



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Identificação e caracterização de genes e seus produtos protéicos do sistema olfatório e morfologia de antena da abelha sem ferrão *Melipona scutellaris* (Apidae: Meliponini)**

Washington João de Carvalho

Uberlândia-MG  
2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Identificação e caracterização de genes e seus produtos protéicos do sistema olfatório e morfologia de antena da abelha sem ferrão *Melipona scutellaris* (Apidae: Meliponini)**

Washington João de Carvalho

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ueira-Vieira / UFU

Co-Orientador: Prof. Dr. Walter Leal / UC, Davis

Tese apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Genética e Bioquímica (Área Genética)

UBERLÂNDIA

2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Identificação e caracterização de genes e seus produtos protéicos do sistema olfatório e morfologia de antena da abelha sem ferrão *Melipona scutellaris* (Apidae: Meliponini)**

Washington João de Carvalho

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof. Dr. Carlos Ueira-Vieira

Examinadores: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Gislene Almeida Carvalho-Zilse

Prof<sup>a</sup> Dr. Carlos Gustavo Nunes da Silva

Prof. Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Bonetti

Prof. Dr<sup>a</sup>. Solange Cristina Augusto

Data da Defesa: 30/07/2014

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas da PGGB para o formato da Tese foram contempladas

---

Prof. Dr. Carlos Ueira-Vieira

## *Dedicatória*

*Dedico esse trabalho especialmente aos meus pais Iolanda e Valter, ao meu irmão Warley, aos meus sobrinhos Clarice e João Victor e, ao meu companheiro Michael pelo apoio dedicado a mim durante todo o percurso desta etapa tão importante na minha vida.*

# *Agradecimentos*

*Agradeço a DEUS por me permitir desfrutar desta maravilhosa e tão proveitosa vida de aprendizados aqui na terra.*

*Agradeço aos meus pais pela sólida e digna educação, respeito e caráter ensinados; pelo apoio nos momentos mais difíceis, pelo amor e carinho dedicados a mim e por terem possibilitado que eu estudasse e chegasse onde cheguei hoje.*

*Agradeço especialmente ao meu pai pelo exemplo de homem, perseverança e caráter, pelos seus ensinamentos e educação; me formando enquanto a pessoa que sou hoje.*

*Agradeço especialmente à minha mãe pela educação exemplar dedicada à mim e pelo exemplo de força, perseverança, garra e vontade de viver, exalando alegria e esperança por onde passa.*

*Agradeço ao meu orientador, Professor Carlos Ueíra-Vieira, por ter contribuído enormemente para minha formação, pelos seus ensinamentos, por ter aberto as portas do seu laboratório para mim e me apresentado o fantástico mundo das abelhas; pelos conselhos, pela amizade e pelos momentos de descontração. Com certeza um exemplo de professor e pesquisador.*

*Agradeço a Professora Ana Bonetti por ter aberto as portas do seu laboratório para que eu terminasse minhas pesquisas de doutorado e pelo carinho e palavras amigas, pelo otimismo e pelos conselhos científicos e de vida.*

*Agradeço a minha grande amiga Patrícia “Patí Japa” por toda a ajuda nos experimentos com phage display, Elisas e Westerns e também pela*

*síncera amizade, pelo apoio, pelo companheirismo, pelas trocas “amigáveis” de apelidos e zuação um com outro e pelas conversas e cafés.*

*Agradeço a todos os meus amigos do LABGEN, Carlos Júnior, Carol, Denis, Natí Mel, Luíza, Andréssa, Rafa, Lucas, Cássio, Pedro, Cristiano (Portuga) e Célio por fazerem parte da minha vida, pelos momentos de brincadeira e por suportarem minhas brincadeiras e palavras de baixo escalão, pelas saídas no risca faca, pelos barzinhos, pela troca de experiências. Agradeço também ao professor Luiz Carlos pelo exemplo de profissionalismo e generosidade, disposto a ajudar sempre que precisei.*

*Agradeço também a todos os amigos que fiz no CREDESH, Thaís (Mary Kay), Tiago (Pescador), Rebecca e também às amigas mais antigas Érica Melo e Janaína Lobato pela sincera amizade e companheirismo.*

*Agradeço aos amigos do laboratório NĀNOS pela amizade e troca de experiências e ao professor Luiz Ricardo Goulart por deixar as portas do seu laboratório abertas sempre que precisei. Agradeço também a Luciana Machado (Luxcolor) pela prestatividade e amizade.*

*Agradeço às fontes financiadoras deste trabalho, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo auxílio financeiro em forma bolsa de estudos, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq por financiar um ano de doutorado na Universidade da Califórnia (USA), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG e à Universidade Federal de Uberlândia (UFU) pelo apoio financeiro ao projeto.*

*Agradeço ao Professor Walter Leal por abrir as portas do seu laboratório permitindo que eu desenvolvesse minha pesquisa e por me proporcionar uma fantástica experiência de estudos nos Estados Unidos. Exemplo de professor e pesquisador que levarei na construção da minha carreira profissional.*

*A special thanks to my partner Michael for supporting me, specially when I wanted to give up, and for giving me the opportunity to share my life with him.*

## SUMÁRIO

### Capítulo I ..... 1

#### FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA ..... 1

1. Introdução.....	1
1.1 Abelhas (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) e seu papel na natureza.....	1
1.2 Determinação do sexo nas abelhas (Hymenoptera: Apidae: Meliponini).....	6
1.3 Diferenciação de castas em abelhas (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) .....	8
1.3.1 Diferenciação de Castas em <i>Melipona</i> .....	11
1.4 Receptores Olfativos .....	14
1.5 Objetivo Geral.....	20
1.6 Objetivos Específicos.....	20
1.7 Referências Bibliográficas .....	22

### Capítulo II ..... 34

#### Morfologia da cabeça de larva pré-defecante e análise morfológica das sensilas da antena de rainha, operária e macho adultos de *Melipona scutellaris* (Apidae: Meliponini)..... 34

Resumo.....	34
Introdução .....	36
Material e Métodos .....	38
Resultados e discussão.....	40
Referências Bibliográficas .....	48
Figuras.....	Error! Bookmark not defined.
Tabela .....	Error! Bookmark not defined.

### Capítulo III ..... Error! Bookmark not defined.

#### Identificação de genes e proteínas do sistema olfatório em larva da abelha sem ferrão *Melipona scutellaris* e seu possível papel na diferenciação de casta..... Error! Bookmark not defined.



Resumo .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1 Introdução .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2 Material e Métodos .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3. Resultados e discussão .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.1 Biologia e diferenciação de casta em abelhas.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.2 Clonagem e sequenciamento das CDS completas.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.3 Expressão da MscuOBP8 recombinante e produção de anticorpo scFv..	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.4 Modelagem das proteínas recombinantes.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.5 Aspectos gerais da proteína MscuOBP8 e seu possível papel na diferenciação de casta em <i>Melipona scutellaris</i> .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4. Referências.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
5 Figuras.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
6 Tabela .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
7 Conclusões gerais.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>

# Lista de Figuras e Tabelas

## Capítulo I

<b>Figura 1:</b> Esquema dos diferentes mecanismos de diferenciação de casta em meliponíneos.....	10
---------------------------------------------------------------------------------------------------	----

<b>Figura 2:</b> Mecanismo de ação dos OBPs e ORs na via de processamento do odor, importante passo na comunicação química dos insetos.....	16
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## Capítulo II

<b>Figura 1:</b> Caracterização morfológica de larva LPD de <i>M. scutellaris</i> .....	56
-----------------------------------------------------------------------------------------	----

<b>Figura 2:</b> Microscopia eletrônica de transmissão da região dorsal da antena direita de operária de <i>M. scutellaris</i> .....	58
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

<b>Figura 3:</b> Microscopia eletrônica de transmissão da região dorsal da antena esquerda de rainha de <i>M. scutellaris</i> .....	60
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

<b>Figura 4:</b> Microscopia eletrônica de transmissão da região dorsal da antena esquerda de macho de <i>M. scutellaris</i> .....	62
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

<b>Figura 5:</b> Microscopia eletrônica de transmissão da região distal do último flagelômero de <i>M. scutellaris</i> .....	64
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

<b>Tabela 1:</b> Padrão de distribuição dos tipos de sensilas d <i>M. scutellaris</i> .....	65
---------------------------------------------------------------------------------------------	----

<b>Tabela 2:</b> Número de sensilas encontrado nas antenas de <i>Melipona scutellaris</i> .....	65
-------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## Capítulo III

<b>Figura 1:</b> Amplificação da CDS completa do gene <i>MscuCSP2</i> e sequência de aminoácidos..	90
----------------------------------------------------------------------------------------------------	----

<b>Figura 2:</b> Amplificação da CDS completa do gene <i>MscuCSP6</i> e sequência de aminoácidos..	91
----------------------------------------------------------------------------------------------------	----

<b>Figura 3:</b> Amplificação da CDS completa do gene <i>MscuOBP4</i> e sequência de aminoácidos..	92
----------------------------------------------------------------------------------------------------	----

<b>Figura 4:</b> Amplificação da CDS completa do gene <i>MscuOBP8</i> e sequência de aminoácidos..	93
----------------------------------------------------------------------------------------------------	----

<b>Figura 5:</b> Gel de poliacrilamida representativo da expressão da proteína recombinante MscuOBP8.....	95
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

<b>Figura 6:</b> Purificação da proteína MscuOBP8 por HPLC. Gel de poliacrilamida das frações da purificação da proteína MscuOBP8 (A) e Western Blot das frações utilizando anticorpo anti-His (B).....	96
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

<b>Figura 7:</b> Predição das estruturas tridimensionais e análise de similaridade.....	97
<b>Figura 8:</b> Estrutura 3D da proteína MscuOBP8.....	98
<b>Figura 9:</b> Detecção da proteína nativa MscuOBP8 em larva de <i>M. scutellaris</i> .....	99
<b>Tabela 1:</b> Sequência dos oligonucleotídeos.....	100

## Lista de Abreviaturas

°C - Graus celsius

\$ - Dólar americano

µg - Micrograma

pmol - Picomol

nmol - Nanomol

BSA - Soroalbumina bovina

CCD - *Colony collapse disorder*

cDNA - DNA complementar

CDS - *Coding DNA sequence*

csd - complementary sex determiner

CSP - Chemosensory protein

DNA - Ácido desoxiribonucleico

fem - *feminizer*

GR - *Gustatory receptor*

HJ - Hormônio juvenil

IR - *Ionotropic receptor*

L1 - Larva de primeiro estágio

L2 - Larva de segundo estágio

L3 - Larva de terceiro estágio

LD - Larva defecante

LPD - Larva pré-defecante

M - Molar

**MscuCSP2** - *Chemosensory protein 2 de Melipona scutellaris*

**MscuCSP6** - *Chemosensory protein 6 de Melipona scutellaris*

**MscuOBP4** - *Odorant binding protein 4 de Melipona scutellaris*

**MscuOBP8** - *Odorant binding protein 8 de Melipona scutellaris*

OBP - *Odorant binding protein*

ODA - *9-oxo-2-decenoic acid*

ODE - *Odorant-degradin enzyme*

OR - *Odorant receptor*

**ORN** - *Olfactory receptor neuron*  
**PBS** - Tampão fosfato salino  
**PBS-T** - PBS com Tween  
**PCR** - Reação em cadeia da polimerase  
**pH** - Potencial hidrogeniônico  
**RNA** - Ácido ribonucléico  
**RT** - Transcrição reversa  
**scFv** - *Single Chain Variable Fragment*  
**SDS** - Dodecil Sulfato de Sódio  
**SEM** - *Scanning Electron Microscopy*  
**SN** - *Sensory neuron*  
**SNMP** - *Sensory neuron membrane protein*  
**USA** - Estados Unidos da América

## Resumo Geral

O principal papel das abelhas na natureza é a polinização de angiospermas, com papel fundamental na manutenção da diversidade biológica, bem como na produção de alimentos de modo geral. As abelhas brasileiras sem ferrão (*Meliponini*), polinizam de 40 a 90% das árvores nativas e estão presentes em todo o mundo, sendo o Brasil o principal representante dessas abelhas. A espécie *Melipona scutellaris* (popularmente conhecida como uruçú do Nordeste) está distribuída na região da Zona da Mata, ocorrendo desde a Bahia até o Rio Grande do Norte. O entendimento sobre a diferenciação de castas em *Melipona scutellaris* é um aspecto extremamente importante para a conservação e manejo dessa abelha, principalmente no Brasil.

Em 1950, Kerr propôs um modelo, para explicar a diferenciação de casta em *Melipona*, de dois genes/dois loci, de modo que larvas duplo heterozigotas, quando bem alimentadas, desenvolvem-se em rainhas e larvas mal alimentadas ou homozigotas para esses genes, tornam-se operárias, em consequência de baixa produção de Hormônio Juvenil.

Para a organização social da colônia e desempenho adequado dos papéis das castas e sexos, as abelhas apresentam um elaborado sistema olfatório, do qual a antena é o principal órgão sensorial, abrigando grande diversidade de sensilas. As sensilas têm papel na comunicação química intra e interespecífica, atuando como receptores de compostos químicos no ar, como os feromônios, levando à respostas comportamentais característico de indivíduos, espécies, famílias ou gêneros.

No segundo capítulo apresentamos, de acordo com as imagens de microscopia de eletrônica de varredura, um padrão heterogêneo de distribuição das sensilas ao longo da antena. Os principais tipos de sensilas identificados nas antenas de *M. scutellaris* foram: tricóide, basicônica, placóide, celocônica, ampulácea e campiniforme, sendo que as sensilas tricóides e placóides foram as mais abundantes em todas as castas e sexo. As sensilas ampulácea e celocônica foram encontradas apenas nos flagelômeros distais das fêmeas e

campiniformes e basicônicas não foram encontradas nas antenas de macho analisadas. As larvas LPD apresentaram estruturas morfológicamente semelhantes à sensilas, com poros em sua base, em diversas regiões da área analisada, que podem representar uma importante porta de entrada de compostos voláteis presentes no alimento larval que possam ativar genes envolvidos na diferenciação de castas de *Melipona scutellaris*.

No terceiro capítulo, nós detectamos transcritos, clonamos e sequenciamos os genes *MscuCSP2*, *MscuCSP6*, *MscuOBP4* e *MscuOBP8* em larvas de *M. scutellaris*. Selecionamos um anticorpo monoclonal por *phage display* que nos permitiu detectar a proteína MscuOBP8 nos estágios L2, L3 (1-3), LPD e LD do desenvolvimento larval. A estrutura 3D da proteína MscuOBP8 apresentou cavidade interna composta por aminoácidos hidrofóbicos corroborando com sua função carreadora de compostos hidrofóbicos tais como, substâncias voláteis.

Neste contexto, este trabalho apresenta a morfologia da antena de adultos e, principalmente, da porção anterior de larva do estágio pré-defecante do desenvolvimento (sensível à ação do hormônio juvenil) e também a caracterização de genes e proteínas do sistema olfatório em larva de *Melipona scutellaris* a fim de correlacioná-los com o mecanismo de diferenciação de castas em *Melipona scutellaris* proposto por Kerr.

## Abstract

The main role of bees in nature is pollination of angiosperms, because of it bees are responsible for biological diversity maintenance and food production as well. Brazilian stingless bees (Meliponini) pollinate 40-90% of native trees and are found worldwide, wherein Brazil is the main representative of these bees. The *Melipona scutellaris* species (popularly known as the “uruçu do nordeste”) is distributed geographically from Bahia to Rio Grande do Norte State, in the Zona da Mata region. The understanding of caste differentiation in *Melipona scutellaris* is extremely important for conservation and management of this bee.

In 1950, Kerr proposed the model two genes/two-locus to explain the caste differentiation in *Melipona*; when well fed double heterozygous larvae develop into queens and underfed larvae or homozygous for these genes become workers, as a result of low production of Juvenile Hormone.

Antennae is the main organ of bee olfactory system playing an important role in maintaining of colony social organization and in the performance of caste and sexes as well. The antennae houses a great diversity of sensilla, which are very important to bee chemical communication as receptors of compounds in the air such as pheromones, leading to typical behavioral responses of individuals, species, genera or families.

The second chapter we show the results from scanning electron microscopy which demonstrates a heterogeneous distribution pattern of sensilla along the antenna. The main types of sensillum found in the antennae of *M. scutellaris* were: trichodea, basiconica, placodea, coeloconica, ampullacea and campaniformia. The most abundant sensilla found were trichodea and placoid in both castes and sexes. The ampullacea and coeloconica sensilla were found only in the distal flagellomeres of females and campaniformes and basiconica sensilla were not found in the analyzed antennae male. Larvae pre-defecant showed structures that are morphologically similar to sensilla. These structures has pores at its base and were found in many parts of the head area, which may represent an important gateway of volatile compounds from the larval food.



These compounds, possibly can activate genes involved in caste differentiation of *Melipona scutellaris*.

The third chapter introduces the detection, cloning and sequencing of transcripts of the *MscuCSP2*, *MscuCSP6*, *MscuOBP4* and *MscuOBP8* genes from *Melipona scutellaris* larvae. We detected the MscuOBP8 protein in the L2, L3 (1-3), LPD LD larval stages of development using a monoclonal antibody selected by phage display. The 3D structure of the MscuOBP8 protein showed an internal cavity composed of hydrophobic amino acids confirming its binding function to hydrophobic compounds such as volatile substances.

According to our data, the morphology of the head and especially adult antenna of the pre-defecating larvae (stage responsive to the action of juvenile hormone) and also the characterization of genes and proteins of olfactory system in larvae of *Melipona scutellaris* can be correlated with caste differentiation mechanism in *Melipona scutellaris* proposed by Kerr.

# Capítulo I

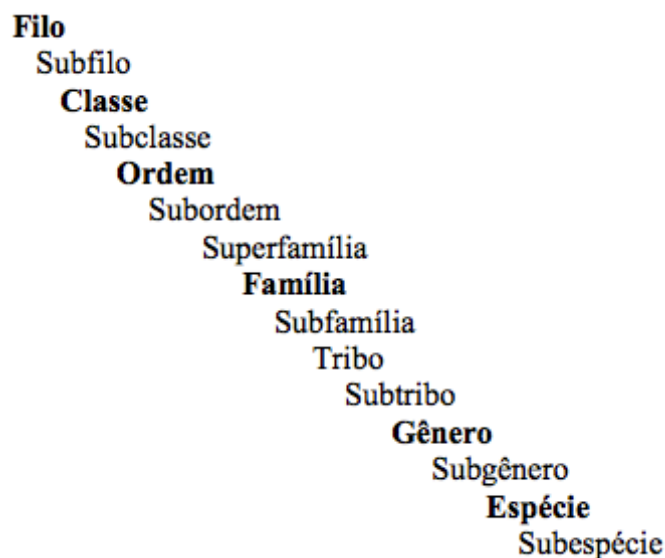
## FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

---

### 1. Introdução

#### 1.1 Abelhas (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) e seu papel na natureza

Os animais são classificados taxonomicamente de acordo com suas características morfológicas, comportamentais e características genéticas conforme o esquema abaixo:



O grupo dos himenópteros é considerado um dos maiores e mais diversificados dentro da classe Insecta, apresentando cerca de 115.000 espécies descritas e está estimado em abrigar de 1.000.000 a 3.000.000 de espécies. Seus representantes são: vespas, formigas e as abelhas (Sharkey, 2007).

As abelhas são, taxonomicamente, classificadas em:

**Reino:** Animalia  
**Filo:** Arthropoda  
**Classe:** Insecta  
**Ordem:** Hymenoptera  
**Subordem:** Apocrita  
**Superfamília:** Apoidea  
**Família:** Apidae

As abelhas pertencem à superfamília Apoidea que se subdivide em 8 famílias: Colletidae, Erenidae, Oxaeidae, Halictidae, Melittidae, Megachilidae, Anthophoridae e Apidae. A família Apidae, por sua vez, subdivide-se em cinco subfamílias: Andreninae, Apinae, Colletinae, Halictinae e Megachilinae, sendo que a Tribo Meliponini, abriga todas as abelhas sem ferrão (Camargo e Pedro, 2013).

O grupo dos Meliponini encontra-se distribuído mundialmente, nas Américas do Sul e Central, África, Austrália, Indonésia, Índia e Malásia, nas zonas Tropical e Subtropical, com 34 gêneros e mais de 300 espécies descritas (Camargo e Pedro, 2013), sendo o Brasil o principal representante dessas abelhas. As abelhas do gênero *Melipona* são encontradas desde o México à Argentina e com maior diversidade na bacia amazônica (Silveira et al., 2002; Camargo e Pedro, 2013). A espécie *Melipona scutellaris* (popularmente conhecida como uruçú do Nordeste) está distribuída na região da Zona da Mata, ocorrendo desde a Bahia até o Rio Grande do Norte (Camargo e Pedro, 2013).

O papel das abelhas na natureza é, particularmente, a polinização, sendo fundamentais na reprodução da maioria das plantas; e estão intimamente ligadas à produção de sementes e, conseqüentemente, frutos. As abelhas brasileiras sem ferrão polinizam de 40 a 90% das árvores nativas; e os 10% restantes são polinizados por abelhas solitárias e outros insetos, água, vento, aves e alguns mamíferos (Kerr et al., 1996).

A polinização animal, especialmente aquela realizada pelos insetos, é de extrema importância para reprodução sexuada das plantas selvagens e,

principalmente, de cultivares na agricultura. A maioria das culturas, principalmente frutas, vegetais e grãos, dependem ou aumentam consideravelmente sua produção quando polinizadas por abelhas da espécie *Apis mellifera* “domesticadas” ou abelhas selvagens, assim como *bumblebees* (Hein, 2009).

Os insetos são os principais polinizadores de monoculturas, sendo a abelha *Apis mellifera* o polinizador economicamente mais importante em todo o planeta (Klein et al., 2007). Das principais culturas consumidas diretamente pelo homem 70% dependem de polinizadores (Klein et al., 2007), sendo que 84% das culturas cultivadas na Europa dependem diretamente da polinização por insetos, principalmente por abelhas (Williams, 1994).

A crescente necessidade de polinizadores pela agricultura faz da polinização por insetos (especialmente abelhas) um serviço comercial e uma prática na produção de alimentos pelos produtores em todo o mundo (Lautenbach et al., 2012).

Um mapa da produção e do valor econômico agregado pela polinização foi feito por Lautenbach e colaboradores (2012), demonstrando que a agricultura de países como USA e Rússia tiveram um aumento na dependência pelo serviço de polinização, enquanto Brasil e China diminuíram essa dependência em torno de 5%. Contudo, quando analisado os benefícios globais trazidos pela polinização, foi observado que, os países como USA, China, Índia, Coreia, Turquia, Itália, Grécia, partes da África, partes do Brasil, Argentina, Cuba e Costa Rica foram os que apresentaram maior ganho, em termos econômico-agroindustriais, com a polinização.

Culturas tais como a soja tem um ganho na produção de até \$490 (dólares americanos) por hectare (Paraná e Rio Grande do Sul, no Brasil, na região do cinturão do milho nos USA, Argentina, Índia e China); até \$1.500 por hectare para o algodão; até \$2.000 por alqueire para maçã e \$1.500 para pêra (principalmente nos USA e Rio Grande do Sul, no Brasil); até \$600 por alqueire para amêndoas (principalmente na Califórnia, nos USA); até \$550 por alqueire

para o cacau (inclusive na Bahia, no Brasil) e até \$2.000 por alqueire para o café, principalmente em Minas Gerais, no Brasil (Lautenbach et al., 2012).

As abelhas, especialmente as abelhas nativas, são extremamente importantes na polinização de morangos, contribuindo com 1.12 bilhões de dólares americanos dos 2.90 bilhões de todo o comércio de morangos na Europa em 2009 (Klatt et al., 2014). Klatt e colaboradores (2014) observaram também que as abelhas nativas foram os principais polinizadores de nove espécies de morangos estudadas. Os frutos oriundos de flores polinizadas pelas abelhas tiveram sua qualidade melhorada (diminuição das más formações, maior intensidade de cor, diminuição dos efeitos da senescência apresentando menor quantidade da razão açúcar/ácido); aumento do peso em mais de 30%; aumentado a firmeza e, conseqüentemente, o tempo de vida nas prateleiras em até 12 horas, diminuindo em mais de 11% as perdas durante a estocagem.

Outros polinizadores que não sejam da espécie *Apis sp.* têm surgido como alternativa para polinização desde a crescente queda nas colônias de *Apis mellifera* registrada em todo o mundo (*colony collapse disorder* - CCD) no início do século XXI. Entretanto, esses polinizadores alternativos são mais caros e requerem maiores cuidados, sendo que a substituição para outro tipo de polinizador, em certas culturas, pode requerer longos períodos para atingir população suficiente para adequada polinização. Além disso a população de diferentes parasitas e patógenos pode aumentar com a expansão desses novos polinizadores; já outros polinizadores outros requerem condições climático-ambientais específicas e se tornam demasiadamente caros para serem expandidos para outras áreas no planeta (Calderone, 2012).

Contudo, estudos têm mostrado que as abelhas sem ferrão podem ser utilizadas como alternativa à *honeybees* na polinização de algumas frutas e vegetais sendo considerados eficientes polinizadores para vegetais como: *camu-camu* (*Myrciaria dubia*), chuchu (*Sechium edule*), urucum (*Bixa orellana*), coco (*Cocos nucifera*), carambola (*Averrhoa carambola*), macadamia (*Macadamia intergrifolia*), manga (*Mangifera indica*), *mapati* (*Poumora cecropiaefolia*), cupuaçu (*Theodroma grandiflorum*), café (*Coffea arabica* e *C. canephora*),

abacate (*Persea americana*), tomate (*Lycopersicon esculentum*), pepino (*Cucumis sativus*) e rambutan (*Nephelium lappaceum*); sendo que a maioria deles faz parte da dieta dos brasileiros (Slaa et al., 2006).

Neste cenário, os meliponíneos também tem ganhado importância na polinização de culturas de consumo humano direto. Alguns exemplos como café, algumas frutas, grãos e castanhas podem ter sua produção diminuída em mais de 90% sem esses polinizadores (Roubik, 2002; Southwick e Southwick Jr, 1992). As abelhas nativas possuem o mesmo desempenho na polinização do que as abelhas domesticadas. A comunidade de abelhas nativas (incluindo as abelhas sem ferrão) podem promover a polinização tão bem quanto as comunidades de abelhas domesticadas ou espécies individuais, inclusive para culturas que exigem altas taxas de polinização, como por exemplo o cultivo de melancia (Hein, 2009).

Estudos avaliando a importância da polinização por abelhas encontraram que a interação entre abelhas nativas e *Apis mellifera* pode aumentar em 5 vezes a taxa de polinização de girassóis híbridos (Greenleaf e Kremen, 2006), e que as abelhas nativas são igualmente importantes no processo de polinização de canola – *Brassica napus* e *Brassica rapa* (Morandin e Winston, 2005). Entretanto, a redução da diversidade e abundância das abelhas nativas têm exigido cada vez mais o uso de abelhas domesticadas para restaurar o “serviço” de polinização (Kremen et al., 2002).

Existem indicações claras de perda de polinizadores nativos e domesticados, acarretando acentuados e negativos impactos ecológicos e econômicos, tais como perda da diversidade ecológica, desestabilidade no ecossistema, diminuição da produção de alimentos e perda na qualidade de vida humana.

Segundo Klein e colaboradores (2007), embora os polinizadores silvestres possam aumentar a produção de algumas culturas, suas populações encontram-se esparsas e não conseguem polinizar áreas de intenso cultivo. Assim é de extrema importância o conhecimento da biologia desses polinizadores, particularmente as abelhas, e seu manejo adequado para conseguirmos atender

as crescentes necessidades humanas por alimentos e, principalmente, conservar a biodiversidade global.

## **1.2 Determinação do sexo nas abelhas (Hymenoptera: Apidae: Meliponini)**

Embora todos os membros do grupo Hymenoptera sejam haplodiplobiontes para determinação do sexo (machos haplóides e fêmeas diplóides), vários mecanismos tem sido propostos para explicar como ocorre a determinação do sexo nesse grupo (Kerr, 1997).

O modo de reprodução mais comum é a partenogênese arrenótoca, em que machos desenvolvem a partir de ovos não fertilizados e fêmeas por ovos fertilizados. Neste grupo as fêmeas tem controle sobre a fertilização dos ovos, pois ela libera o esperma durante a ovoposição e pode ajudar a manter a razão entre machos e fêmeas na colônia (Van Wilgenburg et al., 2006).

Outro modo de reprodução não tão comum é o telítoca em que as fêmeas diplóides se desenvolvem por partenogênese a partir de ovos não fertilizados e não existem machos nesse grupo (Van Wilgenburg et al., 2006).

Os Himenópteros possuem dois sistemas de determinação do sexo:

- Por balanço gênico, em populações endogâmicas, na qual os indivíduos machos são haplóides para os alelos sexuais ( $XO$ ) e fêmeas diplóides ( $XO/XO$ ); não havendo mutações nos alelos  $XO$ , a ocorrência de machos diplóides nessas populações não é observada. Assim genes envolvidos na determinação de características masculinas possuem efeito não aditivo ou pouco aditivo, enquanto genes envolvidos na determinação de características femininas são aditivos (Goldschmidt, 1958; Chaud-Neto, 1975; Kerr et al., 1988; Kerr, 1997).
- Por multiplicidade de alelos, em populações panmíticas, na qual os machos são hemizigotos ( $XO^1$ ) e as fêmeas heterozigotas ( $XO^1/XO^2$ ) para os alelos sexuais, em que os alelos  $XO$  sofreram, ao longo do tempo, sendo possível encontramos vários alelos

sexuais, como ocorre nas espécies de abelhas. Entretanto, nessas populações foram observados também indivíduos machos diplóides  $XO^1/XO^1$  (homozigotos); conforme as observações de Whiting (1945) estudando machos diplóides em *Habrobracon juglandis* (*Bracon hebetor*), Mackensen (1951) em *Apis mellifera*, Woyke (1963, 1979, 1986) em *Apis mellifera* e *Apis cerana* e outros pesquisadores.

Beye e colaboradores (2003), pela técnica de RNA de interferência (RNAi), identificaram o gene *complementary sex determiner* (*csd*) em *Apis mellifera*, descrevendo o mesmo comportamento atribuído ao gene *XO*, em na condição de hemizigose ou homozigose as larvas se desenvolvem em machos e e na condição de heterozigose em fêmeas. A partir de cruzamento de uma fêmea heterozigota e um macho haploide (portador do mesmo alelo sexual que a rainha) foi evidenciado a presença de machos haplóides a partir de ovos não fertilizados e machos diplóides a partir de ovos fertilizados, sendo que as larvas de machos diplóides são comidas pelas fêmeas. Foi demonstrado também que quando o gene *csd* foi inativado nas larvas geneticamente fêmeas, elas desenvolveram gônadas masculinas.

Em estudos posteriores foi identificado outro gene, o *feminizer* (*fem*), a partir do qual ocorreu a duplicação do gene *csd*. O produto do gene *csd* (em heterozigose) atua regulando um *splice* alternativo no gene *fem* resultando no desenvolvimento de fêmeas. Analisando a cabeça de fêmeas em que o gene *fem* foi silenciado, observou-se o desenvolvimento fenotípico de macho. Assim, é proposto que enquanto o gene *csd*, em heterozigose atua ativando a via “feminizante”, o gene *fem* mantém a continuidade dessa via durante todo o desenvolvimento da abelha até ser tornar uma fêmea adulta, ou seja garante o desenvolvimento das características femininas (Hasselmann et al., 2008; Gempe et al., 2009).

A determinação do sexo nas abelhas do gênero *Melipona* ocorre durante as primeiras 3 à 8 horas embrionárias, de acordo com a composição dos alelos



XO (Kerr, 1975). Existem no mínimo 15 alelos diferentes do gene *csd* em *Apis mellifera* (Hasselmann e Beye, 2004). Para os alelos XO (atualmente conhecidos como alelos do gene *csd*) já foram catalogados até 86 diferentes em *Solenopsis invicta* (Cook e Crozier, 1995), 46 em *Bombus terrestris* (Duchateau et al., 1994), 20 em *Melipona compressipes fasciculata* (Kerr, 1987d) e 21 em *Melipona scutellaris* (Carvalho, 2001), sendo que o número de alelos sexuais pode variar de acordo com o manejo da população.

Assim, como em *Apis mellifera*, em meliponíneos são necessários no mínimo 6 alelos sexuais diferentes para manutenção de uma população. Para que esses 6 alelos XO diferentes sejam mantidos foi constatado que, a população deve conter no mínimo 44 colônias em sua área de reprodução (Kerr e Vencovsky, 1982; Woyke, 1980); se a população for menor que 44 colônias, ela será eliminada em cerca de 15 gerações Yokoyama e Nei (1979).

### **1.3 Diferenciação de castas em abelhas (Hymenoptera: Apidae: Meliponini)**

A casta nos insetos é caracterizada pela morfologia, fisiologia e comportamento entre fêmeas (Michener, 1974).

Em abelhas, duas castas são propostas: as rainhas, as quais são fêmeas férteis, responsáveis apenas pela postura da maioria dos ovos e as operárias, que são fêmeas estéreis ou semi-estéreis, responsáveis pela alimentação da cria e da rainha, coleta de alimento, limpeza, construção de alvéolos e do ninho em geral, defesa e, ocasionalmente, pela postura de ovos que originarão machos haplóides ou alimentarão a rainha. Os machos de meliponíneos permanecem na colméia durante o primeiro terço das suas vidas (entre 9 e 11 dias em *Melipona scutellaris*) e já foram vistos realizando trabalhos como: aquecimento da cria, produção e manipulação de cera, desidratação e coleta de néctar e pólen nas flores. Após o primeiro terço de vida eles são expulsos da colméia (Abreu e Penna, 1992; Kerr et al., 1996).

As abelhas eusociais apresentam dois mecanismos de diferenciação de casta, explicada por duas teorias (Kerr, 1948):

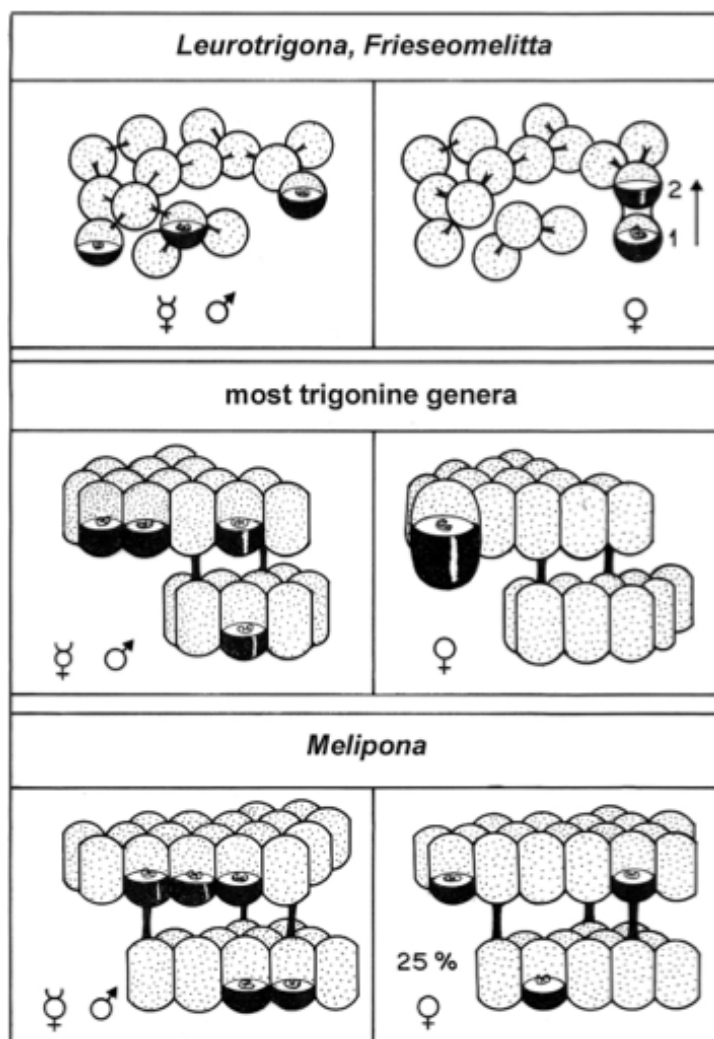
1) Blastogênica, a qual pressupõe a diferenciação de castas de acordo com os traços genéticos da fêmea.

2) Trofogênica ou somatogênica, em que diferenciação é alimentar, como no caso das espécies de meliponíneos (exceto o gênero *Melipona*) e *Apis*, e nas mamangavas.

Em abelhas do gênero *Apis* a diferenciação de castas é determinada troficamente pela geléia real (as rainhas emergem de células de cria maiores - realeiras - conteúdo geléia real), em que o histórico nutricional desencadeia sinais endócrinos que modulam os títulos, casta-específico, dos hormônios juvenil e ecdiesteróides (Hartfelder et al., 2006).

Nos meliponíneos, em *Trigona* e *Scaptotrigona* as rainhas também emergem das realeiras onde há uma maior quantidade de alimento (Perez, 1985; Von Ihering, 1903). Em outras espécies dos gêneros *Frieseomellita* e *Leurotrigona*, e as células de cria são do mesmo tamanho e não há influência da qualidade do alimento na produção de rainhas. Contudo, as células de cria possuem uma disposição em forma de cachos permitindo que uma larva, em estágio avançado de desenvolvimento, tenha acesso ao alimento presente na célula superior e possa obter o dobro de alimento, desenvolvendo-se, assim, em rainha (Hartfelder, 2006; Terada, 1974) (Figura 1).

No gênero *Melipona*, as células de cria de rainha e operária são indistinguíveis e recebem quantidades similares de alimento, excluindo-se a possibilidade da larva de rainha obter fonte extra de alimento (Sakagami, 1982).



**Figura 1:** Esquema dos diferentes mecanismos de diferenciação de casta em meliponíneos. As rainhas (caixas da direita), obtém maior quantidade de alimento pela obtenção de alimento extra da célula de cria adjacente (*Leurotrigona* e *Frieseomelitta*); emergem de células de crias maiores (gênero *Trigona*), onde que há maior quantidade de alimento; enquanto que em *Melipona* as rainhas emergem células de mesmo tamanho que as de operárias e machos. As caixas da esquerda representam as células de cria de onde irão emergir operárias e machos, os quais não obtêm fonte extra de alimento quando comparados às rainhas (Hartfelder, 2006).

Um outro mecanismo intermediário e que parece ser um elo evolutivo entre os outros dois mecanismo de produção de rainha em *Trigona* e *Melipona* é encontrado em *Nanotrigona*, *Plebeia* e *Schwarziana*. Nestes grupos rainhas podem emergir das realeiras bem como de células menores com quantidades

normais de alimento de onde, normalmente, emergem operárias. As rainhas que emergem de células de operárias são menores em comparação às rainhas normais e são chamadas de mini-rainhas; várias teorias tem sido propostas para explicar esse comportamento dentro deste grupo (Camargo, 1974; Imperatriz-Fonseca e Kleinert-Giovanni, 1989).

Embora menores, as mini-rainhas são reprodutivamente viáveis e conseguem comandar a colônia, sem perda de funcionalidade, desempenhando o mesmo papel que a rainha normal dentro da colônia (Ribeiro et al., 2006). Assim como em *Melipona*, a aplicação tópica de hormônio juvenil (HJ) em larvas de operárias *Schwarziana* resulta no desenvolvimento em rainhas. Além disso, foi encontrado que na espécie *Schwarziana quadripunctata quadripunctata* (Lepelletier) a produção de machos é realizada preferencialmente pela rainha do que pela operaria (Campos e Costa, 1989; Toth et al., 2003; Velthuis e Sommeijer, 1991).

### **1.3.1 Diferenciação de Castas em *Melipona***

Uma consequência do sistema de determinação do sexo em abelhas é a evolução para dois tipos de diferenciação de castas. Em um deles em que a especialização de operárias e rainhas não afetou suas características morfológicas enquanto fêmeas, onde as operárias são similares às rainhas e ambas diferentes dos machos, como acontece em *Apis*; no outro as operárias são similares aos machos e ambos diferentes das rainhas, em virtude da ação do hormônio juvenil sobre os genes feminizantes nos diferentes estágios de desenvolvimento, como ocorre em *Melipona* e em algumas espécies de *Bombus* (Kerr et al., 1978; Kerr, 1987a,b,c; Kerr e Cunha, 1990).

Nas espécies do gênero *Melipona*, a diferenciação é blastogênica associada à alimentação. A abelha sem ferrão, *Melipona scutellaris*, a qual é o objeto deste estudo, apresenta, portanto, um mecanismo de diferenciação de castas particular (genético-alimentar) que difere dos outros meliponíneos (Kerr,

1950); tornando esta espécie um intrigante material biológico para estudos genéticos.

Em *Melipona* não há diferença entre as células de crias (alvéolos) de onde rainhas e operárias emergem e as larvas que se desenvolverão em rainha são alimentadas com o mesmo alimento que as operárias e em quantidades similares. Além disso, as operárias operculam as células de cria logo após a oviposição pela rainha, eliminando-se qualquer possibilidade de uma alimentação diferenciada (Kerr et al., 1996).

Após determinado o sexo (formação de ovário ou testículo) nas primeiras horas embrionárias, a larva se desenvolve até o final do estágio larval L3 (L3-3) e início de LPD (larva pré-defecante) onde ocorrerá a diferenciação de casta em rainha ou operária sob influência do hormônio juvenil (HJ) produzido pelas glândulas *corpora allata*. O HJ é considerado o composto que ativa os genes feminizantes responsáveis pelo desenvolvimento de características secundárias (Bonetti, 1982; Campos, 1974; Kerr, 1975).

Em 1950, Kerr propôs um modelo para explicar, em *Melipona*, a segregação de 75 operárias para 25 rainhas em cada 100 nascimentos. Dois genes principais  $X^a$  e  $X^b$ , com dois alelos cada um, seriam os responsáveis por estimular desenvolvimento das características femininas secundárias (produtos feminizantes), de modo que larvas duplo heterozigotas, quando bem alimentadas, desenvolvem-se em rainhas e larvas mal alimentadas ou homozigotas para esses genes, tornam-se operárias, em consequência de baixa produção de Hormônio Juvenil (HJ).

Entretanto, as *corpora allata* somente terão bom desenvolvimento e produzirão HJ em níveis adequados se as larvas forem alimentadas suficientemente (Kerr et al., 1996). A quantidade mínima de alimento para uma larva se desenvolver em rainha já foi determinado para várias espécies de meliponíneos (*Melipona quadrifasciata* - 155 mg, *Melipona rufiventris* - 137 mg, *Melipona marginata* - 40,5 mg, e *Melipona scutellaris* - 222 mg) (Camargo et al., 1976).

A aplicação tópica de HJ em larvas de *Melipona* que estão em estágio de tecelagem de casulo (larvas pré-defecantes) e mesmo no estágio de L3 tardio (L3-3), confirma a influência desse hormônio na produção de rainhas a partir de “larvas de operárias”. A morfologia externa de ovários de rainha de *Melipona quadrifasciata* induzida por tratamento com HJ é idêntica à de rainha natural (Bonetti, 1984). Glândulas terçais de rainhas induzidas por tratamento com HJ mostram, também, padrão de distribuição idêntico ao de rainha natural (Bonetti, 1982; 1983, 1984; Bonetti e Kerr, 1987; Bonetti et al., 1994; Bonetti et al., 1995).

Os efeitos dos Hormônios Juvenil I, II e III foram estudados por Bonetti e colaboradores (1995) em que foi determinada a dosagem mínima suficiente para a produção de rainhas a partir de larvas de operárias de *Melipona quadrifasciata*, *Melipona rufiventris*, *Melipona compressipes* e *Melipona scutellaris*. O HJ I demonstrou ser o mais eficiente na produção de rainhas em *Melipona*, seguido pelo HJ III.

Outro composto que pode agir na diferenciação de casta juntamente como o HJ é o geraniol. Jarau e colaboradores (2010) demonstraram que a adição de 10 µg geraniol ao alimento larval nas células de cria de *Melipona beecheii* aumentou a produção de rainhas atingindo a proporção máxima de 25%, sendo esta a primeira evidência de um composto químico exógeno regulando a diferenciação de castas em abelhas sem ferrão. O fato de até 25% das larvas fêmeas se desenvolverem em rainhas pode ser explicado pela hipótese genético – alimentar proposta por Kerr.

Entretanto, estudos avaliando a ação do geraniol no processo de diferenciação da casta em *Melipona* são necessários. O geraniol pode representar um precursor importante de algum composto terpenóide ou éster geranil, atuando como o HJ, e agindo diretamente na regulação gênica por desencadear a expressão de novos genes e repressão de outros durante o desenvolvimento larval, propiciando a diferenciação de castas.

Com base nestas informações, torna-se necessário conhecimento dos fatores moleculares, genéticos e biológicos envolvidos no desenvolvimento do fenótipo de fêmeas (rainhas e operárias) de maneira a se aperfeiçoar o manejo

para manutenção dos meliponíneos que se tornaram, ao longo da evolução, os principais polinizadores da flora brasileira. Considerando-se que essas abelhas estão intrinsecamente ligadas à polinização de espécies vegetais que sustentam a diversidade da flora brasileira, torna-se importante conhecer sua biologia e os mecanismos genéticos envolvidos no seu desenvolvimento para contribuir com a sua preservação e conseqüentemente com a preservação da biodiversidade.

Tendo em vista que o estágio LPD do desenvolvimento de *Melipona* é sensível ao HJ, estimulando o desenvolvimento do fenótipo de rainha em todas as larvas fêmeas tratadas, e com a possibilidade de atuação de um composto exógeno, como o geraniol, no processo de diferenciação da casta nesse gênero, torna-se intrigante conhecermos como o mecanismo de recebimento e processamento desses compostos nas larvas desse estágio de desenvolvimento. Mediante os dados científicos já apresentados na literatura em relação à composição do alimento larval de *M. scutellaris*, podem indicar que esse composto se apresente na forma volátil. Assim, o conhecimento de estruturas receptoras para estes compostos na superfície corporal da larva, tais como estruturas sensoriais (receptores olfativos), pode representar o primeiro passo a ser investigado na identificação do composto ou dos compostos responsável(eis) pela ativação dos genes  $X^a$  e  $X^b$ .

#### **1.4 Receptores Olfativos**

Nos insetos, a antena é o principal órgão sensorial e abriga grande diversidade de sensilas. As antenas podem ser longas, finas, multissegmentadas (escapo, pedicelo, flagelômeros), não-ramificadas e podem assumir diferentes formas e tamanhos, dentro da classe Insecta. As antenas representam órgão primordial para a sobrevivência dos insetos e é um importante órgão na comunicação química como: encontrar fonte de alimento, machos encontrarem as fêmeas e estas atraírem os machos durante a cópula, para reconhecer predadores e, no caso dos insetos sociais, para organização geral da colônia

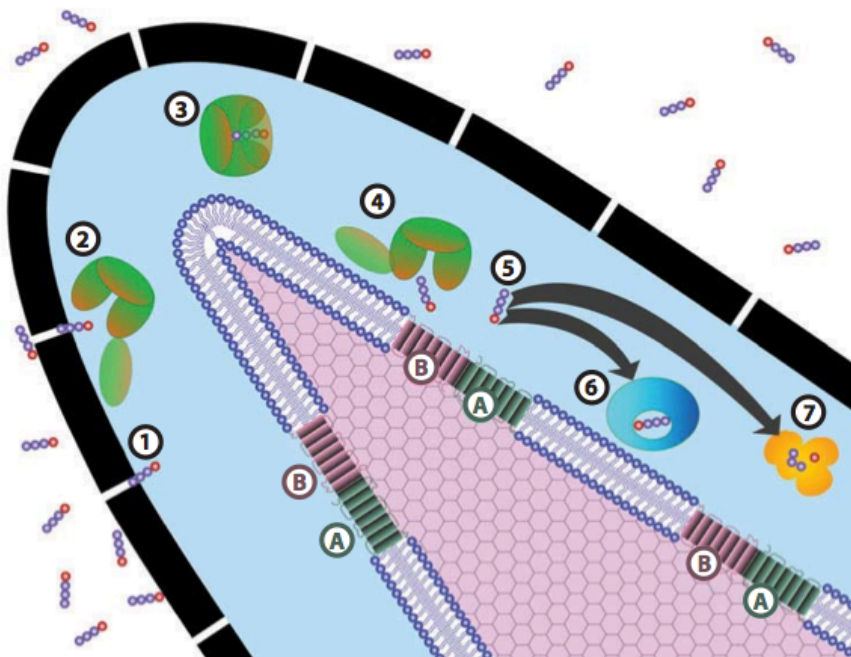
(Gallo et al., 2002; Hansson e Stensmyr, 2011; Trhlin e Rajchard, 2011; Wanner et al., 2007)

As sensilas são, primariamente, pêlos inervados pelos neurônios sensoriais e são consideradas receptores, fazendo parte do sistema olfatório periférico dos insetos. Elas possuem diferentes formas, tamanhos e diferentes funções. São classificadas em tricóide, placóide, básicaônica, celocônica, ampulácea, campiniforme, porém existem grupos que são subclassificados e desempenham funções como receptores de CO<sub>2</sub>, termorreceptores, higrorreceptores, quimiorreceptores, receptores de odor e com função tátil (Frasnelli et al., 2010; Gallo et al., 2002; Nakanishi et al., 2009).

A maior parte das proteínas do sistema olfatório periférico dos insetos, que estão envolvidas na recepção de odores é constituída por *odorant-binding proteins* (OBPs), *odorant-degradin enzymes* (ODEs), *odorant-receptors* (ORs), *ionotropic receptors* (IRs), *chemosensory proteins* (CSPs) e *sensory neuron membrane proteins* (SNMPs). Moléculas como feromônios e outros semioquímicos alcançam a porta de entrada da sensila olfatória, os poros tubulares, ligando-se e sendo solubilizados pelas “*odorant-binding proteins*” (OBPs), em seguida transportados através da linfa dentro da sensila e posteriormente liberados, ativando os ORs presentes na membrana dos *sensory neuron* (SNs), (Leal, 2013; Vogt, 2005) (Figura 2).

Receptores olfativos (*Odorant Receptors* - ORs) são proteínas presentes na membrana dendrítica de neurônios receptores localizados na antena e palpos maxilares de insetos. Esses ORs são receptores, principalmente, de feromônios, podendo também reconhecer outras substâncias provenientes da pele, presentes na respiração, no néctar e substâncias presentes em locais utilizados como sítios de ovoposição, participando, assim, na função olfativa dos insetos (McIver, 1970; Vogt, 2005).





**Figura 2:** Mecanismo de ação dos OBPs e ORs na via de processamento do odor, importante passo na comunicação química dos insetos. Na via as moléculas de odor entram pelos poros da sensila (1) e são capturadas pelos OBPs (2) que as transporta através da linfa (3) até o OR específico (B), onde A representa o receptor ORCO. Em seguida, os odorantes são inativados por armadilhas (6) ou degradados pelas ODEs (7) (Leal, 2013).

Syed *et al.* (2010) encontraram, ocasionalmente, um OR endógeno em *Drosophila melanogaster* altamente sensível a feromônio sexual do bicho-da-seda, bombykol. Contudo, a importância ecológica desse achado permanece desconhecida.

Existem notáveis diferenças nas subfamílias de diversos genes OR, de acordo com a espécie (Jones *et al.*, 2005). O sequenciamento do genoma de *Apis mellifera* (*The Honeybee Genome Sequencing Consortium*, 2006) revelou 10 genes codificantes para *gustatory receptors* (GRs), 10 IRs, 21 OBPs e 170 para ORs (Robertson e Wanner, 2006). Em contrapartida apenas 62 e 79 ORs em *Drosophila melanogaster* e *Anopheles gambiae*, respectivamente, o que representa uma expansão da família de ORs nas abelhas (Hill *et al.*, 2002; Robertson *et al.*, 2003; Vosshall *et al.*, 1999).

Estudos genômicos identificaram um OR, *AmOr11*, que responde ao principal componente do feromônio de rainhas de *Apis mellifera*, 9-oxo-2-decenoic acid (ODA) (Wanner *et al.*, 2007), que, dentre outras funções, atua inibindo parcialmente o desenvolvimento ovariano de operárias.

Pelletier e colaboradores (2010) por análise protéica comparativa encontraram 158 sequências de OR em *Culex quinquefasciatus* homólogas a *Aedes aegypti* e *Anopheles gambiae*. Dentre eles, identificaram um OR (CquiOR2) em *Culex pipiens quinquefasciatus*, ortólogo ao AgamOR2 e AaegOR2, altamente sensível a indol, um atrativo para ovoposição.

O papel dos OBPs no sistema olfatório compreende funções como solubilização de ligantes, transporte de moléculas hidrofóbicas através da hemolinfa da sensila (ambiente aquoso) e contribui na sensibilidade do sistema olfatório dos insetos (Leal, 2013). Entretanto, a ampliação das funções dos OBPs tem sido investigada, uma vez que já foram descritos mais de 50 OBPs em algumas espécies de insetos (Foret e Maleszka, 2006).

Em geral OBPs possuem um padrão de seis resíduos de cisteínas bem conservados entre os diferentes grupos de insetos, apresentando três pontes dissulfeto e dois pequenos *loops* de 8 e 4 resíduos de aminoácidos, e uma sequência protéica com aproximadamente 140 aminoácidos (Pelosi *et al.*, 2006). A sequência de OBPs normalmente, é bem variável entre os clados; a exemplo, é encontrado apenas 15% de similaridade da sequência protéica de OBPs entre *Drosophila melanogaster* e Lepidópteras (Pikielny *et al.*, 1994).

Dessa forma, OBPs tem sido divididos em classes com base nas diferenças do padrão de resíduos de cisteínas; OPBs clássicos possuem um padrão de 6 resíduos de cisteínas, já os OBPs da classe “*Plus C*” podem apresentar até 12 resíduos de cisteínas, 4 a 6 resíduos extras. Outra classe de OBPs, chamada de OBPs atípicos, foi descrita em *Anopheles gambiae*. Esses OBPs são similares aos OBPs clássicos, com 6 resíduos conservados de cisteínas; entretanto eles possuem uma extensão na região C-terminal com cisteínas adicionais conservadas resultando em proteínas de peso molecular aproximado de 35 kDa, enquanto as de OBPs clássicos são de

aproximadamente 14 kDa (Pelosi et al., 2006; Xu et al., 2003). Uma quarta classe de OBPs chamada de “*Minus C*” foi descrito para *D. melanogaster*, em que eles não apresentam todas as 6 cisteínas. Geralmente, os OBPs desta classe não possuem as cisteínas C2 e C5, ou a C1, ou a C1, C2 e C5; entretanto estes OBPs que não possuem a C1 apresentam um outro resíduo de cisteína “alternativa” a 15-16 aminoácidos de distância de onde estaria a C1 original (Hekmat-Scafe et al., 2002).

Uma das hipóteses de ativação do OR, incluem a ativação pelo OBP complexado ao seu ligante. Estudos que suportam essa hipótese correlacionaram uma diminuição na resposta eletroantenográfica quando OBPs específicos foram nocauteados (Leal, 2013). OBPs podem ser específicos aos seus ligantes tanto quanto capazes de discriminar componentes específicos de uma mistura de compostos de um feromônio; a exemplo: BmorGOBP2 é capaz de diferenciar bombykol de bombykal, dois componentes diferentes do feromônio sexual do bicho da seda, *Bombix mori* (Zhou et al., 2009).

*Chemosensory proteins* (CSPs) é uma classe de proteínas que atuam nos processos olfativos e gustatórios, uma vez que foram encontrados no aparelho gustatório, tarso e antena dos insetos. Os CSPs estão presentes em diferentes grupos como Lepidóptera, Himenóptera, Blatóidea, Ortóptera e Hemíptera, compartilhando de 40 a 50% das suas sequências protéicas. As CSPs apresentam aproximadamente de 100 a 120 aminoácidos com quatro conservados resíduos de cisteínas ligadas por duas pontes dissulfeto entre os resíduos vizinhos (Angeli et al., 1999; Pelosi et al., 2006).

A quantidade de genes expressando CSPs é bem menor quando comparada a de OBPs, apresentando desde apenas um CSP em *Cactoblastis cactorum*, *Polistes dominulus* e *Vespa crabro*, 6 em *Apis mellifera*, e 10 em *Mamestra brassicae*, contudo ainda não está claro se este reduzido número de CSPs tem implicações nas suas funções biológicas (Calvello et al., 2003; Calvello et al., 2005; Jacquín-Joly et al., 2001; Kamikouchi et al., 2004; Maleszka e Stange, 1997).

Atualmente, estudos sobre a regulação da expressão gênica estão sendo conduzidos para identificar genes que são super ou sub-expressos em resposta ao HJ durante os estágios de desenvolvimento de *Melipona*, de acordo a hipótese genética de diferenciação de castas proposta por Kerr (1950). Assim, com base nos achados sobre a expressão e fisiologia dos genes *ORs* e *OBPs* em outros insetos e também em abelhas do gênero *Apis*, a proposta deste trabalho foi identificar possíveis genes receptores envolvidos com o sistema olfatório de *M. scutellaris* que possam ajudar a elucidar qual o composto responsável por ativar os genes  $X^a$  e  $X^b$  no processo de diferenciação de castas em *Melipona*.

## 1.5 Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo o estudo de possíveis genes, e seus produtos funcionais, envolvidos com a recepção de moléculas voláteis em larva de *Melipona scutellaris*, com foco em larvas do estágio LPD.

## 1.6 Objetivos Específicos

- Caracterizar, morfologicamente, a região anterior de larva LPD de *M. scutellaris*.
- Identificar e caracterizar, ultraestruturalmente, as estruturas sensoriais presentes em larvas LPD de *M. scutellaris*.
- Caracterizar, morfologicamente, as antenas de adultos de rainhas, operárias e machos de *M. scutellaris*.
- Identificar e caracterizar, ultraestruturalmente, as sensilas de machos e fêmeas *M. scutellaris*.
- Extrair o RNA total de larvas de *M. scutellaris*.
- Identificar e amplificar a região codificante (CDS) completa dos genes *MscuCSPs* e *MscuOBPs* de larvas de *M. scutellaris*.
- Clonar e sequenciar as CDS dos genes *MscuCSPs* e *MscuOBPs* de larvas de *M. scutellaris*.
- Expressar em bactéria e purificar, por HPLC, as proteínas recombinantes *MscuCSPs* e *MscuOBPs* de larvas de *M. scutellaris*.
- Extrair proteínas totais de larvas de *M. scutellaris*.

- Selecionar anticorpo monoclonal, por phage display, ligante à proteína recombinante MscuOBP8.
- Detectar a proteína MscuOBP8, por ELISA, em diferentes estágios do desenvolvimento larval de *M. scutellaris*.
- Análise de bioinformática.

## 1.7 Referências Bibliográficas

Abreu S, Penna MNP. 1992. Biologia Reprodutiva de Meliponíneos. Naturalia, Edição Especial, Encontro Brasileiro sobre Biologia de Abelhas e Outros Insetos Sociais. 255p.

Angeli S, Ceron F, Scaloni A, Monti M, Monteforti G, Minnocci A, Petacchi R, Pelosi P. 1999. Purification, structural characterization, cloning and immunocytochemical localization of chemoreception proteins from *Schistocerca gregaria*. Eur. J. Biochem., 262:745-754.

Beye M, Hasselmann M, Fondrk MK, Page RE, Omholt SW. 2003. The gene *csd* is the primary signal for sexual development in the honeybee and encodes an SR-type protein. Cell, 114:419-429.

Bonetti AM. 1982. Ação do Hormônio Juvenil sobre a expressão gênica em *Melipona* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). Dissertação de Mestrado. FMRP-USP, Ribeirão Preto, São Paulo.

Bonetti AM. 1983. Action of juvenile hormone on gene expression. In *Melipona* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). Rev. Brasil. Genet., 6:583-585.

Bonetti AM. 1984. Efeitos do Hormônio Juvenil no desenvolvimento ovariano de *Melipona quadrifasciata*. Rev. Brasil. Bio., 44:509-516.

Bonetti AM e Kerr WE. 1987. Sex determination in bees. XXIII. Brood of a laying queen treated with juvenile hormone III. Rev. Brasil. Genet., 10:593-597.

Bonetti AM, Landim CC, Kerr WE. 1994. Sex determination in bees. XXX. Effects of Juvenile Hormone in development of tergal glands in *Melipona*. Journal of Apicultural Research 33:11-14.

Bonetti AM, Kerr WE, Matusita SH. 1995. Effects of Juvenile Hormones I, II and III, in single and fractionated dosagem in *Melipona* bees. Rev Bras Biol 55:113-120.

Calderone NW. 2012. Insect pollinated crops, insect pollinators and US agriculture: Trend analysis of aggregate data for the period 1992-2009. PLoS ONE, 5:e37235.

Calvello M, Guerra N, Brandazza A, D'Ambrosio C, Scaloni A, Dani FR, Turillazzi S, Pelosi P. 2003. Soluble proteins of chemical communication in the social wasp *Polistes dominulus*. Cell. Mol. Life Sci., 60:1933-1943.

Calvello M, Brandazza A, Navarrini A, Dani FR, Turillazzi S, Felicioli A, Pelosi P. 2005. Expression of odorant-binding proteins and chemosensory proteins in some Hymenoptera. Insect Biochem. Mol. Biol., 35:297-307.

Camargo CA, Almeida MG, Nates-Parra MG, KERR WE. 1976. Genetics of sex determination in bees. IX. Frequencies of queens and workers from larvae under controlled conditions (Hymenoptera, Apoidea). J. Kansas Ent. Soc., 49:120-125.

Camargo JMF. 1974. Notas sobre a morfologia e biologia de *Plebeia* (*Schwarziana*) *quadripunctata quadripunctata* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). Stud. Entomol., 17:433–470.

Camargo JMF, Pedro SRM. 2013. Meliponini Lepeletier, 1836. In Moure JS, Urban D, Melo GAR, Eds. Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region. Sociedade Brasileira de Entomologia; Curitiba, Brasil. Online version, available at <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Acesso em 04/08/2014.



Campos LAO. 1974. 44p. Dissertação de Mestrado. Determinação de Casta no gênero *Melipona* (Hymenoptera, Apidae): Papel do hormônio juvenil. Universidade de São Paulo. São Paulo – SP, 1974.

Campos LAO, Costa MA. 1989. Determinação de sexo em abelhas. XXVII. Determinação das castas em *Schwarziana quadripunctata* (Hymenoptera, Apidae), Rev. Bras. Biol., 49:121–123.

Carvalho GA. 2001. The number of sex alleles (CSD) in a bee population and its practical importance (Hymenoptera: Apidae). J Hym Res, 10:10-15.

Chaud-Neto J. 1975. Sex determination in bees II. Additivity of maleness genes in *Apis mellifera*. Genetics, 79:213-217.

Cook JM, Crozier RH. 1995. Sex determination and population biology in the Hymenoptera. Tree, 7:281-286.

Duchateau MJ, Hoshiba H, Velthuis HHW. 1994. Diploid males in bumble bee *Bombus terrestris*. Entomol. Exp. Appl., 71:263-269.

Foret S, Maleszka R. 2006. Function and evolution of a gene family encoding odorant binding-like proteins in a social insect, the honey bee (*Apis mellifera*). Genome Res, 16:1404-13.

Frasnelli E, Anfora G, Trona F, Tessarolo F, Vallortigara G. 2010. Morpho-functional asymmetry of the olfactory receptors of the honeybee (*Apis mellifera*). Behav Brain Res, 209:221-225.

Gallo D, Nakano O, Silveira Neto S, Carvalho RPL, Batista GC, Berti Filho E, Parra JRP, Zucchi RA, Alves SB, Vendramim JD. 2002. Entomologia Agrícola. FEALQ, Piracicaba.

Gempe T, Hasselmann M, Schiott M, Hause G, Otte M, Beye M. 2009. Sex determination in honeybees: two separate mechanisms induce and maintain the female pathway. *Plos Biol.*, 10:e1000222.

Goldschmidt RB. 1958. *Theoretical Genetics*. X. University of California Press, Berkeley, USA, pp. 56.

Greenleaf SS, Kremen C. 2006. Wild bees enhance honey bees' pollination of hybrid sunflower. *PNAS*, 103:13890-95.

Hansson BS, Stensmyr MC. (2011) Evolution of insect olfaction. *Neuron* 72: 698-711.

Hartfelder K, Makert GR, Judice CC, Pereira GAG, Santana WC, Dallacqua R, Bitondi MMG. 2006. Physiological and genetic mechanisms underlying caste development, reproduction and division of labor in stingless bees. *Apidologie* 37:144-163.

Hasselmann M, Beye M. 2004. Signatures of selection among sex-determining alleles of the honey bee. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 101:4888-4893.

Hasselmann M, Gempe T, Schiott M, Nunes-Silva CG, Otte M, Beye M. 2008. Evidence for the evolutionary nascence of a novel sex determination pathway in honeybees. *Nature*, 454:519-522.

Hein L. 2009. The economic value of the pollination service, a review across scales. *The Open Ecology Journal*, 2:74-82.

Hekmat-Scafe DS, Scafe CR, McKinney AJ, Tanouye MA. 2002. Genome-wide analysis of the odorant binding protein gene family in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res.*, 12:1357-1369.

Hill CA, Fox AN, Pitts RJ, Kent LB, Tan PL, Chrystal MA, Cravchik A, Collins FH, Robertson HM, Zwiebel LJ. 2002. G Protein–Coupled Receptors in *Anopheles gambiae*. *Science*, 298:176-178.

Imperatriz-Fonseca VL, Kleinert-Giovannini A. 1989. Atividades de rainhas virgens em *Plebeia (Schwarziana) quadripunctata* (Apidae, Meliponinae). In: Resumo I Simpósio Latino- Americano sobre Insetos Sociais Neotropicais, Rio Claro, São Paulo –SP, 11pp.

Jacquin-Joly E, Vogt RG, Francois MC, Nagnan-LeMeillour P. 2001. Functional and expression pattern analysis of chemosensory proteins expressed in antennae and pheromonal gland of *Mamestra brassicae*. *Chem. Senses*, 26:833-844.

Jarau S, Van Veen JW, Twele R, et al. 2010. Workers Make the Queens in *Melipona* Bees: Identification of Geraniol as a Caste Determining Compound from Labial Glands of Nurse Bees. *J Chem Ecol* 36:565-569.

Jones WD, Nguyen TA, Kloss B, et al. 2005. Functional conservation of an insect odorant receptor gene across 250 million years of evolution. *Curr Biol*, 15:R119-21.

Kamikouchi A, Morioka M, Kubo T. 2004. Identification of honeybee antennal proteins/genes expressed in a sex and/or caste selective manner. *Zoolog. Sci.*, 21:53-62.

Kerr WE. 1948. Estudos sobre o gênero *Melipona*. *Anais ESALQ-USP*, 5:181-276.

Kerr WE. 1950. Genetic determination of castes in the genus *Melipona*. *Genetics*, 35:143-152.

Kerr WE. 1975. Genética da determinação do sexo em abelhas. X. Programação de atividade dos genes determinadores de sexo e casta. Anais do 3º Congresso Brasileiro de Apicultura. Piracicaba, SP. 179-187pp.

Kerr WE, Cunha R, Pisani, IF. 1978. Genética da determinação do sexo. XII. Aplicação de métodos numéricos para agrupar sexos e castas de *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. (Apidae). *Rev. Bras. Biol.*, 38:319-324.

Kerr WE, Vencovsky R. 1982. Melhoramento genético em abelhas. I. Efeito do número de colônias sobre o melhoramento. *Braz J Genetics*, 5:279-285.

Kerr WE. 1987a. Biologia, manejo e genética de *Melipona compressipes fasciculata* Smith (Hymenoptera: Apidae). 1987a. 141 pp. Tese de Professor Titular. Universidade Federal do Maranhão. São Luis - MA, 1987.

Kerr WE. 1987b. Sex determination in bees. XVII. Systems of caste determination in the Apinae, Meliponinae and Bombinae and their phylogenetical implications. *Braz. J. Genet.*, 10:685-694.

Kerr WE. 1987c. Sex determination in bees. XXIV. Critical appraisal of sex determination in bees (in Japanese). *Honeybee Sci.*, 8:176-182.

Kerr WE. 1987d. Sex determination in bees. XXI. Number of xo-heteroalleles in a natural population of *Melipona compressipes fasciculata* (Apidae). *Insectes Soc.*, 34: 274- 279.

Kerr WE, Monteiro SG, Kerr HAS. 1988. Sex determination in bees. XXV. Adaptive value of the xo gene in its origin. *Braz. J. Genet.* 11: 469-473.

Kerr WE, Cunha R. 1990. Sex determination in bees. XXVI. Masculinism of workers in the Apidae. *Braz. J. Genet.*, 13:479-489.

Kerr WE, Carvalho GA, Nascimento VA. 1996. Abelha urucu: biologia, manejo e conservação. Belo Horizonte: Acangaú 144.

Kerr WE. 1997. Sex determination in honey bees (Apinae and Meliponinae) and its consequence. *Braz. J. Genet.*, 20:601-611.

Klatt BK, Holzschuh A, Westphal C, Clough Y, Smit I, Pawelzik E, Tscharnkte T. 2014. Bee pollination improves crop quality, shelf life and commercial value. *Proc. Biol. Sci.*, 281:20132440.

Klein AM, Vaissiere BE, Cane JH, et al. 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc. R. Soc. B*, 274:303–313.

Kremen C, Williams NM, Thorp RW. 2002. Crop pollination from native bees at risk from agricultural intensification. *PNAS*, 99:16812–16.

Lautenbach S, Seppelt R, Liebscher J, Dormann CF. 2012. Spatial and temporal trends of global pollination benefit. *Plos One*, 7:e35954.

Leal WS. 2013. Odorant Reception in insects: roles of receptors, binding proteins, and degrading enzymes. *Annu Rev Entomol.* 58:373-391.

Mackensen, O. (1951). Viability and sex determination in the honey bee (*Apis mellifera*). *Genetics*, 36: 500-509

Maleszka R, Stange G. 1997. Molecular cloning, by a novel approach, of a cDNA encoding a putative olfactoryprotein in the labial palps of the moth *Cactoblastis cactorum*. *Gene*, 202:39-43.

Mclver SB. 1970. Comparative study of antennal sense organs of female *Culicine mosquitoes*. *Can Entomol*, 102:1258–1267.

Michener CD. 1974. The social behaviour of the bees. A comparative study. Cambridge, Press Belknap, 404p.

Morandin LA, Winston ML. 2005. Wild bee abundance and seed production in conventional, organic, and genetically modified canola. *Ecological Applications*, 15:871-881.

Nakanishi A, Nishino H, Watanabe H, Yokohari F, Nishikawa M. 2009. Sex-specific antennal sensory system in the ant *Camponotus japonicus*: structure and distribution of sensilla on the flagellum. *Cell Tissue Res*, 338:79-97.

Pelletier J, Hughes, DT, Luetje CW, Leal WS. 2010. An Odorant Receptor from the Southern House Mosquito *Culex pipiens quinquefasciatus* Sensitive to Oviposition Attractants. *Plos One*, 5:e10090.

Pelosi P, Zhou JJ, Ban LP, Calvello M. 2006. Soluble proteins in insect chemical communication. *Cell. Mol. Life Sci.* 63:1658-1676.

Perez J. 1895. Sur le production des femelles et des mâles chez les Meliponides. *C. R. Acad. Sci. Paris.*, 120:273-275.

Pikielny CW, Hasan G, Rouyer F, Rosbach M. 1994. Members of a family of *Drosophila* putative odorant-binding proteins are expressed in different subsets of olfactory hairs. *Neuron*, 12:35-49.

Ribeiro MF, Wenseleers T, Santos-Filho PS, Alves DA. 2006. Miniature queens in stingless bees: basic facts and evolutionary hypotheses. *Apidologie*, 37:191-206.

Robertson HM, Warr CG, Carlson JR. 2003. Molecular evolution of the insect chemoreceptor gene superfamily in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl Acad. Sci.*, 100:14537-14542.

Robertson HM, Wanner KW. 2006. The chemoreceptor superfamily in the honey bee, *Apis mellifera*: expansion of the odorant, but not gustatory, receptor family. *Genome Res.*, 16:1395-1403.

Roubik DW. 2002. The value of bees to the coffee harvest. *Nature*, 417:708.

Sakagami SF. 1982. Stingless bees. In: *Social Insects* (Hermann, H.R., ed.). Academic Press, New York, 3:361-423.

Sharkey MJ. 2007. Phylogeny and classification of Hymenoptera. *Zootaxa*, 1668, 521-548.

Silveira FA, Melo GAR, Almeida EAB. 2002. Abelhas brasileiras: sistemática e identificação. Fundação Araucária, Belo Horizonte.

Slaa EJ, Sanchez Chaves LA, Malagodi-Braga KS, Hofstede FE. 2006. Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. *Apidologie*, 37:293-315.

Southwick EE, Southwick Jr L. 1992. Estimating the economic value of honey bees (Hymenoptera: Apidae) as agricultural pollinators in the United States. *J. Econ. Entomol.*, 85:621-633.

Syed Z, Koop A, Kimbrell DA, Leal WS. 2010. Bombykol receptors in the silkworm moth and the fruit fly. PNAS, 107:9436-9439.

Terada Y. 1974. 96 pp. Dissertação de Mestrado. Contribuição ao estudo da regulação social em *Leurotrigona muelleri* e *Frieseomelitta varia* (Hymenoptera, Apidae). Universidade de São Paulo, São Paulo-SP. 1974.

The Honeybee Genome Sequencing Consortium. 2006. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. Nature, 443:931-949.

Toth E, Strassmann JE, Imperatriz-Fonseca VL, Queller DC. 2003. Queens, not workers, produce the males in the stingless bee *Schwarziana quadripunctata quadripunctata*, Anim. Behav., 66:359–368.

Trhlin, M., Rajchard, J., 2011. Chemical communication in the honeybee (*Apis mellifera* L.): a review. Vet. Med 56, 265-273.

Van Wilgenburg E, Driessen G, Beukeboom LW. 2006. Single locus complementary sex determination in Hymenoptera: an "unintelligent" design?. Front. Zool., 3:1-15.

Velthuis HHW, Sommerer MJ. 1991. Roles of morphogenetic hormones in caste polymorphism in stingless bees. 346–383 pp. In Gupta AP (ed.). Morphogenetic Hormones of Arthropods, Vol. 3. Rutgers University Press, New Brunswick, NJ.

Vogt RG. 2005. Molecular basis of pheromone detection in insects. In: Gilbert LI, Iatro K, Gill S, eds. Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, Pharmacology and Molecular Biology. London: Elsevier. 753–804pp.



Von-Ihering H. 1903. Biologia das abelhas melíferas do Brasil. Tradução de Rodolpho von Ihering e Bruno Sampaio de Correia em 1930. Boletim de Agricultura, 31:534-506, 649-714.

Vosshall LB, Amrein H, Morozov PS, Rzhetsky A, Axel R. 1999. A Spatial Map of Olfactory Receptor Expression in the *Drosophila* Antenna. Cell, 96:725-736.

Wanner KW, Nichols AS, Walden KK, Brockmann A, Luetje CW, Robertson HM. 2007. A honey bee odorant receptor for the queen substance 9-oxo-2-decenoic acid. Proc Natl Acad Sci USA, 104:14383–14388.

Whiting PW. 1945. The evolution of male haploidy. Quart. Rev. Biol., 20: 231-260.

Williams IH. 1994. The dependence of crop production within the European Union on pollination by honey bees. Agricultural Zoology Reviews, 6: 229–257.

Woyke J. 1963. Drone larvae from fertilized eggs of the honeybee. J. Apic. Res., 2:73-76.

Woyke J. 1979. Sex determination in *Apis cerana indica*. J. Apic. Res., 118:122-127.

Woyke J. 1980. Effect of sex allele homo-heterozigoty on honeybee colony population and their honey production. I. Favourable development conditions and unrestricted queens. J Apic Res, 19:51-63.

Woyke J. 1986. Sex determination. In: Bee Genetics and Breeding (Rinderer, T.E., ed.). Academic Press Inc., New York, pp. 91-119.

Xu PX, Zwiebel LJ, Smith, DP. 2003. Identification of a distinct family of genes encoding atypical odorant-binding proteins in the malaria vector mosquito,

*Anopheles gambiae*. *Insect Mol Biol*. 12: 549–560.

Yokoyama S, Nei M. 1979. Population dynamics of sex determining alleles in honey bees and self-incompatibility alleles in plants. *Genetics*, 91:602-626.

Zhou JJ, Robertson G, He X, Dufour S, Hooper AM, Pickett JA, Keep NH, Field LM. 2009. Characterisation of *Bombyx mori* odorant-binding proteins reveals that a general odorant-binding protein discriminates between sex pheromone components. *J Mol Biol*, 389:529-5.

# Capítulo II

---

## NATURWISSENSCHAFTEN

### **Morfologia da cabeça de larva pré-defecante e análise morfológica das sensilas da antena de rainha, operária e macho adultos de *Melipona scutellaris* (Apidae: *Meliponini*)**

#### **Resumo**

As sensilas presentes nas antenas são as principais estruturas sensoriais dos insetos e possuem um papel fundamental na comunicação química intra e interespecífica, atuando como receptores de compostos químicos no ar, como os feromônios, levando à respostas comportamentais características de indivíduos, espécies, gêneros ou famílias. Neste estudo nós identificamos as sensilas presentes nas antenas de macho, operária e rainha adultos de *Melipona scutellaris*, e caracterizamos morfológicamente a região anterior de larva pré-defecante. As imagens da superfície dorsal das antenas foram obtidas por microscópio eletrônico de transmissão. Assim como em outros meliponíneos, esta espécie apresentou uma distribuição heterogênea de sensilas ao longo da antena. Os principais tipos de sensilas identificados nas antenas de adultos de *M. scutellaris* foram: tricóide (tipo a e tipo b), basicônica, placóide, celocônica, ampulácea e campiniforme. As sensilas tricóides e placóides foram as mais abundantes em ambos os sexos e castas, sendo que as tricóides estão presentes em todos os flagelômeros; ampulácea e celocônica foram encontradas apenas no flagelômero 10 e campiniformes e basicônicas não foram

encontradas nas antenas de machos analisadas. Em rainha e operária a maior diversidade de sensilas foi observada nos flagelômeros 7 a 9. As sensilas tricóide tipo a e placóide não apresentaram diferenças quanto ao número entre as castas e sexos. As sensilas tricóides do tipo b foram encontradas mais abundantes em fêmeas quando comparadas aos machos e as basicônicas são mais abundantes em operárias quando comparadas às rainhas. Em larvas LPD foram encontradas estruturas morfológicamente semelhantes à sensilas, com poros em sua base e sem a camada cuticular evidente, na região do clipeo, lobo antenal e mandíbula. Propomos neste trabalho, que estas estruturas possam desempenhar importante papel como receptores de compostos presentes no alimento larval, atuando como porta de entrada para estes compostos, ativando, assim, genes envolvidos na diferenciação da casta. Este estudo é pioneiro em análise comparativa das sensilas das antenas em ambos sexos e castas e o primeiro a descrever a morfologia externa de larva LDP de *M. scutellaris*.

Palavras-chave: *Melipona scutellaris*, abelhas sem ferrão, larva, microscopia eletrônica de transmissão, sensila.

## Introdução

Os insetos se destacam dentre os outros grupos de animais devido ao seu sofisticado sistema olfatório, considerado o principal elemento para sua reprodução e sobrevivência. O sistema olfatório dos insetos é arquitetado em diferentes níveis e as antenas constituem o seu principal órgão abrigando uma enorme quantidade e diferentes tipos de sensilas (Hansson e Stensmyr 2011).

As sensilas são estruturas funcionais dos receptores e são especializadas na detecção de estímulos externos. Elas têm origem na epiderme e sua composição básica é formada por: componentes cuticulares, neurônio sensorial e células da bainha e são classificadas de acordo com a morfologia e função. Morfologicamente, as sensilas podem ser classificadas como tricóide, basicônica, placóide, campiniforme, caética, celocônica ou ampulácea e, são consideradas, como mecanorreceptores, higrorreceptores, termorreceptores e quimiorreceptores (Chapman 1998; McIver 1975).

Nos insetos as sensilas variam entre as espécies em número, distribuição e tipo de acordo com a distribuição geográfica, sexo e casta (Chen et al 2003; Faucheux et al 2006). As sensilas desempenham importante papel na comunicação entre os insetos, principalmente, pela recepção de feromônios e odores na comunicação química; podendo ter significativa atuação, na organização e divisão de trabalho na colônia de abelhas sociais como a *Melipona scutellaris*.

Em termos econômicos, as abelhas sem ferrão são eficientes polinizadores de frutas e vegetais altamente importantes na alimentação brasileira, além de contribuir consideravelmente na produção de café, castanhas e alguns tipos de grãos (Nunes-Silva et al. 2013a,b, Roubik 2002; Slaa et al. 2006). As abelhas sem ferrão são responsáveis por

40 a 90% da polinização das árvores nativas do Brasil. A abelha *Melipona scutellaris* pertence à tribo Meliponini, a qual abriga mais de 300 espécies de abelhas sem ferrão. *M. scutellaris* é endêmica do nordeste brasileiro, ocorrendo nos Estados da Bahia, Alagoas, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Sergipe e Rio Grande do Norte (Camargo e Pedro 2013, Kerr et al. 1996).

A caracterização ultraestrutural do sistema olfatório dos insetos é o primeiro passo no entendimento do processamento da informação e constitui uma importante característica no entendimento do seu comportamento. Embora, a ultraestrutura do sistema olfatório de outras espécies de meliponíneos tenha sido determinada (Johnson e Howard 1987; Ravaiano et al. 2014; Stort e Barelli 1981). Este trabalho é pioneiro no estudo morfológico de larva e adultos de *M. scutellaris*, onde foi proposto avaliar a ultraestrutura morfológica da cabeça e suas estruturas sensoriais, bem como a ultraestrutura comparativa das sensilas presentes na antena de macho, operária e rainha adultos de *M. scutellaris*.

## **Material e Métodos**

### **Amostras biológicas**

Neste trabalho foram utilizados 6 indivíduos adultos (2 operárias, 2 machos e 2 rainhas) e 2 larvas no estágio LPD de *M. scutellaris* que foram coletados no Meliponário da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia – MG (S 18° 55' / W 45° 17'). A cabeça, com seus apêndices, dos indivíduos adultos foram removidas do restante do corpo e a região anterior, que corresponde à cabeça, das larvas foram individualizados com o auxílio de pinça (*forceps blunt-nosed thumb*) e bisturi cirúrgicos.

### **Análises Morfológica por Microscopia Eletrônica de Transmissão (SEM)**

As amostras descritas no item anterior foram fixadas em etanol 70% por três dias à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram desidratadas em solução seriada de etanol (75, 85, 90 e 100%) por 5 minutos, seguido por secagem em ponto crítico em *Pelco CPD 2 drier*. Após secagem, as amostras foram fixadas em *stubs* de alumínio e revestidas com pulverização catódica de ouro/paládio. As imagens foram processadas em microscópio Philips XL 30. Todo o procedimento desde a preparação da amostra à captura de imagens foi realizado no Departamento de Patologia e Laboratório de Medicina da Universidade da Califórnia, Davis (*Electron Microscopy Facility*).

As sensilas foram identificadas de acordo com critérios morfológicos descritos previamente por Frasnelli e colaboradores (2010). A região próxima ao escapo e pedicelo foi considerada como proximal e a região próxima a ponta da antena como distal.

## Quantificação do número de sensilas

Estimativa do número de sensilas foi determinado de acordo com Ravaiano e colaboradores (2014). Foram utilizadas imagens com escala definida de 100  $\mu\text{m}$  e o número de sensilas foi estimado a partir de uma área fixa de 40x80 mm utilizando o programa *CoreDraw Graphics Suite X7*. As sensilas (exceto para as sensilas campiniformes, ampuláceas e celocônicas, pois são encontradas em números muito baixos) foram quantificadas a partir de flagelômeros randomicamente escolhidos de dois indivíduos de cada sexo/casta e a média do número de cada tipo de sensila foi utilizado nas análises estatísticas. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa *GraphPad Prism 6.0*. Para avaliar as diferenças entre as médias das classes de sensilas entre rainha, operária e macho foi utilizado teste ANOVA seguido do teste Tukey (não-paramétrico) ou teste t de *Student* quando apenas duas variáveis estavam presentes. Foram consideradas significativas diferenças quando  $p < 0.05$ .



## Resultados e discussão

O sistema olfatório dos insetos constitui característica primordial de sobrevivência com funções indispensáveis. As antenas constituem o principal apêndice sensorial nos insetos e desempenham funções vitais, tais como, audição, tato, gustação e olfato; ainda podem auxiliar no equilíbrio do inseto e auxiliar o macho a segurar a fêmea durante a cópula (Gallo et al. 2002). As antenas abrigam o maior número de sensilas olfativas, estruturas que atuam como receptores para sinais químicos presentes no ar, tais como feromônios, odorantes e semioquímicos em geral (Leal 2013). Geralmente, as antenas diferem quanto ao tipo, tamanho, inserção e número de flagelômeros entre machos e fêmeas e entre os grupos de himenópteros (Frasnelli et al. 2010; Gallo et al. 2002; Nakanishi et al. 2009; Ochieng et al. 2000). As antenas entre machos e fêmeas de *M. scutellaris* são muito similares, apresentando todos os tipos de sensilas em ambos, entretanto, a antena do macho possui um flagelômero extra.

As sensilas dos insetos apresentam estruturas e funções complexas, mas uma morfologia básica simples (Keil 1997). As sensilas basicônicas e placóides são receptores químicos e consideradas de função olfatória, as sensilas tricóides estão envolvidas com o sentido tátil, as sensilas ampulácea e celocônica são consideradas higrorreceptores, as sensilas campiniformes são receptores de CO<sub>2</sub> e sensores de temperatura, enquanto os órgãos cordotonais são responsáveis pela audição (Dietz e Humphreys 1971; Gallo et al. 2002; Kuwabara e Takeda 1956).

As imagens de *SEM* indicam que as antenas de machos, operárias e rainhas de *M. scutellaris* são do tipo geniculadas apresentando 10 flagelômeros para fêmeas e 11 flagelômeros para os machos. As antenas estão conectadas a um escapo por meio do

pedicelo (Figuras 1a, 2a e 3a) e as sensilas estão distribuídas ao longo de toda a antena (Figuras 1b, 1e, 2d, 2e, 3c e 3d), padrão encontrado nas abelhas, incluindo as abelhas sem ferrão do grupo Meliponini (Frasnelli et al. 2010; Stort e Moraes-Alves 1999). Ravaiano e colaboradores (2014) identificaram 13 tipos de sensila em antena de *M. quadrifasciata*, porém as sensilas tricóides foram classificadas em seis diferentes subtipos. Neste trabalho foi possível subclassificar as sensilas tricóides em dois tipos: sensila tricóide tipo a e tricóide tipo b. Entretanto, de acordo com Missbach e colaboradores (2014), os subtipos das sensilas tricóides parecem não apresentar diferenças funcionais e ainda não está muito bem definido se as sensilas tricóides são receptores olfatórios.

Assim como ocorre em *A. mellifera* e *Scaptotrigona postica* (Stort e Barelli 1981), a maioria das sensilas presentes nas antenas de *M. scutellaris* são placóides e tricóides (Tabela 1). Sendo que, as sensilas placóides, basicônicas e, principalmente, as tricóides podem ser utilizadas na classificação de espécies e castas de abelhas, como proposto por Shang e colaboradores (2010) em estudo de diferentes espécies de abelhas do gênero *Bombus*.

Foi observado maior diversidade de sensilas nos flagelômeros distais (flagelômero 10 para os machos e 8 e 9 para fêmeas) das antenas de *M. scutellaris* (Tabela 1). Esta característica pode estar associada com a comunicação entre a rainha e as operárias dentro da colônia, especialmente durante o processo de ovoposição e provisionamento de alimento (POP). Durante o POP uma sequência de eventos ocorre dentro da colônia, resultado da comunicação entre rainha e operárias (Sakagami e Oniki 1963).

Durante o intervalo entre duas sucessivas oviposições (período de descanso da rainha) as operárias podem cortejar a rainha tocando-a com suas antenas ou, ainda,

quando a rainha está caminhando dentro do ninho e encontra uma operária em estado estático ela toca a face da operária com a antena (Sakagami e Oniki 1963). A rainha também utiliza as antenas para conferir uma nova célula de cria recém construída e também toca violentamente as operárias em volta da célula de cria com sua antena para que essas operárias iniciem a descarga do alimento larval (provisionamento) (Sakagami e Oniki 1963). Durante o provisionamento a rainha confere o alimento inserindo sua cabeça completamente dentro da célula de cria (Sakagami e Oniki 1963), este movimento pode representar um possível uso das antenas durante esta etapa de checagem.

Os eventos durante o POP estão intrinsicamente ligados à descarga de alimento larval dentro da célula de cria podendo, dessa forma, influenciar o processo de diferenciação de casta em *Melipona scutellaris* (Van Veen 2000).

Em *M. scutellaris* as sensilas ampulácea, celocônica e campiniforme aparecem nas regiões distais de cada flagelômero (Figuras 1d, 1g, 2d, 3c), em quantidades muito menores quando comparadas às tricóides e placóides e, normalmente, nos flagelômeros mais distais de macho, operária e rainha analisados. Neste estudo, as sensilas campiniformes não foram encontradas em antenas de machos de *M. scutellaris*. A função dessa classe de sensilas (receptores de CO<sub>2</sub> e sensores de temperatura) pode ser desempenhada por outras sensilas e também por poros podendo, assim, estar ausente nos machos desta espécie; entretanto, os machos de *M. quadrifasciata* apresentam essas sensilas. Já as sensilas celocônicas e ampuláceas foram encontradas, exclusivamente, nas fêmeas de *M. quadrifasciata* (Ravaiano et al. 2014), apresentando, desta forma, uma variação na distribuição desses tipos de sensilas entre as espécies de *Melipona*. Os machos de *A. mellifera* apresentam esses três tipos de sensilas em quase todos os

flagelômeros, exceto no flagelômero 1 (Nascimento et al. 2013; Ravaiano et al. 2014; Stort e Moraes-Alves 1999).

As sensilas basicônicas foram encontradas exclusivamente em fêmeas de *M. scutellaris* (Tabela 1), corroborando com a literatura (Galvani et al. 2012; Ravaiano et al. 2014) e apresentam-se distribuídas, a partir do segundo e terceiro flagelômeros nas operárias e rainhas, respectivamente (Tabela 1). As sensilas basicônicas foram encontradas mais abundantes em operárias quando comparadas as rainhas (Tabela 2), diferentemente de *M. quadrifasciata* em que esse tipo de sensila encontra-se mais abundante em rainhas (Ravaiano et al. 2014). Essas sensilas têm sido descritas como receptores de hidrocarbonos, permitindo assim o reconhecimento de outros indivíduos dentro da colméia e também o reconhecimento de fontes de alimento (Galvani et al. 2012; Nakanishi et al. 2009)

A densidade das diferentes classes de sensilas foi estimada com base no número de sensilas contadas em uma área retangular de 40x80 mm dos flagelômeros de antenas de *M. scutellaris*, exceto para as sensilas campiniformes, ampuláceas e celocônicas, que não se apresentaram em número suficiente para análise estatística.

As sensilas tricóides do tipo a apresentam-se em maior abundância ao longo de todos os flagelômeros quando comparada à outras classes de sensilas e, machos e fêmeas apresentam quantidades similares destas sensilas (Tabela 1). Contudo, no grupo de abelhas Emphorini, outro grupo de himenópteros as sensilas tricóides do tipo a apresentam-se em maior abundância em machos (Galvani et al. 2012). As sensilas tricóides do tipo b também estão distribuídas ao longo de quase todos os flagelômeros e são encontradas menos abundantes quando comparadas às tricóides do tipo a. As

tricóides do tipo b apresentam-se em maior abundância nas fêmeas quando comparado aos machos de *M. scutellaris* (Tabela 2), assim como no grupo de abelhas Emphorini em que as sensilas tricóides do tipo b foram mais abundantes em fêmeas (Galvani et al. 2012).

Diferentemente de *M. scutellaris*, em *M. quadrifasciata* as sensilas tricóides do tipo a se apresentam em menor quantidade em rainhas quando comparado aos machos e operárias e as tricóides do tipo b são encontradas em maior quantidade em operárias e em menor quantidade nos machos, sendo que as rainhas apresentam uma quantidade intermediária destas sensilas (Ravaiano et al. 2014).

As sensilas placóides apresentam-se em proporções similares entre machos e fêmeas (Figuras 1c, 2g, 2h, 3b, 3g, ) de *M. scutellaris*, visto que não houve diferença estatisticamente significativa (Tabela 2). As antenas de machos de *A. mellifera* podem apresentar quantidades superiores de mais de 7 vezes esse tipo de sensila do que fêmeas (Stort e Moraes-Alves 1999). Além disso, as sensilas placóides parecem ser importantes na recepção de odores e feromônios em *Apis* e *Bombus* (Ahmad e Ghamdi 2006; Fang et al. 2012; Spaethe et al. 2007). Embora as sensilas placóides já tenham sido descritas em maior número nos flagelômeros finais da antena de fêmeas de *M. scutellaris* (Nascimento et al. 2013), as figuras 4a-c indicam proporções similares dessas sensilas no último flagelômero de machos e de operárias. Embora os machos das abelhas do grupo Emphorini apresentem maior abundância de sensilas placóides, Galvani e colaboradores (2012) atribuem essa diferença ao fato dos machos possuírem um flagelômero extra. A imagem da região ventral do último flagelômero de rainha (Figura 4b) demonstra que, em geral, as sensilas são raras nesta região e abundantes no lado dorsal.

Este estudo apresenta também a caracterização morfológica da porção anterior (cabeça) de larva pré-defecante (LDP), um importante estágio larval no processo de diferenciação de casta em *M. scutellaris*. Foram identificadas na cabeça de larva LDP de *M. scutellaris* estruturas similares a sensilas (Figuras 5c, e, g), entretanto, com a porção extracuticular pouco desenvolvida. Rozen (2011) apresentou a morfologia do último estágio larval de uma tribo de abelhas solitárias (Emphorini) em que estruturas similares às que foram encontradas na cabeça de larva LDP de *M. scutellaris* foram identificadas como sensilas. Este trabalho é pioneiro em apresentar possíveis estruturas sensoriais e, conseqüentemente, possíveis receptores em larva LPD de abelha do gênero *Melipona*.

Em insetos holometábolos o desenvolvimento da sensila ocorre no estágio de pupa. Em *Melipona quadrifasciata anthidioides* as sensilas iniciam seu desenvolvimento na transição de pré-pupa para pupa de olho branco, estágio em que é possível identificar as células de suporte, os neurônios e o nervo antenal; no estágio de pupa de olho preto já se pode observar as sensilas com suas projeções cuticulares externas assim como se manterá no indivíduo recém emergido (adulto) (Azevedo et al. 2008). Embora a sensila madura esteja presente somente no estágio pupal, as larvas apresentam, mesmo que raro, órgãos sensoriais periféricos constituídos por neurônios bipolares (Cruz-Landim 2009).

Estas estruturas encontradas na cabeça de larva LDP de *M. scutellaris* possuem poros em sua base e são morfológicamente semelhantes às sensilas (5d, f, h). Embora ainda não apresentem os componentes cuticulares evidentes, essas estruturas podem desempenhar um papel importante na diferenciação das castas em *M. scutellaris*. Em *Melipona* o alimento larval é semelhante em quantidade e composição para larvas de rainha e operária, além disso a operculação da célula de cria ocorre rapidamente logo

após a ovoposição pela rainha (Kerr et al. 1996; Sakagami 1982), fatores que levaram Kerr (1950) a propor um mecanismo genético-alimentar para diferenciação das castas nestas abelhas.

Estas estruturas semelhantes à sensilas, atuando como receptores, poderiam detectar compostos, possivelmente voláteis, dentro da célula de cria operculada ativando genes que estimulariam os *corpora allata* a produzir hormônio juvenil (com alimento suficiente disponível no meio ambiente) em níveis adequados para produzir o fenótipo de rainha (Bonetti et al. 1995; Camargo et al. 1976; Kerr, 1974). Assim, componentes do meio ambiente, como o geraniol (Jarau et al. 2010), atuariam ativando o sistema endócrino em determinado estágio do desenvolvimento em que os títulos de hormônio juvenil e de ecdisteróides estariam atuando de forma sinérgica (Hartfelder e Rembold 1991; Hartfelder et al. 2000; Hartfelder et al. 2006; Pinto et al. 2002) desencadeando em um fenótipo de fêmea completa.

O desenvolvimento de rainha em proporções de até 25% como observado por Kerr (1950) no gênero *Melipona* deixa evidente a atuação de um componente genético na diferenciação de casta, entretanto, os componentes exatos deste mecanismo permanecem desconhecidos. Neste trabalho nós identificamos estruturas sensoriais em larva LPD, estágio do desenvolvimento anterior ao de pupa onde as sensilas, geralmente, já estão “completas” e que podem estar envolvidos com a diferenciação de castas. Além disso, apresentamos, a morfologia comparativa entre as castas e sexo em *M. scutellaris*, embora, esta espécie apresente as mesmas classes de sensilas encontradas em outras abelhas do gênero *Apis* e outras espécies de meliponíneos, sendo que maior diversidade de sensilas foi verificada nos últimos flagelômeros. Este trabalho, contribui, também, para novas

perspectivas para os estudos fisiológicos e moleculares que auxiliarão a entender melhor o processo de diferenciação de castas em *Melipona scutellaris*.

### **Agradecimentos**

Agradecemos aos órgãos de fomento, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo auxílio financeiro em forma de bolsa de estudos, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq por financiar um ano de doutorado na Universidade da Califórnia (USA) (Processo 201265/2012-5), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG pelo apoio financeiro ao projeto. Agradecemos também ao Professor Walter Leal da Universidade da Califórnia por nos receber em seu laboratório e financiar parte dos materiais e reagentes utilizados neste trabalho.



## Referências Bibliográficas

Ahmad A, Ghamdi AL (2006) Scanning electron microscopic studies on antennal sensilla organs of adult honey bee workers in genus *Apis* (Hymenoptera: Apidae). Bull Ent Soc Egypt 83:1-11.

Azevedo DO, Matiello-Guss CP, Ronnau M, Zanuncio JC, Serrão JE (2008) Post-Embryonic Development of the Antennal Sensilla in *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera: Meliponini). Microsc Res Tech 71:196-200.

Bonetti AM, Kerr WE, Matusita SH (1995). Effects of Juvenile Hormones I, II and III, in single and fractionated dosagem in *Melipona* bees. Rev Bras Biol 55:113-120.

Camargo CA, Almeida MG, Nates-Parra MG, Kerr WE (1976) Genetics of sex determination in bees. IX. Frequencies of queens and workers from larvae under controlled conditions (Hymenoptera, Apoidea). J. Kansas Ent. Soc., 49:120-125.

Chapman RF (1998) The insects: structure and function. Academic Press, Cambridge.

Camargo JMF, Pedro SRM (2013) Meliponini Lepeletier, 1836. In Moure JS, Urban D, Melo GAR, Eds. Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region. Sociedade Brasileira de Entomologia; Curitiba, Brasil. Online version, available at <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Acesso em 04/08/2014.

Chen HH, Zhao YX, Kang L (2003) Antennal sensilla of grasshoppers (Orthoptera: Acrididae) in relation to food preferences and habits. *J Biosci* 28:743-752.

Cruz-Landim C (2009) Abelhas. Morfologia e função de sistemas. Editora UNESP, São Paulo.

Dietz A, Humphreys WJ (1971) Scanning electron microscopic studies of antennal receptors of the worker honeybee, including sensilla campaniformia. *Ann Entomol Soc Amer* 64:919-925.

Fang Y, Song F, Zhang L, Aleku DW, Han B, Feng M, Li J (2012) Differential antennal proteome comparison of adult honeybee drone, worker and queen (*Apis mellifera* L.). *J Proteomics* 75:756-773.

Faucheux MJ, Kristensen NP, Yen SH (2006) The antennae of neopseustid moths: Morphology and phylogenetic implications, with special reference to the sensilla (Insecta, Lepidoptera, Neopseustidae). *Zoologischer Anzeiger - A Journal of Comparative Zoology* 245:131-142.

Frasnelli E, Anfora G, Trona F, Tessarolo F, Vallortigara G (2010) Morpho-functional asymmetry of the olfactory receptors of the honeybee (*Apis mellifera*). *Behav Brain Res* 209:221-225.

Gallo D, Nakano O, Silveira Neto S, Carvalho RPL, Batista GC, Berti Filho E, Parra JRP, Zucchi RA, Alves SB, Vendramim JD (2002) *Entomologia Agrícola*. FEALQ, Piracicaba.

Galvani GL, Gonzalez A, Roig-Alsina AH, Settembrini BP (2012) Distribution and morphometric studies of flagellar sensilla in Emphorini bees (Hymenoptera, Apoidea). *Micron* 43:673-687.

Hansson BS, Stensmyr MC (2011) Evolution of insect olfaction. *Neuron* 72: 698-711.

Hartfelder K, Rembold H (1991) Caste-specific modulation of juvenile hormone III content and ecdysteroid titer in postembryonic development of the stingless bee, *Scaptotrigona postica depilis*. *J Comp Physiol B* 160:617-620.

Hartfelder K, Cnaani J, Hefetz A (2000) Caste-specific differences in ecdysteroid titers in early larval stages of the bumblebee *Bombus terrestris*. *J Insect Physiol* 46:1433-1439.

Hartfelder K, Makert GR, Judice CC, Pereira GAG, Santana WC, Dallacqua R, Bitondi MMG (2006) Physiological and genetic mechanisms underlying caste development, reproduction and division of labor in stingless bees. *Apidologie* 37:144-163.

Jarau S, van Veen JW, Twele R, Reichle C, Gonzales EH, Aguilar I, Francke W, Ayasse M (2010) Workers make the queens in *Melipona* bees: identification of geraniol as a

caste determining compound from labial glands of nurse bees. *Journal of chemical ecology* 36: 565-569.

Johnson LK, Howard JJ (1987) Olfactory Disc Number in Bees of Different Sizes and Ways of Life (Apidae: Meliponinae). *J Kans Entomol Soc* 60:380-388.

Kerr WE (1974) Sex determination in bees. III. Caste determination and genetic control in *Melipona*. *Insects Soc* 21:357-367.

Kerr WE (1950) Genetic determination of castes in the genus *Melipona*. *Genetics* 35:143-152.

Kerr WE, Carvalho GA, Nascimento VA (1996) *Abelha Uruçu: Biologia, Manejo e Conservação*. Liber Liber, Belo Horizonte.

Keil TA (1997) Comparative morphogenesis of sensila: a review. *Int J Insect Morphol Embryol* 26:151-160.

Kuwabara M, Takeda K (1956) On the hygrosensor of the honey bee *Apis mellifera*. *Physiol Ecol* 7:1-6.

Leal WS (2013) Odorant Reception in Insects: Roles of Receptors, Binding Proteins, and Degrading Enzymes. *Annu Rev Entomol* 58:373-391.

McIver SB (1975) Structure of cuticular mechanoreceptors of arthropods. *Annu Rev Entomol* 20:381-397.

Missbach C, Dweck HK, Vogel H, Vilcinskas A, Stensmyr MC, Hansson BS, Grosse-Wilde E (2014) Evolution of insect olfactory receptors. *eLife* 3: e02115

Nakanishi A, Nishino H, Watanabe H, Yokohari F, Nishikawa M (2009) Sex-specific antennal sensory system in the ant *Camponotus japonicus*: structure and distribution of sensilla on the flagellum. *Cell Tissue Res* 338:79-97.

Nascimento MA, Salomao TMF, Martins GF (2013) Estudo Comparativo das Sensilas Antenais de Operárias de *Melipona scutellaris* Latreille (Hymenoptera: Apidae) de Diferentes Altitudes. *EntomoBrasilis* 6:64-67. doi: 10.12741/ebrasilis.v6i1.252.

Nunes-Silva P, Hrncir M, Shipp L, Kevan P, Imperatriz-Fonseca V (2013a) The behaviour of *Bombus impatiens* (Apidae, *Bombini*) on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill., Solanaceae) flowers: pollination and reward perception. *Journal of Pollination Ecology*, 11:33-40.

Nunes-Silva P, Hrncir M, Silva CI, Roldão YS, Imperatriz-Fonseca V (2013b) Stingless bees, *Melipona fasciculata*, as efficient pollinators of eggplant (*Solanum melongena*) in greenhouses. *Apidologie* 44:537-546.

Pinto LZ, Hartfelder K, Bitondi MM, Simoes ZL (2002) Ecdysteroid titers in pupae of highly social bees relate to distinct modes of caste development. *J Insect Physiol* 48:783-790.

Ravaiano SV, Ferreira RD, Campos LA, Martins GF (2014) The antennal sensilla of *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae: Meliponini): a study of different sexes and castes. *Naturwissenschaften*. doi: 10.1007/s00114-014-1184-0.

Roubik DW (2002) The value of bees to the coffee harvest. *Nature* 417:708.

Rozen JG Jr (2011) Descriptions of mature larvae of the bee tribe Emphorini and its subtribes (Hymenoptera, Apidae, Apinae). In: Engel MS (ed) *Contributions Celebrating Kumar Krishna Zookeys* 148:279-291.

Sakagami SF, Oniki Y (1963) Behavior studies of the stingless bees, with special reference to the oviposition process. I.: *Melipona compressipes manaosensis* Schwarz. *Journal of the Faculty of Science, Hokkaido Univer*, 15:300-318.

Sakagami SF (1982) Stingless bees. In: Hermann HR (ed) *Social Insects*, Academic Press, New York, pp361-423.

Shang L, Wang Y, Wang P, Wang S, Ren B (2010) Application of rough set analysis in species and caste discrimination of bumblebees (Hymenoptera: Apidae: Bombus) based on antennal sensilla. *Ann Entomol Soc Amer* 103:654-660.

Slaa EJ, Chaves LAS, Malagodi-Braga KS, Hofstede FE (2006) Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. *Apidologie* 37:293-315.

Spaethe J, Brockmann A, Halbig C, Tautz J (2007) Size determines antennal sensitivity and behavioral threshold to odors in bumblebee workers. *Naturwissenschaften* 94:733-739

Stort AC, Barelli N (1981) Antennal Sensory Structures of *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera: Apidae). *J Kans Entomol Soc* 54:751-756.

Stort AC, Moraes-Alves MMB (1999) Differences in the number of antennal sensory structures of males of three honey bee types. *Rev Bras Biol* 59:161-166.

Van Veen JW (2000) Cell provisioning and oviposition in *Melipona beecheii* (Apidae, Meliponinae), with a note on caste determination. *Apidologie* 31:411-419.