

**ESTUDOS**

**SÔBRE**

**O**

**GÊNERO MELIPONA**

Warwick Estevam Kerr

**ENGENHEIRO AGRÔNOMO**



**PIRACICABA**  
**ESTADO DE SÃO PAULO**  
**1947**

W. E. Kerr

WARWICK ESTEVAM KERR  
Engenheiro Agrônomo  
Assistente da Cadeira e Secção  
de  
Citologia e Genética Geral  
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"  
UNIVERSIDADE DE S. PAULO

ESTUDOS SÔBRE O GÊNERO MELLIPONA

Tése para Doutoramento apresentada á Escola  
Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".  
em  
30 de Outubro de 1947

*refere*

P A R A

a

M A I O R

H O N R A e G L O R I A

de

D E U S

*u/ker*

## I N D I C E

- 1 - Introdução e agradecimentos
- 2 - Sistemática
- 3 - Contribuição para o estudo da Biologia
- 4 - Anatomia dos Orgãos Genitais
  - Aparelho Genital Masculino
  - Aparelho Genital Feminino
- 5 - Citologia
  - Cromosomas somáticos
  - Espermatogênese
  - Resumo
- 6 - Determinação das castas
  - Métodos
  - Material
  - Resultados
  - Discussão
  - Provas adicionais
  - Proporção das castas durante o inverno
  - Discussão de casos análogos em Termitas e Formigas
  - Resumo
- 7 - Evolução do Gênero Melipona
  - Evolução dos himenópteros
  - Evolução das abelhas
  - Evolução dos meliponíneos
  - Evolução das melíponas
  - Resumo
- 8 - Bibliografia
- 9 - Explicação das figuras

Iniciei meus estudos e observações nos Meliponíneos em 1942, influenciado principalmente pelos livros e artigos de Rodolfo van Ihering.

Desde o início dessas observações minha atenção foi presa ao sistema de criação existente nessas abelhas, principalmente na diferença biológica fundamental entre o gênero *Melipona* e *Trigona*, que é a formação de rainhas: nas melíponas as rainhas nascem de alvéolos iguais aos das operárias, ao passo que nas trígonas nascem de células apropriadas, de maior tamanho. Veio daí a idéia que as diferenças entre operárias e rainhas no gênero *Melipona* talvez pudessem ser genéticas. Imaginou-se primeiramente a possibilidade de existirem diferenças entre cromosomas de rainhas e operárias. Daí terem sido iniciados os estudos citológicos. Os primeiros passos desses estudos foram efetuados nos últimos meses de 1943 em um estágio que fiz sob a direção do Dr. F.G. Brieger. No fim desse estágio, recebi do Dr. F.G. Brieger o conselho de entrar em contacto com o Dr. André Dreyfus e D. Marta Erps Breuer, da Secção de Biologia Geral da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de São Paulo. Aí aprendemos os métodos particulares para o estudo citológico dos himenópteros. Aos Dr. André Dreyfus e D. Marta Breuer quero deixar consignados meus agradecimentos.

De 1945 em diante esses estudos foram continuados nesta Secção de Genética sob a orientação, auxílio e estímulo do Dr. F.G. Brieger a quem particular e sinceramente sou agradecido pela inestimável ajuda prestada.

Todos os espécimens de meliponíneos utilizados foram classificados pelo especialista brasileiro do grupo, Pe. Jesús Moure, CMF, a êle os meus agradecimentos.

Para o estudo de biologia tive necessidade de consultar toda a literatura sobre o gênero *Melipona*, e sou grato ao Dr. F. Lane por ter-me facilitado os meios para tal estudo, pondo-me á disposição a Bibliotéca do Departamento de Zoologia e enviando-me farta bibliografia.

As colônias estudadas foram na sua quasi totalidade, provenientes dos municípios de Parnaíba, Araçariguama e Cabreúva (E.S.P.), onde foram localizadas e despachadas para esta Secção por diversos amigos conhecedores da região entre os quais citarei agradecido:

*m Kerr* 2

Sr. Antonio Salustiano, Sr. João Sebastião, Sr. João Bueno, Sr. Raimundo da Silva e Sr. Amaro R. dos Santos.

Por auxiliarem-me em uma ou outra parte do meu trabalho muito agradeço aos: Dr. Charles D. Michener, Assistant Curator, Department of Insect and Spiders of the American Museum of Natural History por sua bondade em permitir-me o livre uso da sua árvore filogenética das abelhas; ao Dr. George O'Neill Addison, Diretor da Seção de Genética do Instituto Agrônomo do Norte, em Belém, por enviar-me colônias da Bacia Amazônica; ao Dr. Paulo Nogueira Neto, do Departamento de Zoologia, S. Paulo, por suas sugestões e por enviar-me uma colônia do Paraná; ao Dr. Herbert F. Schwarz, Research Associate of the American Museum of Natural History, por informações valiosas que nos enviou sobre a distribuição do gênero *Melipona*; ao Sr. Domínguez S. Dias por sua contribuição em nos facilitar fontes bibliográficas.

Pelas sugestões e crítica construtiva agradeço aos meus colegas de Seção: Dr. José T.A. Gurgel, Dr. Marcílio Dias, Dr. Nelson Kriebel e Dr. Mario P. Mezzacappa.

Ao Dr. José de Mello Moraes deixo meus agradecimentos pelas facilidades que proporcionou-me na execução deste trabalho.

Pela amizade demonstrada em trabalharem mais do que o exigido em seus cargos sou agradecido aos: Sr. Sebastião Coelho Fischer, Sr. Alberto Thomazzi, Sr. João Zandoval Netto, Sr. José P. Maia e Sr. Paulo do Amaral.

Finalmente quero deixar registrado aqui meus sentimentos de imensa gratidão aos meus pais, Sr. Américo C. Kerr e D. Bárbara C. Kerr e a minha esposa Lygia S. Kerr, dedicando-lhes este meu trabalho.

M. K. K.

2 - SISTEMÁTICA

Os gêneros Melipona e Trigona compreendem as abelhas selvagens brasileiras conhecidas pelos nomes de: Mandaçáia, Mandurí, Tuiuva, Guarupú, Urussú, Jandaira, Manduaguarí, Moça-branca, Tuiú-mirim, Borá, Mirim, Jataí, Irapuá, etc., tôdas abrangidas pela denominação comum de "mel de páu". Fazem suas casas em ôcos de árvores, em fendas de pedras, no chão, etc., conforme a espécie. Depositam seu mel em pótes de cêra de aproximadamente 20cc de capacidade; êsse mel é excelente e muito procurado pela população rural Brasileira, que lhe atribue propriedades medicinais.

Situando os Meliponíneos dentro dos Artrópoda podemos dizer rapidamente que pertencem á classe Insecta, sub-classe Pterigogênea, ordem Hymenoptera, sub-ordem Clistogastra, super-família Apoidea, família Apidae, sub-família Apinae, tribu Meliponini, gêneros: Melipona e Trigona.

DUCKE (1916), por não achar que as diferenças entre os dois gêneros fossem suficientes para sua separação, agrupou todos os meliponíneos num único gênero: Melipona.

Por outro lado J. MOURE (1946), considera as abelhas selvagens formando a sub-família Meliponinae, e divide esta em três tribus:

1) Meliponini, com os gêneros: Melipona ILLIGER, 1806; Oxytrigona COCKERELL, 1917; Nannotrigona COCKERELL, 1922; Scaura SCHWARZ, 1938; Plebeia SCHWARZ, 1938; Paratrigona SCHWARZ, 1938; Partamona SCHWARZ, 1939; Scaptotrigona MOURE, 1942; Schwarziana MOURE, 1943; Friesella MOURE, 1946; Mourella SCHWARZ, Meliponula COCKERELL, 1934; Lepidotrigona SCHWARZ, 1939.

2) Trigonini, com os gêneros: Trigona JURINE, 1807; Tetragona LEPELETIER e SERVILLE, 1828; Hypotrigona COCKERELL, 1934; Cephalotrigona SCHWARZ, 1940; Geotrigona MOURE, 1943; Duckeola MOURE, 1946; Dactylurina COCKERELL, 1934; Heterotrigona SCHWARZ, 1939.

3) Lestrimelittini, com um único gênero: Lestrimelitta FRUITS, 1903.

Seguindo IHERING (1903) e SCHWARZ, (1932) preferimos adotar os dois gêneros clássicos Melipona e Trigona pois êsse ponto de vista é reforçado pela biologia, si bem que talvez seja MOURE (1946) o que mais se aproxime da filogenia.

Existem conhecidas até hoje, 14 espécies do gênero Melipona. Damos os seus nomes porém deixamos de descreve-las devido já existi-

rem diversos trabalhos exaustivos sôbre êsse assunto, sendo o principal o de H.F.SCHWARZ, 1932: "The genus Melipona", do qual extraímos a lista abaixo:

- Melipona flavipennis, SMITH (1854)
- Melipona quadrifasciata, LEPELETIER (1836)
- Melipona mandacáia, SMITH (1863)
- Melipona interrupta, LATREILLE (1811)
- Melipona beecheii, BENNETT (1831)
- Melipona quinquefasciata, LEPELETIER (1836)
- Melipona favosa, FABRICIUS (1798)
- Melipona fasciata, LATREILLE (1811)
- Melipona puncticollis, FRIESE (1902)
- Melipona concinna, COCKERELL (1919)
- Melipona subnitida, DUCKE (1910)
- Melipona schencki, GRIBODO (1893)
- Melipona marginata, LEPELETIER (1836)
- Melipona rufipes, FRIESE (1900).

3 - CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DA BIOLOGIA

Temos estudado há um ano e meio o mecanismo da determinação das castas nos meliponíneos. Durante este estudo fizemos diversas anotações sobre a sua biologia, que passamos a relatar.

Um dos fatos conhecidos a respeito dos gêneros Melipona e Trigona é coexistirem em uma colônia rainhas fecundadas, rainhas virgens, zangões e operárias. Desde que por qualquer motivo a rainha fecundada venha a faltar, uma ou mais das virgens será fecundada e, após um certo número de dias iniciará a postura. Na alimentação de uma rainha de Apis, desde larva até o fim da vida, as operárias usam grande quantidade de uma geléia glandular (SNODGRASS, 1925), porém para as larvas de machos e operárias só dão desse alimento até o terceiro dia; daí por diante recebem uma alimentação "progressiva" que inclui mel e pólen. Nas Meliponas a nutrição das larvas é intermediária entre o "alimento massal" de certas abelhas solitárias e o "alimento progressivo" das Apis, e é igual para operárias, zangões e rainhas. Dizemos que é intermediária porque as obreiras de Melipona enchem totalmente de alimento o alvéolo, que vai receber o ovo, com mel, pólen e alimento glandular e logo após a postura fecham a célula. Como os alimentos são de densidade diferente a pequena larva, que fica boiando ao eclodir, se nutrirá primeiro de secreção glandular e depois de mel e pólen.

As rainhas das trígona (Irapoá, Borá, Jataí, Mirins, Tuiumirim, Manduaguari, Tapessoá, Sanharão, etc.), originam-se da mesma maneira que as rainhas de Apis (abelha européia), isto é, por uma alimentação especial. Assim si tomarmos um ovo botado em um alvéolo de operária e o colocarmos em um alvéolo de rainha, não mais nascerá uma operária mas sim uma rainha, porque a constituição do ovo é a mesma, dependendo unicamente da quantidade e qualidade dos alimentos, o fato de tornar-se numa ou noutra casta.

As rainhas de Melipona (Tuiuva, Mandaçáia, Guarupú, Urussú, Jandaira, Mandurí, Urussuboi, etc.), têm todavia, uma origem diferente. Nascem de alvéolo do mesmo tamanho e com a mesma quantidade e qualidade de alimentação que o de uma operária. Si aumentarmos a quantidade de alimentos na ração de uma operária somente conseguiremos uma operária de maior tamanho, mas não lograremos transforma-la numa rainha. Portanto nos ovos de melíponas já se acha determinada a casta a que deve pertencer o indivíduo, e a nutrição não pode alterar tal

natureza. (Kerr, 1947).

Como a rainha virgem de Melipona recebe a mesma alimentação e nasce de um alvéolo do mesmo tamanho que o de uma operária ela se encontra habilitada a iniciar a postura logo após sua fecundação.

Por isso depois da cópula as operárias começam a nutri-la com alimento glandular, que lhe faltou no estado larvário, e assim inicia-se um forte desenvolvimento dos ovários, dando em poucas semanas um aspecto fisiogástrico a rainha. O tempo, desde a fecundação até o início da postura, varia de acordo com a alimentação que as operárias forneçam à rainha, e portanto, é diretamente proporcional ao número de operárias existentes.

Damos em seguida o tempo levado por diversas rainhas virgens desde sua fecundação até o início da postura:

Melipona fasciata rufiventris: colônia forte (13-1 a 29-1-45) 16 dias.

Melipona schencki schencki: colônia fraca (17-1 a 16-2-45) 30 dias.

Melipona quadrifasciata anthidioides: colônia média (2-1 a 22-1-45) 20 dias.

Outras observações que fizemos foi a respeito do ciclo biológico de Melipona quadrifasciata anthidioides. É o seguinte, segundo varie a temperatura e outras condições ambientes:

<u>FASES</u>	<u>OPERÁRIA</u>	<u>RAINHA</u>
Ovo - desde 4,5 até 6,5 dias.		Desde 4,5 até 6,5 dias.
Larva - desde 7 até 8 dias.		Desde 7 até 8 dias.
Prepupa - desde 5 até 5,5 dias.		Desde 4,5 até 5 dias.
Pupa - desde 15,5 até 18 dias.		Desde 11,5 até 15 dias
De ovo à imago - desde 34 até 37 dias.		Desde 30 a 34 dias.

Para termos uma idéia da vitalidade das colmeias dos meliponíneos damos aqui os seguintes dados sobre a postura de duas rainhas, uma de Melipona e outra de Trigona:

Melipona quadrifasciata anthidioides: (Mandassáia) - Em 44 dias (9-7 a 22-8-46) pôs 590 ovos, o que dá uma média de 13 ovos diários, tendo um máximo de 22 ovps por dia.

Trigona: (Plebeia) mosquito (Mirim guassú) - De (9-7 a 24-7-46) pôs 249 ovos. De (9-8 a 24-8-46) pôs 1035 ovos, o que deu uma média de 69 ovos por dia; teve um máximo de 120 ovos diários.

Também no estudo da vida dos meliponíneos, tivemos nossa atenção atraída para seus favos de cria e seus pótes de mel e de pólen.

Esses pótes são conhecidos na ciência desde a sua descrição por Pierre Huber em Melipona doméstica do México (que segundo SCHENCK, 1932 é M. beecheii) e já DARWIN, 1860, fez algumas hipóteses à respeito da sua evolução. Nas melíponas êsses pótes alcançam o tamanho e forma de um ovo de galinha ou de um limão galego. Comumente possuem de 15 a 20 cc. de capacidade. Este modo de armazenar só existe nos Bombus e meliponíneos e evoluiu divergentemente do processo adotado pelas Apis em geral. No gênero Apis os alvéolos tanto são utilizados para criar filhos como para armazenar mel, ao passo que nos meliponíneos os alvéolos são usados exclusivamente para a criação de filhos. Um fato interessante ocorreu em duas de nossas colmeias: Em Fevereiro de 1945, tivemos uma colônia de Melipona schencki schencki muito fraca e parasitada por Phoridae que construiu para armazenamento, alvéolos iguais aos de filhos. Caso análogo observamos a 9-7-46 em uma colônia de Melipona marginata marginata que construiu colados á pótes antigos, alvéolos tipo de cria, para armazenar mel (fig. 1). Isso mostra que em casos de extrema penúria, essas abelhas utilizam para suas reservas células idênticas às de criação; mostra também a grande maleabilidade existente em seus atos instintivos, provavelmente devido ao fato de serem espécies em evolução.

Os alvéolos têm o tamanho do corpo de uma abelha adulta, e são uniformes em tamanho e formato para cada espécie. (Fig. 2).

A respeito da forma dos alvéolos temos a fazer a seguinte observação:

No gênero Melipona há só um tipo de alvéolo para tôdas as castas. No gênero Trigona há alvéolos com dois tamanhos: os pequenos que se destinam á operárias e á zangões, e os grandes destinados á rainhas. Nas Apis mais inferiores, como Apis dorsata, há células reais, porém, não há diferença entre alvéolos de operárias e de zangões (S.SINGH - citado por E.Root, 1943), e nas mais evoluídas, como Apis mellifera, existe um tipo de alvéolo especial para cada casta.

Um detalhe importante da economia doméstica dos meliponíneos com referência aos alvéolos de criação que observamos foi o seguinte: As operárias constroem êsses alvéolos com cêra secretada por suas glândulas dorsais, enchem-no com alimento, e, após a postura da rainha fecham-no herméticamente. Após uns tantos dias (14 aproximadamente)

*mkw*

te na M.q. anthidioides) a larva dessa célula já se transformou em prepupa e começa a tecer um casulo no seu interior. Nesse mesmo tempo as operárias começam a retirar essa cêra para utiliza-la em outros mistéres, deixando o casulo quasi nú.

Após a operária emergir dessa célula, esta é destruída e jogada fora por constituir-se em grande parte de dejeções e material inaproveitável. Esse fato, comum a todos os meliponíneos, foi também observado, porém mal interpretado por IHERING (1903), que julgou a destruição dos resíduos finais como atos perdulários das abelhas selvagens brasileiras. Esse mesmo fato, de deixar o casulo semi-descoberto é encontrado nos *Bombus*, porém não o é em *Apis*.

Também observamos que a forma de um alvéolo após sua construção é de prisma cilíndrico com as bases abauladas. Essa forma permanece até o fim nos alvéolos das margens dos favos, porém nos do interior, êsse formato muda para o de prisma exagonal, devido as pressões que são exercidas internamente pelas larvas adultas comprimindo-se mutuamente nas paredes das células.

A disposição dos alvéolos é muito variável. Assim encontramos espécies como *Trigona silvestris*, que possui seus alvéolos agrupados irregularmente em cachos unidos uns aos outros por pequenas colunetas de cêra, visivelmente pertencentes á um tipo primitivo. Outras espécies (também trígonoas) agrupam indistintamente seus alvéolos, ora em cachos, e ora em favos. Tôdas ou quasi tôdas espécies de meliponíneos que constroem seus alvéolos em favos organizam êsses alvéolos preferencialmente em camadas superpostas (Fig. 4) porém em uma ou outra época da vida da colônia, mudam essa organização, para um arranjo helicoidal. Este procedimento, comum nas trígonoas, observamos também nas *Meliponas*, em colônias de *M. fasciata rufiventris* e *M. quadrifasciata anthidioides* (Fig. 5).

Os machos não aparecem normalmente durante o inverno. Após o inverno os primeiros machos são botados em meados de Agosto. Da mos abaixo um quadro com as porcentagens de machos observados em amostras retiradas das colônias em diversas épocas do ano.

QUADRO I

Meliponas Trifatoriais		
Nº de caixas analisadas	Data	Porcentagem
10 caixas	16- 2 a 1- 7-46	0,0 %
3 "	9- 8 a 22- 8-46	22,8 %
3 "	13- 9 a 28- 9-46	34,9 %
6 "	29- 9 a 19-11-46	7,9 %
6 "	18-11 a 2- 1-47	0,7 %
4 "	17- 1 a 28- 2-47	4 0 %
4 "	25- 2 a 26- 3-47	15,0 %
1 caixa	10- 4 a 23- 4-47	18,9 %

QUADRO II

Meliponas Bifatoriais		
Nº de caixas analisadas	Data	Porcentagem
1 caixa	24- 3 a 1- 4-46	0,0 %
3 caixas	1- 4 a 18- 6-46	0,0 %
2 "	23- 7 a 25- 8-46	0,0 %
2 "	21- 8 a 24- 9-46	28,7 %
3 "	2-11 a 18-11-46	39,3 %
1 caixa	28-12 a 11- 1-47	3,6 %

Após o inverno de 1946, os primeiros machos foram botados dia 10 de Agosto na colônia 8, dia 15 de Agosto na colônia 1, e dia 24 de Agosto na colônia 5. Como vemos eles aparecem em diversas colmeias aproximadamente no mesmo tempo.

#### 4 - ANATOMIA DOS ORGÃOS GENITAIS

##### Aparelho genital masculino

Como métodos de trabalho e de dissecação tomamos por base os descritos no livro de Kennedy (1932). Usamos, quando necessário, como corante morfológico a Hematoxilina de Hansen.

O aparelho genital masculino do gênero *Melipona* (fig. 6) é formado por 2 testículos, 2 vasos deferentes, 2 vesículas seminais, canal ejaculador e penis. No nosso desenho para dar melhor idéia da localização acrescentamos a genitalia (sagitta, uncus, estipes e volsella) em vista dorsal.

Testículo: - Os testículos são corpos esbranquiçados na pupa, envolvidos por uma tênue membrana, formados por quatro tubos, (fig. 7) que na larva são facilmente identificados porém já na prepupa são unidos e emaranhados, de tal modo que só por cuidadosa dissecação podemos isolá-los. Esses quatro tubos acabam em quatro canais bem curtos, que por sua vez se abrem em um conduto único, o canal deferente.

Cada tubo testicular é composto de numerosas lojas com forma elipsóide, tendo um tamanho variando ao redor de 68,5 $\mu$ m de comprimento por 44,6 $\mu$ m de diâmetro (medidas tomadas em *Melipona schencki*).

Cada uma dessas lojas contém células na mesma fase de desenvolvimento, porém se examinarmos todo o comprimento do tubo veremos que conforme vamos caminhando para a extremidade desse tubo, as células vão nos aparecendo em estágio pouco mais adiantado.

É interessante notar que quando essas lojas, na prepupa, contém espermatogônias em metafase, todas ou quasi todas as placas metafásicas estão orientadas tangencialmente, talvez devido a qualquer pressão interna (fig. 20). Desde essa fase até a fase da formação dos espermatozoides o comprimento dessa loja aumenta cerca de 4 vezes, passando de uma forma esférica para uma forma elipsóide, sendo que os espermatozoides acumulam-se num polo (fig. 40).

Para cada loja há uma ou duas células alimentares, endoploides que começam a se desenvolver antes da meiose e alcançam seu tamanho máximo na espermatogênese e servem, talvez devido a sua função alimentar, como orientadoras dos espermatozoides de cada loja.

Vasos deferentes: - São muito tênues, e na sua extremidade anterior acham-se ligados aos testículos. Seu comprimento é variável segundo a espécie.

Vesícula Seminal: - É um alargamento mediano-terminal dos Vasos deferentes e tem tamanho e forma variáveis conforme o gênero e espécie. Essa vesícula atinge seu tamanho máximo no inseto adulto, ao passo que os testículos têm seu maior tamanho na fase pupal.

Canal ejaculador: - É de origem ectodérmica e na pupa ainda não se uniu perfeitamente com o canal deferente post-vesicular. Após sua união, não sabemos quando se rompe a parede celular que os separa, pois já achamos zangões prestes a emergir com a mesma intacta.

Penis: - É muito pequeno e fica localizado no meio da genitália assim como as glândulas acessórias e vesículas seminais, segundo indica a figura (fig. 6). Tem por cima o uncus, envolvendo-o lateralmente as estipes e mais posteriormente as sagitas, que são os órgãos principais para o processo de adaptação durante a cópula, e por baixo tem a espata.

Deixamos de descrever a genitália das melíponas devido acharem-se bem descritas nos trabalhos de SNODGRASS (1941) e SCHWARZ (1932, 1939).

#### Aparelho genital feminino

Os órgãos reprodutivos da fêmea consistem de: 1) dois ovários, 2) dois ovidutos, 3) útero, vagina e 4) Espermateca.

1) Ovários: - são formados por 4 ovaríolos cada um. Seu tamanho e seu volume variam nas castas operárias (fig. 10) e rainha e também entre as rainhas virgens (fig. 9) e fecundadas (fig. 11). Os comprimentos dos ovaríolos são: 1,7 a 2 mms na operária, 11,1 a 11,5 mms na rainha virgem e 76 mms na rainha fecundada (medidas tomadas em *Melipona fasciata melanoventer*, SCHWARZ, 1932). Tanto na rainha virgem como na rainha fecundada, as extremidades dos ovaríolos de ambos ovários são reunidos num só conjunto; deixamos de desenhar esse detalhe no desenho da fig. 9.

2) Ovidutos: - Cada ovário entrega os seus óvulos ao respectivo oviduto. Também estes ovidutos variam de tamanho nas diferentes castas. Na operária e rainha virgem possuem um alargamento esférico na desembocadura dos ovaríolos.

3) Útero e vagina: - Formam o tubo condutor restante para levarem o ovo ao exterior.

4) Espermateca: - Fica situada logo acima do útero. Tem forma esférica achatada; na operária mede aproximadamente 144 $\mu$  x 187 $\mu$ . Possui duas glândulas acessórias aderentes na sua base, cujo volume é de aproximadamente 1/8 da espermateca.

5 - CITOLOGIACromosomas somáticos

Usamos para a contagem de cromosomas somáticos os gânglios nervosos de larvas e prepupas, e também tecidos somáticos do ovário de pupas jovens. O método utilizado mais comumente foi o seguinte: Dissecávamos a larva em Ringer, (NaCl 0,65 gr. + KCl 0,025 gr. + CaCl<sub>2</sub> 0,03 gr. + Água bidistilada 100cc) levávamos a gânglio isolado para outra lâmina onde era esmagado rapidamente. Observávamos sob o microscópio até que a pouca água existente nas margens do material desaparecesse sob o mesmo; nesse instante colocávamos de 6 a 10 gotas do fixador. Usamos como fixadores principais neste método: Kahle modificado segundo SMITH, 1941 (15cc Alcool 95% + 6cc Formol comercial + 1cc Acido Acético Glacial) e Gilson-Petrunkewitsch, (150cc Água bidistilada + 100cc Alcool Absoluto + 45cc Acido Acético Glacial + 5cc Acido Nítrico 1,4 + Sublimado corrosivo até a saturação, que corresponde aproximadamente a 5 grs), variando o tempo de 4 a 10 minutos. Depois de lavado, o material era submetido a reação de Feulgen e montado pelos métodos comuns. Quando necessário usávamos "Fast-green" como corante de fundo.

Também fizemos diversos "smears" provisórios, utilizando a orseina acética como corante.

Podemos resumir o nosso trabalho neste sentido da seguinte maneira:

Melipona fasciata rufiventris - larva de operária - cérebro - 18 cromosomas.

Melipona fasciata rufiventris - larva de rainha - cérebro - 18 cromosomas.

Melipona marginata marginata - pupa de operária - ovário - 18 cromosomas.

Melipona marginata marginata - pupa de rainha - ovário - 18 cromosomas.

Melipona schencki schencki - larva macho - cérebro - 9 cromosomas.

Melipona schencki schencki - larva operária - cérebro - 18 cromosomas.

Melipona quadrifasciata anthidioides - larva operária - cérebro - 18 cromosomas.

Melipona quadrifasciata anthidioides - larva rainha - cérebro - 18 cromosomas.

MKer

Melipona quadrifasciata anthidioides - larva macho - cérebro - 9 cromosomas.

O tecido em que encontramos menos aberrações foi o cérebro, pois em outros tecidos é muito comum a poliploidia, quer de uma ou outra célula isolada, como também toda uma zona. Porém mesmo assim encontramos larvas com algumas células poliplóides no cérebro. Os cromosomas das células poliplóides são mais delgados que os das células diplóides.

### Espermatogênese

O estudo da espermatogênese foi feito com o intuito de verificar a que esquema pertenceria o gênero Melipona dos diversos existentes entre os Hymenopteros como relatados por Dreyfus e Breuer (1944, pg.72).

Assim queríamos saber si há divisão igual ou desigual da espermatogônia, si há ou não expulsão de broto citoplasmático e si este se dá na primeira ou segunda divisão e finalmente quantos espermatozoides resultariam no final da meiose oriundos de uma espermatogonia.

Os métodos que utilizamos são os utilizados comumente em estudos citológicos. Na fixação usamos os seguintes fixadores, enumerados segundo a maior frequência de utilização: Gilson-Petrunkewitsch, Dubose-Brasil (Solução A : 150cc Alcool 80% + 10 gr. Acido pícrico. Na hora de usar juntar: 15cc Solução A + 6cc Formol puro neutro + 1,5cc Acido Acético Glacial) Kahle modificado, Carnoy de Farmer (3 Alcool absoluto + 1 Acido acético) e Carnoy de Semmen (3 Alcool absoluto + 1 Acido Acético Glacial + 1 Cloroformio), ambos como prefixadores, Navashin, Flemming forte, (3,1cc Ac. crômico 10% + 30,0cc Acido Acético Glacial 10% + 12,0cc de ácido Osmico a 2% em solução aquosa de ácido crômico a 2% + Agua bidistilada 11,9cc) e Acetona.

Como corantes usamos: Feulgen, Feulgen e Hematoxilina de Heidenhein, Hematoxilina de Heidenhein, Janus green, Orceína acética e Violeta cristal.

Tanto o método de "smears" permanente ou provisório, como o de inclusão em parafina foram largamente utilizados.

Tomamos sempre o cuidado de utilizar os machos logo após retirados da colmeia, pois sua permanência por muito tempo no laboratório pode ocasionar distúrbios na realização da meiose. Esses distúrbios são provocados pela temperatura baixa que existe fora da co-

lônia.

BUCHNER (1915) descrevendo a técnica que deve-se empregar no estudo da espermatogênese de *Apis* aconselha também que se utilize somente os machos recém-retirados da colônia para evitar aberrações. Os distúrbios observados em *Melipona* serão analisados futuramente em uma publicação á parte.

Na metafase da espermatogônia contamos 9 cromosomas. Dessa divisão resultam dois espermátócitos de primeira ordem. Não há divisão desigual de citoplasma, como é o caso em *Telenomus fariai*, Lima, (DREYFUS e BREUER, 1944). Esses espermátócitos de primeira ordem iniciam um período de crescimento até alcançarem um estágio adulto em que executam a primeira divisão. O diâmetro do espermátócito porém aumenta de 2 a 3 vezes até sua completa maturação. O estágio do macho em que encontramos essas fases vai de prepupa jovem até pupa de olhos brancos. Em cada cisto dos tubos testiculares encontramos células na mesma fase, porém conforme nos aproximamos da saída para o canal deferente, achamos cistos com células um pouco mais adiantadas.

No espermátócito primário os cromosomas aparecem primeiramente nas margens dos núcleos aparentando, mesmo nos estágios mais avançados, um aspecto de cromosomas em cadeia, até individualizarem-se completamente no fim da diacinese e finalmente organizarem-se na placa equatorial na primeira metafase. Não há, em nenhum estágio da profase dessa primeira divisão, qualquer indício de pareamento.

O fuso que se forma nessa primeira metafase é inteiro. Firmamos isso porque em certos himenopteros como: *Diprion polytomum* Htg. (SMITH, 1941) *Xylocopa violacea*, (GRANATA, 1909), e outros, há formação de apenas um semi-fuso na I divisão.

Durante a primeira metafase há formação de diversas porções de condriosomas (facilmente observadas pela coloração com Janus green ou fixação com Flemming ou Benda), que se aglomeram formando 2 ou 3 paranúcleos, um dos quais completa-se após sua expulsão no broto citoplasmático.

Após os cromosomas estarem alinhados na placa equatorial, alinhamento êsse que é muito imperfeito devido a falta de pareamento, a membrana nuclear reforma-se e o núcleo vai para um pólo da célula, sendo expulso, do outro lado, o broto citoplasmático supra citado. (Fig. 24). A célula resultante é agora o espermátócito de segunda ordem.

Após o término dessa primeira divisão que deu origem ao es-

M. Kerr

permatócito de segunda ordem, a célula entra numa fase de repouso, interfase (fig. 26), em que vemos um núcleo grande com seu nucléolo (fig. 24). Encontramos a primeira divisão em pupas com olhos brancos até pupas com olhos rosa-claro.

A profase da segunda divisão, é mais rápida que a da primeira. Os cromosomas aparecem, aglomerados ou não, em uma zona muito restrita que quando na primeira divisão (figs. 27 e 28).

Alinham-se normalmente no equador, onde como na primeira metafase, pode-se contar os 9 cromosomas (fig. 29). Na anafase é comum contarmos no início 10, 15, 16 cromosomas mostrando que há alguns mais lentos e outros mais prestos na sua divisão. Devido o tamanho diminuto dos cromosomas não nos foi possível fazer um ideograma nem dizer qual sua ordem em iniciar a divisão.

A idade do macho em que se encontra a segunda divisão é a da pupa com olhos rosa a vermelho.

Na telofase (figs. 34 a 36) observamos um fenômeno interessante: há um deslocamento dos dois núcleos recém-formados de modo que um deles se aproxima da membrana celular, força-a e é expulso para fora. Essa segunda divisão dá portanto origem a somente um espermátide funcional, sendo o outro abortivo, desaparecendo tarde, ao iniciar-se a formação do espermatozóide, (figs. 37 a 39).

É interessante notar as diferentes variações na espermatogênese dos Himenopteros.

Nos Tenthredinidae (Diprion, SMITH, 1941 ; Pteronidea, SANDERSON, 1933) no gênero *Osmia* (ARMERUSTER, 1913) e alguns outros não há expulsão de broto citoplasmático na primeira divisão. No *Telenomus fariai*, Lima (DREYFUS e BREUER, 1944) há divisão desigual na espermatogônia, e a primeira divisão é normal, sendo a segunda a abortiva. Na maioria dos Aculeata a primeira divisão resulta na expulsão de um broto citoplasmático. (*Vespa*, MEVES e DUESBERG, 1908; *Xylocopa*, GRANATA, 1909; *Apis*, MEVES, 1907; *Polistes*, *Melipona*, *Trigona*, KERR, 1947; *Camponotus*, LAMS, 1908). Na maior parte dos Hymenopteros estudados, cada espermátocito de segunda ordem dá origem a dois espermátides funcionais (*Diprion*, *Pteronidea*, *Habrobracon*, *Vespa*, *Sirex*, *Polistes*, *Camponotus*, etc). Na super-família Apoidea entretanto êsse espermátocito de segunda ordem dá origem a somente um espermátide funcional, sendo o outro abortivo, como é o caso no gênero *Melipona*, que acabamos de descrever. M.J.D. WHITE (1945) diz sobre êsse fato o seguinte: "The functional significance of these cytoplasmic phenomena is far

M. K. W.

from clear. The bees are morphologically the most highly evolved group of the Hymenoptera, but they have preserved a remnant of the first meiotic division that has been lost in the far more primitive sawflies. Yet when we come to the second meiotic division the bees seem to have acquired a specialized mechanism whereby the cytoplasm is unequally distributed to the two spermatids, one of which is functionless".

Encadeando os dados da literatura sobre o assunto verificamos que há 4 tipos de espermatogênese entre os Hymenoptera segundo o modo de usarem o seu citoplasma. 1) Não ha expulsão de broto citoplasmático (Tenthredinidae). 2) Há expulsão de broto citoplasmático na primeira divisão como em Vespa, Polistes, Habrobracon (TORVING, GREB, 1935), Sirex (PEACOCK e GRESSON, 1931), etc. 3) Há expulsão de broto citoplasmático na primeira divisão e aborto de espermatídeo na segunda divisão (Apis, Melipona, Trigona, Xylocopa, etc). 4) Há divisão desigual de espermatogonia e expulsão de broto citoplasmático na segunda divisão. Com exceção do Telenomus fariaii que forma um caso um tanto particular os 3 primeiros tipos acham-se aproximadamente encadeados e correlacionados com o grau de evolução dos grupos que os apresentam.

### RESUMO

#### A - Cromosomas somáticos

- 1) Usou-se principalmente gânglios nervosos de larvas, prepupas e tecidos somáticos do ovário de pupas jovens.
- 2) Descreveu-se os métodos utilizados.
- 3) Constatou-se que as fêmeas, tanto rainhas como operárias, possuem 18 cromosomas em seus tecidos somáticos.
- 4) Constatou-se que os machos possuem 9 cromosomas nos seus tecidos somáticos.
- 5) Constatou-se que a Melipona marginata, Melipona fasciata, Melipona schencki e Melipona quadrifasciata possuem o mesmo número de cromosomas: 18 nas fêmeas e 9 nos machos.
- 6) Verificou-se a existência de células, tecidos e zonas poliplóides em diversas partes do corpo, porém não foram encontradas abelhas poliplóides.

## B - Espermatogênese

- 1) Descreveu-se os métodos usados.
- 2) Usou-se prepupas e pupas jovens até com a idade em que possuem olhos vermelhos.
- 3) A espermatogônia possui 9 cromosomas e resulta em dois espermatócitos de primeira ordem.
- 4) A primeira divisão da meiose é abortiva, havendo expulsão de um broto citoplasmático, originando portanto somente um espermatozoário de segunda ordem.
- 5) A segunda divisão é abortiva, como a de Apis (MEVES, 1907), originando um espermatídeo funcional e um abortivo.
- 6) Comparou-se a espermatogênese encontrada em Melipona com a de outros hymenópteros estudados.

## 6 - DETERMINAÇÃO DAS CASTAS

Existem diversos trabalhos em que se discute o problema da determinação das castas nos insetos sociais: Termitas, Vespas, Mangavas, Abelhas e Formigas, cuja extensa bibliografia pode-se ver nos trabalhos de LIGHT (1943) e WHEELER (1928). Em todos esses estudos constatamos a existência de duas teorias explicativas: blastogênica, ou determinação genotípica e trofogênica, ou somatogênica, que é a determinação por meio de alimentos ou outros fatores devido ao meio.

Ninguém duvida hoje em dia que a casta dos machos, nos Hymenopteros, seja geneticamente determinada; com um ou outro caso particular (Habrobracon, WHITING, 1940) todos os machos dos Hymenoptera são determinados por partenogênese arrenótoca. Esse é também o caso das melíponas, como verificado por sua citologia.

A existência da determinação de castas trofogenicamente já foi constatada em diversos grupos dos insetos sociais, como: mamangavas, (FRISON, 1928 e OSORNO, 1938), trígonas, (PEREZ, 1895), Apis (JURINE, 1814 e DZIERZON, 1845) e provavelmente algumas formigas (WESSON, 1940) porém a determinação blastogênica só tem um representante comprovado: o gênero Melipona (KERR, 1946).

WHEELER (1937) em sua publicação: "Mosaics and other anomalies among ants", sugeriu a determinação genotípica em formigas devido a certos mosaicos e mutações verificadas principalmente em *Acromyrmex octospinosus*. WHITING (1938) fazendo uma revisão do trabalho de WHEELER interpreta os mesmos indivíduos como inter-castas produzidas por alimentação ou como indivíduos inter-sexuados. Sua interpretação é feita devido pôr em dúvida a existência de um esquema genético que explicasse tal mecanismo. Hoje, de acordo com o que sabemos em Melipona, podemos apresentar explicações razoáveis para tais aberrações.

Sobre a determinação das castas no gênero Melipona há muito pouco trabalho realizado.

PEREZ (1895) estudando a biologia de Trigona clavipes, teve oportunidade de comprovar a formação de rainhas por meio de maior quantidade de alimentos, nessa espécie; PEREZ generalizou suas observações para o gênero Melipona, que embora sejam corretas tratando-se do gênero Trigona não o são para as Meliponas.

IHERING (1903) no Brasil e SALT (1929) na Colômbia já venti-

MKer

laram a questão das castas nas meliponas. SALT acusou a sua importância biológica e IHERING concluiu de alguns dos fatos expostos que os ovos já estavam determinados no momento da postura.

A êsse respeito diz IHERING o seguinte: "É absurdo admitir que as condições exteriores devam determinar o sexo e casta do indivíduo durante a sua fase larval, quando nos Meliponíneos, da mesma forma como entre as abelhas solitárias, as células são fechadas logo ao receberem o ovo, o qual portanto, desde êste momento, tem a sua evolução pre-determinada. É errado, também supor que irá depender da quantidade de alimento, si do ovo da rainha deverá nascer uma simples obreira ou uma rainha, quando nas Meliponas, num e noutro caso, a quantidade de alimento é a mesma".

IHERING achou que a existência de células não diferenciadas para rainhas nas Meliponas era de tal importância que a considerou por muito tempo como sendo a distinção fundamental entre Melipona e Trigona, embora mais tarde, devido observações incompletas em Trigona capitata, tenha mudado sua opinião.

SCHWARZ, um dos maiores especialistas na sistemática dos meliponíneos, na definição do gênero Melipona (1932) include o seguinte detalhe: "The virgin queens of Melipona do not exceed the worker in size, being usually smaller, with thorax narrower than that of the worker; whereas in other Meliponidae, so far as known, the queen has a thorax wider than that of the worker and is a bulkier insect. This reversal in the relationship of the size of the worker and of the queen is probably correlated with the fact that in Melipona the queen cells are undifferentiated from those of the worker, whereas in Trigona the royal cell is easily recognised by its size" (pg. 260).

Depois dessas sugestões ninguém mais preocupou-se a fundo com este problema, se bem que nos pareça de suma importância não só para a questão especializada da biologia dos meliponíneos mas também para o problema geral da filogenia da diferenciação social dos apocidas e outros insetos sociais, como formigas, termitas e vespas.

Para demonstrar a determinação genética das castas no gênero Melipona daremos um resumo de todos os nossos dados até o presente momento inclusive os já publicados (KERR, 1946).

#### MÉTODOS

Tomámos favos com número variável de alvéolos, trouxemos ao laboratório, e registramos as castas após as larvas terem-se tornado

pupas ou após a abelha imergir da sua célula. Em ambos os casos a diferenciação entre operária e rainha é facilílima.

No caso de serem pupas, reconhece-se facilmente a rainha pelo tamanho diminuto da cabeça e olhos, ou pelo grande abdomen. Para saber si é macho ou operária temos que, ou examinar a genitália, que é facilmente diferenciável, ou então contar os artículos das antenas que no macho são em número de 13 e na fêmea de 12. No caso de serem insetos adultos podemos distinguir as operárias das rainhas devido ás primeiras serem maiores e de côres mais vivas e acentuadas que as rainhas, e também por ser o formato e tamanho do abdomen diferentes. O torax e principalmente a cabeça são menores nas rainhas.

Não nos é possível fazer as contagens das castas por uma amostra ao acaso de população de uma colônia devido as abelhas matarem as numerosas rainhas logo após seu nascimento desde que não tenham necessidade delas. Por isso estabelecemos o critério de levar os favos para o laboratório e esperar aí o nascimento das abelhas.

#### MATERIAL

Colônias de: - Melipona quadrifasciata anthidioides (IEP., 1836); Melipona quadrifasciata quadrifasciata (IEP., 1836); Melipona schencki schencki (GRIBODO, 1893); Melipona fasciata rufiventris (IEP., 1836); Melipona fasciata melanoventer (SCHWARZ, 1932); Melipona marginata marginata (IEP., 1836). Com exceção da Melipona marginata que é um tipo pequeno, os demais são abelhas grandes.

#### RESULTADOS

Os resultados das contagens foram registrados em dois quadros, um, Quadro III, para as melíponas grandes (M. quadrifasciata, M. schencki, M. fasciata) e outro, Quadro IV, para a Melipona marginata.

Como podemos vêr em ambos os quadros (III e IV) há dois períodos na porcentagem de rainhas durante o ano: um, de alta porcentagem e que vai de Setembro a Abril, e outro, durante o inverno, de Maio a Agosto, com baixa porcentagem.

Analisaremos em primeiro lugar essa porcentagem alta, que chamaremos normal, em virtude de ser nesse período que a colmeia tem o seu máximo de atividade e por as condições ambientes favorecerem o seu amplo desenvolvimento.

Devido a molestias ou outras influências externas, a porcentagem de rainhas pode ser alterada; êsses resultados foram agrupados

no Quadro V para estudos no final deste capítulo.

Tanto no Quadro III como no Quadro IV chamamos à série de dados desse período normal de grupo 1 + grupo 3. Verificamos que, num total de 1489 abelhas do Quadro III haviam 169 rainhas e 1320 operárias, dando 11,35% de rainhas. Por outro lado, no Quadro IV em 398 abelhas (grupo 1 + grupo 3) existem 87 rainhas e 311 operárias, dando uma porcentagem de rainhas igual a 21,86%. Vemos que esses dados estão muito próximos de duas segregações mendelianas 7:1 (12,5%) e 3:1 (25%). Como o número de indivíduos analisados é bastante grande e foi tomado em diversas amostras pequenas, porém suficientes para testes estatísticos, resolvemos tomar como valores ideais esperados nas análises estatísticas os calculados segundo as proporções 7:1 e 3:1.

Usamos para essas análises o  $\chi^2$  teste, e como podemos verificar pelos Quadros III e IV na coluna em que relatamos o resultado do teste, não há significância alguma para os  $\chi^2$  sobre as amostras individuais e nem sobre o  $\chi^2$  para o total (grupo 1 + grupo 3).

A soma dos  $\chi^2$  individuais é:

Quadro III (15 amostras)	operárias = 1,7202 rainhas = 11,9524 $\Sigma \chi^2 = \underline{13,6726}$
Quadro IV (6 amostras)	operárias = 1,9014 rainhas = 5,7043 $\Sigma \chi^2 = \underline{7,6057}$

Também aqui vemos que os dados variam ao acaso ao redor dos valores teóricos estabelecidos (3:1 e 7:1), não havendo qualquer significância, pois os limites são: para  $nf = 15$   $\left\{ \begin{array}{l} 1\% = 30,6 \\ 5\% = 25,0 \end{array} \right.$

para  $nf = 6$   $\left\{ \begin{array}{l} 1\% = 16,8 \\ 5\% = 12,6 \end{array} \right.$

Temos assim a prova estatística de que os nossos dados correspondem aos valores teóricos que lhes propusemos.

*u/Keur* 22

QUADRO 3

SEGREGAÇÃO EM MELIPONAS TRITATORIAS

Espécies	Data da postura	Castas			Rainha	X <sup>2</sup>		
		Oper.	Rainha	Total	%	Oper.	Rainha	
<u>Grupo 1</u>								
4-fasc.ant.	1 16- 2 a 27- 2-46	69	8	77	10,39	0,0392	0,2744	
4-fasc.ant.	1 20- 2 a 5- 3-46	144	18	162	11,10	0,0357	0,2499	
4-fasc.ant.	2 27- 2 a 7- 3-46	52	8	60	13,30	0,0048	0,0336	
4-fasc.ant.	3 6- 3 a 17- 3-46	45	10	55	18,10	0,2092	1,464%	
4-fasc.vic.	4 14- 3 a 26- 3-46	56	4	60	6,60	0,2333	1,6333	
4-fasc.vic.	4 26- 3 a 28- 3-46	29	4	33	12,10	0,0005	0,0038	
<u>Grupo 2</u>								
4-fasc.ant.	3 9- 5 a 16- 5-46	52	2	54	3,70	0,4775	3,3426	
4-fasc.ant.	2 14- 5 a 24- 5-46	73	2	75	2,67	0,8288	5,8017	
4-fasc.ant.	3 28- 5 a 6- 6-46	56	2	58	3,45	0,5431	3,8017	
4-fasc.ant.	3 20- 6 a 1- 7-46	43	2	45	4,70	0,3337	2,3367	
4-fasc.ant.	1 9- 8 a 16- 8-46	79	3	82	3,66	0,7326	5,1280	
4-fasc.ant.	3 12- 8 a 22- 8-46	77	4	81	4,94	0,5293	3,7052	
4-fasc.ant.	12 12- 8 a 17- 8-46	31	2	33	6,60	0,1564	1,0947	
4-fasc.ant.	3 13- 9 a 17- 9-46	85	1	86	1,16	1,2663	8,8430	
4-fasc.ant.	1 16- 9 a 22- 9-46	40	0	40	0,00	0,7143	5,0000	
<u>Grupo 3</u>								
schenc.schenc.13	20- 9 a 28- 9-46	11	4	15	26,66			
4-fasc.ant.	2 29- 9 a 6-10-46	78	8	86	9,30	0,1004	0,7030	
4-fasc.ant.	14 26-10 a 10-11-46	57	9	66	13,60	0,0227	0,0682	
schenc.schenc.13	28-10 a 2-11-46	71	8	79	10,13	0,0509	0,3560	
schenc.schenc.13	6-11 a 13-11-46	41	2	43	4,65	0,3027	2,1191	
4-fasc.ant.	2 11-11 a 19-11-46	91	8	99	8,08	0,1430	1,0014	
fasc.melan.	16 18-11 a 20-11-46	28	2	30	6,66			
fasc.rufivent.	17 8-12 a 12-12-46	18	4	22	18,18			
4-fasc.ant.	12 13-12 a 23-12-46	156	23	179	12,85	0,0024	0,0174	
4-fasc.ant.	12 17- 1 a 25- 1-47	97	12	109	11,01	0,0277	0,1938	
4-fasc.ant.	12 22- 2 a 11- 3-47	177	17	194	8,76	0,3096	2,1675	
4-fasc.ant.	12 10- 4 a 23- 4-47	100	20	120	16,66	0,2381	1,6666	
Grupo 1	---	395	52	447	11,63	0,0384	0,2687	
Grupo 2	---	536	18	554	3,25	5,4183	37,929	
Grupo 3	---	925	117	1042	11,23	0,1936	1,3479	
Grupo 1 + 3	---	1320	169	1489	11,35	0,2251	1,5756	

QUADRO 4  
SEGREGAÇÃO EM MELIPONA MARGINATA

Número	Data da postura	Castas			Rainha %	X <sup>2</sup>		
		Oper.	Rainha	Total		Oper.	Rainha	
<u>Grupo 1</u>								
5	24- 3 a 1- 4-46	34	14	48	29,1	0,1111	0,3333	
5	1- 4 a 14- 4-46	83	27	110	24,5	0,0030	0,0092	
<u>Grupo 2</u>								
5	2- 6 a 18- 6-46	118	11	129	8,4	4,6673	14,0020	
9	8- 6 a 18- 6-46	73	2	75	2,7	4,9877	14,9630	
9	23- 7 a 4- 8-46	158	11	169	6,6	7,7046	23,1140	
5	18- 8 a 25- 8-46	14	0	14	0,0	1,1666	3,4999	
5	21- 8 a 3- 9-46	9	1	10	10,0	0,3000	0,9000	
<u>Grupo 3</u>								
9	18- 9 a 24- 9-46	62	12	74	16,2	0,7613	2,2838	
15	2-11 a 10-11-46	32	6	38	15,8	0,4298	1,2895	
15	2-11 a 10-11-46	39	7	46	15,2	0,5870	1,7609	
15	13-11 a 18-11-46	1	0	1	--	---	---	
15	28-12 a 11- 1-47	60	21	81	25,9	0,0092	0,0277	
Grupo 1	---	117	41	158	25,9	0,0019	0,0569	
Grupo 2	---	372	25	397	6,3	18,5150	55,5470	
Grupo 3	---	194	46	240	19,2	1,0889	3,2667	
Grupos 1 + 3	---	311	87	398	21,9	0,5234	1,5703	

u/Keur

QUADRO V  
SEGREGAÇÕES ANORMAIS

Espécies	Data da postura	Castas		Rainha %	Observações
		Oper.	Rainha		
4-fasc.ant.	1 16-10 a 24-10-46	111	4	3,48	(1)
4-fasc.ant.	1 28-11 a 2-12-46	57	3	5,00	(1)
fasc. rufiv.	17 10-12 a 18-12-46	170	6	3,44	(3)
4-fasc. ant.	14 15-12 a 28-12-46	121	9	6,92	(2)
schenc.schenc.13	26- 1 a 1- 2-47	119	5	4,03	(2)
fasc. rufiv.	17 10- 2 a 15- 2-47	42	0	0,00	(3)
4-fasc.ant.	12 19- 2 a 28- 2-47	83	2	2,35	(4)
schenc.schenc.13	25- 2 a 2- 3-47	147	9	5,77	(2)
schenc.schenc.13	6- 3 a 10- 3-47	80	3	3,61	(2)
schenc.schenc.13	19- 3 a 26- 3-47	174	9	4,92	(2)

(1) Parasitado por phorideos (Dipt.)

(2) Doenças bacterianas.

(3) Enfraquecida por troca de caixas e por transporte aéreo.

(4) Nesta data (19-2-1947) tiramos um favo de filhos para estudo.

DISCUSSÃO

Os indivíduos analisados eram provenientes de 13 colônias diferentes recém-chegadas das matas. Algumas delas após algum tempo perderam suas rainhas, que foram substituídas por outras, portanto fecundadas aqui, e em tôdas elas verificou-se a mesma proporção de castas que vínhamos observando.

Pelos nossos téstes estatísticos ficou provado que nas melíponas grandes há uma segregação de 7 operárias para 1 rainha e na Melipona marginata há uma segregação de 3 operárias para 1 rainha.

Sendo os machos das melíponas haplóides, como ficou provado por sua citologia, são consequentemente homogaméticos, isto é, todos os seus espermatozóides têm uma mesma constituição gênica. O seu cruzamento com a rainha segue um mesmo esquema que um pai homozigoto em um "back-cross", portanto para explicar as nossas proporções mendelianas devemos idealizar fórmulas que correspondam a uma segregação tipo "back-cross" para quaisquer formas homozigotas, tanto dominantes como recessivas.

Teremos para um "back-cross" bifatorial (3:1) a seguinte situação:

$$AaBb \times aabb = \frac{1}{4} AaBb + \frac{1}{4} Aabb + \frac{1}{4} aaBb + \frac{1}{4} aabb$$

Achamos desde o início que deveríamos considerar a rainha como a "totalmente heterozigota" por ter ela que dar origem a todos os indivíduos da colônia. É claro que, sendo os machos haplóides, e portanto homogaméticos, de seu cruzamento com uma fêmea homozigota, só poderia resultar uma única casta e nunca qualquer segregação. A única explicação que nos permitirá entender todos os cruzamentos possíveis da rainha com qualquer tipo de zangão será considerando-a como a duplo-heterozigota: AaBb.

Os machos terão, por serem partenogenéticos, qualquer das 4 fórmulas correspondentes a segregação gônica da rainha: AB, Ab, aB, ab.

As operárias por sua vez têm tôdas as demais combinações que possuam um ou dois fatores em homozigose, como por exemplo:

$$AaBb \times AB = AaBb + (\underline{AABB} + \underline{AABb} + \underline{AaBB})$$

1 Rainha + 3 operárias

Damos no Quadro VI uma explicação mais detalhada mostrando que qualquer que seja o cruzamento considerado sempre obtemos 3 operárias para 1 rainha.

Para explicar o segundo caso, onde a porcentagem de rainhas

é ao redor de 12,5% (Quadro III), logo correspondente a segregação 7:1, é suficiente considerarmos que, nessas espécies (melíponas grandes) ao envez de termos dois fatores determinantes das castas temos três. Desta maneira, a rainha será a tripla-heterozigota: AaBbCc, sendo a sua segregação gônica: ABC, ABc, AbC, Abc, aBC, aBc, abC, abc.

Os zangões como são originários de ovos não fertilizados terão uma das 8 constituições citadas. As operárias serão aquelas em que houver um, dois ou três fatores em homozigose. Para ilustrar esse caso construímos o Quadro VI.

Estabelecemos portanto, com as considerações acima, o seguinte princípio para a determinação genética das castas: os indivíduos totalmente heterozigotos terão seus órgãos sexuais desenvolvidos, serão férteis, e os indivíduos com qualquer homozigose serão estéreis.

Essa explicação, atribuindo ao genotipo completamente heterozigoto um fenotipo diferente dos demais, pode parecer um tanto estranha, porém encontramos certo paralelo em alguns casos da literatura dos quais citaremos:

GUSTAFSSON (1947) cruzando dois tipos de cevada contendo os gens recessivos xantha e albina verificou que as plantas dihíbridas (AaBb) distinguiam-se das plantas normais (AABB) e das monohíbridas (AaBB e AABb) por suas melhores qualidades e maior vigor.

WRIGHT e DOBZHANSKY (1946) mostraram que, em certas condições ecológicas, indivíduos de *Drosophila pseudo-obscura*, heterozigotos para uma inversão, tinham maior viabilidade em competição com as duas formas heterozigotas. Essas citações e outras sobre o milho que poderíamos transcrever considerámos como paralelos à nossa explicação.

QUADRO VI

AaBb x ab		AaBb x aB		AaBb x AB	
♀ \ ♂	ab	♀ \ ♂	aB	♀ \ ♂	AB
AB	AaBb = <u>rainha</u>	AB	AaBB = operária	AB	AAHB = operária
Ab	Aabb = operária	Ab	AaBb = <u>rainha</u>	Ab	AABb = operária
aB	aaBb = operária	aB	aaBB = operária	aB	AaRB = operária
ab	aabb = operária	ab	aaBb = operária	ab	AaBb = <u>rainha</u>

QUADRO VII

AaBbCc x ABC		AaBbCc x ABc		AaBbCc x abc	
♀ \ ♂	ABC	♀ \ ♂	ABc	♀ \ ♂	abc
ABC	AABBCc = operária	ABC	AAHBCC = operária	ABC	AaBbCc = <u>rainha</u>
ABc	AABBCc = operária	ABc	AABBCc = operária	ABc	AaBbcc = operária
AbC	AABbCC = operária	AbC	AABbCc = operária	AbC	AabbCc = operária
Abc	AABbCc = operária	Abc	AABbcc = operária	Abc	Aabbcc = operária
aBC	AaBbCC = operária	aBC	AaBbCc = operária	aBC	aaBbCc = operária
aBc	AaBbCc = operária	aBc	AaBbcc = operária	aBc	aaBbcc = operária
abC	AaBbCC = operária	abC	AaBbCc = <u>rainha</u>	abC	aabbCc = operária
abc	AaBbCc = <u>rainha</u>	abc	AaBbcc = operária	abc	aabbcc = operária

Provas adicionais

Podemos adicionar aos dados citados mais algumas provas que contribuirão para consolidar nossas conclusões:

1) As rainhas de Apis, Bombus e Trigona diferem das operárias somente por seu tamanho e proporções, porém diversas espécies de Melipona têm rainhas que diferem das operárias não só em tamanho e proporções mas também na coloração. Como exemplo temos as Meliponas quadrifasciadas e Meliponas quinquefasciadas, cujas operárias têm os tergitos pretos com bandas amarelas ao passo que as rainhas são uniformemente coloridas de marron escuro. Esse efeito é difícil admitir-se como produzido pela alimentação.

FRITZ MÜLLER (1875) examinando ninhos de Melipona covrepi, Müller, pensou ter encontrado uma espécie parasítica, Melipona cucullina Müller, que IHERING (1903) ao rever a descrição verificou tratar-se da rainha virgem. Esse acontecimento é suficiente para mostrar quão diferentes são as rainhas das operárias.

2) As células donde nascem as rainhas virgens de Melipona têm o mesmo tamanho e a mesma quantidade de alimento que as células de onde nascem operárias. Esse fato foi verificado por todos os biólogos que estudaram esse gênero (SILVESTRI 1902, IHERING 1903, MARIANNO 1911, WHEELER 1923, 1928, SALT 1929) e também confirmado amplamente em nossas observações.

3) Todas as células são enchidas com alimento por diversas operárias ao mesmo tempo e logo que os alimentos atinjam um determinado nível a rainha põe o seu ovo. Esses passos tornariam muito complicada uma possível diferenciação das castas pela alimentação porque não há células diferentes para provocarem um estímulo especial, como em Apis.

4) Fizemos em Apis e Trigona certas observações quanto a posição das células reais nos favos. Em Apis verificamos que a grande maioria de células reais são colocadas na parte terminal dos favos e são produzidas em grande quantidade quando por qualquer circunstância a rainha vem a faltar. Nas trígona as células reais são arrumadas preferencialmente nas margens do favo porém mesmo que morra a rainha não há acréscimo de células reais, por todas elas serem fechadas após a postura.

Si fosse a alimentação a determinante das castas nas meliponas, seria de esperar-se uma situação idêntica, isto é, um arranjo preferencial, provavelmente nas margens dos favos, das células destinadas a rainha. Sob essa orientação tomamos diversos favos com

MKer

pupas e desoperculámos tôdas as células; após isso tomámos nota da localização das células onde existiam operárias ou rainhas, desprezando as em que haviam zangões. Dêsses favos escolhemos um, de Melipona quadrifasciata anthidioides, (fig. 41) e outro de Melipona marginata marginata, (Fig. 42) nas quais as proporções entre operárias e rainhas foram extremamente próximas a segregação ideal 7:1 e 3:1.

Executámos nesses dois favos téstes estatísticos procurando provar que a distribuição das células de rainhas estão distribuídas ao acaso, isto é, não há qualquer preferência em seu agrupamento.

Para poder executar aqui uma análise estatística temós em primeiro lugar, que reunir os alvéolos em grupos ou amostras para depois verificar si o aparecimento de rainhas, dentro dêsses grupos, pode ou não ser atribuído ao acaso. Uma vez que a distribuição dos alvéolos não nos indicou "a priori" qualquer método objetivo de agrupamento, escolhemos subjetivamente os princípios para tal finalidade.

Em segundo lugar precisamos resolver como executar o teste estatístico, levando em consideração o número de alvéolos por amostra, que é muito pequeno. Como demonstrado por BRIEGER (1946) podemos usar uma aproximação à distribuição de Gauss mesmo em amostras pequenas desde que um dos tipos apareça com frequência superior a 0,1 (ou 10%). Preferimos entretanto, para os nossos casos, usar distribuições mais exatas, tais sejam as distribuições binominais, em vez de aplicar um teste  $X^2$  ou calcular os desvios relativos.

As considerações teóricas a respeito do que expuzemos acima encontram-se bem detalhadas nos trabalhos de BRIEGER sôbre números mínimos (1947 a) e sôbre amostras pequenas (1947 b), que tomamos como básicos na execução destas análises.

Nas séries de alvéolos que vamos analisar podemos encontrar em cada amostra 0, 1, 2, 3, etc., rainhas. Para calcular as probabilidades de encontrar 1, 2, 3, etc., rainhas nas diversas séries de alvéolos, usamos da expansão do binômio  $(q+p)^n$  onde  $p$  representa a frequência de ter rainhas,  $q$  representa a frequência de não ter rainhas, (ou seja de ter operárias) e finalmente  $n$  é o número de alvéolos de cada série. O primêiro termo da expansão do binômio representa a frequência provável de obtermos 0 rainhas no número  $n$  de alvéolos considerado; o segundo termo nos dará a frequência provável de encontrarmos 1 rainha, o 3º de encontrarmos 2, o 4º de encontrarmos 3 rain-

*reflex*

nhas e assim por diante. A resolução do Binômio de Newton é:

$(q+p)^n$	$=$	$q^n$	$+$	0 rainha
		$+ nq^{n-1} p$		1 rainha
		$+ \frac{n!}{2!} q^{n-2} p^2$		2 rainhas
		$+ \frac{(n-1)!}{3!} q^{n-3} p^3$		3 rainhas
		$+ \text{etc...}$		etc...

A) Para executarmos a primeira análise (fig.4) fizemos a soma dos indivíduos de cada coluna e anotamos o número de rainhas e operárias encontradas nas direções A, B, e C. As anotações foram organizadas no Quadro VIII sob o título de: "observado".

Como as extremidades eram muito pequenas somamos cada uma delas com a coluna subsequente. A ordem que seguimos para as contagens foi da esquerda para a direita, mantendo a ponta da flexa em questão voltada para cima. Temos, desse modo, uma série de amostras formadas de 9 a 14 alvéolos e, de acordo com a variação do acaso, podemos esperar em cada amostra 0,1,2,3, etc... rainhas.

As probabilidades nas diferentes amostras podem ser calculadas pela resolução do Binômio, onde p representa a frequência de ter rainhas, que em nosso caso será 1/8 e q representa a probabilidade de não ter rainhas, sendo neste caso 7/8 e, finalmente, n é o número de indivíduos, portanto neste problema será o número de alvéolos: 9, 10, 11, 12, 13 ou 14.

Aplicando a fórmula do Binômio ao nosso caso, para n=9 teremos:

$$\left(\frac{7}{8} + \frac{1}{8}\right)^9 = \left(\frac{7}{8}\right)^9 + 9\left(\frac{7}{8}\right)^8 \frac{1}{8} + 36\left(\frac{7}{8}\right)^7 \left(\frac{1}{8}\right)^2 + 84\left(\frac{7}{8}\right)^6 \left(\frac{1}{8}\right)^3 + \text{etc...}$$

mKer

## QUADRO VIII

Observado			Probabilidades calculadas	Significância para 1% e 0,1%
Operárias	Rainhas	Total		
<u>Direção A</u>				
11	0	11	23,020 %	..
9	1	10	37,583 %	..
10	2	12	27,131 %	..
9	4	13	5,248 %	..
10	1	11	36,174 %	..
10	0	10	26,309 %	..
11	1	12	34,530 %	..
6	5	11	0,633 %	duvidoso
12	0	12	20,143 %	..
9	1	10	37,583 %	..
9	2	11	25,839 %	..
12	1	13	32,731 %	..
11	1	12	34,530 %	..
10	2	12	27,131 %	..
9	1	10	37,583 %	..
8	1	9	38,659 %	..
<u>Direção B</u>				
12	2	14	28,641 %	..
9	1	10	37,583 %	..
12	0	12	20,143 %	..
10	3	13	14,696 %	..
10	1	11	36,174 %	..
11	2	13	28,058 %	..
8	5	13	1,349 %	..
11	2	13	28,058 %	..
10	1	11	36,174 %	..
9	1	10	37,583 %	..
12	1	13	32,731 %	..
11	2	13	28,058 %	..
10	2	12	27,131 %	..
10	0	10	26,309 %	..
10	0	10	26,309 %	..
<u>Direção C</u>				
13	1	14	30,844 %	..
10	0	10	26,309 %	..
11	2	13	28,058 %	..
12	1	13	32,731 %	..
10	2	12	27,131 %	..
10	1	11	36,174 %	..
10	2	12	27,131 %	..
11	2	13	28,058 %	..
11	2	13	28,058 %	..
11	2	13	28,058 %	..
10	1	11	36,174 %	..
11	2	13	28,058 %	..
9	2	11	25,839 %	..
8	1	9	38,659 %	..
9	2	11	25,839 %	..

que resolvido nos dará:

<u>Binômio</u>	<u>Fracões</u>	<u>Porcentagens</u>	<u>Número de rainhas</u>
$(\frac{7}{8} + \frac{1}{8})^9 =$	0,3007 +	30,07	0
	+ 0,3866 +	38,66	1
	+ 0,2209 +	22,09	2
	+ 0,0736 +	7,36	3
	+ 0,0158 +	1,58	4
	+ 0,0022 +	0,22	5
	+ etc...	etc...	etc...
	1,0000	100,00	9

Calculamos esse binômio para cada um dos números de indivíduos das nossas colunas e achamos os seguintes resultados, que transformamos em porcentagens:

QUADRO IX

Valor de n	Probabilidade em % de encontrarmos :					
	0 rainha	1 rainha	2 rainhas	3 rainhas	4 rainhas	5 rainhas
9	30,066	38,659	22,089	7,363	1,578	0,225
10	26,309	37,583	24,160	9,204	2,301	0,394
11	23,020	36,174	25,839	11,073	3,164	0,633
12	20,143	34,530	27,131	12,919	4,153	0,949
13	17,625	32,731	28,058	14,696	5,248	1,349
14	15,422	30,844	28,641	16,365	6,429	1,837

Organizamos os dados no Quadro VIII afim de compara-los. Colocamos os resultados observados nas três primeiras colunas: a primeira para o número de operárias, a segunda para o número de rainhas e a terceira para o total de indivíduos. Na quarta coluna colocamos as probabilidades de encontrar o número de rainhas observado no total de indivíduos de cada linha. Essas probabilidades retiramos do Quadro IX.

*refm*

Estatisticamente sabemos que o limite de precisão não é um fator absoluto (BRIEGER, 1937, 1945, 1946). Adotamos a fórmula empírica de BRIEGER em que os acontecimentos são considerados improváveis quando esperados com a probabilidade de  $1/10n$  e prováveis quando esperados com a probabilidade de  $1/5n$ , sendo  $n$  o número de comparações.

Para o nosso caso as comparações são as 46 análises. Portanto um caso esperado com frequência maior que  $\frac{1}{5 \times 46}$ , ou seja 0,00435 (0,43%) ainda é possível acontecer, sendo o limite de impossibilidade abaixo de  $\frac{1}{10 \times 46}$ , ou seja 0,00218 (0,22%). Si quizessemos aplicar os limites convencionais, deveríamos considerar, em o nosso caso, como limite de probabilidade o valor 1% e como improbabilidade 1%.

A aplicação do limite de 5% não tem justificativa alguma em nosso caso, pois um acontecimento esperado uma vez em 20 é possível acontecer em 46 comparações. Dentro dos limites de 1% e 1% teríamos assinalado um valor na direção A como duvidoso (0,633%), que marcaríamos no Quadro VIII. Porém a aplicação desses limites convencionais não se justifica pois um acontecimento esperado teoricamente uma vez em 100 pode ser encontrado em 46 comparações, como demonstrado acima pela fórmula de BRIEGER.

Fora essa justificativa estatística para o nosso valor duvidoso (0,633%) podemos dar uma justificativa biológica: Por uma vista de olhos na coluna em questão, da Direção A, vemos que esses alvéolos estão muito distanciados um dos outros. Podemos acrescentar pelas nossas observações que nos alvéolos do centro os ovos foram botados cerca de 8 a 12 dias antes dos da beirada, o que sugere a impossibilidade de uma seletividade por parte das operárias. A única coluna que nos levou a suspêitas foi a 8a. da Direção A, onde há em 13 indivíduos, 9 operárias e 4 rainhas, tendo tôdas, aproximadamente, uma mesma idade; porém constatamos que esse valor é esperado com uma frequência de 5,24%, portanto dentro dos nossos limites.

Uma vez que na análise anterior não levamos em consideração a ordem provável da postura, fizemos outro teste agrupando séries de 14 alvéolos seguindo aproximadamente a época de postura. A primeira amostra é representada pelos 14 alvéolos isolados do centro (fig.41), sendo as outras amostras tomadas consecutivamente, de 14 em 14 alvéolos, a partir da rainha supra colocada na coluna 9, sendo a contagem executada em espiral na direção contrária á rotação dos ponteiros do relógio. Para essas amostras de 14 alvéolos temos os seguintes núme-

ros de rainhas: 3-3-3-2-2-3-1-2-0-1-1-1-, sobrando uma última série de 11 indivíduos com uma rainha.

Para 14 indivíduos a probabilidade de obtermos:

0 (zero)	rainha	é 15,422%
1	rainha	é 30,844%
2	rainhas	é 28,641%
3	rainhas	é 16,365%

e para 11 indivíduos a probabilidade de obtermos uma rainha é 36,174%.

As probabilidades teóricas são tôdas tão altas que nem precisamos calcular limites de precisão, podendo concluir imediatamente que a distribuição dos alvéolos contendo rainhas é completamente ao acaso.

Concluimos dessas análises que "não há qualquer preferência por parte das operárias de Melipona quadrifasciata de superalimentar uma zona determinada para provocar aí a formação de rainhas" como seria de esperar si fosse a alimentação o fator determinante das castas.

B) Para o nosso segundo favo, de Melipona marginata (fig.42) usámos os mesmos princípios básicos discutidos atrás, porém modificámos o método de agrupamentos de alvéolos.

Resolvemos analisar todos os exágonos possíveis, de 7,6 ou 8 indivíduos em cada um. Começámos nossa contagem na fileira 1, no primeiro alvéolo e traçámos a partir dele, o exágono que na figura 42 está determinado por uma linha cheia. Anotámos em seguida o número de rainhas existentes nesse exágono (4). Passámos em seguida para o 2º alvéolo da mesma fileira e traçámos o exágono que vemos com linha pontilhada. Anotámos o número de rainhas (também 4). Passámos depois para a fileira dois; traçámos pelo 1º alvéolo o exágono, depois pelo 2º, 3º, 4º e 5º e anotámos o número de rainhas de cada um que nos deram respectivamente 1, 2, 3, 3, 3.

Na fileira 12 executámos dois exágonos: um com o 3º e outro com o 4º alvéolo, dando um duas rainhas e o último 3. Sobraram 10 alvéolos que reunimos em dois grupos de 5. (O 1º grupo com os primeiros alvéolos das fileiras 8, 9, 10, 11, 12 e o 2º grupo com os primeiros alvéolos das 15a. e 12a. fileiras, com o 2º alvéolo da 12a. e da 15a. fileiras, mais o 3º alvéolo da 14a. fileira).

Todos os resultados e as probabilidades calculadas reunimos no Quadro X.

As probabilidades foram calculadas pelo binômio  $(q+p)^n$  onde p representa a frequência de ter rainhas, que em nosso caso será  $1/4$ , e q representa a probabilidade de não ter rainhas, sendo neste caso  $3/4$ , e n será neste caso 5, 6 ou 7 conforme o número de alvéolos de cada exágono.

Vemos nesse Quadro X que não há nenhum caso esperado com a frequência inferior a 5%, sendo pois todos insignificantes, de modo que não precisamos preocuparmos com os limites de precisão deduzidos.

*mken*

QUADRO X

No da Fileira	Número de rainhas em áreas exagonais com:			Probabilidades calculadas para o número de rainhas encontradas		
	7 alvéolos	6 alvéolos	5 alvéolos	n=7	n=6	n=5
1	4			5,77%		
1	4			5,77%		
2	1			31,14%		
2	2			31,14%		
2	3			17,30%		
2	3			17,30%		
2	3			17,30%		
3	1			31,14%		
3	0			13,35%		
3	0			13,35%		
3	0			13,35%		
3	2			31,14%		
3	4			5,77%		
3		3			10,47%	
3			1			39,55%
4		1			35,59%	
4	2			31,14%		
4	1			31,14%		
4		0			17,80%	
4		0			17,80%	
4	2			31,14%		
4		3			10,47%	
4			2			26,37%
4			1			39,55%
5			1			39,55%
5			2			26,37%
5		1			35,59%	
5			1			39,55%
5			0			23,73%
5	1			31,14%		
5		1			35,59%	
5			1			39,55%
5		2			29,66%	
6			2			26,37%
6		0			17,80%	
6		1			35,59%	
6		1			35,59%	
6		1			35,59%	
7			1			39,55%
7		2			29,66%	
7		1			35,59%	
8			2			26,37%
8			0			23,73%
12			2			26,37%
12			3			8,80%
Resto A			0			23,73%
Resto B			2			26,37%

M. K. W.

### Proporção das castas durante o inverno

Como já foi mencionado, distinguimos nos Quadros III e IV duas fases na segregação das castas: uma, de Setembro a Abril que chamamos normal e, como verificámos nos capítulos anteriores, a proporção entre as castas pode ser explicada por duas fórmulas mendelianas simples.

A outra fase vai de Maio a Agosto, onde a percentagem de rainhas sofre uma queda brusca para  $1/4$  da sua percentagem anterior. Assim nas espécies que segregavam  $\pm 12,5\%$  de rainhas houve uma queda para  $\pm 3\%$  e na espécie que segregava  $\pm 25\%$  houve uma queda para  $\pm 6\%$ .

A êsse fenômeno chamamos de "eliminação de rainhas" e nos nossos Quadros III e IV representámos como: grupo b.

Nos nossos gráficos (figs. 43 e 44) podemos verificar facilmente que a eliminação dá-se, normalmente, durante o inverno e que, logo no início de Setembro, há o retôrno a segregação normal.

A resolução dêste problema deve estar relacionada com a alimentação e com a temperatura (como podemos vêr pelos gráficos das figuras 43, 44 e 45, e pelo Quadro V). Trata-se de uma alteração secundária das proporções mendelianas provocadas pelas condições adversas do inverno ou por qualquer outro fator que contrarie o bom desenvolvimento das colméias como pragas, moléstias, ou deficiências alimentares.

Um caso de eliminação semelhante a êsse encontramos em *Lebistes* (WINGE, 1934) onde determinados cruzamentos que deveriam produzir 50% de machos só segregaram assim na primavera, havendo nas outras estações um excêssos de fêmeas. Parece que o caso do *Lebistes* é devido a qualquer influência externa nos espermatozóides, como indica a linha de experiências realizadas por WINGE (1937 e outras não publicadas).

Até agora não sabemos qual será o mecanismo que rege a eliminação de rainhas nas *Meliponas*. Fizemos porém diversas hipóteses de trabalho para explicar êsse fenômeno, que daremos abaixo com as críticas correspondentes.

a) Eliminação na fase larval pelas operárias: - Constatámos que nascem indivíduos de todos os alvéolos, e tomámos cuidado de examinar favos sem nem uma falha, isto é, sem nenhum alvéolo vazio.

Também observámos que, após a postura, as operárias fecham o

alvéolo, o qual só é aberto pelo inseto adulto ao emergir.

b) Oosorção preferencial: - Influenciados por algumas publicações de FLANDERS (1942, 1945, 1946) sobre oosorção, pensamos que "no inverno, por falta de alimentação, houvesse oosorção dos ovos ocasionando diminuição de tamanho nas operárias e eliminação de rainhas".

Esta hipótese foi recusada pela seguinte razão: - A oosorção teria o efeito desejado si somente se desse após a fertilização; porém a fertilização ocorre no momento da postura e, evidentemente, não há tempo suficiente para a degeneração preferencial dos ovos com constituição heterozigota.

Pode ser entretanto que a oosorção facilite a execução do mecanismo que proporemos para a resolução deste problema.

c) Perdas de cromosomas: - Devido a aberrações citológicas, observadas no macho, pensamos que talvez houvesse uma "eliminação de determinados cromosomas na meiose das fêmeas ocasionando uma homozigotia que daria origem às operárias". Pela contagem de cromosomas de cerca de 50 larvas de *Melipona marginata*, no inverno, e verificado todas possuírem 18 cromosomas, foi rejeitada esta hipótese.

d) Anormalidades na fertilização: - Restam-nos ainda alguns processos citológicos que podemos idealizar, todos tendentes a provocar homozigotia, de maneira a nascerem operárias em vez de rainhas. São eles: 1) Fertilização preferencial de modo a nascerem somente indivíduos homozigotos; 2) Desenvolvimento partenogenético, pela falta de fecundação, seguida de fusão preferencial de 2 dos 4 núcleos gênicos de modo a formarem combinações homozigotas; 3) Desenvolvimento partenogenético por qualquer eliminação a posteriori do núcleo masculino, seguido pela fusão preferencial de 2 dos 4 núcleos gênicos; 4) Desenvolvimento partenogenético, como nos casos anteriores, mas agora segue-se a fusão dos núcleos na 1.ª divisão da clivagem.

Destas quatro explicações a mais simples e a mais provável parece ser a última. Essa última hipótese poderia ser descrita mais detalhadamente da seguinte maneira:

Por causa da baixa temperatura ou falta de alimentação, o meio citoplasmático ficaria denso, o núcleo masculino não poderia movimentar-se, o núcleo feminino haplóide faria a primeira divisão embrionária, e os dois núcleos resultantes se fundiriam restaurando o número diplóide. Como esse processo tornaria o indivíduo homozigoto, o resultado seria uma operária. Essa hipótese serve para explicar a

M. K.

eliminação de rainhas e a quasi completa ausência de machos no inverno. Para comprová-la teremos que executar cruzamentos entre sub-espécies que difiram de caracteres facilmente comparáveis porém até agora não nos foi possível executar tal intento. Essa hipótese é a única que tem resistido nossa auto-crítica, devido ser baseada em alguns fatos conhecidos.

O trabalho principal que vem a favor é o de MACKENSEN (1943): "The occurrence of parthenogenetic female in some strains of honey bees". Nessa publicação, MACKENSEN relata suas observações sobre a progênie de algumas rainhas virgens de Apis em que foram encontradas cerca de 1% de operárias. MACKENSEN conseguiu duas gerações de rainhas obtidas partenogeneticamente.

A partenogênese diplóide nos himenópteros é encontrada tanto nos seus representantes mais primitivos (por exemplo: Diprion, SMITH 1941) como nas abelhas sociais; por isso achamos provável seja uma variante desse mecanismo que controle a eliminação de rainhas nas melíponas.

Na evolução do processo da determinação genética das castas precisamos supor uma evolução paralela de um mecanismo já existente nos himenópteros, tal seja o descrito, para controlar as deficiências da determinação genotípica.

É possível que a hipótese por nós levantada para explicar a eliminação das rainhas não corresponda a realidade, porém a existência dessa eliminação é comprovada, e isso nos leva a crer que ela também exista nas formigas e termitas, o que nos traria às seguintes conclusões: quando quisermos estudar a determinação das castas nas formigas, termitas, vespas, melíponas, temos que analisar colônias grandes, em ótimas condições de trabalho, em épocas próprias á enxameagem, para evitarmos as consequências de um possível mecanismo de eliminação em existência.

#### Discussão de casos análogos em Termitas e Formigas

Apesar de não termos feito estudos originais em formigas e termitas até o presente momento, julgamos oportuno incluir aqui uma rápida discussão sobre esse assunto. Pensamos que as novas conclusões a que chegámos, no estudo das Melíponas, poderão afetar os atuais conceitos da determinação das castas nos termitas e nas formigas.

Nos termitas encontramos castas tanto entre fêmeas como entre machos, que são diplóides.

Devido a existência de castas entre os machos (SNYDER, 1925) podemos supor que os Termitas tenham um mecanismo determinador de castas tipo *Melipona* (os heterozigotos sendo as formas sexuais e os homozigotos para um ou mais fatores as formas estéreis).

A publicação de LIGHT (1943), que é baseada sobre um grande número de "colônias incipientes" de Termitas, principalmente de *Zootermopsis nevadensis*, é a favor de uma determinação extrínseca das castas. Acharmos porém que o método de estudar "colônias incipientes" pode nos levar a resultados completamente falsos desde que exista qualquer mecanismo de eliminação idêntico a esse encontrado nas melíponas. Portanto aqui também o processo será o de estudarmos os filhos de colônias muito grandes, nada havendo que atrapalhe os seus hábitos.

Sobre as formigas não vamos entrar em detalhes particulares quanto a sua determinação das castas, mas somente analisar certas publicações que tenham relação com o estudo que fizemos em *Melipona*.

O trabalho que julgamos de mais importância nesse assunto é o já citado de WHEELER (1937), sobre anomalias em formigas. Nesse trabalho WHEELER adota uma teoria genética para determinação das castas a fim de explicar o aparecimento de diversos mosaicos e mutações observados principalmente em *Acromyrmex octospinosus*.

O único ponto que discutiremos é o referente aos mosaicos, que podem ser explicados a luz do que sabemos em *Melipona*.

Diz WHEELER: "The occurrence of such anomalies as the gynergates is unusual and their close mosaic resemblance to the gynandromorphs is so surprising as to upset widely accepted views concerning the origin of the latter. It is generally assumed that the gynandromorphs of the Hymenoptera develop from fertilized eggs, and various hypotheses have been framed to account for the nuclear determination and eventual distribution of their sexual components. We must obviously assume as the result of the observations recorded in the preceding paragraphs a similar nuclear and developmental mechanism for the gynergates, but this necessarily implies a genetic determination of the two female castes in the egg. Moreover this early determination must also be attributed to the subcastes of the worker, if we are correct in interpreting the single diploergate as a major and media worker mosaic. We are, perhaps, concerned with a number of polyploid forms, but this is a matter which must be left to the decision of the cytologists and geneticists".

*Wheeler*

Esta última frase está, evidentemente, em desacôrdo com o que sabemos sôbre Melipona, porém si as anomalias citadas são genéticas, podemos sugerir a seguinte explicação:

a) Ginergatas (mosáicos entre rainhas e operárias): Suponhamos um ovo  $AaBb$ , que originaria uma rainha. Na primeira divisão embriônica acontece uma não disjunção do cromosoma que contém  $A$  e teremos: um núcleo  $ABb$  (que será operária, devido ser puro para  $A$ ) e outro núcleo  $AaaBb$  (que será rainha devido os fatores  $A$  e  $a$  estarem em heterozigose). Uma perda de um cromosoma que contenha  $A$  ou  $B$  ou uma mutação de  $a$  para  $A$ , por exemplo, teriam o mesmo efeito.

b) Diploergata (mosáicos entre operárias médias e grandes): Em primeiro lugar teremos que assumir que os diferentes graus de homozigotia darão diferentes tipos de operárias nas formigas em questão, sendo maiores as parcialmente homozigotas (tipo  $AaBB$ ) e menores as totalmente homozigotas (tipo  $AABB$ ). Si fôr esse o caso, as diploergatas podem ser facilmente explicadas por uma não-disjunção em uma célula  $AaBB$ , dando uma zona  $ABB$  (operária pequena) e outra  $AaaBB$  (operária grande). Como no primeiro caso, perdas de cromosomas contendo êsses gens, ou mutações, também explicam o fenômeno.

WHITING (1938) revendo o trabalho de WHEELER sugere "that we are dealing not with sex and caste mosaics but with sex and caste intergrades of another sort namely, intersexes and intercastes". "Intersexuality may be caused genetically by race-crossing as in Lymantria, or it may result from trophogenic or other environmental influences". E no fim do seu trabalho lemos: "The single haploid male caste is without question differentiated genetically. As for the various females castes, the reviewer inclines toward the trophogenic theory. Any blastogenic scheme involving hereditary differences would necessitate some system for maintaining in the reproductive members of the pure race genic differences which might segregate to form the sterile castes, Such is conceivable but doubtful." Como vemos WHITING inclina-se para a teoria trofogênica também por achar duvidosa a existência de uma determinação gênica. É claro que os mosáicos de WHEELER podem ser explicados como intercastas, porém agora que conhecemos o mecanismo existente nas Meliponas, onde a forma sexuada segregá todos os indivíduos da colônia, podemos novamente considerá-los e explicá-los como mosáicos verdadeiros.

WILSON (1940) trabalhando com Leptothorax curvispinosus chegou a conclusão que as castas das formigas eram determinadas somente

MKer

por influência do meio. Sua experiência consistiu em submeter dois grupos, A e B, de 44 larvas cada um, após um período de hibernação de 5 meses, a diferentes quantidades de alimentos.

Ao grupo A foi dada superabundância de alimentos e o resultado final foi: 32 rainhas e 3 operárias. Ao grupo B deu-se a quantidade mínima de alimento, suficiente somente para permitir o crescimento da larva, e resultou em: 10 rainhas e 23 operárias. Esses resultados são dos mais convincentes de que temos notícia até agora para provar a formação das castas pela alimentação em formigas, porém mesmo assim podemos admitir a hipótese de que haja determinação genética por 4 motivos: 1) nessa experiência não aparecem intermediárias entre rainhas e operárias, como também não aparecem em outras experiências similares (EZHIKOV, 1954); 2) experiências para produzir rainhas de larvas de Leptothorax curvispinosus durante o verão por superalimentação não obtiveram sucesso; 3) a colônia B, subalimentada, produziu 10 rainhas em 33 indivíduos, o que nos sugere que haviam algumas larvas já predeterminadas a serem rainhas, e com estes dados seria fácil executar um esquema genético como em Melipona; 4) a colônia A superalimentada ainda produziu 3 operárias, o que nos sugere as mesmas considerações acima.

Preferimos, todavia, esperar dados mais completos de WESSON para tirarmos conclusões mais exatas.

Os problemas sobre determinação de castas em formigas são difíceis de serem analisados devido certas dificuldades da biologia desses himenópteros. Assim, um dos fenômenos que atrapalhariam o estudo de segregações genéticas em certos gêneros é existirem operárias poedeiras. Esse é, por exemplo, o caso da Oecophylla smaragdina, FABR. (BHATTACHARYA, 1943), da Aphaenogaster picea e Aphaenogaster lamellidens (HASKINS e ENZMANN, 1945) cujas operárias, não fecundadas, põe ovos dos quais nascem fêmeas, operárias ou rainhas, portanto por partenogênese telítoca. Também sobre operárias poedeiras lemos no trabalho de TANQUARY (1943) que uma colônia, somente de operárias, de Iasius niger americanus produzia uma larga quantidade de ovos, quando superalimentada, dos quais só resultaram machos, portanto um caso de partenogênese arrenótoca.

Por termos conhecimento do mecanismo de eliminação, podemos supor que em certas formigas a determinação das castas seja genotípica. Por exemplo, em Atta sexden, as primeiras formigas que nascem em um formigueiro novo são operárias, e somente quando esse formigueiro

M. Keen

re aumenta bastante de tamanho, e que aparecem rainhas. Poderíamos supor que fosse a alimentação o determinante dessas castas, porém a falta de intermediárias entre operárias e rainhas (que existem em Apis e Bombus) e as grandes diferenças existentes entre ambas, indicam-nos serem essas diferenças causadas por fatores genéticos. Acreditamos que não haja formação de rainhas antes da idade de um certo número de anos por causa de um mecanismo eliminativo tipo Melipona.

Como veremos no estudo da filogenia das Meliponas, elas são as únicas, dentre as abelhas sociais, que possuem mecanismo genético para determinar as castas, possuindo as demais determinação trofoscênica. Entre as formigas as variações são mais acentuadas que nas abelhas devido seus hábitos sociais serem mais antigos (WHEELER, 1926), permitindo a coexistência de grupos com determinação genética ou alimentar. Esse é também o parecer de W. WHEELER como exposto em seu trabalho sobre anomalias em formigas (1937, p.40).

#### RESUMO

A - São feitas considerações sobre a determinação das castas nos insetos sociais e examina-se o que foi feito em Melipona.

B - Métodos: 1) trouxe-se favos de cria ao laboratório e anotou-se as castas após as abelhas terem emergido.

2) Dá-se as diferenças morfológicas entre rainhas, operárias e machos para uma fácil diferenciação.

C - Material: 13 colônias de: Melipona quadrifasciata anthidioides (IEP., 1836); Melipona quadrifasciata quadrifasciata (IEP., 1836); Melipona fasciata rufiventris (IEP., 1836); Melipona fasciata melanoventer (SCHWARZ, 1932); Melipona schencki schencki (GRIBODO, 1893); Melipona marginata marginata (IEP., 1836).

D - Resultados: 1) Os resultados das contagens foram colocados: no Quadro III (meliponas grandes: M. quadrifasciata, M. schencki, M. fasciata), no Quadro IV (M. marginata) e no Quadro V (anormalidades na segregação).

2) Analisou-se estatisticamente e verificou-se que os valores do Quadro III no período normal correspondem a segregação 7 operárias para 1 rainha, e no Quadro IV correspondem a segregação 3 operárias para 1 rainha.

E - Discussão: 1) Para explicar a segregação 3:1 propôs-se a seguinte explicação: as rainhas teriam a fórmula AaBb e portanto

M. K. W.

seriam duplamente heterozigotas, os machos teriam tôdas as fórmulas correspondentes a segregação gônica da rainha e as operárias tôdas as fórmulas correspondentes a segregação zigótica da rainha em que houvesse um ou dois fatores em homozigose.

2) Para explicar a segregação 7:1 teceu-se as mesmas considerações sómente que as fórmulas em vez de serem bifatoriais seriam trifatoriais.

F - Provas adicionais: 1) As rainhas diferem das operárias, além do tamanho, em coloração e formato.

2) As células donde nascem as rainhas são do mesmo tamanho que as donde nascem operárias.

3) As células são enchidas por diversas operárias ao mesmo tempo e, não havendo tamanho diferente de célula, não ha possibilidade de um estímulo coordenado.

4) Si fosse a alimentação que determinasse as castas em Melipona deveria haver, como em Apis e Trigona, aglomerações de alvéolos de rainhas, provavelmente nas margens dos favos. Feitas análises estatísticas constatou-se que as células de rainhas, tanto em Meliponas trifatoriais como Bifatoriais, acham-se distribuidas ao acaso nos favos.

G - Proporção das castas durante o inverno:

1) Explica-se o fenômeno da queda da porcentagem de rainhas.

2) Cita-se o caso do Lebitas (WINGE, 1934) como um caso paralelo.

3) Devido a correlação do gráfico de temperatura (fig. 45) e de faltas alimentares (Quadro V) com a segregação deduzimos que a eliminação tem a sua origem.

4) Enumera-se certas hipóteses citogenéticas e biológicas que não resistiram a crítica.

5) Cita-se uma hipótese que até agora tem resistido a crítica. Trata-se de explicar a eliminação como sendo provocada pelo desenvolvimento de ovos por partenogênese diploide, provocada pela fusão de 2 núcleos haplóides na 1.ª divisão da clivagem.

6) Devido a possível generalidade do mecanismo de eliminação em outros insetos sociais considera-se duvidosas as experiências executadas sem que a colônia esteja num máximo de vitalidade.

H - Discussão de casos análogos em Termitas e Formigas:

*Wheeler*

1) Faz-se algumas considerações sobre a determinação das castas nos termitas e sugere-se um método de trabalho.

2) Analisa-se rapidamente o trabalho de WHEELER (1937) e WHITING (1938) mostrando -se que é possível explicar-se o caso dos mosaicos encontrados em formigas como sendo produto de não disjunção, mutações ou perdas de cromosomas.

3) Analisa-se sumariamente a publicação de WESSON (1940).

4) Devido a existência de partenogênese telitoca nas formigas (BHATTACHARYA, 1943, HASKINS e ENZMANN, 1945) supõe-se que também exista aqui o fenômeno de eliminação de rainhas.

5) Concorda-se com WHEELER (1937) que talvez existam nas formigas ambas as formas de determinação das castas: alimentação ou fatores genéticos.

M. K. W.

7 - EVOLUÇÃO DO GÊNERO MELIPONAEvolução dos Hymenopteros

Para podermos estudar a filogenia do gênero *Melipona* precisamos nos referir um pouco aos estudos sobre a evolução dos hymenopteros em geral.

TILLYARD (1924) estudando os fósseis do Permiano de Kansas, U.S.A., encontrou três espécies de uma nova ordem, Protohymenoptera, que são: *Protohymen permianus*, *Permohymen schucherti* e *Asthenohymen dunbari*. O *Protohymen* é a forma mais primitiva de hymenoptero encontrado até hoje: possui as nervuras facilmente comparáveis às das famílias *Xyelidae* e *Siricidae* entre os atuais *Chalastogastra*. As asas das três espécies fósseis supra citadas são claramente intermediárias entre as dos *Panorpatae* e *Neuroptera* e as dos *Hymenoptera* atuais. Por intermédio dos *Panorpatae* os *Hymenoptera* se acham relacionados com as seguintes ordens: *Lepidoptera*, *Diptera*, que junto com os *Trichoptera*, *Aphaniptera* e *Panorpatae* formam o chamado Complexo *Panorpoide* de TILLYARD (AP. WHEELER, 1928 p.29 e WILSON e DONER, 1937, p.108).

Das duas sub-ordens dos *Hymenoptera*, *Chalastogastra* e *Clistogastra*, todos os entomologistas são acordes em dizer que a primeira é a mais primitiva devido aos seus fósseis, à sua semelhança com os protohymenopteros e aos seus caracteres morfológicos.

Nessa sub-ordem encontramos as seguintes famílias: *Tenthredinidae*, *Xyelidae*, *Oryssidae*, *Siricidae*, *Xiphydriidae*, *Cephidae*, *Pamphiliidae*. Dessas famílias as mais primitivas são *Pamphiliidae* e *Xyelidae* (WHEELER, 1928, p.30).

A sub-ordem *Clistogastra*, que reúne as duas antigas sub-ordens *Terebrantia* e *Aculeata*, segundo ASHMEAD (1901) divide-se em oito superfamílias: *Cynipoidea*, *Chalcidoidea*, *Ichneumonoidea*, *Proctotrypoidea*, *Formicoidea*, *Sphecoidea*, *Vespoidea*, *Apoidea*. Destas superfamílias a mais primitiva é a *Ichneumonoidea*.

Porém dentre as diversas famílias dos *Ichneumonoidea*, tais sejam: *Evanidae*, *Stephanidae*, *Ichneumonidae* e *Braconidae*, não há concordância entre os estudiosos em qual será a mais primitiva. Como não temos dados nem estudos sobre tal assunto aceitamos a opinião de BRIES (1921) grande especialista na matéria, que considera como a família mais primitiva dos *Ichneumonoidea* a *Stephanidae*, por se relacionar com os *Chalastogastra* por meio da família *Oryssidae*.

Evolução das abelhas

Sobre a evolução dos aculeados (formigas, vespas e abelhas) há muita divergência no assunto. Assim, há autores que acham que eles se originaram de um ancestral comum com os terebrantes enquanto que outros acham que se desenvolveram a partir dos terebrantes. O que nos interessa no entanto, é a evolução das abelhas, e esta encontra-se muito bem estudada atualmente. Admite-se que as abelhas tenham se originado a partir das vespas sphecoideas. As relações entre as abelhas e as vespas sphecoideas são muito antigas, pois essas vespas, tal como existem hoje já se acham muito especializadas (MICHENER, 1944) "pois através do Terciário as relações entre os Sphecidae e Apidae já eram essencialmente aquelas encontradas presentemente" (WHEELER, 1928, pg. 80).

Como as abelhas são exclusivamente antófilas (exceto algumas espécies parasitas) devem ter-se originado junto com as angiospermas, que aparecem no Cretaceo tendo porém iniciado sua adaptação antes, "pois nessa época já se encontravam flores quasi idênticas á algumas ainda hoje existentes" WELLS, HUXLEY e WELLS, 1935, p. 212).

MICHENER, em seu trabalho (1944) sobre morfologia, filogenia e classificação das abelhas, baseando-se nos caracteres morfológicos das vespas sphecoideas, organizou uma lista de caracteres que seriam considerados primitivos e os correspondentes especializados.

Com fundamento nessa lista e em diversos caracteres correlacionados executou a árvore filogenética das abelhas. Assim, considerou a tribo Paracolletini como o grupo de abelhas mais primitivo devido a estas possuírem praticamente todos os caracteres tidos como primitivos. De um ancestral do tipo Paracolletes derivou as outras sub-famílias dos Colletidae por meio de perdas independentes da área pigidial e da escopa, e também por outras modificações acessórias.

Assim, relacionando um grupo com outro, uma família com outra, procurando quando possível derivá-los de um ancestral comum, foi formada toda a árvore filogenética com as 6 famílias dos Apoidea: Colletidae, Andrenidae, Halittidae, Melittidae, Megachilidae e Apidae.

Vejamos quais foram as considerações de MICHENER para localizar em sua "árvore" a sub-família Apinae: "Os Apinae, com exceção dos Euglossini e Psithyrus, são abelhas sociais. Exceto para as formas parasíticas, são todos caracterizados pela posse de corbículas

(nas operárias pelo menos). Parece que a aquisição de hábitos sociais aumentou grandemente a velocidade evolutiva nessas formas. Em um único gênero como *Trigona*, temos uma imensa variação em estruturas. As diferenças entre as genitálias dos machos de *Apis* e as dos outros Hymenoptera são enormes, de tal forma que nessa base as *Apis* poderiam ser colocadas muito longe de quaisquer outras abelhas. Entretanto, a corbícula, os pentes apicais das tíbias das fêmeas, a ausência de esporões nas tíbias trazeiras, a proximidade do clipeo á base antenal, a primeira vêia recorrente que é curta e angulada, além de outros caracteres provam suficientemente a estreita relação entre *Melipona* e *Apis* (MICHENER, 1944, p.231).

### Evolução dos Meliponineos

Como êsses caracteres morfológicos, citados no parágrafo anterior, pertencem tanto ás *Melipona*, *Trigona* e *Apis*, podemos considerá-los coexistentes no ancestral comum.

Os característicos biológicos e fisiológicos que êsse ancestral deveria ter seriam: casta tipo *Bombus*, onde as rainhas são produzidas pela alimentação (os trabalhos sôbre *Bombus* que consultamos foram os de IHERING (1903 b, 1940) FRISON (1927) e OSORNO e OSORNO (1938)); aprovisionamento em pôtes e em casulos velhos, arrumados desorientadamente; células do mesmo tamanho para machos e operárias, em cachos; cêra produzida por glândulas ventrais e dorsais. (Fig 51)

Dêsse tipo originou-se de um lado os Apini e de outro os Meliponini. Os Apini se originaram dêsse tipo por: 1) criação de um sistema de favos verticais usando, como no tipo ancestral, as células de filhos também para armazenamento; 2) a segregação de cêra sómente por glândulas ventrais; 3) nos Apini primitivos, as células para machos e operárias são ainda do mesmo tamanho, como na *Apis dorsata*, porém, nos mais evoluídos, há um tipo de célula especial para cada casta; 4) aquisição de certos caracteres morfológicos como: olhos desamente pilosos, unhas bífidas, ferrão bem desenvolvido, nervuras das azas bem marcadas, com três células sub-marginais fechadas; grande desenvolvimento do endopenis.

Os Meliponini originaram-se do ancestral comum por: 1) atrofia do ferrão e das glândulas anexas; 2) produção de cêra apenas por glândulas dorsais; 3) favos para os filhos em cachos (como em *Trigona Silvestri* e outras, como relatado por IHERING (1932) e SCHWARZ (1945

M. Kew

4) especialização do sistema de armazenamento em pótes; 5) as castas são produzidas por alimentação; 6) as azas sofreram alguma modificação nas nervuras que se tornaram muito fracas, as vezes faltando, os olhos são glabros e unhas simples.

Dêsse tipo de Meliponineo primitivo, mais aproximado a Trígona que á Melipona, originaram-se primeiramente as Trígonas atuais e mais tarde por uma modificação gênica complexa o gênero Melipona.

Antes de discorrermos sôbre a formação do gênero Melipona vejamos por alto qual é a distribuição geográfica dos meliponíneos.

As melíponas são restritas ás Américas: sua distribuição alcança aproximadamente todo o continente entre 30° de latitude, para Norte e para Sul, excetuando a zona Andina muito elevada. A maior quantidade e variedade de tipos encontram-se na Região Amazônica. As trígonas são entretanto mais espalhadas, si bem que descontinuadamente. Existem nas Américas, nas mesmas condições que as Meliponas, existem na região Indo-malaya, Austrália, Índia e África (principalmente África Oriental), porém com espécies diferentes das americanas, e geralmente também diferentes entre si (fig. 50).

Essa distribuição descontínua somente é compreensível se admitirmos que os meliponíneos, em seus tipos ancestrais, habitavam também nas regiões intermediárias. Aliás êsses casos de distribuição descontínua entre animais sulamericanos atualmente existentes e africanos, australianos e indo-malaios são comuns, como por exemplo: os camelídeos - existem no sul da Ásia, África do Norte e região Andina; as antas - existem nas ilhas malaias e Brasil; os marsupiais - existem na Austrália e América do Sul; os peixes pulmonados - existem na Austrália, África e Brasil; etc.

Segundo H.C. WELLS, J. HUXLEY e G.P. WELLS (1935) "a distribuição de qualquer grupo de animais terrestres depende de três fatores:

1º - da região onde o grupo surgiu pela primeira vez;

2º - das conexões que essa região tenha ou venha a ter mais tarde com outras massas continentais;

3º - da sorte que aguarda o grupo, nas diferentes regiões por onde terá de passar".

Devido aos meliponíneos possuírem raio de vôo muito restrito podemos lhes aplicar estes mesmos princípios, como explicaremos em detalhe:

1º - Entrando no primeiro fator, temos que levar em consideração os fósseis encontrados e a distribuição das atuais espécies. O

M. Kew

fossil que mais nos interessa foi estudado por TOSI (1896), encontrado no ambar da Sicília, pertencente ao período Mioceno: trata-se de um gênero de meliponíneo, *Meliponorytes*, com duas espécies *M. sugcini* e *M. sicula*. Essa descoberta é de muito interesse pois mostra que os meliponíneos foram outrora representados na Europa (WHEELER, 1938). Outros fósseis que são de interesse para a derivação dos meliponíneos primitivos são os gêneros vizinhos do *Bombus*, encontrados no ambar do Báltico, pertencentes ao Oligoceno inferior (COCKERELL, 1909); são eles: *Protobombus* (um tanto puchado ao *Apis*), *Chalcobombus*, *Sophrobombus* e *Electrapis* (considerado por alguns autores como intermediário entre *Bombus* e *Apis*). Temos aí portanto uma indicação de que no início e meados do Cenozóico existiam na Europa, Ásia e América do Norte diversas abelhas sociais primitivas. Os tipos de *Meliponorytes* e afins constituíam a população dos meliponíneos nesta fase geológica. Assim o primeiro fator fica resolvido adotando-se a hipótese que os primeiros meliponíneos apareçam na Europa ou Ásia no período Oligoceno. Essa hipótese todavia deve ser aceita com uma certa reserva, devido a coleção de fósseis deste grupo ser muito limitada e duvidosa, e novos achados paleozoológicos podem forçar-nos a mudar essas conclusões.

2º - Como sabemos pela geologia, a América do Sul esteve ligada á do Norte no Eoceno inferior, para desligar-se logo depois no mesmo período, permitindo uma ampla e variada evolução sem muita concorrência, dos animais que conseguiram entrar na América do Sul nesse intervalo. No fim do Mioceno ou no Plioceno restabeleceu-se novamente a ligação entre os dois continentes havendo um grande intercâmbio dos animais que haviam evoluído isoladamente nesse largo espaço de tempo. A ligação da África com o continente Eurasiático de maneira a permitir passagens de animais deu-se primeiramente no Oligoceno por pouco tempo, e depois no Plioceno, que também separou-se novamente si bem que deixando uma pequena via de comunicação: o ístimo de Suez (WELLS, HUXLEY, WELLS, 1935). Também a América do Norte ligou-se com a Ásia no Mioceno, permitindo a passagem para a América de elefantes asiáticos e possibilitando a passagem de meliponíneos.

Vejamos a significação desses movimentos continentais na distribuição dos meliponíneos. A primeira ligação entre as Américas no Eoceno, e entre a África e Eurásia no Oligoceno não nos interessam na distribuição dos meliponíneos por estes não se haverem formado ainda. Portanto a invasão da América do Norte pelos meliponíneos deu-se

provavelmente, a partir do Mioceno, a da América do Sul a partir do Plioceno e a da Austrália e Arquipélago Maláio em diversas épocas, pois permaneceram muito <sup>tempo</sup> passíveis de contato com a península Maláia devido as distâncias entre suas ilhas serem muito pequenas, ao alcance do vôo dos meliponíneos. Explica-se assim o fato de coexistirem na península e em diversas das ilhas ao redor de Bornéu certas variedades de Trigonas tais como *T. iridipennis*, *T. fusco-balteata*, *T. apicalis*, etc. (SCHWARZ, 1939). A invasão da África teve lugar no Plioceno em diante, pois permaneceu ligada com a Ásia.

3º - O terceiro fator, a sorte que aguarda o grupo nas diferentes regiões onde terá de passar, é também de interesse para nós devido estarem aí as causas da distribuição descontínua atualmente verificada entre os meliponíneos.

Neste ponto defrontamos, como principal agente, com as duas glaciações que se deram no Pleistoceno. Essas glaciações tiveram como efeito a extinção dos meliponíneos em todo hemisfério norte acima de 35º de latitude, ficando os mesmos isolados, dando-se assim a possibilidade de acumularem-se diferenças pelo mecanismo chamado, nas teorias de evolução, "isolamento geográfico" (DOBZHANSKY, 1944, BRIDGER, 1944). Com o aumento dessas diferenças formaram-se as diversas espécies de *Trigona* que hoje conhecemos.

### Evolução das Meliponas

Propositadamente deixamos para falar no gênero Melipona separadamente. O gênero Trigona pela sua variabilidade e distribuição muito grandes mostra ser que se originou primeiro e sugerimos mesmo que sua formação tenha começado do Mioceno em diante.

Quanto ao gênero Melipona podemos dizer que se originou das Trigonas mais primitivas, das quais se isolou completamente por motivos genéticos de capital importância que estudaremos logo mais. Para precisar o período da sua aparição temos sérias dificuldades, porém podemos aventar duas hipóteses: a) originou-se antes do glacial porém não teve oportunidade de difundir-se, tanto pela quantidade de inimigos que não podiam combater sem ferrão, como por quaesquer outras causas; b) originou-se durante ou depois do glacial, no Pleistoceno, e não pôde alcançar a Ásia devido as gelêiras.

Desde que não sejam encontrados fósseis de Meliponas em períodos pré-glaciais preferimos a última hipótese por duas razões: a primeira é a sua restrita distribuição geográfica e a segunda o fato

M Kerr

de serem de uma a três mutações, seguidas de um rearranjo dos modificadores, os determinantes principais da formação do gênero *Melipona*.

Falta-nos agora, já que falamos sobre o tempo em que se formaram as melíponas, dizer, com base nos dados genéticos obtidos nestes dois últimos anos, como se formaram.

Recapitulando rapidamente os resultados desses estudos genéticos podemos afirmar que as *Meliponas* fogem da regra geral dos *Apis* quanto ao processo de determinação das castas. Assim nos gêneros *Bombus*, *Apis* e *Trigona* a alimentação é a responsável pela formação das operárias ou rainhas ao passo que nas *Meliponas* essas mesmas castas encontram-se pre-determinadas no ovo em virtude de serem o resultado de uma segregação genética (KERR, 1946). Encontramos entre diversas espécies analisadas dois tipos de segregação: um bifatorial, pertencente a *Melipona marginata* e suas variedades e outro trifatorial, comum às demais melíponas estudadas. Há formação de rainhas quando os fatores estão em heterozigose ( $AaBbCc$ ) e de operárias quando um ou mais deles se encontra em homozigose (por exemplo:  $AABbCc$ ,  $AaBBCC$ ,  $AABBCC$ , etc...)

Por este sumário vemos que existem dois tipos de *Meliponas*: um bifatorial ( $AaBb$ ) e outro trifatorial ( $AaBbCc$ ). Por motivos teóricos admitimos que existe ou existiu um tipo mais primitivo, de *Melipona* monofatorial ( $Aa$ ).

Por diversas razões, morfológicas, genéticas e de comportamento, consideramos o tipo *Melipona marginata* como o mais primitivo entre os existentes atualmente.

Sabendo que os principais métodos de origem de diferenças gênicas são através de mutações (ver DOBZHANSKY, 1941) e por rearranjos nos complexos de modificadores (BRIEGER, 1943) podemos sintetizar o aparecimento das *Melipona* da seguinte maneira:

Numa colônia de uma *Trigona* primitiva ( $AABBCC...$ ) aconteceu de nascer uma operária com uma mutação ( $a$ ) que em interação com o gene ( $A$ ) teria os seguintes efeitos: grande desenvolvimento do ovário e alterações nos órgãos sexuais independentemente da alimentação e maior precocidade. Como resultado dessa mutação essa operária teve maior chance de ser escolhida pelo macho e fertilizada. Essa maior chance foi proveniente do fato de ser fértil mesmo em condições de vida precária.

Após ser fertilizada foi alimentada como seria a rainha, com-

M. K. W.

QUADRO XI

Eras	Períodos	Fósseis e acontecimentos relacionados com a evolução dos Hymenópteros em geral e das Meliponas em particular
Paleozóico	Mississippiano	
	Pennsylvaniano	Protohymenoptera (Sycopteron, BOLTON)
	Permiano	Protohymenoptera (Protohymen permianus, Perhymen schucherti, Asthenoymen dunbari)
Mezozóico	Triássico	Primeiros hymenopteros(?) (Chalastogastra)
	Jurássico	Ichneumonoidea
	Cretáceo	(Angiospermas) abelhas, vespas essecoides
Cenozóico	Paleoceno	Ligação e separação das Américas (Fósseis de Aculeados)
	Eoceno	
	Oligoceno	Protobombus, Electrapis, Chalcobombus, Sophrobombus, Ctenoplectrella, Glyptapis. Ligação e separação da África com o Continente Eurasiático.
	Mioceno	Meliponorytes succini e M. sicula Ligação da América do Norte e Asia
	Plioceno	Formação dos Istimos de Panamá e Suez (Trigonas)
	Pleistoceno	1a. e 2a. glaciação (Meliponas?)
	Recente	

M. K. W.

pletou o desenvolvimento total de seu ovário e iniciou a postura. Essa fêmea fértil (Aa) foi fecundada por um macho (A), descendente da rainha primitiva e portanto as operárias filhas da nova rainha seriam: 50% AA e 50% Aa.

Tanto os ovos AA como os Aa podem dar origem a rainhas porém com a grande diferença que as Aa tornam-se férteis em quaisquer circunstâncias enquanto as AA ficam dependentes da alimentação para o seu aparecimento.

Devido o fator apontado acima, de não precisar alimentação especial para nascer rainha, podemos supor que houve uma tendência de seleção favorável para estabelecer o novo aléle.

Nascendo em qualquer época uma porcentagem de fêmeas férteis independentemente da alimentação (Aa), tornou-se desnecessária a construção de alvéolos reais e as abelhas foram aos poucos selecionadas para um tipo que perdeu a faculdade de construir células especiais para suas rainhas, sendo portanto as fêmeas (Aa) férteis devido sua constituição genética e as operárias estéreis pela mesma razão que sempre foram, isto é, falta de alimentação.

Nas fêmeas de constituição AA, que de agora em diante seriam estéreis, não haveria mais uma seleção para manter sua fertilidade potencial. Sustada a seleção nesse sentido, processou-se lentamente uma mudança no "complexo de modificadores" perdendo essas fêmeas a propriedade de reagir em relação ao alimento real, isto é, que não passariam mais de estéril para fértil por meio da alimentação. Esse ponto julgamos passível de experimentação e logo que tenhamos material iniciaremos estudos para determinar si não nos será possível transformar operárias por alimentação especial, em rainhas.

Podemos atribuir a mutação de A para a uma vantagem definida: tornar o aparecimento de fêmeas férteis automático e independente da alimentação. Porém esta situação provocou, simultaneamente, uma desvantagem muito grande para as colônias: tornam-se rainhas, 50% de seus habitantes, apesar de somente serem precisas umas poucas rainhas para a manutenção da colônia.

Supomos novamente que o processo repetiu-se pela segunda vez, de forma idêntica, com uma mutação em outro gen (B) para (b), onde a produção de rainhas e operárias segue a fórmula AaBb e não mais Aa.

Temos agora uma certa dificuldade em nosso processo. Antes desta mutação tínhamos operárias ou fêmeas estéreis da constituição AABB ou aaBB sendo as fêmeas férteis AaBB. A nova combinação AaBb de-

via ter qualquer vantagem especial, sobre AaBB como: maior fertilidade, maior precocidade, mais atrativos ao macho, etc., de maneira que a seleção foi favorável a êste novo genotipo. Dêsse modo das 50% de fêmeas férteis, sempre que necessário, eram escolhidas uma das 25% que possuíam o aléle (b); por isso foram rearranjando-se os gens modificadores que diminuiam cada vez mais a fertilidade da rainha (AaBB) até torná-la igual as operárias.

Essa reversão fenotípica ficará mais compreensível si considerarmos o seguinte: na forma inicial com determinação de castas trofôgenicas, as operárias podiam regular a porcentagem de fêmeas férteis, inaptas para os trabalhos curriqueiros da colmeia (fabricação de cêra, carregamento de pólen e mel, etc..) Logo após a primeira mutação, estabeleceu-se, como já dissemos, uma seleção a favor dos gens modificadores que acentuariam a fecundidade das rainhas e esterilidade das operárias. Aconteceria portanto que nesse tipo 50% dos filhos seriam fêmeas férteis e portanto inaptas ao trabalho.

Tal proporção desfavorável para a manutenção da colméia só poderia ser regulada pelas operárias por uma matança sistemática da quasi totalidade das fêmeas (o que observamos em tôdas as melíponas estudadas). Numa colônia média de M. quadrifasciata encontrámos cêrca de 600 operárias e, conforme a época, aproximadamente 10 rainhas-virgens; isso implicaria, si ela fosse do tipo primitivo (Aa), numa eliminação de 590 rainhas, com todo o prejuizo acarretado na fase larval pela perda de espaço no favo, perda de trabalho, de material nutritivo, cêra, etc. Esse prejuizo contribuiu para dificultar a sobrevivência das espécies de melíponas monofatoriais pois até hoje não encontrámos hem uma dêsse tipo. Contribuiu também para um rápido estabelecimento das populações de melíponas bifatoriais.

Nas espécies com determinação bifatorial a porcentagem de rainhas é mais tolerável pois, como vimos, a seleção em direção da reversão fenotípica as levou a perderem sómente cêrca de 25% da sua população.

As 14 espécies de melíponas atualmente conhecidas podem ser classificadas em dois grupos: melíponas grandes, ao qual pertencem 13 espécies e melíponas pequenas ao qual pertence uma única espécie, Melipona marginata, com tipo de determinação de castas bifatoriais, cuja evolução acabamos de descrever.

Das 13 espécies do outro grupo foram analisadas 3 espécies: Melipona quadrifasciata, Melipona schencki, Melipona fasciata tôdas

pertencendo a um tipo trifatorial cuja origem vamos discutir em seguida.

Para explicar a origem desse tipo trifatorial temos que repetir as considerações feitas para o tipo bifatorial e supor que o processo repetiu-se uma terceira vez pela mutação do gen (C) para (c), com os mesmos detalhes citados para a mutação de (B). De novo o tipo totalmente heterozigoto (AaBbCc) ofereceria vantagens a seleção de modo a se estabelecer havendo também a reversão fenotípica nas antigas rainhas heterozigotas apenas para os fatores (A) e (B), que também se tornaram idênticas as operárias.

A determinação trifatorial restabeleceu a porcentagem de rainhas férteis aproximadamente a aquela existentes nas colônias de abelhas com determinação fenotípica, pois somente 12,5% do total de fêmeas são rainhas e as 87,5% restantes são operárias.

Resumindo podemos dizer que, nesse problema relatado, aplicamos dois princípios:

1º - Supomos, de acordo com nossas observações, que a forma heterozigota (Aa, <sup>AaBb</sup> AaBbCc) é sempre mais fértil que suas correspondentes que possuam qualquer fator em homozigose.

Como já dissemos no capítulo anterior, pode nos parecer estranha a hipótese de que a forma heterozigota tenha diferenças qualificativas notáveis ou vantagens na seleção sobre as formas completa ou parcialmente homozigotas: existem porém na literatura diversos casos que também já comentamos, onde foi encontrada essa situação, aos quais citaremos novamente:

GUSTAFSSON (1947) estudando o comportamento de dois mutantes em cevada, xantha e albina, demonstrou que os heterozigotos dihíbridos são superiores aos monohíbridos e estes são superiores aos homozigotos normais com respeito a diversos caracteres: número de espigas, número e peso de grãos, sendo, por exemplo, o número médio de grãos para dihíbrido 114,16, para os dois monohíbridos 104,76 e 104,66 e para os homozigotos normais 96,62. Os homozigotos "xantha" e "albina" são letais.

WRIGHT e DOBZHANSKY (1946) mostraram em *Drosophila pseudoobscura*, que os heterozigotos para aberrações estruturais de cromossomas apresentam um valor seletivo superior aos homozigotos, para determinadas temperaturas (25°C).

2º - Supomos um processo de "reversão fenotípica" em que, após uma dada mutação, há uma recombinação de modificadores que leva

o tipo fértil antigo para a categoria de operárias estéreis. Para citar um caso análogo e paralelo lembraremos o fato muito comum em experimentos de seleção, onde certos tipos escolhidos, numa determinada seleção rigorosa, tendem a desaparecer em consequência de um reagrupamento de gens modificadores logo que cesse essa seleção intensiva.

Também podemos citar casos de modificação do efeito do gen quando há mudança do "complexo de modificadores", como foi demonstrado por BRIEGER (1929) em cruzamentos de *Nicotiana* e em 1930 por HOLLINGSHEAD em *Crepis*. Em ambos os casos trata-se de um gen letal ou sub-letal sem efeito nas espécies puras porém com efeito fenotípico no híbrido.

Temos também os casos em que há alteração fenotípica por seleção do "complexo de modificadores" como demonstrado por WINGE (1934) em *Lebistes* e por BRIEGER em milho (1943).

Casos análogos são aqueles em que os modificadores em vez de causarem uma mudança qualitativa como os supra-citados, alteram a dominância de determinados gens, como por exemplo foi verificado por BRIEGER e FORSTER (1943) em cruzamentos de *Nicotiana tabacum*, com referência ao caracter "petiolaris" e sésil das folhas.

Sintetizando as vantagens que o processo seguido na evolução das melíponas lhes trouxe temos:

a) a determinação genotípica em vez da fenotípica para a fertilidade das fêmeas garante a sobrevivência da espécie mesmo em condições desfavoráveis á alimentação.

b) A reversão fenotípica dos heterozigotos mais simples para fêmeas estéreis ou operárias, corrigiu os defeitos ocasionados pela determinação mono e bifatorial, isto é, o aparecimento de um número desnecessariamente alto de rainhas.

c) a determinação multifatorial substitue satisfatoriamente o controle de frequência das fêmeas executada pelas operárias na alimentação das larvas em espécies com determinação trofogênica.

Adicionalmente desenvolveu-se ou aperfeiçoou-se mais um outro processo regulativo que impediu a formação de grandes quantidades de fêmeas férteis em ocasiões impróprias, como no inverno, por exemplo. Verificamos, que nas Melíponas a porcentagem de fêmeas férteis (rainhas) cai aproximadamente para 1/4 da proporção mendeliana esperada em épocas em que acontecem desarranjos na colmeia, ou escassês alimentar, ou inverno, etc. Assim nas formas trifatoriais encontramos aproximadamente 3,5% em vez de 12,5% e nas raças bifatoriais 6,5% em vez

de 25%.

A *Melipona marginata*, única espécie bifatorial que conhecemos, é relativamente polimorfa, e possui oito subespécies.

Pensamos que a *Melipona* trifatorial mais primitiva seja do tipo da *Melipona fasciata* pelas seguintes razões:

- a) é a espécie que em comportamento, variação e coloração mais se aproxima a *M. marginata*.
- b) é a de distribuição mais ampla.
- c) é a espécie que contém maior número de subespécies como podemos ver pela seguinte lista que extraímos dos trabalhos de SCHWARZ (1932, 1938):

<i>Melipona fasciata</i>	22 subespécies
<i>Melipona interrupta</i>	8 subespécies
<i>Melipona favosa</i>	7 subespécies
<i>Melipona quadrifasciata</i>	2 subespécies
<i>Melipona beecheyi</i>	2 subespécies
<i>Melipona puncticolis</i>	2 subespécies
<i>Melipona schencki</i>	2 subespécies
<i>Melipona flavipennis</i>	1 subespécie
<i>Melipona mandacáia</i>	1 subespécie
<i>Melipona quinquefasciata</i>	1 subespécie
<i>Melipona concinnula</i>	1 subespécie
<i>Melipona subnitida</i>	1 subespécie
<i>Melipona rufipes</i>	1 subespécie

Temos entretanto de expôr que essa grande variação encontrada na *Melipona fasciata* pode ter outras explicações além da que lhe admitimos, de ser a forma mais <sup>variável</sup> devido ao maior espaço de tempo que teve a disposição para acumular mutações. Esse mesmo fato poderia ser explicado como uma espécie que tivesse entrado em evolução explosiva ou também de um conjunto de formas derivadas de cruzamentos interespecíficos recentes. Talvez para o futuro, quando executarmos cruzamentos interespecíficos, possamos elucidar esse ponto.

Para finalizar diremos que supomos que a Bacia Amazônica é a zona mais provável de ter sido o centro de origem das *Meliponas*, e indicamos para afirmar este ponto de vista os seguintes motivos:

- 1<sup>a</sup> - A Bacia Amazônica é o atual centro geográfico da área.

M. K. K.

habitada pelas melíponas. Em se tratando de um gênero recente, como o prova a sua distribuição restrita, parece-nos razoável supor que ele permaneceu em sua zona de origem, e não concentrou-se aí secundariamente como refúgio, como aconteceu com muitas espécies que foram expulsas de seu "habitat" natural durante as glaciações.

2º - A bacia Amazônica é a zona onde há a maior variação, o que podemos julgar pelo número de espécies, subespécies e variedades aí existentes. Para comprovar o que dissemos extraímos de diversos autores os seguintes dados:

a) Em 60 subespécies de melíponas analisadas por SCHWARZ (1932, 1938) constatamos que: 26 habitam somente a Bacia Amazônica; 6 habitam a Bacia Amazônica mais as regiões ao Sul (incluindo o nordeste brasileiro); 2 habitam a Bacia Amazônica e a parte norte (América Central); 16 habitam somente a parte sul (nordeste incluso) e 9 habitam somente a parte norte.

Portanto de um total de 60 temos que: 34 habitam a Bacia Amazônica, 11 a parte ao Norte e 22 a parte Sul.

b) Em 22 subespécies analisadas por DUKE (1916) temos: 13 habitam a Amazônia, 13 a parte Sul, uma a parte Norte.

c) MARIANO FILHO (1911) fazendo um estudo das abelhas do Brasil Meridional descreve em 25 espécies e subespécies: 15 do Brasil Meridional e 11 da Amazônia porém quando trata da distribuição das Melíponas em geral escreve: "pode-se adiantar que no Brasil Septentrional (Amazônia, etc.) se encontram relativamente mais numerosos representantes do gênero Melipona" (p.13).

Assim, aplicando os princípios clássicos de DE CANDOLE e VAVILOV, pensamos que a localização por nós proposta para o centro de origem das Melíponas acha-se suficientemente justificada.

As nossas considerações sobre a evolução do mecanismo da determinação das castas nas melíponas têm que ser essencialmente hipotéticas, porém demonstrámos que essas explicações são perfeitamente possíveis tendo nossas bases em princípios utilizados nas considerações filogenéticas, tais sejam: seleção, mutações e mudança no complexo de gens modificadores.

#### RESUMO

1º - São feitas referências sobre a evolução dos hymenopteros segundo as escolas mais aceitas.

2º - Cita-se a evolução das abelhas segundo MICHENER (1944).

M. Keen

3º - A evolução dos Meliponíneos é estudada sob o ponto de vista da sua biologia estabelecendo-se o tipo do meliponíneo primitivo.

4º - São feitas considerações sobre a distribuição geográfica dos meliponíneos entrando-se em detalhes sobre os seus fósseis, sobre a influência dos deslocamentos geológicos do cenozóico sobre sua distribuição, com particular referência ao seu estabelecimento na América do Sul. Considera-se também o efeito das glaciações e a descontinuidade por ela provocada na distribuição dos meliponíneos.

5º - São feitas hipóteses sobre a época em que se formaram as Meliponas, sobre o processo de determinação das castas das melíponas e sua influência na evolução das mesmas. O tipo *M. marginata* é considerado o mais primitivo dos existentes atualmente.

E' dada uma hipótese, baseada na biologia e genética das Meliponas, para explicar sua evolução a partir de uma *Trigona* primitiva.

6º - Sugere-se que a *M. fasciata* seja do tipo da *Melipona* trifatorial primitiva, tomando-se por base a sua proximidade a *M. marginata*, sua distribuição e sua variação.

7º - Sugere-se como centro de origem das melíponas a Bacia Amazônica por ser êsse lugar a zona onde há maior variação e por ser o centro geográfico da área habitada pelas Meliponas.

*W. Kern*

8 - BIBLIOGRAFIA

- ARMBRUSTER, L. - 1913 - Chromosomenverhältnisse bei der spermatogenese solitärer Apiden (*Osmia cornuta* Latr.) Arch. f. Zellf. 11.
- ASHMEAD, W.H. - 1901 - Proc. U.S. Nat. Mus. 23, 1901 (Ap. 11ª ed. da Encicl. Brit.)
- BHATTACHARYA, G.C. - 1943 - Reproduction in Agressive red-ants *Oecophylla smaragdina*, Fabr. - Trans. Bose Inst. 15:137-156, Pgs. 10-12 - Feb.
- BRIEGER, F.G. - 1929 - Vererbung bei Artbastarden unter besonderer Berücksichtigung der Gattung *Nicotiana*. "Der Züchter" 1:140-152.
- \_\_\_\_\_ - 1937 - Tábuas e Fórmulas para Estatística - 46 pgs. Cia. de Melhoramentos de São Paulo - São Paulo.
- \_\_\_\_\_ - 1943 - Origem do Milho - Rev. Agr. 18: 409-418.
- \_\_\_\_\_ - 1944 - Considerações sobre o mecanismo da evolução. An. Esc. Sup. Agr. "Luiz de Queiroz" - 1:177-202.
- \_\_\_\_\_ - 1946 - Limites Unilaterais e Bilaterais na análise estatística. *Bragantia* 6: 479-545, figs. 1-6.
- \_\_\_\_\_ - 1947a - A determinação dos números de indivíduos mínimos necessários na Experimentação genética. Anais da Esc. Sup. Agr. "Luiz de Queiroz" - Em Impressão.
- \_\_\_\_\_ - 1947b - Análise da variação qualitativa em amostras pequenas. (não publicado).
- BRIEGER, F.G. e FORSTER, R. - 1943 - Modificação da Dominância em *N. tabacum petiolaris*. Rev. Agr. 18: 446-447.
- BRIEGER, F.G. e SILVIO MOREIRA - 1945 - Experiências de Cavalos para Citrus II - *Bragantia* 5: 597-658. fig. 1-3.
- BRUES, C.T. - 1921 - Am. Nat. 55: 134-164.
- BUCHNER, PAUL - 1915 - Praktikum der Zellenlehre. viii, 336 pp., Universität München - Berlin.
- COCKERELL, T.D.A. - 1909 - Some European Fossil Bees, *Entomologist*, 313-317.
- CLAUS, C. e GROEBEN, KARL - 1917 - Lehrbuch der Zoologie. xvi, 1087 pp. Universität Wien. Viena.

M. Kern

- DARWIN, C. - 1860 - Origin of Species - Pg: 199-209.
- DOBZHANSKY, TH. - 1941 - Genetics and the origin of species - ix, 446 - Columbia University.
- \_\_\_\_\_ - 1944 - Mecanismo da Evolução e Origem das espécies. Bol. Curs. Ap. e Esp. nº 2. Ministério da Agricultura. Rio de Janeiro.
- DOBZHANSKY, TH. and WRIGHT, SEWALL - 1946 - Genetics of Natural Populations XII. Experimental reproduction of some of the changes caused by natural selection in certain populations of *D. pseudoobscura*: 31: 125-156.
- DREYFUS, A. e BREUER, M.E. - 1944 - O sexo nos Himenópteros Arrênótopos. Bol. Fac. Fil. Ciências e Letras, Biologia Geral, nº 5.
- DUCKE, A. - 1916 - Enumeração dos Hymenopteros colligidos pela Comissão e Revisão das espécies de abelhas do Brasil - Publicação nº 35, anexo nº 5, - Historia Natural - Zoologia pp. 1-175.
- EZHILOV, T. - 1934 - Individual variability and dimorphism of social insects. American Naturalist, 68: 333-344.
- FLANDERS, S.E. - 1942 - Oosorption and ovulation in relation to oviposition in the parasitic Hymenoptera. Ann.Ent.Soc.Amer. 35: 251-266.
- \_\_\_\_\_ - 1945 - Is caste differentiation in ants a function of the rate of egg deposition? Science 100: 168-169.
- \_\_\_\_\_ - 1946 - Control of sex and sex-limited polymorphism in the Hymenoptera. Quart. Rev.Biol. 21 (2): 135-143.
- FRISON, T.H. - 1927 - The development of the castes of Bumblebees. (Bremidae: HYM.) An.Ent.Soc.Am. 20: 156-178, 2 pls.
- GRANATA, L. - 1909 - Le divisione degli Spermatocite di *Xylocopa violacea* L. - Biologia 2. Torino.
- GUSTAFSSON, Å. - 1947 - The advantageous effect of deleterious mutations. Hereditas 33: 573-575.
- HASKINS, C.P. and ENZMANN, E.V. - 1945 - On the occurrence of impaternate females in the Formicidae. Journ. N.Y. Ent. Soc. 53 (4): 263-277.
- HOLLINGSHEAD, L. - 1930 - A lethal factor in *Crepis*, effective only in an interspecific hybrid. Gen. 15: 114-140.

M Kerr

- IHERING, H.v. - 1903 - Zoolog. Jahrbucher, 19: 179-287.
- \_\_\_\_\_ - 1932 - Biologia das Abelhas Melíferas do Brasil. Trad. do Zool. Jahrbucher 19: 179-287, com notas adicionais.
- IHERING, R.v - 1903b - Biolog. Beobachtungen an brasilian Bombus - Nestern; Allgem Zeitschr. Entomolog. Neudamm 8: 447-452.
- \_\_\_\_\_ - 1940 - Dicionário dos animais do Brasil, pg. 479-481.
- KENNEDY, C.H. - 1932 - Methods for the Study of the Internal Anatomy of Insects. Dept. Ent. Ohio State University.
- KERR, W.E. - 1946 - Formação das Castas no gênero Melipona. (Ilustr., 1806) - An. Esc. Sup. Agr. "Luiz de Queiroz". 3: 299-312.
- \_\_\_\_\_ - 1947 - Biologia da rainha de Melipona. Chácaras e Quintais.
- LAMS, H. - 1908 - Les divisions des spermatocytes chez la fourmi (Camponotus herculeanus) Arch. f. Zellf. 1.
- LIGHT, S.F. - 1932 - The determination of the castes of social insects. Quart. Rev. Biol. 17 (4): 291-326 and 18 (1): 46-63.
- MACKENSEN, O. - 1943 - Journ. Econ. Ent. 36 (3): 465-467 June.
- MARIANO, J. - 1911 - Ensáio sôbre as Melíponas do Brasil. Rio de Janeiro.
- MEVES, F. - 1907 - Die Spermatocytenbildung bei der Honigbiene. Arch. mik. An. 70.
- MEVES, F. e DUESBERG, J. - 1908 - Die Spermatocytenteilungen bei der Hornisse (Vespa crabro L.). Archiv. mikr. Anat. 71.
- MICHENER, C.D. - 1944 - Comparative external Morphology, Phylogeny and a Classification of the bees (Hymenoptera) Bull. Am. Mus. Nat. Hist. 82 (6): 151-326. April, N. York.
- MOURE, Pe. J. - 1946 - Melíponas do Brasil. Cha. e Qui. 74:609-612.
- MÜLLER, H. - 1875 - Zool. Garten, 16: 41-45 (ap. IHERING (1903) and SCHWARZ, (1932)).
- OSORNO, E. e OSORNO, H. - 1938 - Notas biológicas sôbre algunas especies de Bombus de los alrededores de Bogotá. Colombia S.A., Rev. Ent. 9 (1 and 2): 31-39 Setembro.

- W. K. Kerr*
- PEACOCK, A.D. and GHESSON, R.A.R. - 1931 - Male Haploidy and Female Diploidy in *Sirex cyaneus* F. (Hymen.). Proc. Royal Soc. Edinb. 51: 97-103 - 1 il.
- PEREZ, F. - 1895 - On the production of males and females in *Melipona* and *Trigona*. Am. Mag. Nat. Hist. Pg. 125-127.
- SALT, G. - 1929 - Trans. Entomol. Soc. London. 77: 431-470.
- SANDERSON, A.R. - 1933 - The cytology of parthenogenesis in *Tenthredinidae*. Genetic, 14: 321-451.
- SCHROEDER, C. - 1925 - Handbuch der Entomologie, Band III, p. 254.
- SCHWARZ, H.F. - 1932 - The *Melipona* Genus. Bull. Am. Mus. Nat. Hist. 63: 231-460. Fig. I-X.
- \_\_\_\_\_ - 1938 - The stingless Bees (*Meliponidae*) of British Guiana and Some Related Forms. Bul. Am. Mus. Nat. Hist. 74 (7): 437-508. N. York.
- \_\_\_\_\_ - 1939 - The Indo-Malayan Species of *Trigona*. Bul. Am. Mus. Nat. Hist. 76: 83-141.
- \_\_\_\_\_ - 1945 - The way of stingless bees and the uses to which it has been put. Journ. New York Ent. Soc. 53: 137-144, June.
- SILVESTRI, F. - 1902 - Contribuzione a la conoscenza dei *Meliponidi* dal Bacino del Rio de La Plata. Rev. Pat. Vej. 10: 121-170.
- SINGH, S. - 1943 - Las Abejas Melíferas de la India (ABC y XYZ de la Apicultura, de A.I. y E.R. Root, 1943, Pg: 621).
- SMITH, S.G. - 1941 - A new form of spruce sawfly identified by means of its cytology and parthenogenesis. Sc. Agr. 21 (5): 245-305.
- SNODGRASS, R.E. - 1925 - Anatomy and Physiology of the Honeybee - First Edition - Second Impression. Mc Graw - Hill Book Company, Inc. New York.
- \_\_\_\_\_ - 1941 - The male genitalia of Hymenoptera. Smithsonian Miscellaneous Collections 99 (14).
- SNYDER, T.E. - 1925 - The Biology of the Termite Castes. Quart. Rev. Biol. I (4): 522-552, Oct.
- TANQUARY, M.C. - 1943 - Biological and Embriological studies on Formicidae. Bull. Ill. Lab. Nat. Hist. 9: 417-479. Pls. LVII - LXIV.
- TILLYARD, R.J. - 1924 - Kansas Permian Insects. Part 3. The New Order Prothymenoptera. Amer. Journ. Sc. 5(8): 111-122.

- W. Kern*
- TORVIK-GREB, M. - 1935 - The chromosomes of *Habrobracon*. Biol. Bull. 63
- TOSI, A. - 1896 - Di un nuovo genere di *Apiaria* fossile Nell' Ambra di Sicilia (*Meliponorytes succini*, M. sicula) Rev. Ital. Paleontol. 2: 352-356. Pl. VI.
- VAVILOV, N.I. - 1928 - Geographische genzentren userer Kulturpflanzen. Verh. Sten. Kong. Vererb., Z.I.A.V. Suppl.
- \_\_\_\_\_ - 1932 - The process of evolution in cultivated plants. Proc. 6th. Cong. Gen. (this two VAVILOV papers are cited ap. WADDINGTON, C.H. - An Introduction to Modern Genetics p. 250 - 1939 - The Macmillan Company - New York.)
- WELLS, H.G., HUXLEY, J., WELLS, G.P. - 1935 - Evolução dos seres vivos. (Tradução do Prof. Almir de Andrade, 1940).
- WESSON, L.G. Jr. - 1940 - An experimental study on caste determination in ants. Psyche 47 (4): 105-111.
- WHEELER, W.M. - 1923 - Social life among the insects. vii, 375 pp. New York.
- \_\_\_\_\_ - 1928 - The social insects. xviii, 378 pp. New York.
- \_\_\_\_\_ - 1937 - Mosaics and other anomalies among ants. Harvard University Press.
- WHITE, M.J.D. - 1945 - Animal Cytology e Evolution - viii, 375 pp., University College, London.
- WHITING, P.W. - 1938 - Anomalies and caste determination in ants. Journ. Hered. 29: 189-193.
- \_\_\_\_\_ - 1940 - Multiple alleles in sex-determination of *Habrobracon*. Journ. Morphol. 66.
- WILSON, H.F. e DONER, M.H. - 1937 - The Historical Development of Insect classification. II, 133, University of Wisconsin.
- WINGE, Ø. - 1934 - The experimental alteration of sex chromosomes into autosomes and vice-versa, as illustrated by *Lebistes*. Comp. Rend. Trav. Laboratoire Carlsberg, Vol. 21 (1) 50 pp. 2 pl.
- WINGE, Ø and DITTEVSEN, E. - 1937 - On some attempts to control sex determination by treatment of sperm in trout (*Salmo trutta*). Compt. rend. Lab. Carlsberg, Sér. physiologie 22, 7.
- YUASA, H. - 1922 - A Classification of the Larvae of the Tenthredinoidea. Illinois Biol. Monogr. Vol. 1.

9 - EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

- Fig. 1 - Rainha virgem de Melipona quadrifasciata anthidioides. Fotografia de uma pintura feita pelo Sr. Alberto Thomazi.
- Fig. 2 - Operária adulta de Melipona quadrifasciata anthidioides.
- Fig. 3 - Colméia de Melipona marginata marginata mostrando:
- Alvéolos de filhos usados para armazenamento.
  - Alvéolos de filhos usados para criação.
  - Pótes de armazenamento.
- Fig. 4 - Favo de alvéolos com filhos de Melipona quadrifasciata anthidioides mostrando uma organização em uma só camada horizontal. Nota-se aí que todas as células são do mesmo tamanho; vê-se também que as operárias já raspam a cera excedente deixando o casulo nú, somente com cera nos interstícios.
- Fig. 5 - Favo de Melipona fasciata rufiventris mostrando uma organização helicoidal dos seus alvéolos. Nota-se que não há diferença de tamanho entre as células e que estas são reconstruídas devido ainda se acharem totalmente cobertas de cera.
- Fig. 6 - Aparelho genital masculino de pupa Melipona quadrifasciata anthidioides.
- Fig. 7 - Testículo de Melipona quadrifasciata anthidioides desenvolvido, mostrando que é formado por 4 tubos testiculares.
- Fig. 8 - Ovário de rainha virgem de Melipona quadrifasciata anthidioides. É interessante notar a dilatação do oviduto na desembocadura dos 4 ovaríolos.
- Fig. 9 - Espermateca de pupa de rainha virgem de Melipona schencki schencki mostrando a posição das duas glândulas anexas.
- Fig. 10 - Ovário de pupa de operária de Melipona quadrifasciata anthidioides. Note-se o tamanho diminuto dos ovaríolos e espermateca.
- Fig. 11 - Ovário de uma rainha fecundada de Melipona schencki schencki.
- Fig. 12 - Célula somática (nervosa) em divisão, de larva de operária de Melipona schencki schencki, mostrando 18 cromossomos. Orceína acética.
- Fig. 13 - Célula somática (nervosa) em divisão, de prepupa de rainha de Melipona quadrifasciata anthidioides mostrando 18 cromossomos. Orceína acética.
- Figs. 14 e 15 - Células somáticas (nervosas) de prepupa de macho de Melipona quadrifasciata anthidioides. Preparação total. Gilson-Petrunkewitsch. Feulgen.

M. K. K.

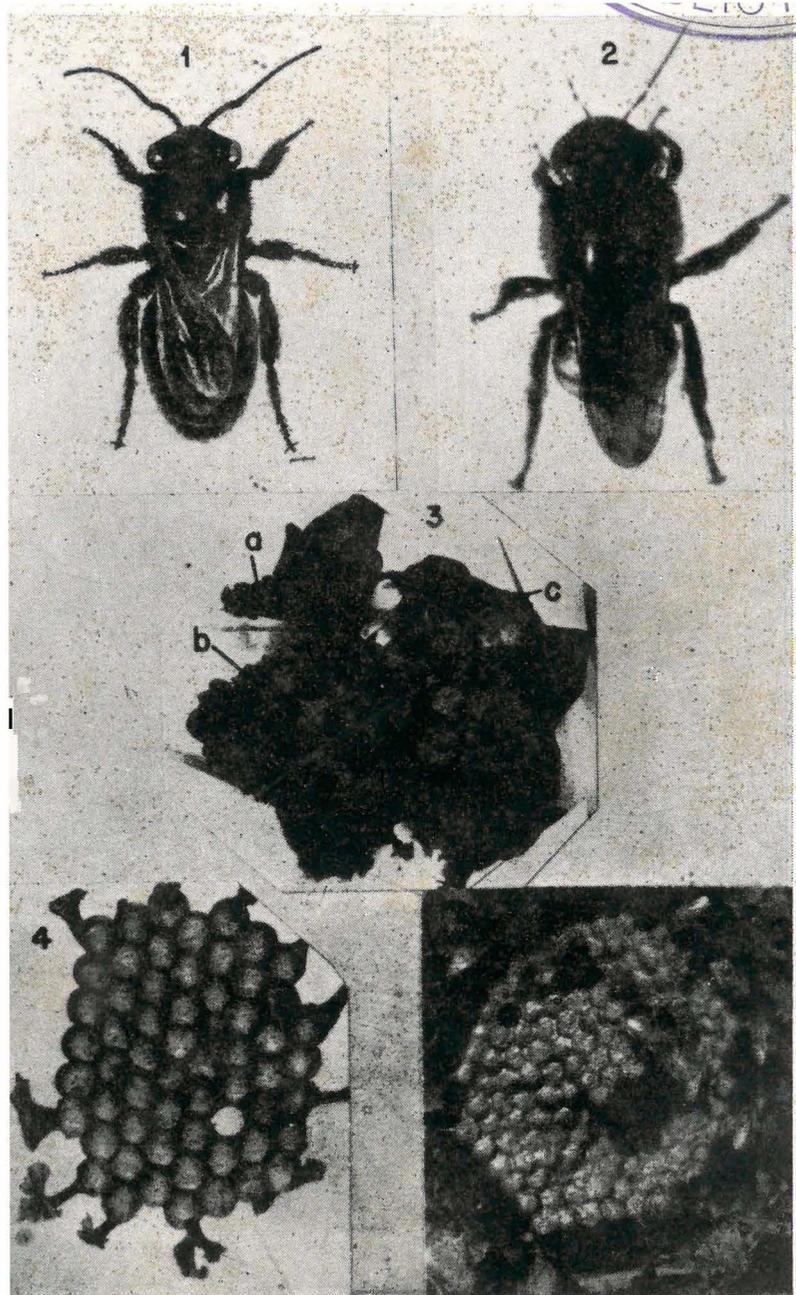
- Fig. 16 - Célula somática (nervosa) pentaplóide da mesma lâmina das figuras 14 e 15.
- Fig. 17 - Célula somática (nervosa) de larva de operária de Melipona na quadrifasciata anthidioides, mostrando 18 cromosomas. Orceina acética.
- Figs. 18 e 19 - Células somáticas do ovário de pupa jovem de operária de Melipona marginata marginata mostrando 18 cromosomas. Preparação total. Gilson-Petrunkewitsch. Feulgen.
- Figs. 20 a 40 - Espermatogênese.
- Fig. 20 - Cisto de testículo de Trigona (Plebeia) mosquito, mostrando a orientação tangencial das placas equatoriais das espermatogônias.
- Fig. 21 - Anafase de espermatogônia. Testículo de prepupa de macho de Melipona schencki schencki. Orceina acética.
- Fig. 22 - Profase da 1a. divisão. Melipona quadrifasciata anthidioides. Preparação total. Gilson-Petrunkewitsch. Feulgen e Hematoxilina de Heidenhein.
- Fig. 23 - Metafase da 1a. divisão. Pupa com olho branco de Melipona na quadrifasciata anthidioides. Preparação total. Gilson-Petrunkewitsch. Feulgen.
- Fig. 24 - Expulsão do broto citoplasmático. Melipona marginata marginata. Orceina acética.
- Fig. 25 - Telofase da 1a. divisão. Melipona marginata marginata. Orceina acética.
- Fig. 26 - Intercinese. Pupa com olho róseo de Melipona quadrifasciata anthidioides. Corte. Gilson-Petrunkewitsch. Hematoxilina de Heidenhein.
- Fig. 27 - Profase da 2a. divisão. Melipona schencki schencki. Preparada com Carnoy, fixada com Nawashin. Preparação total. Feulgen e Hematoxilina de Heidenhein.
- Fig. 28 - Profase da 2a. divisão. Melipona quadrifasciata anthidioides. Corte. Gilson-Petrunkewitsch. Hematoxilina de Heidenhein.
- Figs. 29 e 30 - Metafase da 2a. divisão. Mesma lâmina da figura 28.
- Figs. 31 e 33 - Anafase da 2a. divisão. Mesma lâmina da figura 28.
- Fig. 34 - Telofase da 2a. divisão. Mesma lâmina da figura 28.
- Figs. 35, 32, 36, 37, 38 e 39 - Fases da expulsão do broto nucleado até o início da formação do espermatozoide. Mesma lâmina da figura 28.

M. K. K.

- Fig. 40 - Cisto de testículo de Trigona (Plebeia) mosquito contendo espermatozoides. Compare o seu tamanho com o cisto da figura 20.
- Fig. 41 - Favo de Melipona quadrifasciata anthidioides. Os alvéolos assinalados com um ponto preto continham rainhas e os demais operárias. Nos espaços em branco existiam zangões ou falhas.
- Fig. 42 - Favo de Melipona marginata marginata. Valem aqui as mesmas considerações feitas para a figura 41.
- Fig. 43 - Segregação nas meliponas trifatoriais. Registramos aqui a porcentagem de rainhas encontradas nas diversas amostras do Quadro III. Agrupamos as amostras da seguinte maneira:
- A - 16- 2 a 7- 3-46 - 3 caixas
  - B - 6- 3 a 28- 3-46 - 3 caixas
  - C - 9- 5 a 6- 6-46 - 3 caixas
  - D - 20- 6 a 16- 8-46 - 2 caixas
  - E - 12- 8 a 22- 9-46 - 4 caixas
  - F - 20- 9 a 10-10-46 - 3 caixas
  - G - 28-10 a 19-11-46 - 3 caixas
  - H - 18-11 a 23-12-46 - 3 caixas
  - I - 17- 1 a 23- 4-47 - 3 caixas
- Fig. 44 - Segregação na Melipona marginata (bifatorial). Registramos aqui a porcentagem de rainhas encontradas nas diversas amostras do Quadro IV. Agrupamos as amostras da seguinte maneira:
- A - 24- 3 a 14- 4-46 - 2 caixas
  - B - 2- 6 a 18- 6-46 - 3 caixas
  - C - 23- 7 a 3- 9-46 - 3 caixas
  - D - 18- 9 a 24- 9-46 - 1 caixa
  - E - 2-11 a 18-11-46 - 3 caixas
  - F - 28-12 a 11- 1-47 - 1 caixa
- Fig. 45 - Gráfico de condições meteorológicas no mesmo período das figuras 43 e 44. As linhas cheias representam os máximos e mínimos médios de cada mês, as linhas pontilhadas os máximos e mínimos absolutos, e o histograma representa a chuva total de cada mês.
- Fig. 46 - Arvore filogenética indicando as afinidades prováveis das várias famílias dos Chalastogastra (segundo YUASA, 1922):

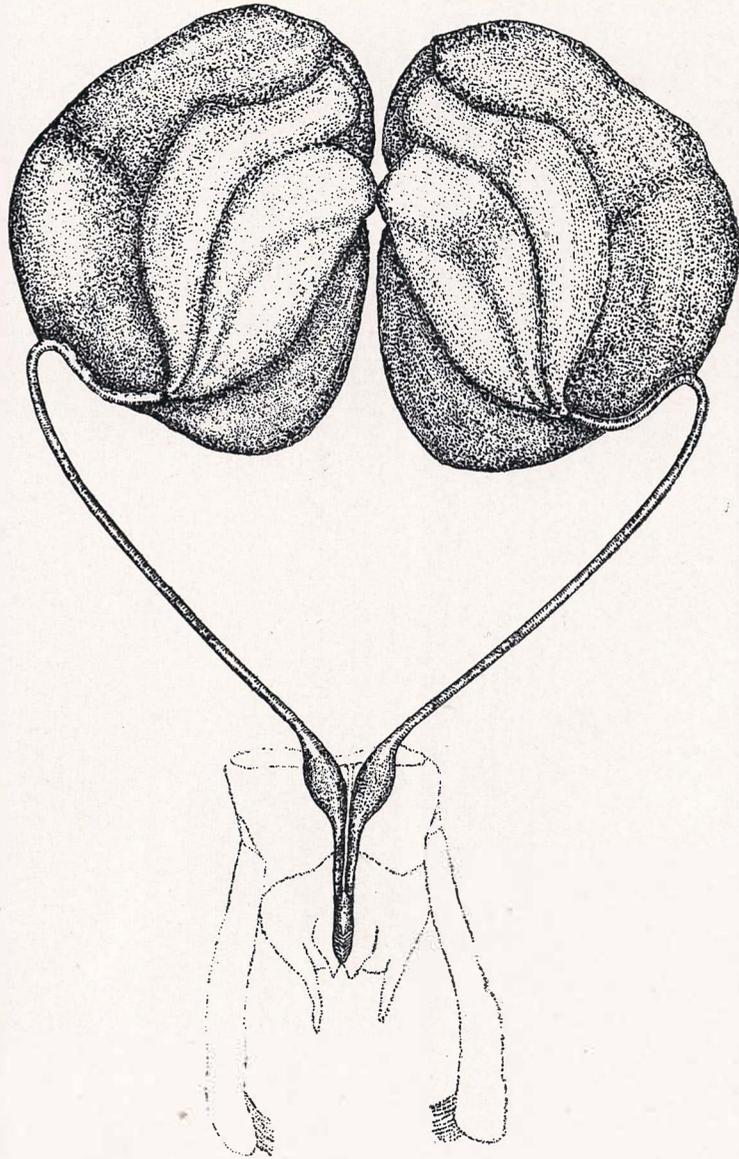
M. K. K.

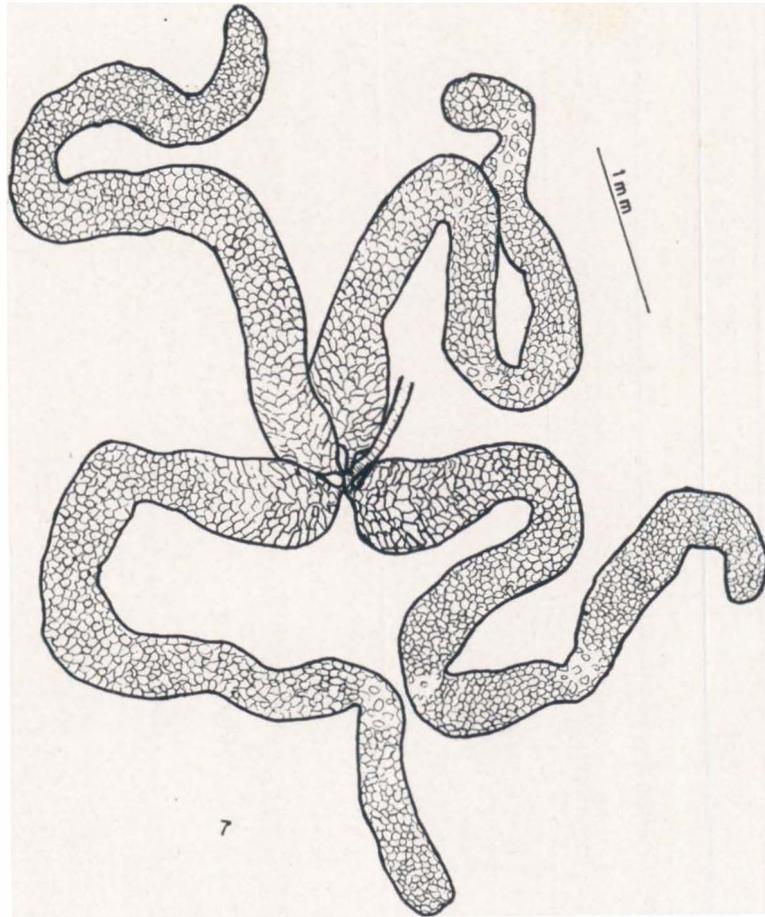
- Fig. 47 - Arvore filogenética sugerindo os parentescos das diversas sub-famílias e tribus de abelhas. (segundo MICHENER, 1944, página 230).
- Fig. 48 - Operária de *Meliponorites succini*, TOSI, 1896. Fóssil encontrado no ambar siciliano, Mioceno. (Ap. SCHROEDER, 1925, página 254).
- Fig. 49 - Filogenia do gênero *Melipona*, baseada em dados biológicos e na determinação das castas.
- Fig. 50 - Mapa-mundi mostrando a distribuição geográfica dos meliponíneos. As melíponas existem somente nas Américas. Na região marcada com uma mancha preta supõe-se ser a zona provável de origem das *Meliponas* trifatoriais.
- Fig. 51 - Colônia de *Bombus lapidarius* mostrando cachos de casulos de operárias (semelhantes aos de *Trigona silvestrii*), potes de mel e pólen (semelhantes aos dos meliponíneos em geral) e casulos velhos cheios com mel e pólen (aproximadamente semelhante ao sistema utilizado pelas *Apis*), (segundo F.W.SLAIDEN, citado por WHEELER, 1923).

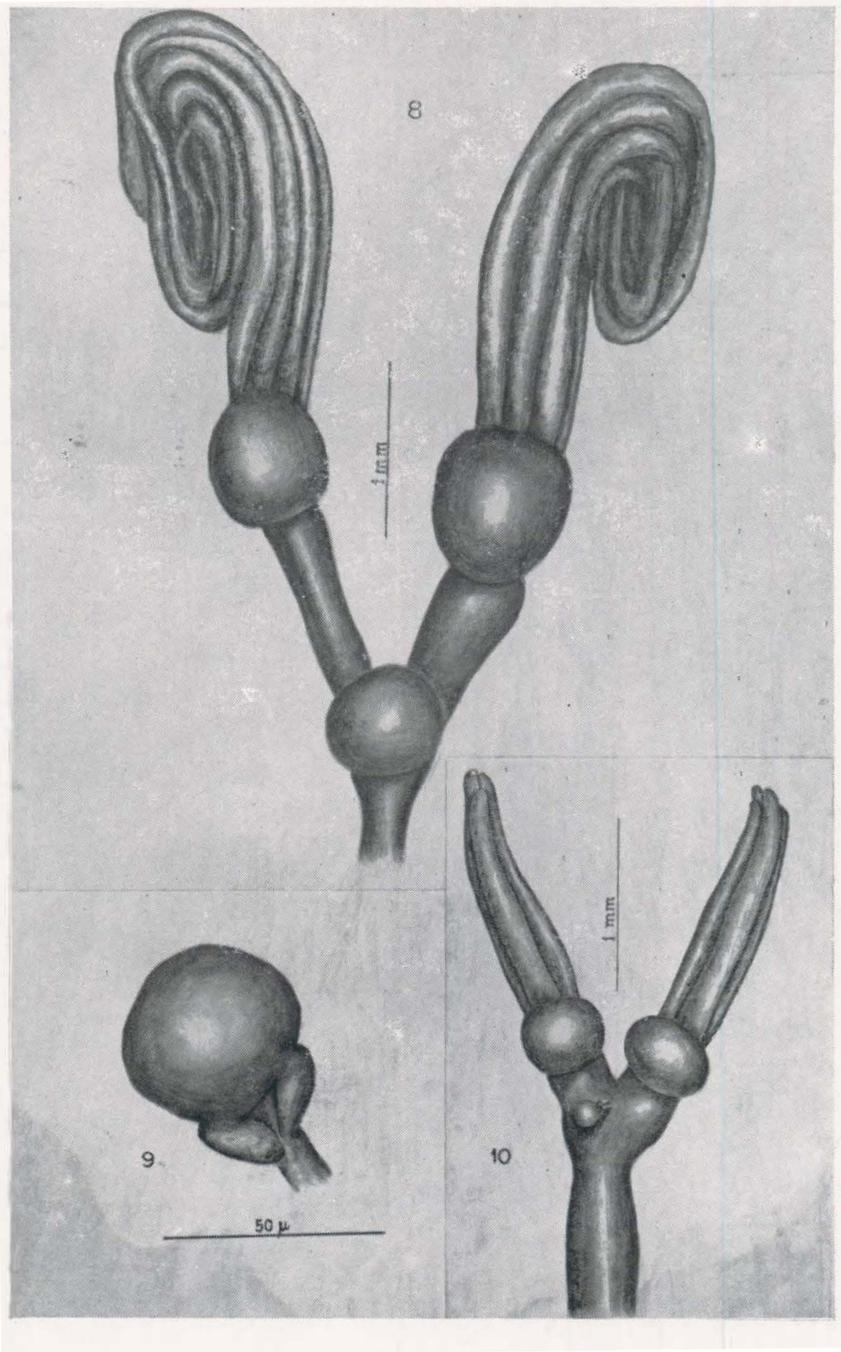


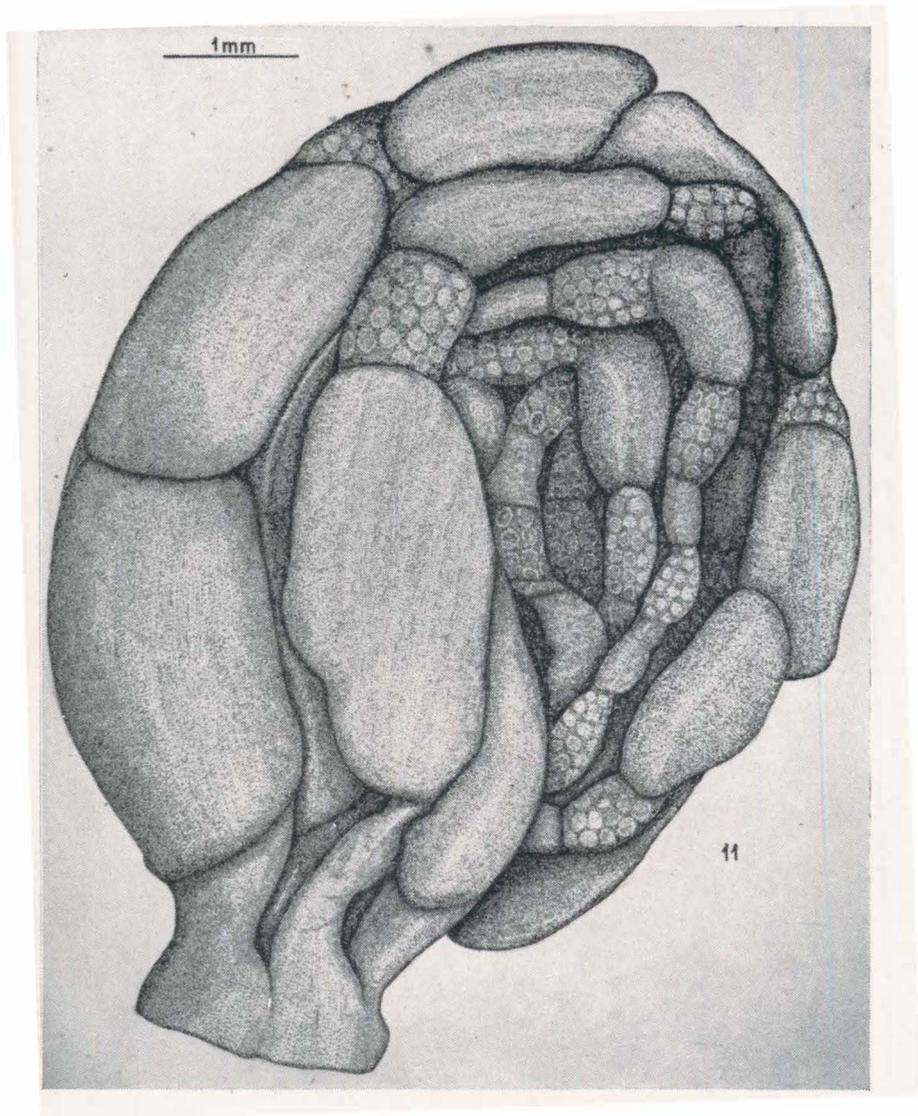
6

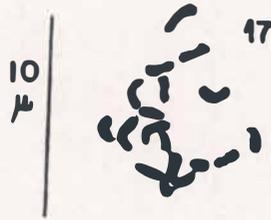
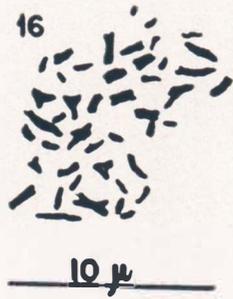
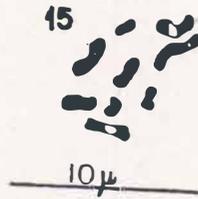
1 m m

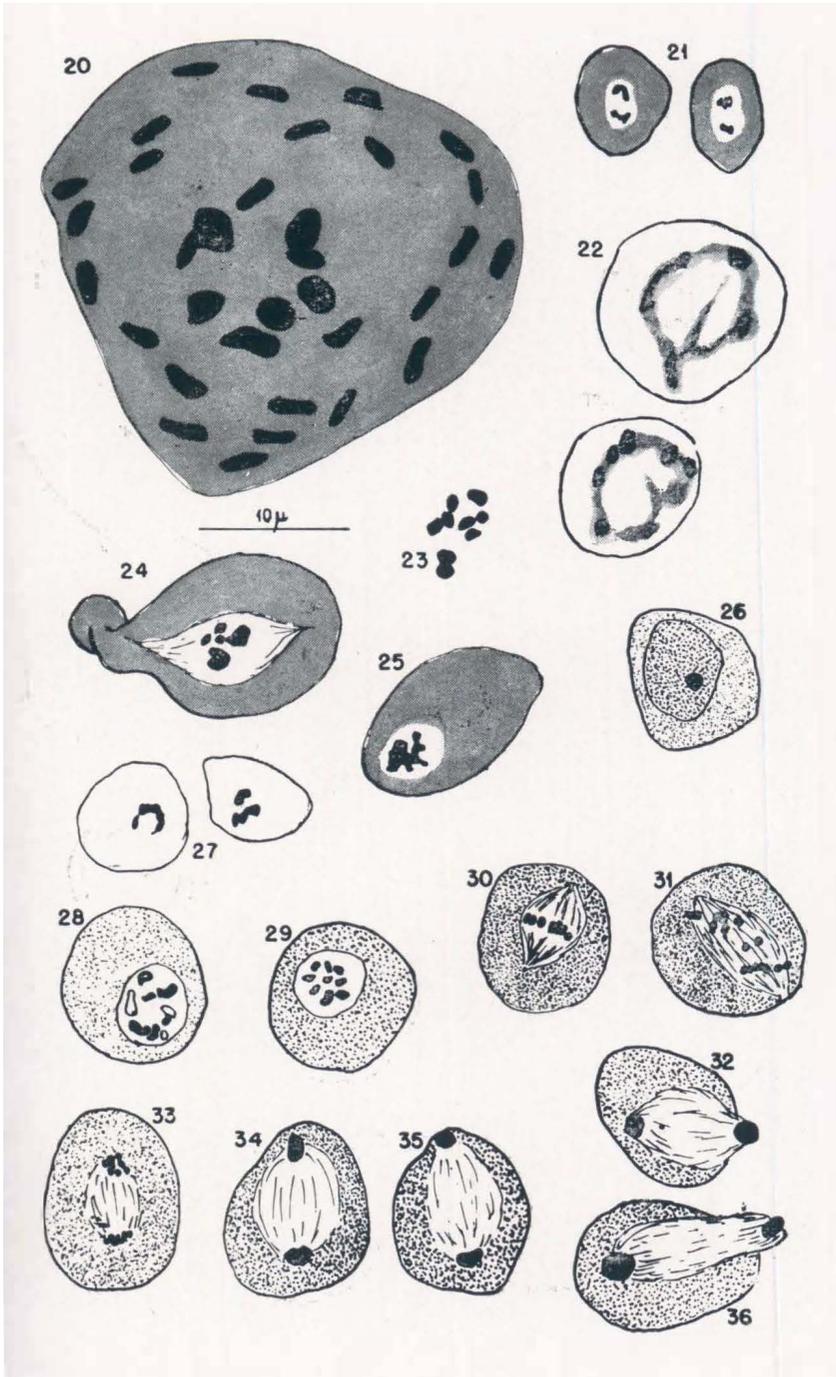


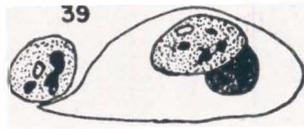
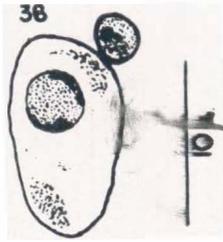
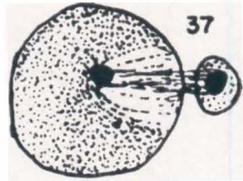
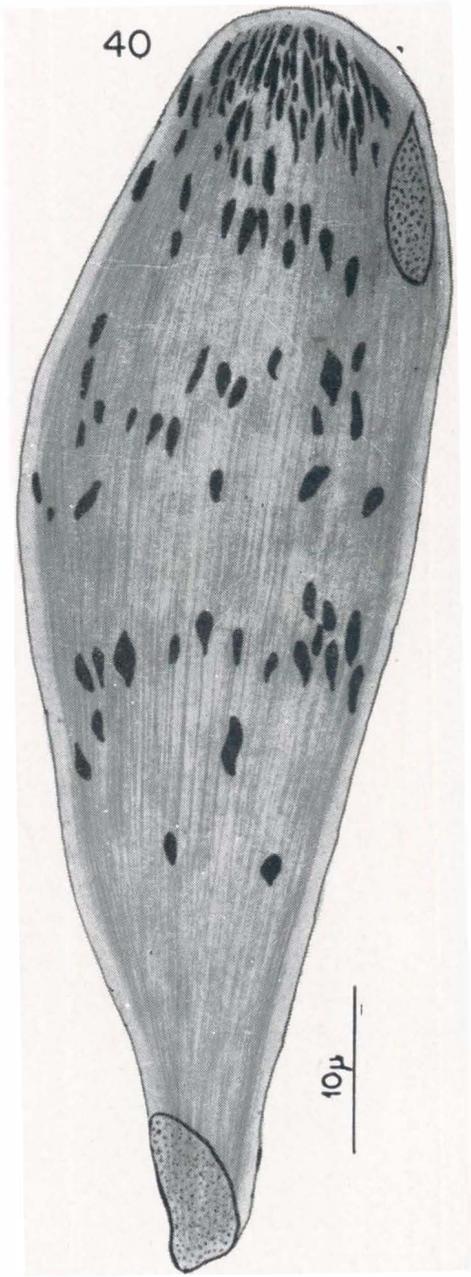


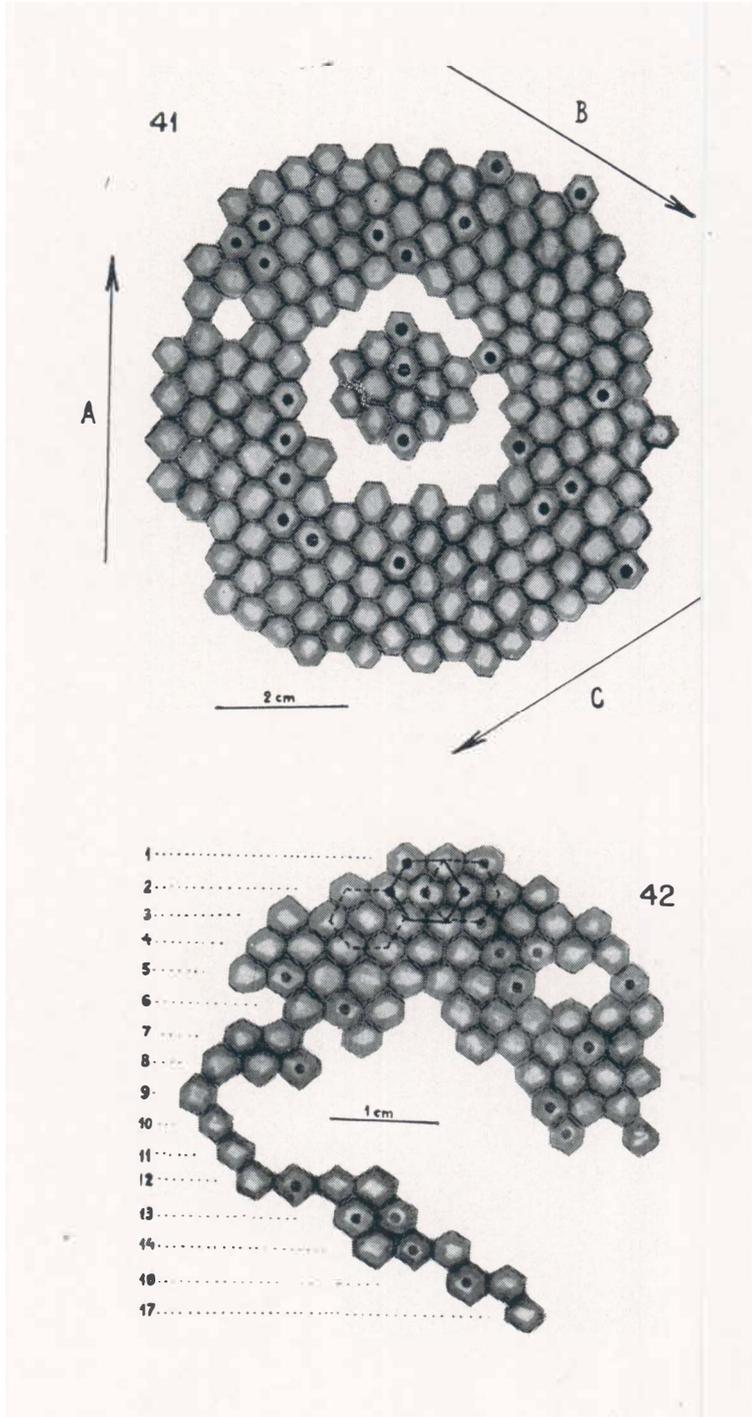




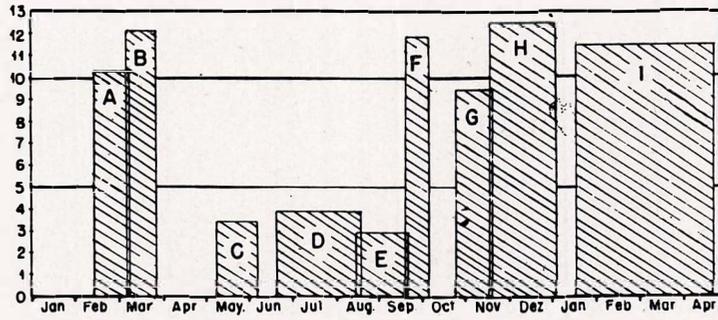




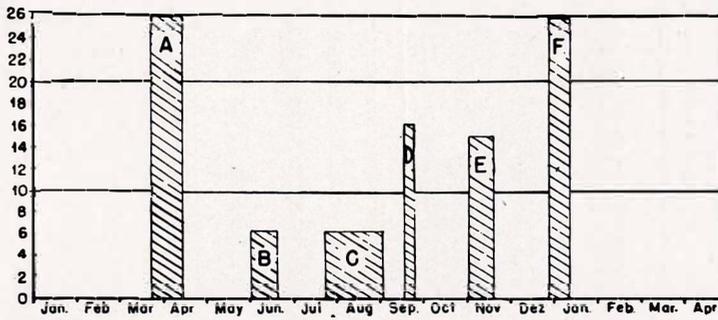




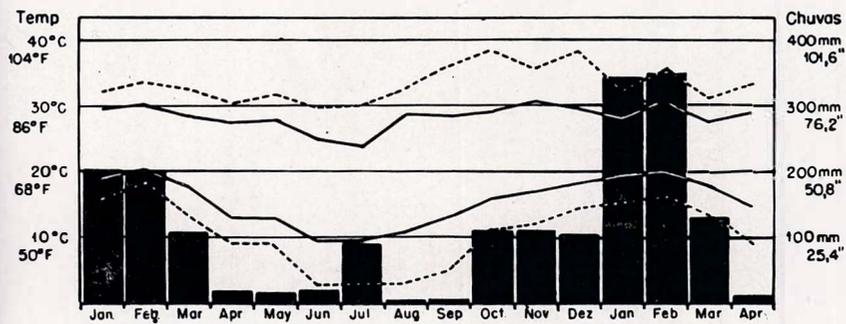
43

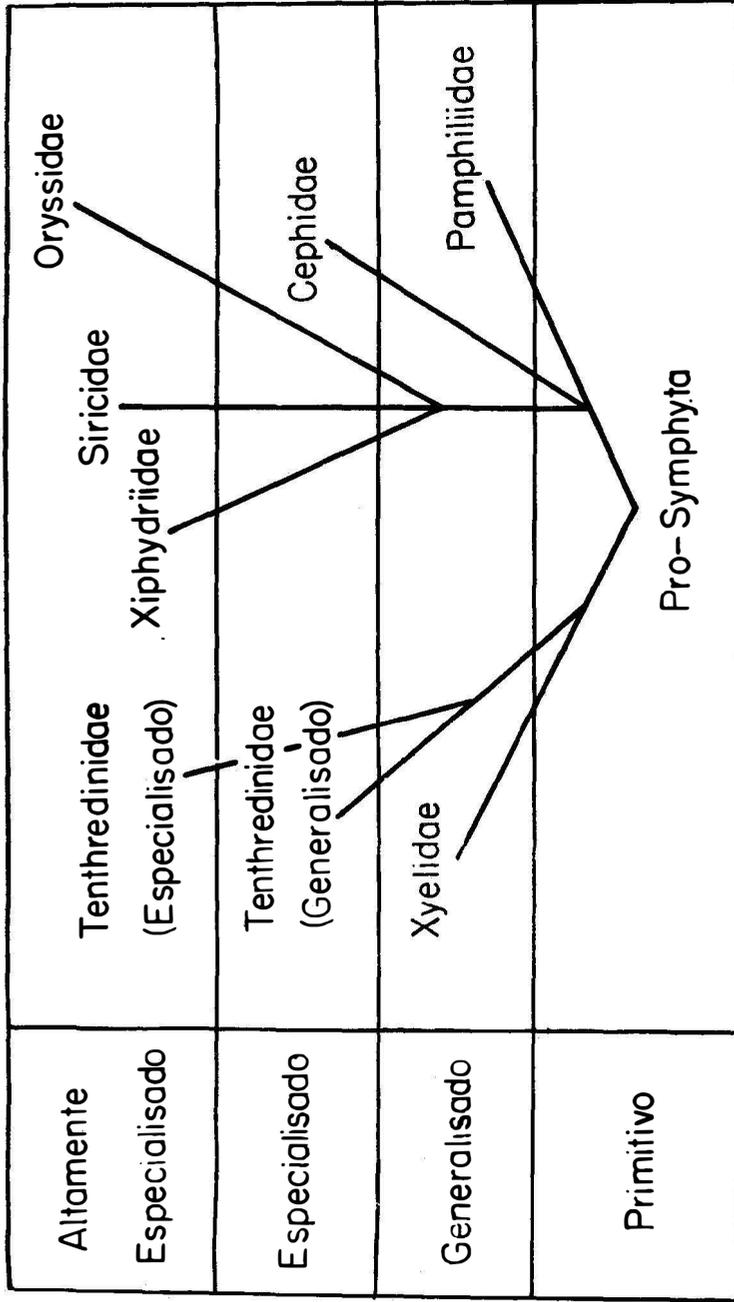


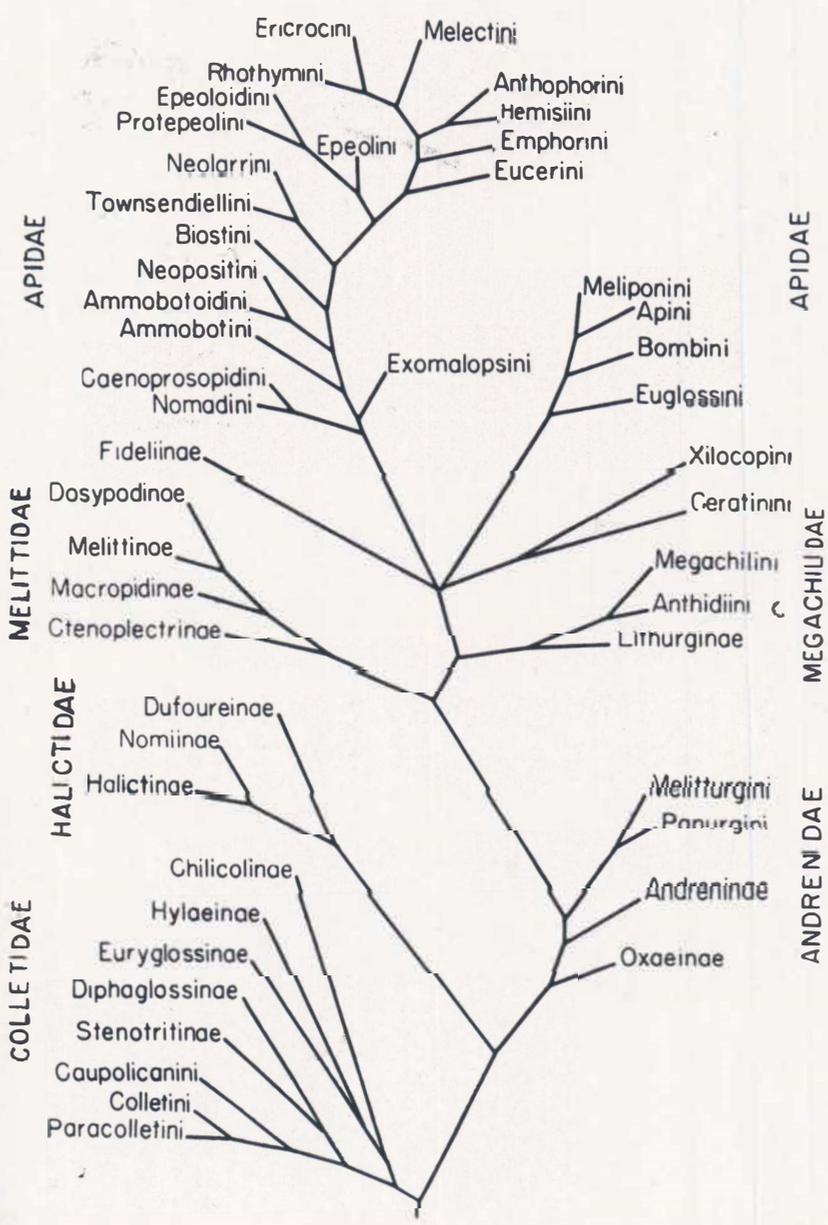
44

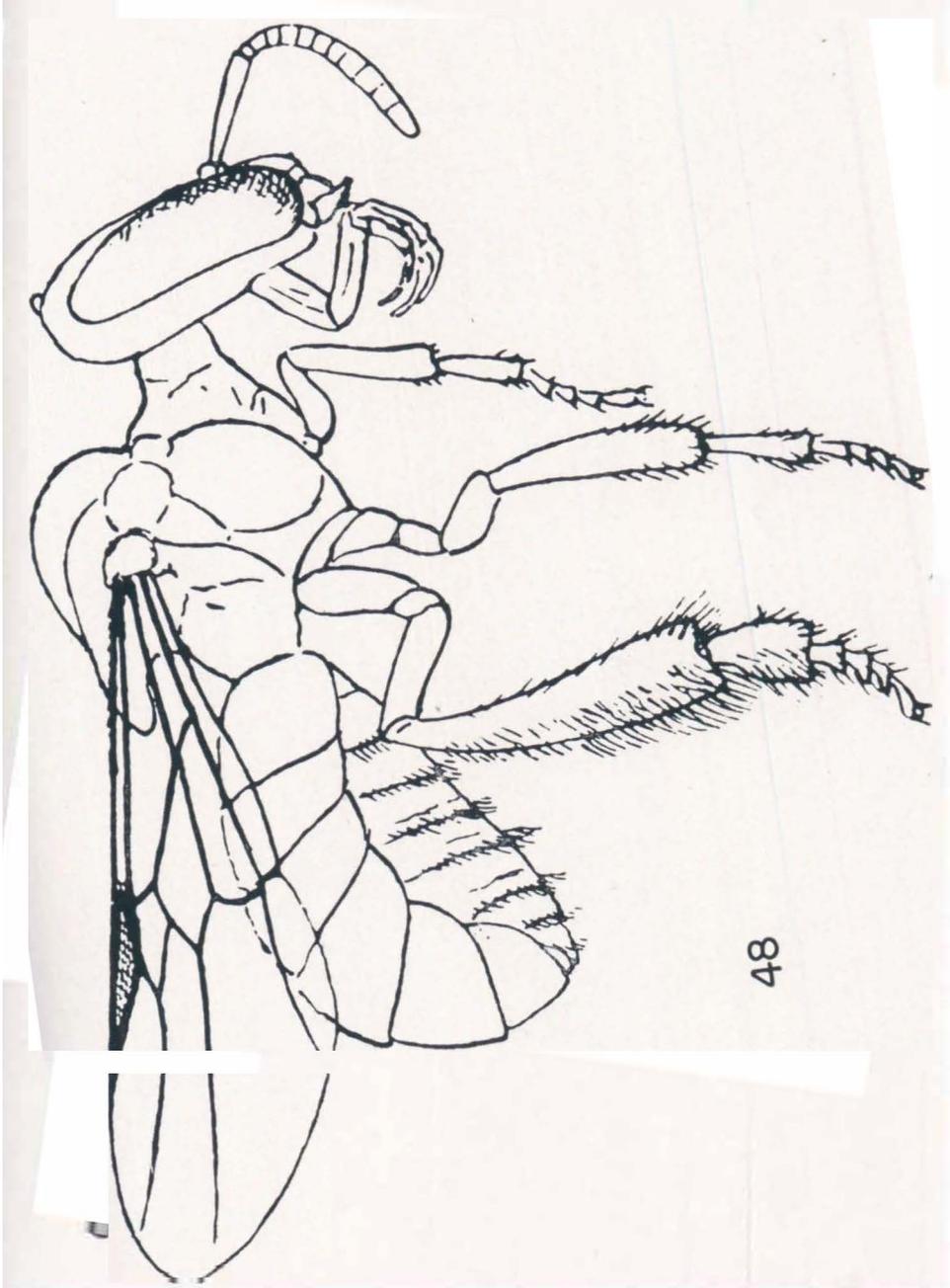


45

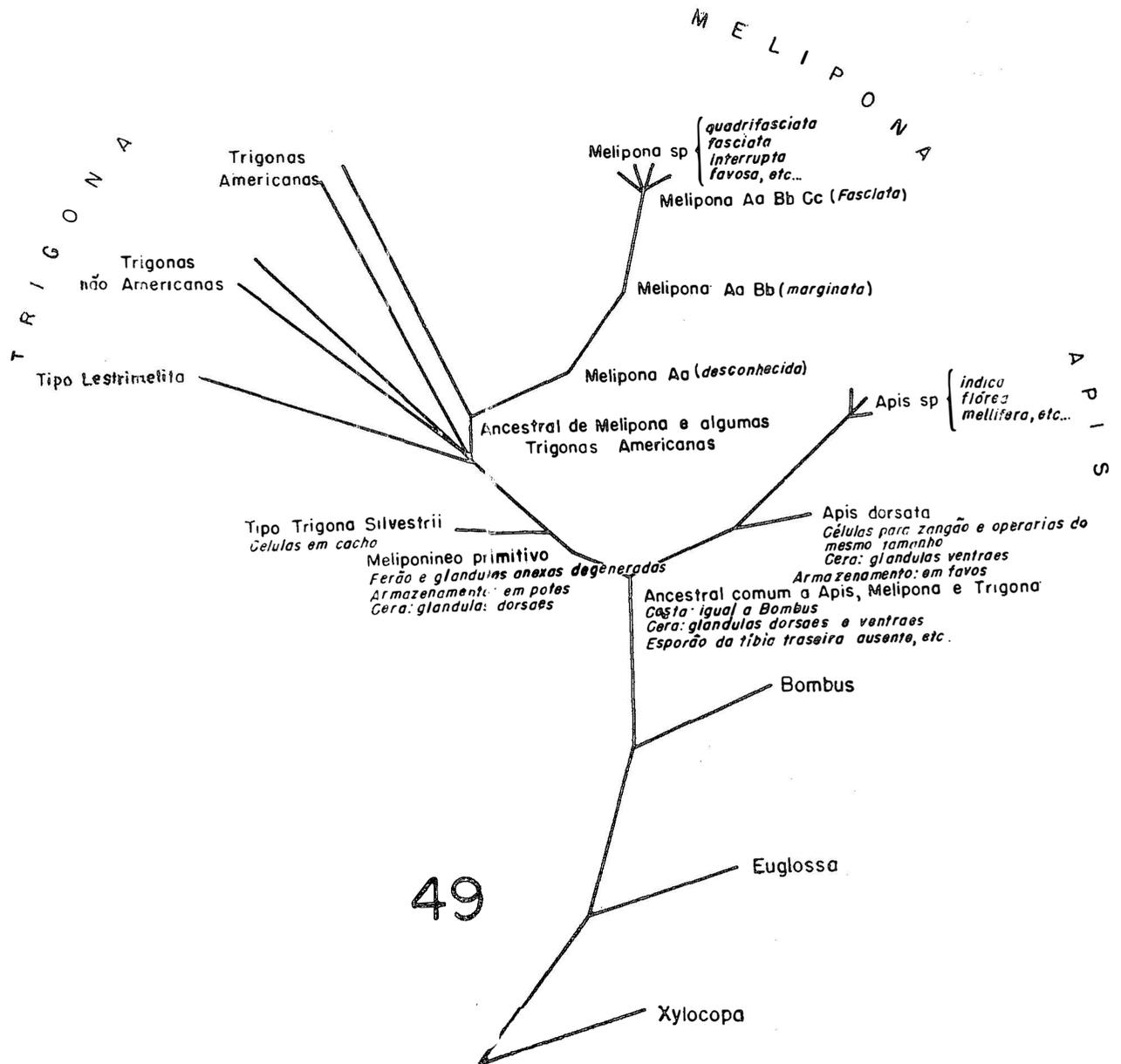


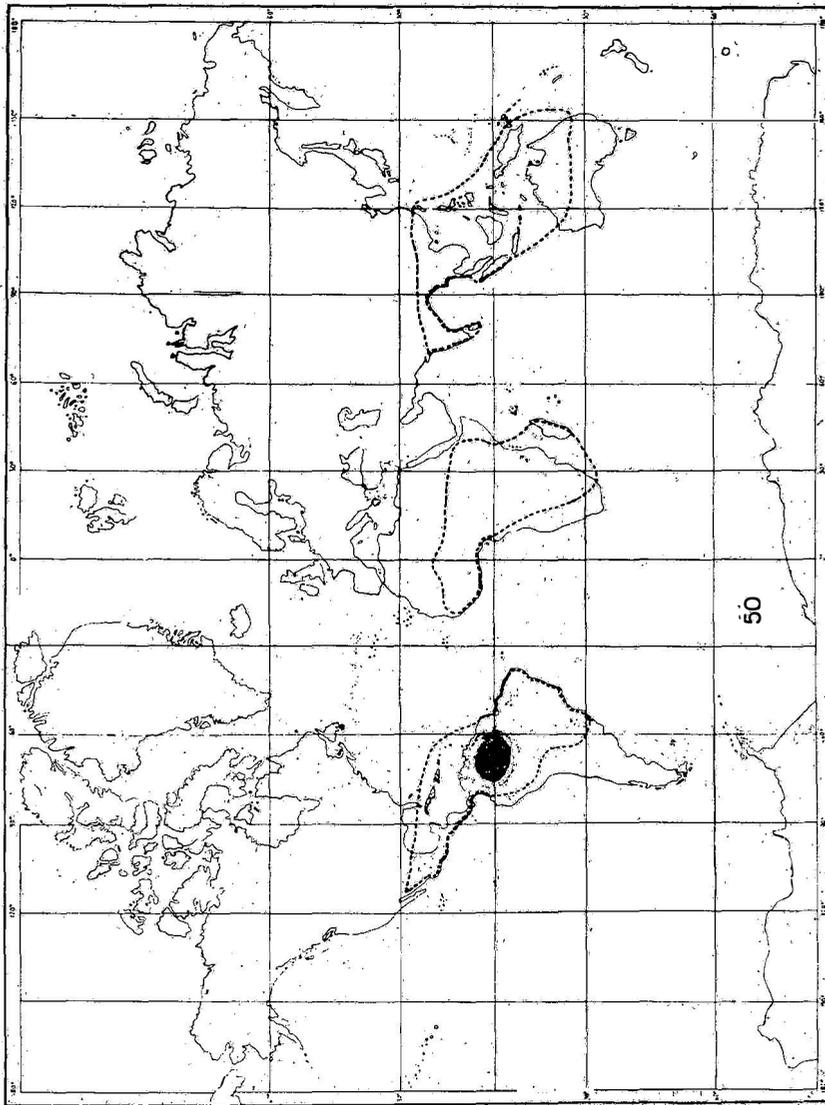


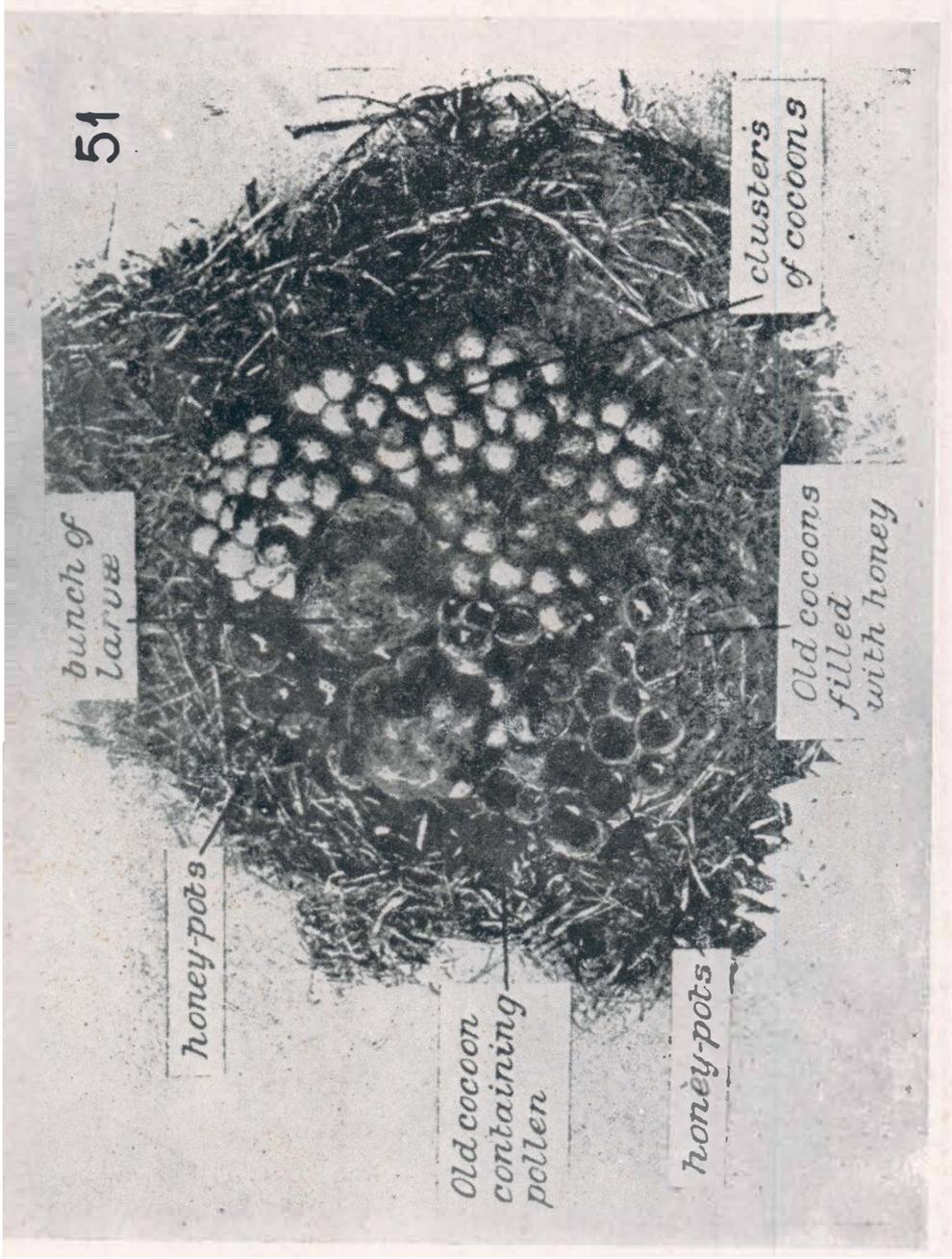




48







bunch of larvae

honey-pots

Old cocoon containing pollen

honey-pots

Old cocoons filled with honey

clusters of cocoons