

ALIMENTAÇÃO LARVAL DE *Melipona* (Hymenoptera, Apidae): ESTUDO INDIVIDUAL DAS CÉLULAS DE CRIA

LARVAL FEEDING OF *Melipona* (Hymenoptera, Apidae): STUDY OF INDIVIDUAL BROOD CELLS

Cristiano MENEZES¹; Ana Maria BONETTI²; Isabel Marques Rodrigues AMARAL²; Warwick Estevam KERR²

1. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo; 2. Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia

RESUMO: Existem poucos estudos acerca da qualidade e da constituição do alimento larval das abelhas sem ferrão. O objetivo do presente trabalho foi acrescentar dados sobre as características do alimento larval, que embasem futuras pesquisas sobre a influência da alimentação das larvas na determinação de castas no gênero *Melipona*. Um favo recém construído foi retirado de uma colônia forte de *Melipona scutellaris* e o alimento de 25 alvéolos foram estudados em relação ao volume total de alimento, volume da camada superior e inferior, quantidade e concentração de proteínas e atividades enzimáticas. Ficou evidenciado que o número de variáveis na alimentação larval não se restringe ao volume total (CV=14,19%), mas também, à quantidade de proteínas da camada superior do alimento (CV=13,75%) e, principalmente, de pólen (CV=34,09%). O monitoramento dessas variáveis em diferentes estações do ano pode fornecer pistas sobre quais elementos da alimentação são refletidos na proporção de rainhas produzidas.

PALAVRAS CHAVE: Alimento larval. Determinação de castas. Enzimas. Pólen. Abelhas sem ferrão.

INTRODUÇÃO

Os mecanismos de determinação de casta nas abelhas eussociais dependem, direta ou indiretamente, da alimentação na fase larval, mesmo naquelas em que fatores genéticos podem estar envolvidos (HARTFELDER et al., 2006).

Em abelhas do gênero *Apis* a quantidade e a qualidade de alimento desempenham papel fundamental para a diferenciação de operárias e rainhas. As larvas que darão origem às rainhas recebem geléia real durante todo seu desenvolvimento e as que vão originar operárias, recebem uma mistura de mel e pólen após o terceiro dia de alimentação larval (REMBOLD et al., 1974; WEAVER, 1974; ISHAY et al., 1976; ASECOT; LENSKY 1984).

Nas espécies do gênero *Melipona*, segundo a hipótese de Kerr (1950) e Kerr e colaboradores (1966), o sistema de determinação das castas é regulado por mecanismos genéticos e por influência ambiental, especialmente, alimentar. As rainhas emergem de células isomórficas em relação às células ocupadas por operárias ou machos.

Em outros gêneros de abelhas sem ferrão a quantidade de alimento é o fator decisivo na determinação de castas (DARCHEN; DELAGE-DARCHEN, 1971; CAMARGO, 1972). As rainhas emergem de células reais, maiores do que as de operárias, onde as larvas recebem um suprimento alimentar extra.

Há outros possíveis mecanismos de produção de rainhas, restritos a determinadas circunstâncias e a algumas espécies de meliponíneos, porém, derivam dos mecanismos mencionados acima ou carecem de teorias bem fundamentadas, como é o caso das rainhas miniaturas (RIBEIRO et al., 2006; HARTFELDER et al., 2006;).

Muitos aspectos envolvidos na determinação de castas permanecem desconhecidos, especialmente, no grupo das abelhas sem ferrão. Há poucos dados acerca da qualidade e da constituição do alimento larval dessas abelhas. O objetivo do presente trabalho foi acrescentar dados sobre as características do alimento larval, que embasem futuras pesquisas sobre a influência da alimentação das larvas na determinação de castas das abelhas sem ferrão. Outros objetivos incluem: (1) quantificar os principais elementos do alimento larval; (2) comparar a composição do alimento larval dos alvéolos de cria de uma mesma colônia de *Melipona*; (3) analisar a atividade enzimática do alimento larval de *Melipona scutellaris* Latreille, 1811.

MATERIAL E MÉTODOS

Quantificação do alimento larval e de seus componentes

O material biológico foi retirado de uma colônia de *Melipona scutellaris*, proveniente da

Bahia e mantida em colméia racional, no Meliponário Uberlândia, em Uberlândia-MG, desde o ano 2000. A colônia estava forte no momento do experimento, o que foi concluído pela quantidade de potes de alimento, número de operárias, número de favos de cria e agressividade das abelhas. Foi retirado um favo com cerca de 150 alvéolos, todos contendo ovos.

Os alvéolos foram abertos e, com auxílio de uma pinça, os ovos foram removidos. O alimento larval de cada um deles foi coletado, separadamente, com uma pipeta automática e transferido para tubos numerados. Aleatoriamente, foram tomados 25 tubos para o ensaio experimental. Os tubos foram centrifugados por 15 min a 10.000 rpm, separando duas camadas: (1) superior, contendo basicamente, secreções das glândulas mandibulares e hipofaríngeas, água, açúcares e subprodutos da digestão do pólen (VELTHUIS, 1992); (2) inferior, contendo o pólen do alimento.

A camada superior foi transferida para outro tubo e o volume foi quantificado com uma pipeta automática. Para medir o volume da camada inferior, 100 μ L de água destilada foram adicionados ao tubo, permitindo a medição do seu volume com uma pipeta automática, após subtração do volume de água adicionado. Somando-se o volume das duas camadas, obteve-se a quantidade total de alimento larval em cada alvéolo.

O padrão de polipeptídios de cada alvéolo foi comparado, por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE/SDS) 12%, segundo o método de Laemmli (1970). A quantificação de

proteínas, na camada superior do alimento, foi feita pelo método de Bradford (1976).

Análise enzimática

A camada superior do alimento de cada alvéolo foi submetida a um teste qualitativo e semi-quantitativo da atividade enzimática, por meio do Kit Api Zym (BIOMÈRIEUX) que identifica 19 tipos de enzimas a partir de pequena quantidade de amostra não purificada (Tabela I). A amostra foi diluída e distribuída em 20 poços de uma galeria, cada um contendo um substrato específico para a enzima testada. O resultado da reação foi mensurado pela alteração ou não da cor e, nos casos positivos, a intensidade da cor está diretamente relacionada com o grau de reação com o substrato, permitindo estimar a quantidade de enzima presente na amostra.

Foram diluídos 30 μ L do alimento da camada superior de cada alvéolo, individualmente, em 1,5 mL de soro fisiológico e aplicados 60 μ L desta solução em cada poço da galeria.

Para avaliar alterações nas reações enzimáticas em função do tempo foi também usado o Kit Api Zym. Foram analisados dois grupos experimentais: um contendo alimento de três alvéolos recém-operculados e outro contendo alimento de três alvéolos cujos ovos haviam eclodido recentemente. Foram diluídos, separadamente, 30 μ L da camada superior do alimento do alvéolo de cada grupo em 1,5 mL de soro fisiológico e aplicados 60 μ L dessa solução em cada poço da galeria do Kit Api Zym.

Tabela 1. Enzimas analisadas pelo Kit Api Zym (Biomèrieux).

Nº	Enzima Detectada	Substrato
1	Controle	-
2	Fosfatase alcalina	2-naftil fosfato
3	Esterase (C 4)	2-naftil butirato
4	Esterase Lipase (C 8)	2-naftil caprilato
5	Lipase (C 14)	2-naftil miristato
6	Leucina arilamidase	L-leucil-2-naftilamida
7	Valina arilamidase	L-valil-2-naftilamida
8	Cistina arilamidase	L-cistil-2-naftilamida
9	Tripsina	N-benzoil-DL-arginina-2-naftilamida
10	α -quimotripsina	N-glutaril-fenilalanina-2-naftilamida
11	Fosfatase ácida	2-naftil fosfato
12	Naftol-AS-BI-fosfohidrolase	Naftol-AS-BI-fosfato
13	α -galactosidase	6-Br-2-naftil- α D-galactopiranosida
14	β -galactosidase	2-naftil- β D-galactopiranosida
15	β -glucuronidase	Naftol-AS-BI- β D-glucuronida
16	α -glucosidase	2-naftil- α D-glucopiranosida
17	β -glucosidase	6-Br-2-naftil- β D-glucopiranosida
18	N-acetil- β -glucosaminidase	1-naftil-N-acetil- β D-glucosaminida
19	α -manosidase	6-Br-2-naftil- α D-manopiranosida
20	α -fucosidase	2-naftil- α L-fucopiranosida

RESULTADOS

Quantificação do alimento larval e de seus componentes

Conforme mostra a Tabela II, a média do volume de alimento presente nos alvéolos de cria de *M. scutellaris* foi 119,3 μL ($\pm 16,9$; CV = 14,19%). A média do volume da camada superior do alimento centrifugado foi 82,4 μL ($\pm 9,2$; CV = 11,14%). O volume médio da camada inferior foi de 36,9 μL ($\pm 12,6$; CV = 34,09%).

A quantidade média de proteínas da camada superior do alimento foi de 652,01 μg ($\pm 89,66$; CV = 13,75%) e a concentração média foi 7,92 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ($\pm 0,73$; CV = 9,34%). A análise em gel de eletroforese PAGE/SDS mostrou diferença no perfil protéico do alimento dos alvéolos, com alteração da intensidade das bandas, que se mostraram menos intensas ou, mesmo, desapareceram das amostras retiradas de alvéolos que estavam próximos ao centro do favo.

Tabela 2. Informações sobre o alimento larval do alvéolo de cria de *Melipona scutellaris*.

	Volume Total de Alimento (μL)	Volume da Camada Inferior (μL)	Volume da Camada Superior (μL)	Quantidade de Proteínas (μg)	Concentração de proteínas ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
Média + SD	119,3 \pm 16,9	36,9 \pm 12,6	82,4 \pm 9,2	652,01 \pm 89,66	7,92 \pm 0,73
Coefficiente de Variação	14,19 %	34,09 %	11,14 %	13,75 %	9,34 %
Máximo	141	60	99	826,92	9,67
Mínimo	72	8	63	497,76	5,52

Análise enzimática

Os testes enzimáticos mostraram a presença das seguintes enzimas no alimento larval: Fosfatase Alcalina, Esterase (C4), Esterase Lipase (C8), Fosfatase Ácida, Naftol-AS-BI-fosfohidrolase, α -galactosidase, β -galactosidase, α -glicosidase e β -glicosidase.

Verificou-se diminuição na intensidade das reações das enzimas do alimento dos alvéolos que estavam próximo ao centro do favo, com exceção da enzima β -galactosidase, que apresentou atividade

máxima na maioria dos alvéolos analisados.

As reações enzimáticas do alimento de alvéolos recém-operculados foram mais intensas do que nos alvéolos que tinham larvas recém-nascidas (Tabela III). A diferença foi mais acentuada para as enzimas Fosfatase Alcalina, Esterase (C4), Esterase Lipase (C8), Fosfatase Ácida, Naftol-AS-BI-fosfohidrolase e α -glicosidase e menos acentuada para as enzimas α -galactosidase, β -galactosidase e β -glicosidase.

Tabela 3. Intensidade das reações enzimáticas do alimento larval de *M. scutellaris* dos favos recém-operculados e dos favos que tinham larvas recém nascidas. A intensidade de reação é diretamente proporcional ao seu número: 1 e 2 representam reações negativas e 3, 4 e 5 representam reações positivas.

	Favos recém-operculados	Favos que tinham larvas recém nascidas
Fosfatase Alcalina	5	3
Esterase (C4)	3	1
Esterase Lipase (C8)	3	1
Fosfatase Ácida	5	3
Naftol-AS-BI-fosfohidrolase	5	3
α -galactosidase	3	2
β -galactosidase	5	4
α -glicosidase	5	2
β -glicosidase	4	3

DISCUSSÃO

Segundo a hipótese de Kerr e colaboradores (1966) sobre a determinação de castas no gênero *Melipona*, fatores genéticos relacionados à variação de um ou mais fatores ambientais poderiam explicar a variação na proporção de rainhas e operárias observada entre os favos de cria e em diferentes estações do ano. Esses autores propuseram, ainda, que o principal fator ambiental deveria ser a quantidade total de alimento. Os dados obtidos no presente trabalho corroboram essa hipótese e evidenciam que o número de variáveis na alimentação larval não se restringe ao volume total, mas também, à quantidade de proteínas da camada superior do alimento e, principalmente, de pólen.

A variação encontrada na atividade enzimática e nas bandas de proteínas entre os alvéolos da região central do favo e das bordas está refletindo sua ordem de construção, que ocorre do centro para a periferia. Este argumento é reforçado também pelas diferenças na intensidade das reações enzimáticas entre alvéolos recém-operculados e os que tinham larvas recém nascidas. As enzimas estudadas estão, provavelmente, relacionadas às funções digestivas, especialmente, conversão de carboidratos e digestão do pólen. O fato de não haver enzimas fortemente ativas, avaliado pela coloração da reação, no momento da eclosão dos ovos é uma evidência disso, pois, quando a larva nasce, o alimento já deve estar pronto para consumo. Velthuis (1992) sugeriu que a função original das secreções hipofaringeanas das abelhas é, em geral, simplesmente digestiva e esse padrão é ainda prevalente em Bombini e Meliponini. Pereboom (2000) mostrou que essas secreções não têm nenhuma função na determinação de castas de *Bombus terrestris*, pois são fornecidas, igualmente, a machos, operárias e rainhas. Kerr e colaboradores (1966) também, não observaram em *Melipona quadrifasciata*, comportamento que justificasse diferenças qualitativas nas secreções entre os diferentes alvéolos durante o processo de provisionamento de cada um deles. Essas evidências permitem deduzir que, dificilmente, as enzimas estariam diretamente relacionadas à determinação de castas no gênero *Melipona*.

Por outro lado, as amplas variações encontradas nos outros elementos do alimento larval poderiam estar relacionadas, direta ou indiretamente, com a variação encontrada na proporção entre rainhas e operárias, em diferentes circunstâncias ambientais. Essa premissa é

sustentada pelos dados obtidos por Maciel-Silva e Kerr (1991), onde larvas de *Melipona compressipes* alimentadas com alimento larval homogeneizado, portanto, sem variação entre as larvas, geraram 25% de rainhas entre as fêmeas.

Schawrziana quadripunctata Lepelletier, 1836 é uma espécie de abelha sem ferrão que produz, freqüentemente, rainhas em células de operárias, conhecidas como rainhas miniaturas, além de rainhas grandes, em células reais (CAMARGO, 1974; WENSELEERS et al., 2005; RIBEIRO et al., 2006). Castilho-Hyodo (2001) investigou fatores que poderiam influenciar a determinação de castas nesta espécie, inclusive fatores alimentares. Os dados mostraram diferença significativa na quantidade de alimento nas células de cria e na concentração de proteínas em diferentes estações do ano. A autora atribuiu isso à disponibilidade de recursos no ambiente nessas estações e as variações no valor protéico do pólen de diferentes fontes florais. Estas variações podem estar relacionadas com o aumento ou diminuição no número de rainhas produzidas em diferentes estações do ano.

Hartfelder e Engels (1989) estudaram o alimento larval de algumas espécies de meliponíneos, enfatizando a relação entre o balanço nutricional e a filogenia das abelhas estudadas. Em *M. quadrifasciata*, foram analisados os componentes solúveis em água do alimento larval de células individuais e os autores não encontraram variações nos elementos estudados que pudessem estar relacionadas com a determinação de castas.

São necessários testes com alimentação controlada para avaliar, isoladamente, a importância de cada variável do alimento larval na determinação de castas de abelhas sem ferrão do gênero *Melipona* e nas espécies que produzem rainhas miniaturas. O monitoramento das variáveis em diferentes estações do ano pode fornecer pistas sobre quais elementos da alimentação interferem na proporção de rainhas entre as fêmeas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos colegas do Instituto de Genética e Bioquímica (INGEB-UFU) e da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP-USP) pela colaboração, em especial à Profa. Dra. Vera L. Imperatriz Fonseca pelas válidas sugestões na redação do trabalho. Também agradecemos ao apoio da FAPEMIG, CNPq e UFU.

ABSTRACT: There are few studies on the quality and constitution of larval food of stingless bees. The present study was performed to increase the knowledge about the characteristics of larval food. This knowledge can be used in the future to investigate the influence of larval nourishment on the caste determination of *Melipona*. One recently built comb was removed from a strong colony of *Melipona scutellaris* and the larval food of 25 brood cells was studied individually. We analyzed the total volume of the larval food, the volume of its superior and inferior layers, the quantity and concentration of proteins, and also the enzymatic activities. The variation among the brood cells was very high, not only concerning the total volume of larval food (CV=14,19%), but also the quantity of proteins (CV=13,75%) and, mainly, the quantity of pollen (CV=34,09%). Monitoring these variables through different seasons can give an idea about which elements of larval food can be related to queen production.

KEYWORDS: Larval food. Caste determination. Enzymes. Pollen. Stingless bees.

REFERÊNCIAS

- ASENCONT, M.; LENSKEY, Y. Juvenile hormone induction of “queenliness” on female honey bee (*Apis mellifera* L.) larvae reared on worker jelly and on stored royal jelly. **Comp. Biochem. Physiol. B.** v. 78, n. 1, p. 109-117, 1984.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Anal. Biochem.** v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976.
- CAMARGO, C. A. Determinação das castas em *Scaptotrigona postica* Latreille. (Hymenoptera, Apidae). **Rev. Bras. Biol.** v. 32, n. 1, p. 133-138, 1972.
- CAMARGO, J. M. F. Notas sobre a morfologia e biologia de *Plebeia (Schwarziana) quadripunctata quadripunctata* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae), **Stud. Entomol.** v. 17, n 1-4, p. 433-470, 1974.
- CASTILHO-HYODO, Vivian Cristina Costa. **Rainha ou operária? Um ensaio sobre a determinação de castas em *Schwarziana quadripunctata* (Lepelletier, 1836) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)**. 2001. 134f. Tese (Doutorado em Ecologia) – Curso de Pós-graduação em Ecologia - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.
- DARCHEN, R.; DELAGE-DARCHEN B. Le determinisme des castes chez les Trigones (Hyménoptères, Apidés). **Insect. Soc.** v. 18, n. 2, p. 121-134, 1971.
- HARTFELDER, K.; ENGELS W. The composition of larval food in stingless bees: evaluating nutritional balance by chemosystematic methods. **Insect. Soc.** v. 36, n.1, p. 1-14, 1989.
- HARTFELDER, K.; MAKERT G. R.; JUDICE, C. C.; PEREIRA, G. A. G.; SANTANA W. C.; DALLACQUA, R.; BITONDI M. M. G. Physiological and genetic mechanisms underlying caste development, reproduction and division of labor in stingless bees. **Apidologie.** v. 37, n. 2, p. 144-163, 2006.
- ISHAY, J., FISCHL, J.; ALPERN, G. Study of honeybee caste differentiation by glucose level differences during development. **Insect. Soc.** v. 23, n. 1, p. 23-28, 1976.
- KERR, W. E. Genetic determination of castes in the genus *Melipona*. **Genetics.** v. 35, n. 2, p. 143-152, 1950.
- KERR, W. E., STORT, A. C. G.; MONTENEGRO, M. J. Importância de alguns fatores ambientais na determinação de castas no gênero *Melipona*. **An. Acad. Bras. Ciênc.** v. 38, n. 1, p. 149-168, 1966.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. **Nature.** v. 227, n.5259, p. 680-685, 1970.

MACIEL-SILVA, V. L.; KERR, W. E. Sex determination in bees. XXVII. Castes obtained from larvae fed homogenized food in *Melipona compressipes* (Hymenoptera, Apidae). **Apidologie**. v. 22, n. 1, p. 15-19, 1991.

PEREBOOM, J. J. M. The composition of larval food and the significance of exocrine secretions in the bumblebee *Bombus terrestris*. **Insect. Soc.** v. 47, n. 1, p. 11-20, 2000.

REMBOLD, H.; CZOPPELT, C.; RAO, P. J. Effect of juvenile hormone treatment on caste differentiation in the honeybee, *Apis mellifera*. **J. Insect Physiol.** v. 20, n. 7, p. 1193-1202, 1974.

RIBEIRO, M. F.; WENSELEERS, T.; SANTOS-FILHO, P. S.; ALVES, D. A. Miniature queens in stingless bees: basic facts and evolutionary hypotheses. **Apidologie**. v. 37, n. 2, p. 191-206, 2006.

VELTHUIS, H. H. W. Pollen digestion and the evolution of sociality in bees. **Bee World**. v. 73, n. 2, p. 77-88, 1992.

WEAVER, N. Control of dimorphism in the female honeybee. 3. The balance of nutrients: **J. Apic. Res.** v. 13, p. 93-101, 1974.

WENSELEERS, T.; RATNIEKS, F. L. W.; RIBEIRO, M. F.; ALVES, D. A., IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Working-class royalty: bees beat the caste system. **Biol. Lett.** v. 1, n. 2, p. 125-128, 2005.