. Acute toxicity of fipronil to the stingless bee *Scaptotrigona postica* Latreille. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 90, p. 69-72, 2013.

KANG, Yun et al. Disease dynamics of honeybees with *Varroa destructor* as parasite and virus vector. **Mathematical biosciences**, v. 275, p. 71-92, 2016.

KERR, Warwick Estevam; ZILSE, Gislene Almeida Carvalho; NASCIMENTO, Vania Alves. Abelha uruçú: biologia, manejo e conservação. 1996.

KHALIFA, Shaden AM et al. Overview of bee pollination and its economic value for crop production. **Insects**, v. 12, n. 8, p. 688, 2021.

LECLERC, Vincent; REICHHART, Jean-Marc. The immune response of *Drosophila melanogaster*. **Immunological reviews**, v. 198, n. 1, p. 59-71, 2004.

LI, Tian et al. Hemocyte changes during immune melanization in *Bombyx mori* infected with *Escherichia coli*. **Insects**, v. 10, n. 9, p. 301, 2019..

LINKSVAYER, Timothy A. et al. Larval and nurse worker control of developmental plasticity and the evolution of honey bee queen–worker dimorphism. **Journal of evolutionary biology**, v. 24, n. 9, p. 1939-1948, 2011.

LUCENA, D. L. S. Análise do perfil transcriptômico e da morfologia ovariana de *Scaptotrigona bipuncata* (Lepelletier) e as estratégias reprodutivas das abelhas eussociais. Tese de Doutorado—Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 2022b.

MACHADO, M. F. P. S.; CONTEL, E. P. B.; KERR, W. E. Proportion of males sons-of-the-queen and sons-of-workers in *Plebeia droryana* (Hymenoptera, Apidae) estimated from data of an MDH isozymic polymorphic system. **Genetica**, v. 65, p. 193-198, 1984.

MANZOOR, Farkhanda; PERVEZ, Mahnoor. Pesticide Impact on Honeybees Declines and Emerging Food. **Global Decline of Insects**, p. 65, 2022.

MICHENER, Charles D. **The bees of the world**. JHU press, 2007.

NAPPI, A. J.; VASS, E. Melanogenesis and the generation of cytotoxic molecules during insect

cellular immune reactions. **Pigment Cell Research**, v. 6, n. 3, p. 117-126, 1993..

NOGUEIRA-NETO, Paulo. Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão. In: **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão**. 1997. p. 446-446.

OLIVEIRA, Willams et al. Food plants in Brazil: origin, economic value of pollination and pollinator shortage risk. **Science of The Total Environment**, v. 912, p. 169147, 2024.

REGINATO, R. D.; CRUZ-LANDIM, C. Differentiation of the worker's ovary in *Apis mellifera* L.(Hymenoptera, Apidae) during life of the larvae. **Invertebrate Reproduction & Development**, v. 39, n. 2, p. 127-134, 2001.

REGINATO, Rejane Daniele; DA CRUZ-LANDIM, Carminda. Morphological characterization of cell death during the ovary differentiation in worker honey bee. **Cell Biology International**, v. 26, n. 3, p. 243-251, 2002.

RONAI, Isobel et al. Regulation of oogenesis in honey bee workers via programmed cell death. **Journal of insect Physiology**, v. 81, p. 36-41, 2015.

SILVEIRA, Fernando A.; MELO, Gabriel AR; ALMEIDA, Eduardo AB. **Abelhas brasileiras: sistemática e identificação**. Guilherme Carnevale Carmona, 2002.

SNODGRASS, Robert E. **Anatomy of the honey bee**. Cornell University Press, 1956.

STULIGROSS, Clara; WILLIAMS, Neal M. Past insecticide exposure reduces bee reproduction and population growth rate. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 118, n. 48, p. e2109909118, 2021.

TANAKA, Erica D.; HARTFELDER, Klaus. The initial stages of oogenesis and their relation to differential fertility in the honey bee (*Apis mellifera*) castes. **Arthropod Structure & Development**, v. 33, n. 4, p. 431-442, 2004.

TELFER, William H. Development and physiology of the oöcyte-nurse cell syncytium. In: **Advances in insect physiology**. Academic Press, 1975. p. 223-319.

TETTAMANTI, Gianluca; CASARTELLI, Morena. Cell death during complete metamorphosis. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 374, n. 1783, p. 20190065, 2019.

VANENGELSDORP, Dennis et al. A survey of honey bee colony losses in the US, fall 2007 to spring 2008. **PloS one**, v. 3, n. 12, p. e4071, 2008.

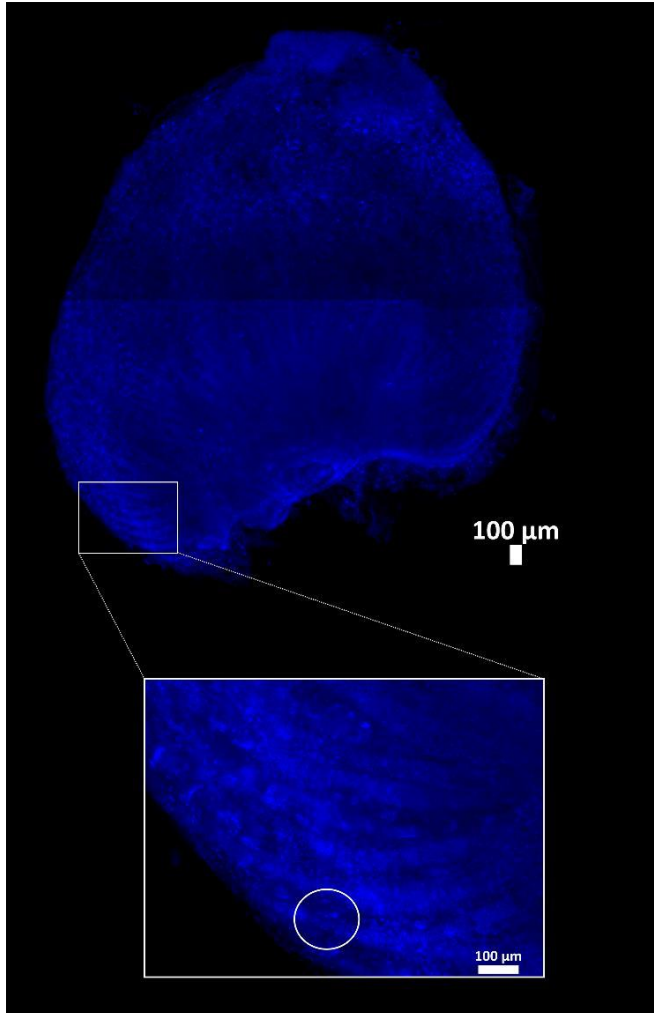
Velthuis, BJ., Velthuis, H. Columbus Surpassed: Biophysical Aspects of How Stingless Bees Place an Egg Upright on Their Liquid Food. **Naturwissenschaften** **85**, 330–333 (1998). <https://doi.org/10.1007/s001140050509>

VISICK, Oliver D.; RATNIEKS, Francis LW. Density of wild honey bee, *Apis mellifera*, colonies worldwide. **Ecology and Evolution**, v. 13, n. 10, p. e10609, 2023.

- WARNER, Summer et al. A scoping review on the effects of Varroa mite (*Varroa destructor*) on global honey bee decline. **Science of the total environment**, v. 906, p. 167492, 2024.
- WHITFIELD, Charles W. et al. Thrice out of Africa: ancient and recent expansions of the honey bee, *Apis mellifera*. **Science**, v. 314, n. 5799, p. 642-645, 2006.
- WILLIAMSON, D. H.; FENNELL, D. J. The use of fluorescent DNA-binding agent for detecting and separating yeast mitochondrial DNA. In: **Methods in cell biology**. Academic Press, 1975. p. 335-351.
- WILSON, Edward O. **The insect societies**. 1971.
- WINSTON, M. L. *A biologia da abelha*. Porto Alegre: Magister. 276p.; il. 2003.
- YANG, Yinying et al. Global honeybee health decline factors and potential conservation techniques. **Food Security**, v. 15, n. 4, p. 855-875, 2023.
- ZAVODSKA, Radka; SEHADOVA, Hana. The rate of DNA synthesis in ovaries, fat body cells, and pericardial cells of the bumblebee (*Bombus terrestris*) depends on the stage of ovarian maturation. **Frontiers in Physiology**, v. 14, p. 1034584, 2023.

Anexo 1

Ovário de pupa com pigmentação corporal média de rainhas de *A. mellifera*, com destaque à região onde pode ser identificadas células organizadas em rosetas (círculo).



Anexo 2

Ovário de larvas de rainhas de *A. mellifera* em estágio L5S. A membrana que mantém os ovaríolos unidos foi rompida, de modo a separar-los.

