UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

**“Efeito da linhagem paterna
sobre a ativação dos ovários e produção de zangões
em operárias de *Apis mellifera* deixadas órfãs.”**

Gustavo Rodrigues Makert dos Santos

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de Mestre,
pelo curso de Pós-Graduação em Genética –
Área de concentração: Genética.

Orientador: Prof. Dr. Klaus Hartfelder

Ribeirão Preto

2002

Data da Defesa: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof(a) Dr(a) _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a) Dr(a) _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a) Dr(a) _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICO

Ao meu pai **Maurides Makert**, também Biólogo, pelo amor e pelo incentivo, desde o início, nessas áreas maravilhosas que são a BIOLOGIA e a GENÉTICA. À minha mãe **Claudete Rodrigues**, pelo amor, apoio e dedicação à minha formação.

Ao meu irmão **Fernando Makert**, pela amizade, e apoio ao meu aprendizado das línguas alemã e inglesa, além do auxílio na parte da informática.

À **Anja Teuschel**, pela paciência e, principalmente, pelo amor demonstrado nos momentos mais decisivos desta jornada. Também à **Christina Teuschel** e ao **Helmut Teuschel**, por me considerarem como um filho.

Agradecimentos

Ao amigo e orientador Prof. Dr. Klaus Hartfelder pelas diretrizes seguras, permanente incentivo, confiança e apoio desde 1996, quando estávamos em Tübingen.

Às Profas. Dras. Zilá Luz Paulino Simões e Márcia M. Gentile Bitondi pela amizade e ensinamentos que foram fundamentais no meu retorno, da Alemanha.

Ao Prof. Dr. Robert J. Paxton pelo auxílio na análise estatística, consideração, simpatia e amizade.

A todos que direta ou indiretamente, colaboraram na execução desse trabalho, incluindo Profa. Dra. Vera Lucia Castelo Figueiredo, cujo apoio técnico foi decisivo ao andamento dos experimentos; Profas. Dras. Kimie Simokomaki e Clarice Harumi, pelas discussões sobre microssatélites; Profas. Dras. Rosana de Almeida e Sibeles Tozetto pelas lembranças compartilhadas da Alemanha; Karina Rosa Guidugli, José Esequiel Bonifácio da Silva e Nínive A. Colonello, pelo estudo em conjunto; Angel Roberto Barchuk, Anete Pedro Lourenço, Alexandre dos Santos Cristino, Weyder C. Santana, Alessandra Herling Lambertucci e Tiago M. Franco, pelo companheirismo; Geusa Simone Freitas, Érica Donato e Maria Salete Zufelato, e aos técnicos do laboratório, pela convivência e companheirismo. Ao Márcio Araújo Furtado, Renato Sousa Cardoso, Stephano Spanó Mello e Regis Camargo Figueiredo pela grande consideração e amizade.

e a FAPESP pelo apoio financeiro.

Frases Marcantes

O mestre não deve ser o farol que ilumina o caminho guiando os passos do discípulo. O mestre deve ser o sol que ilumina todos os caminhos, permitindo ao discípulo que escolha o seu, permitindo até que o discípulo perceba as sombras onde o sol não pode iluminar.

Maurides Makert

Lernen ist wie Rudern gegen den Strom, hört man auf, treibt man zurück.

autor desconhecido

Razão, Observação e Experiência – A trindade completa da ciência.

Robert G. Ingersoll

Plus j'apprends des choses, plus je me rend compte que je ne sais rien.

Albert Einstein

A teoria das probabilidades nada mais é do que o bom senso transformado em cálculo.

Pierre S. Laplace

Was wir wissen, ist ein Tropfen,

Was wir nicht wissen – ein Ozean.

Isaac Newton

Sumário

Resumo.....	11
Summary	12
1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Níveis de organização em insetos	15
1.2. Nível de organização em <i>Apis mellifera</i>	15
1.3. Conflito reprodutivo	17
1.4. Orfandade	18
1.5. Policiamento e abelhas anarquistas	19
2. OBJETIVOS	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1. Coleta de amostras	24
3.1.1. Escolha de núcleos apropriados	24
3.1.2. Alelos da rainha e amostra populacional	24
3.1.3. Operárias órfãs e seus filhos	25
3.2. Ativação dos ovários	25
3.3. Extração do DNA	27
3.4. Análise dos microssatélites	27
3.5. Eletroforese e determinação dos genótipos	28
3.6. Análise Estatística	29
3.6.1. Escolha dos núcleos apropriados	29
3.6.2. Análise da frequência das patrilineas	29
3.7. Diagrama de fluxo do procedimento experimental	31
4. RESULTADOS	33
4.1. Análise dos ovários	33
4.1.1. Ovariolos	33
4.1.2. Análise da ativação dos ovários	35
4.2. Análise de microssatélites do ninho 65 em géis	36
4.2.1. Alelos da rainha do ninho 65	36
4.2.2. Amostra populacional das operárias do ninho 65	37
4.2.3. Zangões filhos de operárias do ninho 65	39
4.3. Análise de microssatélites do ninho 67 em géis	39
4.3.1. Alelos da rainha do ninho 67	39
4.3.2. Amostra populacional das operárias do ninho 67	40
4.3.3. Operárias marcadas (14 e 21 dias) do ninho 67, cujos ovários foram analisados	40
4.3.4. Zangões filhos de operárias do ninho 67	41
4.4. Análise estatística ninho 65	42
4.4.1. Frequências alélicas da amostra populacional e zangões filhos das operárias do ninho 65	42
4.4.2. Genótipos (A88/A24) do ninho 65	44
4.4.3. Patrilineas na amostra populacional do ninho 65	45
4.4.4. Probabilidade do mesmo alelo ter vindo de dois diferentes zangões (ninho 65)	48
4.4.5. Probabilidade de duas operárias possuírem um alelo em comum (ninho 65)	48
4.4.6. Frequência de patrilineas em operárias marcadas do ninho 65	49
4.4.7. Patrilineas na amostra populacional e amostra de zangões produzidos por operárias órfãs no ninho 65	50
4.4.8. Relação entre patrilineas e a ativação ovariana nas operárias marcadas do ninho 65	52
4.4.9. Frequências normalizadas da relação entre patrilineas e a ativação ovariana nas operárias marcadas do ninho 65	54
4.4.10. Relação entre patrilineas e o número de ovariolos nas operárias do ninho 65	56

4.4.11.	Frequências normalizadas da relação entre patrilíneas e o número de ovariolos nas operárias marcadas do ninho 65.....	59
4.5.	Análise estatística ninho 67	60
4.5.1.	Frequências alélicas da amostra populacional e zangões filhos das operárias do ninho 67.....	61
4.5.2.	Genótipos (A88/A24) no ninho 67	62
4.5.3.	Patrilíneas na amostra populacional do ninho 67.....	64
4.5.4.	Probabilidade do mesmo alelo ter vindo de dois diferentes zangões (ninho 67)	66
4.5.5.	Probabilidade de duas operárias possuírem um alelo em comum (ninho 67).....	66
4.5.6.	Frequência de patrilíneas em operárias marcadas do ninho 67.....	67
4.5.7.	Patrilíneas na amostra populacional e amostra de zangões produzidos por operárias órfãs no ninho 67.....	68
4.5.8.	Relação entre patrilíneas e ativação ovariana nas operárias do ninho 67.....	70
4.5.9.	Frequências normalizadas da relação entre patrilíneas e a ativação ovariana nas operárias marcadas do ninho 67	72
4.5.10.	Relação entre patrilíneas e o número de ovariolos nas operárias do ninho 67.....	74
4.5.11.	Frequências normalizadas da relação entre patrilíneas e o número de ovariolos nas operárias marcadas do ninho 67.....	76
4.6.	Análise estatística comparada entre os ninhos	78
4.6.1.	Tabela das frequências das patrilíneas e o número de ovariolos e ativação ovariana nas operárias dos ninhos 65 e 67	79
4.6.2.	Tabela das frequências das patrilíneas transmitidas após a orfandade nos ninhos 65 e 67.....	79
4.6.3.	Teste exato de Fisher em ambos ninhos.....	80
5.	DISCUSSÃO	83
6.	CONCLUSÕES	90
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93
	APÊNDICE	100

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Grau de ativação do ovário	28
Figura 2 - Número de ovariolos em operárias de todos os ninhos	35
Figura 3 - Alelos maternos no ninho 65 (A88)	39
Figura 4 - Amostra populacional do ninho 65 (A7)	39
Figura 5 - Amostra populacional do ninho 65 (A88/A24)	40
Figura 6 - Zangões filhos das operárias órfãs do ninho 65 (A7)	41
Figura 7 - Alelos maternos no ninho 67 (A88/A24)	41
Figura 8 - Amostra populacional do ninho 67 (A88/A24)	42
Figura 9 - Operárias marcadas do ninho 67 (A88/A24)	43
Figura 10 - Zangões filhos das operárias órfãs do ninho 67 (A88/A24)	43
Figura 11 - Relação patrilineas e ativação ovariana no ninho 65	56
Figura 12 - Freq. normalizadas das patrilineas/ativação ovariana (N. 65)	58
Figura 13 - Relação patrilineas-número de ovariolos em operárias (N65)	60
Figura 14 - Freq.normalizadas das patrilineas-nº ovariolos em op. (N65)	62
Figura 15 - Relação patrilineas e ativação ovariana no ninho 67	74
Figura 16 - Freq. normalizadas das patrilineas/ativação ovariana (N. 67)	76
Figura 17 - Relação patrilineas-número de ovariolos em operárias (N67)	78
Figura 18 - Freq.normalizadas das patrilineas-nº ovariolos em op. (N67)	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação dos estágios de ativação dos ovários em operárias	27
Tabela 2 - Número de ovários e análise estatística em todos ninhos	36
Tabela 3 - <i>Status</i> ovariano em operárias de 15 dias em condições órfãs	37
Tabela 4 - <i>Status</i> ovariano em operárias de 21 dias em condições órfãs	38
Tabela 5 - Frequência alélica direta (ninho 65)	45
Tabela 6 - Patrilineas em zangões filhos de operárias do ninho 65	46
Tabela 7 - Patrilineas na amostra populacional do ninho 65	48
Tabela 8 - Patrilineas em operárias marcadas do ninho 65	51
Tabela 9 - Patrilineas na amostra populacional e zangões do ninho 65	53
Tabela 10 - Relação patrilineas e ativação ovariana no ninho 65	55
Tabela 11 - Freq. normalizadas das patrilineas/ativação ovariana (N. 65)	57
Tabela 12 - Relação patrilineas-número de ovários em operárias (N65)	59
Tabela 13 - Freq.normalizadas das patrilineas-nº ovários em op. (N65)	61
Tabela 14 - Frequência alélica direta (ninho 67)	63
Tabela 15 - Patrilineas em zangões filhos de operárias do ninho 67	65
Tabela 16 - Patrilineas na amostra populacional do ninho 67	66
Tabela 17 - Patrilineas em operárias marcadas do ninho 67	69
Tabela 18 - Patrilineas na amostra populacional e zangões do ninho 67	71
Tabela 19 - Relação patrilineas e ativação ovariana no ninho 67	73
Tabela 20 - Freq. normalizadas das patrilineas/ativação ovariana (N. 67)	75
Tabela 21 - Relação patrilineas-número de ovários em operárias (N67)	77
Tabela 22 - Freq.normalizadas das patrilineas-nº ovários em op. (N67)	79
Tabela 23 - Patrilineas de operárias marcadas dos ninhos 65 e 67	81
Tabela 24 - Patrilineas de zangões filhos de operárias dos ninhos 65 e 67	82

LISTA DE ABREVIATURAS E PRODUTOS QUÍMICOS

Ácido Bórico: Boric Acid (Gibco BRL)

Acrilamida: Acrylamide PAGE (Pharmacia Biotech)

APS: Ammonium persulphate (Pharmacia Biotech)

Bisacrylamide: Methylenebisacrylamide (Pharmacia Biotech)

Cloreto de magnésio: Magnesium Chloride (USB)

Cloreto de sódio: Sodium Chloride (Pharmacia Biotech)

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$) (Pharmacia Biotech)

NP-40: NP-40 (Calbiochem) Detergent, 10% Solution

Sacarose: Saccharose (MERCK)

SDS: Sodium dodecyl sulphate (Pharmacia Biotech)

TBE: Tris / BoricAcid / EDTA

TEMED: N,N,N', N'-tetramethylethylenediamine (Pharmacia Biotech)

Tris: Tris(hydroxymethyl)-aminomethane, $NH_2Cl (CH_2OH)_3$ (Pharmacia Biotech)

N. 65: Ninho 65

N. 67: Ninho 67

Freq.: Frequência

Status ovariano: Estado de ativação ovariana

N ou N^o: Número

Op.: Operárias

i.e.: isto é

Resumo

Makert, G. R. (2002) Efeito da linhagem paterna sobre a ativação dos ovários e produção de zangões em operárias de *Apis mellifera* deixadas órfãs. Dissertação Mestrado, Depto. Genética, FMRP-USP, Ribeirão Preto.

Rainhas de *Apis mellifera* acasalam com 10-20 zangões. O parentesco médio entre as operárias filhas da rainha, portanto, atinge valores bastante divergentes entre operárias da mesma patrilinea ($r=0,75$) e operárias de diferentes patrilineas ($r=0,29$), o que deve resultar em conflitos de interesse no que diz respeito à reprodução.

Neste estudo abordamos esta questão sociogenética ao nível molecular, por análise de microssatélites em dois ninhos de abelhas africanizadas, envolvendo mais especificamente a influência paterna na ativação dos ovários em operárias que ficaram órfãs após perda da sua rainha. Detectamos existência de uma preferência dentre as linhagens paternas, quanto à ativação dos ovários destas operárias e a correlação do número de ovários em operárias com o seu genótipo.

Utilizando o primer A88 e A24 conseguimos distinguir um mínimo de 14 patrilineas diferentes na população de operárias dos ninhos. A partir da análise de zangões filhos das rainhas dos ninhos 65 e 67, conseguimos identificar os alelos maternos. Além disso, conseguimos distinguir 20 patrilineas diferentes em zangões filhos de operárias órfãs do ninho 65, e 14 patrilineas diferentes em zangões filhos de operárias órfãs do ninho 67.

Analizando o grau de ativação de ovários em operárias órfãs com idade de 15 e 21 dias, detectamos diferenças entre as colmeias com respeito ao *status* ovariano dessas. Correlacionando-se o grau de ativação do ovário e número de ovários, com as patrilineas detectadas, foi possível distinguir patrilineas cuja ativação ovariana e número de ovários foi baixo (patrilineas com os alelos 4/1, 4/2, 4/3, 4/4 - alelos referentes aos microssatélites A88/A24), como também, se encontrou patrilinea onde ambos aspectos foram elevados (principalmente patrilinea com os alelos 2/4). E essas mesmas patrilineas com alto *status* ovariano foram mais representadas após a orfandade, através de seus filhos. E por fim, através da análise estatística, pôde-se comprovar pelo teste exato de Fisher, que essas diferenças de representatividade das patrilineas antes, e após a orfandade, não ocorreram aleatoriamente.

Esses resultados mostram a alta eficiência da metodologia empregada e, possibilitaram comprovação de que há diferenças genéticas na probabilidade de operárias se tornarem poadeiras.

Summary

Makert, G. R. (2002) Patriline effect on the activation of the ovary and production of drones in queenless workers of *Apis mellifera*. Dissertação Mestrado, Depto. Genética, FMRP-USP, Ribeirão Preto.

A honeybee queen normally mates with 10-20 drones. Mean kinship relations, therefore, attain quite distinct values when comparing kinship between workers within the same patriline ($r=0,75$) to the corresponding values for workers between different patrilines ($r=0,29$). This discrepancy results in conflicts with respect to reproductive interests.

In the present study, we employed microsatellites as molecular markers to approach this sociogenetic question in two honey bee nuclei. In detail, we asked whether differences in ovary activation, previously observed in queenless workers, can be attributed to patriline differences. Additionally, we asked whether differences in ovariole numbers in worker bees also correlate with their patriline genotype.

We obtained the following results:

Utilizing microsatellite primer A88 and A24 we could distinguish a minimum of 14 different worker patrilines in the two nuclei. The two maternal alleles for nuclei 65 and 67 were identified from the genotypes of the queen's sons. We could distinguish at least 20 different patrilines in the sons of queenless workers in nucleus 65, and 14 patrilines in the sons of queenless workers in nucleus 67.

Analyzing the degree of ovary activation in 15 and 21-day-old queenless workers, we detected differences in ovary status between the two nuclei. When correlating the degree of ovary activation and number of ovarioles in marked queenless workers, we were able to detect patrilines whose ovary status and ovarioles number was low (patrilines with the alleles 4/1, 4/2, 4/3, 4/4 - microsatellites **A88/A24**), in contrast, there were also patrilines where both parameters were high (especially in patriline with the alleles 2/4). It was exactly these patrilines which produced most offspring (drones) after queen removal. And finally, by Fisher's exact test, we could show that these representation differences before and after orphanhood did not occur randomly.

These results show the high efficiency of the methodology used, and made it possible to demonstrate that there are genetic differences in the probability of workers to become egg layers.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A questão fundamental no caso de insetos sociais é de quem reproduz e quem desiste de reproduzir por si próprio e, ao invés disto, ajuda a criar a prole de outra fêmea na colmeia. O fato de que a maioria dos insetos sociais é encontrada na ordem himenóptera, certamente se deve a uma pré-adaptação genética deste grupo, o mecanismo de determinação do sexo por haplodiploidia (1), e pré-adaptações comportamentais, sendo (2) a tendência de que as fêmeas aprovisionem a cria e (3) a tendência de que elas voltem ao ninho parental e o reutilizem (Wilson, 1971). Portanto, a interação desses fatores comportamentais com fatores biológicos (determinação de sexo por haplodiploidia, por exemplo) contribuiu para a eficiência e predomínio dos himenóptera dentro do grupo dos insetos. A importância da determinação de sexo por haplodiploidia (1) dá-se ao fato de tal mecanismo implicar em uma assimetria nos graus do parentesco genético em associações matrilineais, sendo as irmãs mais relacionadas entre si, do que com os seus irmãos. Estas assimetrias constituem o argumento básico nas explicações do aparente surgimento múltiplo de um ciclo de vida social em himenópteros. A teoria de *kin selection* divide o *fitness* (valor adaptativo) de um indivíduo em um componente de *individual fitness* (valor adaptativo individual) e um componente de *inclusive fitness* (valor adaptativo por parentesco). Obviamente, esta teoria que ganhou aceitação inequívoca entre os pesquisadores que estudam evolução, ciclos de vida e comportamento em insetos sociais, pois explica muito bem as razões responsáveis pela socioevolução neste grupo. Não identifica, porém, os mecanismos fisiológicos e/ou controle do desenvolvimento, que levam uma fêmea a desistir de reproduzir por si própria e, ao invés disso, ajudar a sua mãe ou irmã na reprodução. Esta divisão de trabalho na reprodução dentro de colmeias depende da capacidade de uma (ou poucas) fêmea(s) em monopolizar a reprodução e "convencer" as fêmeas companheiras a aceitar o papel de operária. Os passos evolutivos e os mecanismos que consideramos essenciais para a evolução da dominância reprodutiva de insetos sociais serão detalhados a seguir.

1.1. Níveis de organização em insetos

Em insetos classificados como primitivo eussocial (Michener, 1974) uma hierarquia social de dominância reprodutiva é estabelecida por interações agressivas entre as fêmeas. Nas abelhas sociais (os *Apinae*), este nível de organização foi atingido pelos *Euglossini* e os *Bombini*. Nos *Euglossini*, todas as fêmeas presentes em um ninho são capazes de produzir ovos; porém, a maioria dos ovos colocados em células preparadas e aprovisionadas por elas, é consumido pela(s) fêmea(s) dominante(s) e substituídos pelos ovos dela(s) própria(s) (Garófalo, 1985; Augusto, 1999). Nos *Bombini* já existem algumas diferenças entre rainhas e operárias, quanto ao tamanho e fisiologia, porém as operárias produzidas começam a contestar a dominância da rainha quando um ninho encontra-se em fase avançada do desenvolvimento, i.e., quando uma colmeia passou por um momento conhecido como *competition point* (Duchateau e Velthuis, 1988). Após este momento algumas operárias de um determinado grupo com alto *status* na escala de hierarquia social começam ativar os seus ovários, marcado pela presença de folículos em vitelogênese (Duchateau e Velthuis, 1989). Em *Bombus terrestris* a dominância reprodutiva da rainha e o alto *status* social em operárias estão correlacionados com títulos elevados de hormônio juvenil nestes indivíduos (Röseler e van Honk, 1990; Bloch et al., 1996; Bloch et al., 2000). Aparentemente, este hormônio sincroniza os aspectos comportamentais da dominância com o grau de ativação dos folículos nos ovários, não apenas de *Bombini*, mas também em outros insetos sociais, como no gênero *Polistes* que atingiram nível semelhante de eussocialidade e apresentam também uma hierarquia de dominância baseada em interações agressivas (Strambi, 1990).

1.2. Nível de organização em *Apis mellifera*

Nas populosas colmeias de abelhas altamente eussociais do gênero *Apis*, com sistema de castas morfológicamente bastante distintos, um sistema de dominância baseada em interações agressivas obviamente não era mais viável e, aparentemente, foi substituído por controle químico da capacidade

reprodutora das operárias pelo feromônio da rainha. A *Apis mellifera* foi objeto de análises profundas quanto à composição e função do feromônio da rainha (Free, 1987; Winston e Slessor, 1993). Este feromônio é composto por cinco componentes, dentre os quais, predomina quantitativamente o ácido 9-ceto-(E)2-decenóico (9ODA). Este feromônio é seqüestrado pelas operárias que formam a corte real e assim o distribuem pela colmeia, indicando a presença da rainha. Apesar dos efeitos comportamentais deste feromônio (formação da corte real, impedimento de construção de células reais – realeiras –, coesão da colônia no processo de enxameação, atração de zangões no vôo nupcial, etc.), este feromônio também provoca profundas alterações na fisiologia das operárias. O 9ODA age como repressor dos *corpora allata* na biossíntese de hormônio juvenil (Kaatz et al., 1992) e inibe a ativação de folículos nos ovários das operárias (Winston e Slessor, 1993).

O feromônio da rainha, portanto, foi interpretado geralmente como instrumento de coerção e manipulação das operárias para “desistir” de produzir ovos e, ao invés disso, ajudar a mãe na criação de irmãs. Esta idéia de manipulação química das operárias pela rainha, i.e., que o feromônio induz as operárias de agirem contra os seus “próprios interesses” reprodutivos em termos evolutivos, foi recentemente contestado por Keller e Nonacs (1993). Estes autores propuseram que o feromônio da rainha é considerado pelas operárias como um sinal “honesto” da presença da rainha para que aceitem a dominância reprodutiva dessa, para o próprio interesse. O argumento é que, devido a sua baixa capacidade reprodutiva – cada um dos ovários das operárias é composto de apenas 2-10 ovariolos, enquanto que o ovário da rainha contém 180-200 ovariolos – assim elas devem preferir o monopólio da rainha na reprodução para maximizar o seu *fitness*, pela prevalência do componente do *inclusive fitness* sobre o seu *individual fitness* (Keller e Nonacs, 1993; Gadagkar, 1997).

Este argumento encaixa-se perfeitamente na descoberta do comportamento de “policiamento” das operárias de *Apis mellifera* sobre os ovos postos nos favos de uma colmeia (Ratnieks e Visscher, 1989). Uma colmeia de *Apis mellifera* é composta por uma rainha, operárias e zangões; as operárias, ao contrário dos zangões, são diplóides e filhas de vários acasalamentos da rainha (Adams et al., 1977). Deve-se citar ainda que, em resultado destes

acasalamentos com diferentes zangões, encontra-se uma estrutura genética de mais de 10 subfamílias em uma colônia. Em consequência calcula-se um coeficiente de parentesco médio entre as operárias que é de 0,29 (Pamilo, 1987), e assim é bem menor que o grau de parentesco observado entre operárias em caso de monoginia e monoandria (0,75). Essas operárias filhas de diferentes pais (diferentes linhagens paternas) formam subfamílias baseadas em diferentes patrilineas.

1.3. Conflito reprodutivo

Para distinguir o relacionamento genético entre as operárias surgiram denominações tais como “super-irmãs” e “meio-irmãs” que correspondem, respectivamente, às irmãs filhas de um mesmo zangão haplóide (com coeficiente de parentesco igual a 0,75, ou seja, semelhante a um caso de monoginia e monandria) e às irmãs filhas de diferentes zangões haplóides (Beye et al., 1998). Assim, um conflito de interesses reprodutivos não ocorre somente entre operárias e rainha, mas também, entre operárias descendentes de diferentes patrilineas. Os dois tipos de conflitos, teoricamente, devem estar centralizados na produção de machos. Nesta situação de acasalamento múltiplo da rainha e conseqüentemente a presença de diferentes patrilineas dentro da colmeia, cada operária deveria dar preferência aos machos produzidos pela rainha, aos produzidos por uma *meio-irmã*, devido ao maior grau de parentesco genético (Moritz, 1985; Ratnieks e Boomsma, 1995). Como resultado, pode ter surgido o comportamento de “policiamento” das operárias e a remoção dos ovos postos por operárias (Ratnieks e Visscher, 1989). Fato interessante é que tal comportamento parece ausente na maioria dos meliponídeos, nos quais as rainhas geralmente só acasalam com um único zangão, e todas as operárias geneticamente são “super-irmãs” (Kerr et al., 1962; Kerr, 1969; Engels e Imperatriz-Fonseca, 1990; Imperatriz-Fonseca et al., 1998; Peters et al., 1999; Paxton et al., 1999). Desta forma a fertilidade das operárias pode ser relativamente alta e a sua contribuição na produção dos machos é significativo (Contel e Kerr, 1976; Machado et al., 1984). Em trabalho recente, Sommeijer et al. (1999) estimaram que 94,5% dos machos de uma colmeia de *Melipona favosa* seriam produzidos por operárias.

1.4. Orfandade

Os argumentos apresentados acima como explicação da fertilidade reduzida das operárias em *Apis mellifera* se aplicam às condições normais de uma colmeia, i.e., à presença de uma rainha altamente reprodutiva nessa colmeia. Embora usualmente consideremos como certa a presença de uma rainha em uma colmeia, algumas vezes as abelhas podem ficar sem rainha quando elas falham em produzir uma nova, ou perdem a sua rainha devido à morte acidental, doença ou velhice (Moritz e Southwick, 1992). Em muitos casos as operárias são capazes em substituir a rainha ou produzir novas rainhas a partir de larvas (operárias) jovens, produzindo realeiras de emergência. Esse processo é possível, pois a diferenciação das castas se inicia apenas na terceira fase larval (Dedek et al., 1998). Na ausência de cria jovem, algumas operárias sofrem, porém, ativação dos ovários e, após 5-46 dias (dependendo da raça) começam a pôr ovos não fertilizados (Ruttner e Hesse, 1981; Page e Erickson, 1988; Robinson et al., 1990), sendo que, a produção de ovos haplóides dá origem a zangões, a única opção que as resta, nesse caso, para a propagação genética. Em termos evolutivos, esta “última saída” é uma boa estratégia pois o número de machos produzidos pelas operárias pode ser considerável, assim representando uma contribuição significativa ao *fitness* (Ratnieks, comunicação pessoal).

Portanto, aí é que justamente surge a nossa pergunta relacionada à seleção: dentre as operárias, qual inicia a ovogênese, e por quê? Existem três linhas de evidências sugerindo que há um conflito reprodutivo em colônias de *Apis mellifera* na ausência da rainha. A primeira delas demonstra, que ocasionalmente uma ou mais operárias em colmeias de abelha européia sem rainha produzem feromônio mandibular de rainha (Plettner et al., 1993) por alteração do processo da biosíntese de 9ODA (Plettner et al., 1996) e inibem a oviposição de outras irmãs da mesma colônia (Sakagami, 1958; Moritz e Hillesheim, 1985; Robinson et al., 1990). Já o segundo indício, é sobre o fato das operárias se comportarem umas em relação às outras, de acordo com o *status* de produção de ovos e o parentesco genético entre elas (Sakagami, 1954; Evers e Seeley, 1986). E finalmente, citamos que pelo menos alguns

membros de todas subfamílias de colônias sem rainha se dedicam a oviposição; entretanto a atividade de oviposição não deve ser igual entre as subfamílias (Page e Erickson, 1988; Robinson et al., 1990).

Como vemos, a capacidade de desenvolver ovários e tornar-se operária poedeira em colônias de abelhas melíferas sem rainha, parece estar relacionada às diferentes subfamílias existentes nas colmeias, podendo ser uma consequência da competição reprodutiva entre indivíduos com diferenças no seu *status* reprodutivo e, até mesmo, de relações genéticas entre estes indivíduos (diferenças genéticas entre os zangões).

1.5. Policiamento e abelhas anarquistas

Em condições normais, ou seja, na presença da rainha, as operárias de *Apis mellifera* possuem ovários inativos e apenas auxiliam a rainha na sua função reprodutiva dentro da colmeia. Essa dominância da rainha como única responsável pela reprodução dentro da colmeia fica evidente, não somente devido a sua maior capacidade reprodutivo-biológica citada anteriormente (180-200 ovaríolos), mas também por componentes comportamentais como o “policiamento” das operárias (Ratnieks e Visscher, 1989). Mesmo assim, nessas colônias normais cerca de 10% das operárias podem apresentar sinais iniciais de ativação do ovário (Jay, 1968, 1970; Kropacova e Haslbachova, 1969; Visscher, 1996), mas apenas um número menor que 0,01% das operárias chegam a ovipositar (Visscher, 1996), e posteriormente, 99,88% desses ovos de operárias são removidos pelo comportamento de “policiamento” (Visscher, 1989, 1996).

Porém, foi identificado um fenótipo comportamental extremamente raro, onde operárias mesmo na presença da rainha, ativam os seus ovários e começam a produzir número elevadíssimo de ovos haplóides, a ponto da maioria dos zangões da colmeia serem filhos dessas operárias, e não da rainha (Page e Erickson, 1988; Oldroyd et al., 1994).

Devido à ausência de um “policiamento” eficiente e/ou da proteção dos ovos contra o “policiamento”, e também devido a este comportamento extremo de oviposição mesmo na presença da rainha, essas operárias foram denominadas de “anarquistas” (Oldroyd et al., 1994). Oldroyd e colaboradores

realizaram análises genéticas empregando microssatélites, e observaram que 48 de 49 pupas de zangões pertenciam à mesma subfamília de operárias (Oldroyd et al., 1994). Em experimentos posteriores conseguiu-se identificar inclusive, algumas subfamílias que eram anarquistas. Porém, após a retirada da rainha, algumas subfamílias “anarquistas” deixaram de possuir essa dominância reprodutiva (Montague e Oldroyd, 1998). Conseqüentemente concluiu-se que a existência desse comportamento anarquista em abelhas melíferas demonstra que o policiamento caracteriza-se por um processo dinâmico, no qual interesses individuais são constantemente corrigidos para que haja um predomínio dos interesses reprodutivos da colmeia (Montague e Oldroyd, 1998).

Um fenômeno similar da reprodução de operárias mesmo na presença de rainha foi recentemente descrito em *Apis mellifera capensis*, raça caracterizada pela oviposição de ovos diplóides (replicação). Estas operárias poedeiras de *Apis mellifera capensis* são capazes de estabelecer-se em colmeias de *Apis mellifera scutellata*, comportando-se como parasita social. Após a eliminação da rainha nas colmeias das abelhas *scutellata*, a reprodução pseudo-clonal das operárias *capensis* (Stephen et al., 2002) acabam causando a perda da colmeia para o apicultor.

Portanto, observamos dois fenótipos extremos, um caracterizado pela produção de pseudo- clones de operárias, descrito por Martin e colaboradores, e a existência excepcional de abelhas anarquistas, descritas por Oldroyd e colaboradores, cujo predomínio reprodutivo dava-se em presença da rainha, mas nem todas essas linhagens anarquistas continuaram a produzir zangões após a orfandade (retirada da rainha). Já que em no nosso estudo (Makert e Hartfelder, 2000, 2002) as patrilineas na presença da rainha não apresentavam ativação ovariana e, portanto, não se caracterizam como abelhas anarquistas, propusemos que as “abelhas anarquistas” descritas por Oldroyd, poderiam representar um genótipo excepcional, enquanto que, nas condições de orfandade, algumas patrilineas poderiam dominar o conflito reprodutivo devido a sua maior facilidade de ativar os seus ovários e/ou por possuir maior número de ovários.

Objetivos

2. OBJETIVOS

O projeto tem como objetivo geral e principal testar a hipótese da provável existência de uma preferência dentre as linhagens paternas, quanto à ativação dos ovários das operárias que foram deixadas órfãs. Para tal, utilizaremos a técnica de análise de microssatélites, devido ao seu modo mendeliano de herança e sua alta variabilidade (Queller et al., 1993; Pamilo et al., 1997).

Portanto, esse trabalho aqui apresentado é um estudo que consistiu no desenvolvimento e aprimoramento de uma metodologia eficaz para testarmos através desta análise por microssatélites, a composição genética (patrilíneas) de colmeias para responder à pergunta, se há diferenças genéticas na probabilidade de operárias se tornarem poedeiras, através da comparação da representação de patrilíneas nas operárias em geral e nos filhos de operárias poedeiras. Além dessa comparação entre representação das patrilíneas, também foi verificada se existia uma relação entre o número de ovariolos, e a probabilidade da ativação dos ovários, nas respectivas patrilíneas.

Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Coleta de amostras

Foram coletadas amostras de 6 núcleos (núcleos Alfa, Beta, nº 27, nº 65, nº 67 e nº 127) de abelhas africanizadas do apiário experimental do Departamento de Genética da FMRP-USP em Ribeirão Preto.

3.1.1. Escolha de núcleos apropriados

Foi feita dissecação e análise de 72 operárias (dos 6 núcleos) imersas em solução de Ringer para insetos (NaCl 0,17M; KCl 0,01M; CaCl₂ 0,003M), para avaliar o número de ovariolos por ovário por operária. Escolhemos pelos demais trabalhos os núcleos que apresentaram maior variabilidade no número de ovariolos nas operárias.

Devido à necessidade de induzir a produção de zangões e coleta de amplo material de cada núcleo, os mesmos passaram por um processo de ampliação a ninho, com adição de mais 7 favos “limpos” (sem cria) aos inicialmente 3 favos pertencentes ao núcleo. Com essa metodologia duplicou-se o material inicial, sem adição de genótipos de outros núcleos.

3.1.2. Alelos da rainha e amostra populacional

Após ampliar os núcleos e estimulação da produção de zangões, foram coletados 50 zangões (30 zangões do ninho 65 e 20 do ninho 67) filhos da rainha, para determinação dos alelos maternos. A identificação dos alelos da rainha através dos seus filhos haplóides representa um método “não invasivo” à rainha, uma vez que procuramos repetir o experimento com a mesma colmeia. Ainda foram coletadas 400 operárias (250 do ninho 65 e 150 do ninho 67) para a determinação do número de linhagens paternas presentes na amostra populacional desses ninhos, e cálculo da frequência de cada uma destas patrilineas.

3.1.3. Operárias órfãs e seus filhos

Após remoção das rainhas os favos foram controlados diariamente (durante 11 dias) após a orfandade. Nessa condição de orfandade os favos com cria pronta para emergir foram colocados em uma estufa (34° C, 80 % u.r.), sendo que 700 operárias (350 do ninho 67 e 350 do ninho 65) foram marcadas com placas “Opalith”, e re-introduzidas nos respectivos ninhos.

A escolha da idade de coleta das operárias órfãs marcadas deu-se durante o projeto de iniciação científica, onde constatamos que em operárias mais velhas havia maior nitidez na diferenciação de “*status* ovariano” entre as diversas patrilineas da colmeia. Portanto operárias marcadas de 15 e 21 dias de idade foram recuperadas, totalizando 227 operárias marcadas. No ninho 65 foram recapturadas 117 operárias de 14 dias e 10 operárias de 21 dias de idade. Já no ninho 67 foram coletadas 84 operárias de 14 dias e 16 de 21 dias de idade.

Após um período prolongado de orfandade, iniciou-se de forma espontânea a produção de zangões filhos das operárias. Foram coletados 200 zangões filhos de operárias poedeiras (100 zangões de cada ninho), visando-se à identificação da existência (ou não) de linhagens paternas que possam ser predominantes na reprodução. Esses zangões coletados ainda na fase de pupa (para garantir que eram realmente filhos das operárias, e não de outras colmeias), foram colocados em placas de Petri forradas com papel de filtro, e mantidos em estufa a 34°C e 80% de umidade relativa, condições que permitem o desenvolvimento normal das pupas.

3.2. Ativação dos ovários

Para padronizar a avaliação do grau da ativação dos ovários das operárias em condições órfãs, estabelecemos os seguintes critérios (Tab. 1 e Fig. 1)

Tabela 1: Critérios adotados para a classificação dos estágios de ativação dos ovários em operárias.

Estágio	Características
A	Ovários ainda inativados, apresentando apenas o germário e folículos iniciais em fase de separação.
B	Início da pré-vitelogênese (e desta forma da ativação do ovário), com folículos claramente separados do germário. Pré-vitelogênese mais avançada, ovariolos com folículos semelhantes ao início da pré-vitelogênese, diferenciando-se porém devido ao maior volume de seus componentes (ovócito e trofário).
C	Fase inicial da vitelogênese, sendo que nos folículos o ovócito passa a ser maior que o trofário. Fase da coriogênese, apresentando ovócito muito volumoso e trofócitos extremamente reduzidos ("fase pré-oviposição").

Observar também a figura 1, logo abaixo:

Figura 1: Grau de ativação do ovário em operárias de *Apis mellifera*, e padronização com a tabela 1. (A) Ovários ainda inativados, apresentando apenas o germário e folículos iniciais em fase de separação; (B) Pré-vitelogênese com folículos claramente separados do germário; (C) Vitelogênese mais avançada, onde ovócito e trofário possuem maior volume, sendo que, ovócito é bem maior que o trofário. Esses desenhos são modificações dos originais encontrados em Snodgrass (1956) e Michener (1974).

3.3. Extração do DNA

O DNA foi extraído das antenas das abelhas, utilizando a metodologia de Innis et al. (1990) utilizando-se tampão de lise (Tris/HCl 0,005M, pH 8,5; KCl 0,01M; MgCl₂ 0,0025M; NP-40 1%, sacarose 13,8%) e 0,02% de proteinase K (Merck). Preferencialmente o DNA foi extraído de abelhas adultas (quando as antenas já estão bem quitinizadas), pois observamos melhor amplificação de nossas amostras.

Uma antena era retirada de cada abelha com pinça estéril e colocada em 102µl de solução de lise (100µl tampão lise com 2µl proteinase K - 10mg/ml).

3.4. Análise dos microssatélites

Empregamos na análise de nossas amostras *loci* de microssatélites com número de alelos suficientemente altos para detecção das diversas patrilineas em colmeias de *Apis mellifera*, seqüenciados (Estoup et al., 1994) e testados em diversas análises (Estoup et al., 1995a).

Dentre os 10 *loci* de microssatélites detectados em *Apis mellifera* e *Bombus terrestris* (Estoup et al., 1994; Estoup et al., 1995a e Estoup et al., 1995b), escolhemos os primers A88, A24 e A7 devido aos seus altos números de alelos detectados durante os experimentos do projeto de Iniciação Científica (FAPESP 99/05001-6).

As seqüências dos primers (sintetizadas pela Gibco BRL) foram as seguintes: primer A7 (A7A: 5'GTTAGTGCCCTCCTCTTGCG3' e A7B:5'CCCTTCCTCTTTCATCTTCC3'), primer A88 (A88A: 5'CGAATTAACCGATTTGTCG3' e A88B: 5'GATCGCAATTATTGAAGGAG3') e por fim primer A24 (A24A: 5'CACAAGTTCCAACAATGC3' e A24B:5'CACATTGAGGATGAGCG3').

Seguindo o método de Estoup et al. (1994) e Estoup e Turgeon (1996), as análises foram feitas através da técnica de PCR. Para a amplificação de uma amostra (uma reação) necessita-se de 15,5µl água Millipore, 2,5µl tampão de amplificação (DNA polymerase Reaction buffer 10x, Pharmacia Biotech), 0,2µl dNTPs (solução trabalho 0,2µM - 20,0µl de H₂O autoclavada + 20µl da

mistura de dNTPs da Ultrapure dNTP set 2'-deoxynucleoside 5'-triphosphate, Pharmacia Biotech), 3,0µl do primer A (50µM) e 3,0µl do primer B (50µM), além de 0,5µl Taq polimerase (Amersham Pharmacia Biotech, 5units/µl). Por fim adicionou-se 1,0µl de DNA da amostra e 1 gota de óleo mineral.

O equipamento termociclador utilizado para amplificação das amostras foi uma máquina Perkin Elmer, modelo 480. Após o passo de desnaturação por 3 minutos a 94°C, as amostras passaram pelo procedimento de PCR, sendo um programa de 30 ciclos que consistiu de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 58°C, e 30 segundos a 72°C. Após o último ciclo houve um passo de alongação por 10 minutos a 72°C. Este programa básico de PCR para microssatélites de *Apis mellifera*, atualmente usado também em outros estudos neste laboratório, foi testado e otimizado quanto à temperatura, número de ciclos e concentração de cloreto de magnésio.

3.5. Eletroforese e determinação dos genótipos

Foram utilizados géis de poliacrilamida (6%, 120x100x0,9 mm) para análise dos produtos de PCR dos microssatélites. Para um gel usou-se 9,2ml "Mix" (6,2ml água Millipore; 2ml acrilamida/bisacrilamida 30% - 29:1; 1ml tampão TBE 10X), 700µl APS (10%) e 7µl TEMED. Tampão TBE 10X (54g Tris; 27,5g ácido bórico; 300ml água Millipore; 20ml EDTA 0,5 M -18,6g em 100ml), sendo o pH: 8,3 – ajustar volume para 500 ml.

Aplicaram-se 5µl de amostra amplificada, diluída em 5µl de "loading buffer" (100µl TBE 10X pH 8,3; 200µl água Millipore; 400mg sacarose; 100µl bromophenol blue - 2,5%; 100µl "xylene cyanol" – 2,5%; 500µl ficol - 30%; 200µl EDTA 0,5M pH 8,0). Os marcadores de peso molecular foram "50 Base-Pair Ladder" (1µg/µl – Pharmacia) e também "100 Base Pair Ladder" (1µg/µl – Pharmacia).

Estes géis eram corados por prata, seguindo o método de Sanguinetti et al. (1994), sendo que se agitava o gel durante 5 minutos em 100ml de solução fixadora (144ml etanol absoluto; 6ml ácido acético; 750ml H₂O deionizada) com 700µl de nitrato de prata (15%). A solução "fixadora mãe" era constituída de 960ml etanol absoluto e 40ml de ácido acético.

Posteriormente lavava-se com água destilada por 10 segundos, adicionando-se em seguida 100ml de solução reveladora (100ml de solução de hidróxido de sódio 2,25% com 700 µl de formaldeído 37%). Agitava-se o gel na solução reveladora até a formação de “bandas”. Após formação de “bandas”, bloqueava-se rapidamente a reação por incubação do gel em 100ml de solução fixadora.

A secagem do gel era feita após mantê-lo 12 horas em solução bloqueadora (fixadora), sendo que o gel era revestido por papel celofane, e levado à secadora (Lab Gel Dryer modelo SE1160), a 75°C e a vácuo, durante 1h 30min.

3.6. Análise Estatística

3.6.1. Escolha dos núcleos apropriados

Utilizamos o programa “Sigma-Stat”, para avaliar se o número de ovários em operárias, dos núcleos inicialmente escolhidos, apresentava distribuição normal. Identificados quais núcleos apresentavam operárias com maior variabilidade de ovários, pôde-se prosseguir o trabalho com as amostras mais adequadas ao nosso experimento.

3.6.2. Análise da frequência das patrilineas

Através da leitura dos alelos de microssatélites nos géis, realizou-se uma listagem de todos alelos presentes nos *loci* analisados e após a identificação dos respectivos alelos maternos de cada *locus*, os alelos paternos foram inferidos por subtração. O programa GENEPOP, desenvolvido por Michel Raymond e Francois Rousset, Laboratoire de Genetique et Environment, Montpellier, França, permite cálculos para amostragens grandes, do número de homozigotos, heterozigotos, matriz genotípica, frequência alélica, frequência genotípica, além de testes de “Chi-quadrado” (“Hardy-Weinberg exact tests”) e “Fisher’s exact test”. O programa está disponível no web site <http://www.cefe.cnrs-mop.fr/>.

Uma vez definidos os alelos paternos de cada colmeia, pôde-se inferir o número mínimo de acasalamentos de cada rainha e calcular as respectivas freqüências das diferentes patrilineas nas operárias e a representação destas patrilineas nos filhos das operárias poadeiras (através da exclusão dos alelos maternos, e utilizando-se cálculo proporcional simples, além do auxílio do programa “Genepop version 3.3” que infere diretamente a proporção de homozigotos, heterozigotos e distribuição genotípica – consultar anexo I). A hipótese de que não haja diferença entre a representação percentual esperada das patrilineas, e a observada nos filhos das operárias poadeiras (baseada na sua representação nas colmeias), foi avaliada pelo teste “Chi-quadrado”. Porém, para a análise de nossos dados, com o auxílio e colaboração do Professor Dr. Robert Paxton, da Universidade de Tübingen, Alemanha, chegou-se à conclusão de que o método estatístico mais adequado ao nosso problema seria o “Fisher’s exact test” calculado através do programa “Struc.exe” rodado no programa “Genepop version 3.1c”.

Além desses programas, foram realizados o (I) cálculo da probabilidade de que um mesmo alelo pudesse ter vindo de 2 diferentes zangões, ou seja, de que patrilineas pudessem ser contadas como as mesmas:

$$(I) \quad P \hat{=} q_i^2 \text{ (Boomsma e Ratnieks, 1996; Paxton, 2000)}$$

e (II) o cálculo da probabilidade de que duas operárias tenham um alelo em comum, apesar de serem filhas de duas rainhas diferentes, fato que pode acontecer quando uma operária entra em colméia errada:

$$(II) \quad 4 \hat{=} p_i^2 - 2(\hat{=} p_i^2)^2 - 4 \hat{=} p_i^3 + 3 \hat{=} p_i^4 \text{ (Franck et al., 2000)}$$

3.7. Diagrama de fluxo do procedimento experimental

Os passos principais realizados durante o desenvolvimento de nossos experimentos, podem ser observados no diagrama logo a seguir:

DIAGRAMA DE FLUXO DO PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Análise dos ovários

4.1.1. Ovaríolos

Na análise dos ovaríolos dos 6 núcleos do apiário da USP-RP, detectou-se variabilidade nos diferentes núcleos analisados, como se observa a seguir:

Figura 2: Número de ovaríolos em operárias de abelhas africanizadas dos núcleos 27, 65, 67, 127, Alfa e Beta do apiário experimental do Departamento de Genética da USP de Ribeirão Preto. Foram analisadas 10 operárias por núcleo, com exceção dos núcleos 27 (20 operárias) e núcleo 65 (12 operárias).

Tabela 2: Número de ovários e análises estatísticas em operárias de abelhas africanizadas dos núcleos 27, 65, 67, 127, Alfa e Beta do apiário experimental do Departamento de Genética da USP de Ribeirão Preto.

Núcleo	Nº	Modo	Mediana	Distr. Normal*
27	20	2	2,0	+
65	12	4	4,0	-
67	10	2	3,5	-
127	10	2	2,0	+
Alfa	10	4	5,5	-
Beta	10	4	4,0	-

*testado por teste Kolmogorov Smirnov

Observa-se que a distribuição do número de ovários é muito diferenciada, de um núcleo para o outro. As medianas nos 6 núcleos analisados, por exemplo, apresentaram grande variabilidade. No núcleo 27 a mediana foi de 2,00 ovários por ovário em operárias coletadas aleatoriamente nesse núcleo. Portanto, o núcleo 27 foi considerado não apropriado ao nosso experimento.

Já no núcleo 65, a mediana foi de 4,00 ovários por ovário nas operárias, sendo esse núcleo, portanto, apropriado ao nosso experimento. Além desse núcleo, o núcleo 67 também foi considerado apropriado ao nosso experimento por apresentar uma mediana de 3,50 ovários por ovário em operárias coletadas aleatoriamente, além do núcleo alfa (mediana 5,5) e beta (mediana 4,0). A mediana no núcleo 127 também foi de 2,00 ovários por ovário em suas operárias.

Através do programa "Sigma-Stat", foi realizado o teste Kolmogorov Smirnov para avaliar se o número de ovários desses núcleos apresentam distribuição normal. Pode-se notar que apenas os núcleos 27 e 127 podem ser considerados, ter uma distribuição normal no que diz respeito ao número de ovários nas operárias.

Com relação ao modo, destacam-se os núcleos 65, alfa e beta que apresentaram o maior modo (= 4,0), sendo que os demais núcleos, apresentaram um modo igual a 2,0. Portanto os núcleos 65, 67, alfa e beta apresentam, no geral, operárias com maior número de ovários por ovário, caracterizando-se como os núcleos mais apropriados ao nosso experimento, em relação ao seu modo. Resolvemos utilizar nas análises apenas os núcleos 65 e 67, uma vez que o núcleo alfa substituiu a rainha durante o experimento e, do núcleo beta, foi coletada apenas uma amostragem parcial.

4.1.2. Análise da ativação dos ovários

Na dissecação de operárias órfãs (de 15 e 21 dias de idade) detectamos principalmente ovários em estágio A (conforme critérios de classificação apresentados na figura 1 e tabela 1), mostrando que a ativação dos ovários aparentemente é um processo bastante lento.

Tabela 3: Status ovariano em operárias de 15 dias em condições órfãs.

Status ovariano	Operárias do ninho 65		Operárias do ninho 67	
	Nº	%	Nº	%
A	79	69,91	61	73,49
B	11	9,74	14	16,87
C	23	20,35	8	9,64
Total	113	100	83	100

Este resultado demonstra-nos diferenças existentes entre as operárias dos ninhos 65 e 67, com relação à ativação dos ovários. Observa-se que, em ambos ninhos, o maior número de operárias não apresentaram ativação ovariana. No ninho 65 as operárias que se encontravam com status ovariano A chegou a 69,9% e, no ninho 67, este número foi proporcionalmente ainda maior (73,5% das operárias não apresentaram ativação ovariana).

No ninho 65 foram encontradas 9,7% de operárias que apresentavam ovários no início da sua ativação (*status B*), e 20,4% das operárias desse ninho estavam com folículos muito desenvolvidos (*status C*). Já no ninho 67 o observado foi justamente o oposto, ou seja, foram encontradas mais operárias

com ovários no início da ativação (16,9%), e apenas 9,6% operárias com “*status* ovariano C”.

Conseguimos ainda, avaliar o *status* ovariano em operárias órfãs coletadas com 21 dias (tabela 4).

Tabela 4: *Status* ovariano em operárias de 21 dias em condições órfãs.

<i>Status</i> ovariano	Operárias do ninho 65		Operárias do ninho 67	
	Nº	%	Nº	%
A	8	80,00	6	37,50
B	0	0,00	4	25,00
C	2	20,00	6	37,50
Total	10	100	16	100

Mesmo se tendo somente um pequeno número amostral, pode-se observar que, no caso do ninho 65, pelo menos em termos percentuais, o número de ovários muito ativados (“*Status* ovariano C”) em operárias de 21 dias foi equivalente ao percentual observado em abelhas de 15 dias. Fato a ser ressaltado, porém, é que no ninho 65 não foram observadas operárias, com “*status*” ovariano em fase de ativação inicial (“*status* B”).

Já no ninho 67, deve-se notar que aos 21 dias de idade houve um aumento (percentual) acentuado de operárias com alto grau de ativação ovariana. Apenas 37,5% das operárias não apresentaram ativação ovariana (com 14 dias de idade, esse percentual era de 73,5%), enquanto que 25% das operárias apresentaram ativação inicial ovariana, e um número elevado (37,5%) de operárias apresentou alto grau de ativação ovariana (apenas 9,6% das operárias de 15 dias de idade apresentavam *status* ovariano C).

4.2. Análise de microssatélites do ninho 65 em géis

4.2.1. Alelos da rainha do ninho 65

Pode-se observar abaixo os dois alelos maternos identificados no ninho 65. Esses alelos foram obtidos a partir de amplificação do DNA que foi extraído da antena dos zangões filhos da rainha desse ninho.

Com essa metodologia foi possível a identificação dos alelos maternos sem causar nenhum dano à rainha.

Figura 3: Alelos maternos da rainha do ninho 65 detectados por amplificação com primer A88. Na amostra de 18 zangões (números 1 a 18) conseguiu-se distinguir os dois alelos maternos, denominados de 1 e 3. O marcador (100bp) de peso molecular está representado pela letra M.

4.2.2. Amostra populacional das operárias do ninho 65

Os mesmos alelos foram constantemente encontrados também nas outras abelhas dessa população.

Figura 4: Patrilineas na amostra populacional do ninho 65 detectadas por amplificação com primer A7. Neste gel de 17 operárias (números 1031 a 1047) conseguiu-se distinguir 4 alelos diferentes, denominados de 1 a 4. O marcador (100bp) de peso molecular está representado pela letra M.

Enquanto que a figura 4 representa os alelos discernidos com o microssatélite A7, a figura 5 apresenta os alelos encontrados na amplificação com os microssatélites A24 e A88, no ninho 65.

Figura 5: Patrilineas na amostra populacional do ninho 65 detectadas por amplificação com primer A88 e A24. Neste gel de 17 operárias (números 31 a 47) conseguiu-se distinguir 8 alelos diferentes, denominados de 1 a 4 em cada microsatélite. O marcador (100bp) de peso molecular está representado pela letra M.

Pode se observar nestes géis a grande eficácia da metodologia utilizada pois, apesar do pequeno número de amostras aqui apresentadas, observa-se uma alta variabilidade no número de patrilineas (representados por alelos diferentes destes 3 microsatélites) nos ninhos.

Deve-se notar que tanto a figura 3, quanto a figura 4 e 5, representam genótipos de um mesmo ninho (ninho 65), apresentando assim o mesmo alelo materno, em cada microsatélite. A figura 3 representa 18 amostras dos 30 zangões filhos da Rainha que foram coletados no ninho 65, visando-se à identificação dos 2 alelos maternos com o microsatélite A88. Na figura 4 pode-se observar a existência de 4 alelos, compondo diferentes linhagens paternas presentes na amostra populacional do ninho 65, identificadas com o primer A7. Já na figura 5, observa-se 8 alelos diferentes na amostra populacional, sendo 4 alelos do primer A88, e 4 alelos do primer A24. Pode se observar na figura 5, que as patrilineas em algumas amostras estão representadas pelos alelos 2 e 4 do primer A88, por exclusão dos alelos maternos 1 e 3 (figura 3). As conclusões sobre representação diferencial de patrilineas, relativa às demais linhagens, necessitaram avaliação de mais dados pelo programa Genepop e apropriados testes estatísticos, apresentados na análise estatística, e pormenorizados na discussão (capítulo 5).

4.2.3. Zangões filhos de operárias do ninho 65

Abaixo temos os genótipos e respectivos alelos de alguns zangões originados da produção de ovos haplóides, por parte de algumas das operárias órfãs do ninho 65. Deve-se notar que na amostra 1416 detectam-se dois alelos, podendo significar que este zangão era diplóide, ou que uma banda é espúria, e por esse motivo esta mais fraca (banda 3).

Figura 6: Patrilineas na amostra de zangões filhos de operárias poedeiras do ninho 65 detectadas por amplificação com primer A7. Na amostra de 16 pupas (números 1402 a 1417) conseguiu-se distinguir 3 alelos diferentes, denominados de 1, 3, e 4. O marcador (50bp) de peso molecular está representado pela letra M. Deve-se notar a amostra 1416, onde observou-se 2 bandas, sendo que pode-se tratar de um zangão diplóide, ou de banda espúria.

4.3. Análise de microssatélites do ninho 67 em géis

4.3.1. Alelos da rainha do ninho 67

Pode-se observar abaixo os dois alelos maternos identificados no ninho 67. Esses alelos foram obtidos a partir de amplificação do DNA que foi extraído da antena dos zangões filhos da rainha desse ninho.

Figura 7: Alelos maternos da rainha do ninho 67 detectados por amplificação com os primers A88 e A24. Na amostra de 18 zangões (números 601 a 620) conseguiu-se distinguir os dois alelos maternos, denominados de 2 e 3 para o A88, e 1 e 3 para o A24. O marcador de peso molecular (50bp) está representado pela letra M.

4.3.2. Amostra populacional das operárias do ninho 67

A figura 8 apresenta os alelos encontrados na amplificação com os microssatélites A24 e A88, no ninho 67. Os mesmos genótipos foram constantemente encontrados também nas outras abelhas dessa população.

Figura 8: Patrilineas na amostra populacional do ninho 67 detectadas por amplificação com primer A88 e A24. Neste gel de 19 operárias (números 732 a 751) conseguiu-se distinguir 8 alelos diferentes, denominados de 1 a 4 em cada microssatélite. O marcador de peso molecular (50bp) está representado pela letra M.

Deve-se notar que tanto a figura 8, quanto a figura 9, representam genótipos de um mesmo ninho (ninho 67), apresentando assim o mesmo alelo materno, em cada microssatélite. A figura 8 representa 18 amostras dos 30 zangões filhos da rainha que foram coletados no ninho 67, visando-se à identificação dos 2 alelos maternos (1 e 3) com o microssatélite A88, e dos dois alelos maternos (1 e 3) com o microssatélite A24. Já na figura 9, observam-se 8 alelos diferentes na amostra populacional, sendo 4 alelos do primer A88, e 4 alelos do primer A24. Pode se observar na figura 9, que as patrilineas em algumas amostras estão representadas pelos alelos 2 e 4 do primer A88, por exclusão dos alelos maternos 1 e 3 (figura 8). As conclusões sobre representação diferencial de patrilineas relativa aos demais, serão apresentadas durante a avaliação de mais dados pelo programa Genepop e apropriados testes estatísticos.

4.3.3. Operárias marcadas (14 e 21 dias) do ninho 67, cujos ovários foram analisados

Além dos genótipos observados na figura anterior, foram encontrados na amostra de operárias marcadas do ninho 67, cujo *status* ovariano foi analisado, genótipos que também representam patrilineas com amplificação dos

microssatélites A24 e A88. Estes genótipos podem ser observados na figura abaixo:

Figura 9: Patrilineas na amostra de operárias marcadas do ninho 67, cujo *status* ovariano foi analisado. Na amostra de 18 abelhas (790 a 807) conseguiu-se distinguir 7 alelos denominados de 1 a 4 no microssatélite A88, e de 1, 3 e 4 no microssatélite A24. O marcador (50bp) de peso molecular está representado pela letra M.

4.3.4. Zangões filhos de operárias do ninho 67

Abaixo temos os genótipos de alguns zangões originados da produção de ovos haplóides, por parte de algumas das operárias órfãs do ninho 67. Quando se tornaram pupas de olho marrom, foram coletadas para análise dos seus genótipos.

Assim como na colmeia 65, todas amostras foram amplificadas tanto com o primer A24 quanto com o primer A88, como pode-se observar na figura seguinte.

Figura 10: Patrilineas na amostra de zangões filhos de operárias poedeiras do ninho 67 detectadas por amplificação com os primers A24 e A88. Na amostra de 11 pupas (números 967 a 977) conseguiu-se distinguir 6 alelos diferentes, denominados de 1, 2 e 3 para o A88, e de 1, 3 e 4 para o A24. O marcador (50bp) de peso molecular está representado pela letra M.

4.4. Análise estatística ninho 65

Dentre os testes estatísticos disponíveis atualmente na literatura, optou-se pelo emprego do programa “GENEPOP”, e pelo “FISHER’s EXACT TEST”. Na análise das amostras aplicadas em géis, foram identificados 4 alelos (denominados de 1 a 4) para cada um dos microssatélites. Com a identificação dos alelos nas rainhas, na amostra populacional, nas operárias órfãs e seus filhos, pôde-se aplicar estes testes estatísticos.

4.4.1. Frequências alélicas da amostra populacional e zangões filhos das operárias do ninho 65

Neste ponto, onde analisamos as frequências alélicas, é importantíssimo lembrar quais são os alelos maternos, pois devido à condição de monoginia (todos indivíduos da colmeia são filhos de uma rainha), é esperado que os alelos maternos possuam frequência elevada na amostra populacional. Os alelos maternos no ninho 65 são os seguintes:

- para o microssatélite A88: alelos 1 e 3
- para o microssatélite A24: alelos 2 e 3
- para o microssatélite A7: alelos 1 e 3

Inicialmente foi feita a “análise direta dos alelos” em cada indivíduo (anexo 1), cujo resultado pode ser observado na tabela 5:

Tabela 5: Análise das “*freqüências alélicas diretas*” de três microssatélites em operárias de abelhas africanizadas na presença da rainha, e em zangões filhos de operárias produzidas após a retirada da rainha do ninho 65. Em destaque observam-se alelos, cuja representação após a orfandade foi reduzida, e em negrito alelos que aumentaram de freqüência na amostra dos filhos das operárias.

Amostra populacional							Zangões, filhos de operárias órfãs						
Alelos	Primer						Alelos	Primer					
	A88		A24		A7			A88		A24		A7	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%		Nº	%	Nº	%	Nº	%
1	109	32	35	10	99	20	1	38	47	7	8	19	22
2	27	8	85	24	75	16	2	23	29	2	2	1	1
3	119	34	152	43	255	53	3	6	7	30	35	50	57
4	89	26	82	23	55	11	4	14	17	47	55	18	20
Total	344	100	354	100	484	100	Total	81	100	86	100	88	100

Observa-se que o “alelo 1” do microssatélite A88 que se apresentava em uma freqüência de 32% na amostra populacional, em condição de orfandade, passou a uma freqüência de 47% em zangões filhos dessas operárias deixadas órfãs. Outro alelo, cuja freqüência foi elevada após a orfandade, foi o “alelo 2” (29%). Já o “alelo 3” caiu para 34% dos alelos na amostra populacional, passou para apenas 7% após a orfandade.

No microssatélite A24, o “alelo 4” foi o que predominou após a orfandade, correspondendo a 55% dos alelos presentes nos zangões filhos das operárias. O segundo alelo do microssatélite A24, com representatividade significativa após a orfandade, foi o “alelo 3” (35%). O “alelo 2” representou apenas 2% dos alelos do microssatélite A24, após a orfandade.

Já no caso do microssatélite A7, o “alelo 3” (cuja freqüência na amostra populacional era de 53%) apresentou uma freqüência de 57% na amostra dos zangões filhos das operárias órfãs. O segundo alelo mais freqüente foi o “alelo 1”, representando 22% de todos os alelos após a orfandade. Aqui também o “alelo 2” teve representatividade baixa, apenas 1% dos alelos presentes nos zangões filhos das operárias órfãs. Portanto observaremos aqui que, no caso do microssatélite A88, o alelo mais representado após a orfandade, é o “alelo 1”, um dos alelos maternos. Já o “alelo 2”, segundo mais presente após a

orfandade (quase um terço das amostras), representa apenas uma única patrilinea, pois a rainha não era portadora desse alelo.

No caso do microssatélite A24, o alelo predominante após a orfandade foi o “alelo 4” (mais da metade dos zangões possuía esse “alelo 4”). É de suma importância realçar que o “alelo 4” não estava presente na rainha. Esta por sua vez, teve os “alelos 1 e 3” identificados, sendo que este último alelo, na condição de orfandade continuou com representatividade alta.

O único microssatélite, cujos dados foram pouco informativos, foi o microssatélite A7, devido ao fato que os alelos que predominaram após a orfandade (patrilineas transmitidas após a orfandade) serem os mesmos que os alelos maternos. Deve-se notar que inclusive as percentagens antes e após a orfandade foram muito semelhantes. Devido à “coincidência” dos alelos maternos no microssatélite A7 serem os mesmos que predominaram após a orfandade, dar-se-á mais atenção aos microssatélites A88 e A24, por possuírem “alelos não maternos” com representação diferenciada após a orfandade.

4.4.2. Genótipos (A88/A24) do ninho 65

A partir da “análise direta dos alelos” em cada indivíduo, foi possível construir-se a tabela 6, onde são representados os genótipos transmitidos após a orfandade:

Tabela 6: Análise das patrilineas nos zangões filhos de operárias produzidas em condição de orfandade no ninho 65, do apiário experimental do Depto. de Genética da USP de Ribeirão Preto.

Patrilineas transmitidas na condição de orfandade							
Alelos A88/A24	Nº de zangões	Alelos A88/A24	Nº de zangões	Alelos A88/A24	Nº de zangões	Alelos A88/A24	Nº de zangões
1/1	4	2/1	1	3/1	-	4/1	1
1/2	1	2/2	-	3/2	-	4/2	-
1/3	5	2/3	11	3/3	4	4/3	6
1/4	28	2/4	10	3/4	2	4/4	6

A análise aqui apresentada contém apenas os microssatélites A88 e A24, pois como citado anteriormente, no microssatélite A7 os alelos paternos

transmitidos na condição de orfandade são os mesmos que os alelos maternos (alelos 1 e 3). Portanto, devido as patrilíneas transmitidas após a orfandade (dos microssatélites A88 e A24) não possuírem alelos que coincidem com os alelos maternos, estes foram denominados de “*alelos decisivos*”.

Foi possível identificar 12 prováveis patrilíneas (com os microssatélites A88 e A24) representadas na próxima geração (zangões), na condição de orfandade do ninho 65. Deve-se observar que nesta análise com os microssatélites A88 e A24 (4 alelos identificados em cada microssatélite), o número máximo de genótipos (patrilíneas) que poderiam ter sido transmitidos seria de 16 genótipos diferentes:

Foram encontrados 12 genótipos (patrilíneas), indicando-nos que quase todas as patrilíneas foram transmitidas, mesmo em condição de orfandade. Porém, deve-se notar que a frequência de transmissão dos alelos (conseqüentemente patrilíneas) foi muito diferenciada, de patrilínea para patrilínea. Enquanto algumas patrilíneas não foram transmitidas (genótipos 2/2, 3/1, 3/2 e 4/2) à geração seguinte (zangões), as patrilíneas 1/4, 2/3 e 2/4 apresentaram-se com frequências elevadas de 0,35, 0,14 e 0,13 respectivamente. Esses dados indicam que possam existir diferenças no potencial reprodutivo entre as patrilíneas.

4.4.3. Patrilíneas na amostra populacional do ninho 65

Os genótipos tanto da amostra populacional, quanto dos zangões filhos das operárias órfãs, foram transformados em todas possíveis patrilíneas, através da exclusão dos alelos maternos (considerando-se os microssatélites A88/A24/A7).

Em outras palavras, após a identificação dos respectivos alelos maternos de cada *locus*, os alelos paternos foram inferidos por subtração. Os resultados podem ser observados na tabela 7.

Além do cálculo manual de subtração dos alelos maternos (tabela 7), para detecção das patrilíneas, os genótipos também foram inseridos no programa GENEPOP (Version 3.3), e analisados pelo programa de cálculo de frequências alélicas e genotípicas, além de fornecer o número de homozigotos e heterozigotos de cada *locus* (anexo I).

Tabela 7: Possíveis patrilíneas em operárias da amostra populacional do ninho 65.

Rainha	A88	A24	A7	Amostra
# Patrilíneas	Alelos maternos 1/3	Alelos maternos 2/3	Alelos maternos 1/3	Nº de operárias
1	1	1	2	1
2	1	1	3	2
3	1	1	4	1
4	1	1	1/3	1
5	1	2	3	2
6	1	2	2	3
7	1	2	4	1
8	1	2	1/3	4
9	1	2/3	1/3	1
10	1	3	2	2
11	1	3	3	3
12	1	3	4	4
13	1	3	1/3	3
14	1	4	2	1
15	1	4	3	3
16	1	4	4	2
17	1	4	1/3	2
18	1/3	3	1/3	1
19	1/3	4	3	1
20	2	3	2	1
21	2	3	3	1
22	2	3	4	1
23	2	4	1/3	1
24	3	1	3	1
25	3	1	4	1
26	3	1	1/3	1
27	3	2	1/3	2
28	3	2	3	3
29	3	3	2	3
30	3	3	3	2
31	3	3	4	4
32	3	3	1/3	4
33	3	4	2	5
34	3	4	3	6
35	3	4	4	3
36	3	4	1/3	4
37	4	1	2	1
38	4	1	3	3
39	4	1	1/3	1
40	4	2	2	3
41	4	2	3	2
42	4	2	4	2
43	4	3	2	6
44	4	3	3	6
45	4	3	4	5
46	4	3	1/3	3
47	4	4	2	1
48	4	4	3	5
49	4	4	4	1
Total = 49	A88	A24	A7	<i>Total = 120</i>

Os dados obtidos pelo emprego do programa GENEPOP (Version 3.3) nessa amostra populacional podem ser vistos no anexo I.

A função principal dessa tabela 7, é identificar a frequência das patrilineas na amostra populacional. Observa-se que o número de possíveis patrilineas na amostra populacional do ninho 65 foi de 49. Porém, deve-se notar que muitas dessas patrilineas certamente não existem, devido aos dois alelos em cada microssatélite (6 alelos no total) que os zangões filhos de operárias possuem em comum com a rainha. Então existem amostras (como indivíduos da patrilinea 39) onde não pode se afirmar qual alelo é o paterno, e qual é o materno. Esse problema, em saber-se com certeza qual o número mínimo de patrilineas presente no ninho (e se esses alelos não vieram de outro ninho), foi solucionado através de quatro estratégias principais. Em parte, (1) através da análise estatística da (item 4.4.4) probabilidade do mesmo alelo ter vindo de dois diferentes zangões, ou seja, de que patrilineas possam ser contadas como as mesmas. Ainda adotando-se análise estatística, também foi feito (2) o cálculo da (item 4.4.5) probabilidade de que 2 operárias tenham um alelo em comum, apesar de serem filhas de duas rainhas distintas. Ainda assim, foi feita a (3) observação das patrilineas na amostra de operárias marcadas (item 4.4.6), onde se pode afirmar com certeza que todas as patrilineas são deste ninho, pois todas abelhas foram coletadas quando recém nascidas, e marcadas. E finalmente, as patrilineas dos (4) zangões filhos das operárias órfãs (item 4.4.7) é que nos forneceram a resposta definitiva à pergunta de qual o número mínimo de patrilineas, e quais patrilineas realmente estão presentes e pertencem ao ninho, pois esses zangões foram coletados ainda na fase de pupa (certamente pertenciam ao ninho).

Além da análise das patrilineas dos zangões filhos das operárias órfãs fornecer-nos a resposta, de qual era o número mínimo de patrilineas presentes no ninho (e quais alelos realmente pertenciam a esse ninho), mais importante ainda ao nosso trabalho foi à comparação da representatividade das patrilineas dos zangões filhos dessas operárias, com a representatividade das patrilineas da amostra populacional. Essa comparação de representatividade de patrilineas dos zangões (filhos das operárias órfãs), com as patrilineas da amostra populacional, nos indicou quais patrilineas predominaram após a orfandade (item 4.4.7). Já se observou que com os três microssatélites

A88/A24/A7, houve uma representatividade proporcionalmente significativa (item 4.4.2) de algumas patrilineas, após a orfandade. Porém, no item 4.4.7, ainda fizemos o “Fisher’s exact test” considerando as patrilineas, dos três microssatélites utilizados na análise das amostras do ninho 65.

Por fim, ainda foram analisadas as relações entre, patrilineas e o *status* ovariano nas operárias órfãs (item 4.4.8), e também entre patrilineas e o número de ovários (item 4.4.10) nessas mesmas operárias do ninho 65, uma vez que através dessas novas abordagens procuramos identificar mecanismos pelos quais patrilineas predominaram após a orfandade.

4.4.4. Probabilidade do mesmo alelo ter vindo de dois diferentes zangões (ninho 65)

No anexo II pode ser visto em detalhes como foi feito o cálculo da probabilidade de que um mesmo alelo pudesse ter vindo de dois diferentes zangões, ou seja, de que patrilineas pudessem ser contadas como as mesmas:

$$P \text{ à } q_i^2 = 0,29$$

4.4.5. Probabilidade de duas operárias possuírem um alelo em comum (ninho 65)

Cálculo da probabilidade de que duas operárias tenham um alelo em comum (anexo III), apesar de virem de duas rainhas diferentes:

$$4 \text{ à } p_i^2 - 2(\text{à } p_i^2)^2 - 4 \text{ à } p_i^3 + 3 \text{ à } p_i^4 = 0,38$$

4.4.6. Frequência de patrilineas em operárias marcadas do ninho 65

Utilizando apenas os primers A88 e A24, por se tratarem dos microssatélites cujos alelos foram denominados de “*alelos decisivos*” (item 4.4.2), conseguimos distinguir até 14 patrilineas diferentes nas operárias marcadas do ninho 65 (tabela 8).

Tabela 8: Frequência de patrilineas analisadas pelos microssatélite A88 e A24 nas operárias marcadas do ninho 65. Destacada está a única patrilinea, cuja representação foi acima de 10 operárias.

# das Patrilineas	Alelos paternos		Frequência em operárias marcadas do ninho 65	
	A88	A24	Número	%
1	1	1	6	7,1
2	1	2	4	4,7
3	1	3	8	9,4
4	2	1	4	4,7
5	2	2	5	5,8
6	2	3	2	2,4
7	2	4	9	10,6
8	3	1	11	12,9
9	3	2	8	9,4
10	3	3	8	9,4
11	3	4	9	10,6
12	4	1	2	2,4
13	4	3	7	8,2
14	4	4	2	2,4
Total=14	A88	A24	85	100

Pode-se observar que nas operárias marcadas do ninho 65 não há um predomínio com respeito a patrilinea. A patrilinea 8 (alelos 3 e 1) foi à única que teve representatividade acima de 10 indivíduos. Deve-se salientar, porém, que a patrilinea 8 possui o alelo 3 do microssatélite A88 (um alelo também presente na rainha). Apesar de sabermos que as operárias marcadas também representavam uma parte da amostra populacional (além de termos a certeza de que todas pertenciam ao ninho 65, pois foram marcadas ao nascer), optamos por considerar o teste de Fisher da relação entre amostra

populacional e zangões filhos das operárias (item 4.4.7), por não termos encontrado todas as patrilineas dos zangões (20 patrilineas – tabela 9) nesta amostra de operárias marcadas (14 patrilineas – tabela 8).

4.4.7. Patrilineas na amostra populacional e amostra de zangões produzidos por operárias órfãs no ninho 65

Inicialmente calculou-se patrilineas utilizando os microssatélites A88, A24 e A7. As patrilineas na amostra populacional podem ser consideradas como “patrilineas não 100% identificáveis”, devido principalmente aos alelos das patrilineas analisadas pelo microssatélite A7 serem os mesmos alelos maternos 1 e 3. Conseqüentemente em várias patrilineas não se pôde afirmar se o alelo 1, ou o alelo 3, é que vinha do zangão (e o outro da rainha).

Portanto, a resposta a qual era o mínimo de patrilineas presentes no ninho 65, não podia ser obtida somente através da análise da amostra populacional. Esta resposta foi obtida através das patrilineas dos zangões filhos das operárias órfãs. As patrilineas dos zangões podem ser consideradas como “patrilineas 100% identificáveis” pois foram as possíveis de identificação com os 3 microssatélites. Sabemos também, que todos eles realmente pertenciam ao ninho 65 (por terem sido coletados ainda na fase de pupa). Portanto, aqui sim se pode inferir que o mínimo de patrilineas (identificadas com A88/A24/A7) presentes no ninho 65 foi de 20 patrilineas (dos zangões - tabela 9).

Tabela 9: Patrilineas na amostra populacional e na amostra de zangões produzidos por operárias órfãs no ninho 65. Na análise foram utilizados os três microssatélites (A88/A24/A7). As patrilineas destacadas (15, 16, 21 e 23) representam linhagens cujo valor observado de indivíduos contendo esses alelos foi muito superior a frequência esperada. O valor observado foi calculado a partir das frequências das patrilineas encontradas na amostra de zangões filhos das operárias órfãs, e o valor esperado foi calculado a partir das frequências das mesmas patrilineas, mas na amostra populacional.

Patrilineas		Operárias		Zangões			
Amostra populacional	Zangões			Observado		Esperado	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%
1		1	0,83	0	0,00	0,5893	0,83
2		2	1,67	0	0,00	1,1857	1,67
3	1	1	0,83	2	2,82	0,5893	0,83
4	2	1	0,83	2	2,82	0,5893	0,83
5		2	1,67	0	0,00	1,1857	1,67
6		3	2,50	0	0,00	1,7750	2,50
7		1	0,83	0	0,00	0,5893	0,83
8	3	4	3,34	1	1,41	2,3700	3,34
9		1	0,83	0	0,00	0,5893	0,83
10		2	1,67	0	0,00	1,1857	1,67
11	4	3	2,50	4	5,63	1,7750	2,50
12	5	4	3,34	1	1,41	2,3700	3,34
13		3	2,50	0	0,00	1,7750	2,50
14	6	1	0,83	1	1,41	0,5893	0,83
15	7	3	2,50	14	19,72	1,7750	2,50
16	8	2	1,67	9	12,68	1,1857	1,67
17	9	2	1,67	4	5,63	1,1857	1,67
18		1	0,83	0	0,00	0,5893	0,83
19		1	0,83	0	0,00	0,5893	0,83
20		1	0,83	0	0,00	0,5893	0,83
21	10	1	0,83	7	9,86	0,5893	0,83
22		1	0,83	0	0,00	0,5893	0,83
23	11	1	0,83	8	11,26	0,5893	0,83
24		1	0,83	0	0,00	0,5893	0,83
25		1	0,83	0	0,00	0,5893	0,83
26		1	0,83	0	0,00	0,5893	0,83
27		2	1,67	0	0,00	1,1857	1,67
28		3	2,50	0	0,00	1,7750	2,50
29		3	2,50	0	0,00	1,7750	2,50
30	12	2	1,67	3	4,22	1,1857	1,67
31	13	4	3,34	1	1,41	2,3700	3,34
32		4	3,34	0	0,00	2,3700	3,34
33		5	4,17	0	0,00	2,9607	4,17
34	14	6	5,00	1	1,41	3,5500	5,00
35		3	2,50	0	0,00	1,7750	2,50
36	15	4	3,33	1	1,41	2,3699	3,33
37		1	0,83	0	0,00	0,5893	0,83
38	16	3	2,50	1	1,41	1,7750	2,50
39		1	0,83	0	0,00	0,5893	0,83
40		3	2,50	0	0,00	1,7750	2,50
41		2	1,67	0	0,00	1,1857	1,67
42		2	1,67	0	0,00	1,1857	1,67
43		6	5,00	0	0,00	3,5500	5,00
44	17	6	5,00	4	5,63	3,5500	5,00
45		5	4,17	0	0,00	2,9607	4,17
46	18	3	2,50	2	2,82	1,7750	2,50
47		1	0,83	0	0,00	0,5893	0,83
48	19	5	4,17	4	5,63	2,9607	4,17
49	20	1	0,83	1	1,41	0,5893	0,83
Total=49	Total=20	120	100	71	100	71	100

Mesmo existindo esse detalhe metodológico da não diferenciação dos alelos materno e paterno, nos poucos casos onde ambos alelos eram os mesmos, o teste de Fisher (“Genepop version 3.1c, Prog. Struc.exe”) acusou a diferença entre a representatividade das patrilineas antes e após a orfandade como **“NÃO ALEATÓRIA”**, pois a **probabilidade de aleatoriedade foi igual a 0,00124 e S.E. igual a 0,00057** (anexo IV - Fisher dos zangões). Ainda assim, para reforçar a existência de patrilinea com representatividade diferenciada após a orfandade, realizamos outras análises (item 4.4.8 a 4.4.11) utilizando-se apenas os microssatélites A24 e A88 (pois nesses microssatélites os alelos predominantes após a orfandade não eram os mesmos presentes na rainha), que podem ser vistas a seguir.

4.4.8. Relação entre patrilineas e a ativação ovariana nas operárias marcadas do ninho 65

Analizamos o “*status* ovariano” das operárias marcadas, cujos genótipos foram apresentados no item (4.4.6). Aqui estabeleceremos a relação entre essas patrilineas apresentadas anteriormente, com a ativação ovariana dessas operárias marcadas do ninho 65.

Deve-se notar que, nessa tabela 10, houve também a preocupação em calcular-se o peso de cada genótipo observado. Esse cálculo do “peso” é o resultado da divisão do total de indivíduos analisados, pelo número de indivíduos de cada patrilinea.

$$\text{Peso} = \frac{\text{Número total de indivíduos analisados}}{\text{número de indivíduos de cada patrilinea}}$$

Esse peso aqui calculado (apresentado nessa tabela 10), será posteriormente empregado no cálculo da tabela 11, ou seja, na tabela normalizada pela frequência das patrilineas do ninho 65.

Tabela 10: Relação patrilineas – ativação ovariana no ninho 65. O *status* ovariano aumenta de A para C, sendo de inativo (A) para ovogênese evidente (C). Destacadas estão as patrilineas cuja ovogênese era evidente (*status* C).

P A T R I L I N E A	A L E L O S	A L E L O S	Status ovariano			T o t a l	P e s o
	A88	A24	A	B	C		
1	1	1	5	1		6	13,5
2	1	2	4			4	20,25
3	1	3	4	1	3	8	10,125
4	2	1	4			4	20,25
5	2	2	4	1		5	16,2
6	2	3	1		1	2	40,5
7	2	4		1	8	9	9
8	3	1	11			11	7,364
9	3	2	7	1		8	10,125
10	3	3	6	1	1	8	10,125
11	3	4	5		4	9	9
12	4	1	2			2	40,5
13	4	3	4			4	20,25
14	4	4	1			1	81
Total	A88	A24	58	6	17	81	

Deve-se notar que os indivíduos das patrilineas 2, 4, 8, 12, 13 e 14 representam significativos 32,1% de indivíduos analisados (26 operárias, de 81 operárias analisadas), sendo que, todas essas operárias possuíam ovários completamente inativos (*status* A). Podemos observar também que, em termos numéricos, as patrilineas 3, 6, 7, 10 e 11 foram às únicas 5 (de 14 patrilineas) que apresentaram o *status* ovariano C. Os indivíduos da patrilinea 7 representam 39,13% (9 operárias, de 23 indivíduos) das operárias com ovário

ativado (status B), e 47,06% (8 operárias, de 17 indivíduos) das operárias poedeiras (status C). A partir dessa tabela, construiu-se o gráfico (figura 11) a seguir.

Figura 11: Relação patrilineas – ativação ovariana nas operárias marcadas do ninho 65

Deve-se notar ainda, a diferença do número de indivíduos encontrados em cada patrilinea. Devido a essa diferença numérica, apresentaremos a seguir uma tabela normalizada desses mesmos dados, para possibilitar visualização e análise mais nítidas.

4.4.9. Frequências normalizadas da relação entre patrilineas e a ativação ovariana nas operárias marcadas do ninho 65

A tabela 11 apresenta as frequências das patrilineas e o seu “status ovariano” normalizado pelo “peso”, calculado na tabela 10.

Tabela 11: Frequências normalizadas das patrilineas e o *status* ovariano nas operárias do ninho 65. Destacadas estão as patrilineas cuja ovogênese era evidente (*status* C).

P A T R I L I N E A	A L E L O S	A L E L O S	Status ovariano			P e s o	T o t a l
	A88	A24	A	B	C		
1	1	1	67,5	13,5		13,5	81
2	1	2	81			20,25	81
3	1	3	40,5	10,125	30,375	10,125	81
4	2	1	81			20,25	81
5	2	2	64,8	16,2		16,2	81
6	2	3	40,5		40,5	40,5	81
7	2	4		9	72	9	81
8	3	1	81			7,364	81
9	3	2	70,875	10,125		10,125	81
10	3	3	60,75	10,125	10,125	10,125	81
11	3	4	45		36	9	81
12	4	1	81			40,5	81
13	4	3	81			20,25	81
14	4	4	81			81	81

Com a normalização dos dados da tabela 10, observa-se mais nitidamente aqui na tabela 11 a diferença existente entre as 5 patrilineas que apresentaram operárias com status ovariano C, e as 6 patrilineas cujas operárias não apresentavam ativação ovariana (status A).

Também foi construído um gráfico (figura 12) a partir da tabela 11:

Aqui nesta figura 12 observa-se ainda mais nitidamente que, enquanto todas as operárias da patrilinea 7 apresentaram ativação ovariana (status B e status C), todas operárias das patrilineas 2, 4, 8, 12, 13 e 14 apresentaram operárias cujos ovários estavam completamente inativados (status A).

4.4.10. Relação entre patrilineas e o número de ovários nas operárias do ninho 65

Além da análise do status ovariano, também fizemos a contagem do número de ovários que cada abelha marcada apresentava.

Tabela 12: Relação entre patrilinea e o número de ovariolos em operárias marcadas no ninho 65. O peso de cada patrilinea foi calculado através da divisão do total de indivíduos analisados, pelo número de indivíduos de cada patrilinea. Destacada está a patrilinea cujo número de ovariolos por ovário foi elevado.

Patrilineas	Número de ovariolos						P e s o
	2-3	4-5	6-7	8-10	11-12	Total	
1	1	4	1			6	13,5
2	3	1				4	20,25
3	5	2		1		8	10,125
4	1	2	1			4	20,25
5	2	3				5	16,2
6	1	1				2	40,5
7	1	1	4	2	1	9	9
8	5	4	2			11	7,364
9	5	2	1			8	10,125
10	4	4				8	10,125
11	1	7		1		9	9
12	1	1				2	40,5
13	2	2				4	20,25
14	1					1	81
Total	33	34	9	4	1	81	

Observamos nesses resultados que a maioria dos indivíduos apresentaram de 4 a 5 ovariolos. Destacou-se nesse contexto a patrilinea 7, onde 77, 8% dos seus membros (7 das 9 operárias) apresentaram número de ovariolos acima de 5, sendo também a única patrilinea onde se encontrou uma operária com 12 ovariolos por ovário.

Figura 13: Relação patrilineas – número de ovariolos nas operárias marcadas do ninho 65

Deve-se notar ainda que apesar da existência dessa patrilinea 7, cujas operárias apresentaram um número elevado de ovariolos, 50% das patrilineas (2, 5, 6, 10, 12, 13 e 14) não apresentaram sequer uma operária com número de ovariolos acima de 5, por ovário.

A tabela normalizada desses dados é apresentada logo a seguir.

4.4.11. Freqüências normalizadas da relação entre patrilineas e o número de ovariolos nas operárias marcadas do ninho 65.

Tabela 13: Freqüências normalizadas das patrilineas e o número de ovariolos nas operárias do ninho 65. Destacada está a patrilinea cujo número de ovariolos foi elevado.

Patrilineas	Número de ovariolos						T o t a l
	2-3	4-5	6-7	8-10	11-12	Peso	
1	13,5	54	13,5			13,5	81
2	60,75	20,25				20,25	81
3	50,625	20,25		10,125		10,125	81
4	20,25	40,5	20,25			20,25	81
5	32,4	48,6				16,2	81
6	40,5	40,5				40,5	81
7	9	9	36	18	9	9	81
8	36,81	29,46	14,73			7,364	81
9	50,625	20,25	10,125			10,125	81
10	40,5	40,5				10,125	81
11	9	63		9		9	81
12	40,5	40,5				40,5	81
13	40,5	40,5				20,25	81
14	81					81	81

A figura 14 representa esses dados numéricos da tabela 13, em um gráfico da normalização dos dados da tabela 12.

Figura 14: Frequências normalizadas das patrilineas e o número de ovariolos nas operárias marcadas do ninho 65

Observamos portanto, que existem operárias (patrilinea 7) que se destacaram com número elevado de ovariolos, enquanto que a maioria das operárias apresentou menos de 6 ovariolos por ovário.

Estabelecendo-se uma relação entre *status* ovariano e número de ovariolos, pode-se analisar 126 operárias do ninho 65. A mediana do ninho 65, como observado na figura 2 e tabela 2, foi de 4 ovariolos por ovário, nas operárias. Apenas 32,5% dessas operárias (41 de 126 operárias) apresentaram número de ovariolos superior a 4 e, apenas 28,6% desses indivíduos (36 das 126 operárias), possuíam ovário ativado (*status* B e C). Porém, quase metade dessas operárias (17 de 36 operárias) com ovário ativado, apresentavam também número de ovariolos por ovário, superior a 4.

E mais interessante ainda é que 47,1% das operárias (8 dos 17 indivíduos) que possuíam ovário desenvolvido (*status* B e C) e número de ovariolos elevado (acima de 4 ovariolos por ovário) pertenciam a patrilinea 7.

4.5. Análise estatística ninho 67

Mantivemos os mesmos tratamentos e testes estatísticos (programa “GENEPOP”, e pelo “FISHER’s EXACT TEST”) no ninho 67, para não influenciar os resultados, e para podermos posteriormente fazer uma comparação direta entre os ninhos. Portanto, inclusive na análise das amostras

aplicadas em géis, foram identificados 4 alelos (que receberam a mesma denominação de 1 a 4) para cada um dos microssatélites. Conseqüentemente, quando falarmos do alelo 1 do microssatélite A88 no ninho 67, este terá o mesmo peso molecular do alelo 1 do microssatélite A88 no ninho 65.

4.5.1. Freqüências alélicas da amostra populacional e zangões filhos das operárias do ninho 67

Relembramos da importância de saber quais são os alelos maternos, pois devido à condição de monoginia, é esperado que os alelos maternos possuam freqüência elevada na amostra populacional. Os alelos maternos no ninho 67 foram os seguintes:

- para o microssatélite A88: alelos 1 e 3
- para o microssatélite A24: alelos 1 e 3

Inicialmente foi feita a “análise direta dos alelos” em cada indivíduo (anexo V), cujo resultado pode ser observado na tabela 14:

Tabela 14: Análise das “*freqüências alélicas diretas*” de três microssatélites em operárias de abelhas africanizadas na presença da rainha, e em zangões filhos de operárias produzidas após a retirada da rainha do ninho 67. Em destaque observam-se alelos, cuja representação após a orfandade foi reduzida, e em negrito alelos que aumentaram de freqüência na amostra dos filhos das operárias.

Amostra populacional					Zangões, filhos de operárias órfãs				
Alelos	Primer				Alelos	Primer			
	A88		A24			A88		A24	
	Nº	%	Nº	%		Nº	%	Nº	%
1	59	28,4	88	40,4	1	19	20,4	14	24,1
2	25	12,0	22	10,1	2	36	38,7	4	6,9
3	113	54,3	94	43,1	3	33	35,5	15	25,9
4	11	5,3	14	6,4	4	5	5,4	25	43,1
Total	208	100	218	100	Total	93	100	58	100

Observa-se que o “alelo 2” do microssatélite A88 que se apresentava em uma freqüência de 12% na amostra populacional, em condição de orfandade, passou a uma freqüência de 38,7% em zangões (filhos dessas operárias deixadas órfãs). O outro alelo do microssatélite A88, cuja freqüência foi elevada

(35,5%) após a orfandade, foi o alelo 3. Porém, deve-se notar que antes da orfandade, este se apresentava com uma frequência de 54,3%. Portanto, deve-se observar que, apesar da predominância desses alelos (por serem pelo menos parcialmente maternos) na amostra populacional, após a orfandade houve redução significativa de ambos alelos maternos após a orfandade.

Com relação ao microssatélite A24, os alelos predominantes na população antes da orfandade, eram os alelos 1 e 3, como já era esperado, por se tratarem dos alelos maternos. Porém, após a orfandade, além de ocorrer uma redução na representatividade de ambos alelos maternos, o alelo 2 teve uma redução também, passando de uma representatividade de 10,1% na amostra populacional, para apenas 6,9% após a orfandade. O único alelo do microssatélite A24 que após a orfandade teve um aumento de representatividade, foi o alelo 4. Este alelo que representava apenas 6,4% dos alelos da amostra populacional e, após a orfandade, passou a representar praticamente metade de todos os alelos presentes nessa população (43,1%).

Na discussão esses dados serão analisados mais profundamente, mas já observaremos aqui que, no caso do microssatélite A88, o alelo mais representado após a orfandade foi o alelo 2, que no ninho 65, também havia se destacado (segundo mais presente após a orfandade, totalizando quase 1/3 das amostras).

No caso do microssatélite A24 ficou mais evidente ainda que o alelo predominante, após a orfandade, foi o alelo 4. Fato não menos importante é que, no ninho 65, este mesmo alelo 4 já havia representado mais da metade dos alelos presentes nos zangões.

É de suma importância realçar novamente que, tanto o alelo 2 do microssatélite A88, quanto o alelo 4 do microssatélite A24, não estavam presentes nas rainhas, representando portanto, apenas patrilineas.

4.5.2. Genótipos (A88/A24) no ninho 67

A partir da “análise direta dos alelos” em cada indivíduo, foi possível construir-se a tabela 15, onde são observados os genótipos transmitidos após a orfandade:

Tabela 15: Análise das patrilineas nos zangões filhos de operárias produzidas em condição de orfandade no ninho 67, do apiário experimental do Depto. de Genética da USP de Ribeirão Preto.

Patrilineas transmitidas na condição de orfandade							
Alelos A88/A24	Nº de zangões	Alelos A88/A24	Nº de zangões	Alelos A88/A24	Nº de zangões	Alelos A88/A24	Nº de zangões
1/1	2	2/1	4	3/1	7	4/1	1
1/2	-	2/2	3	3/2	1	4/2	-
1/3	3	2/3	3	3/3	6	4/3	2
1/4	9	2/4	8	3/4	5	4/4	1

Como citamos anteriormente, análise aqui apresentada contém apenas os microssatélites A88 e A24, pois as patrilineas transmitidas após a orfandade não coincidirem com os mesmos alelos maternos. Esses foram portanto denominados de “*alelos decisivos*”.

Foi possível identificar 14 patrilineas (com os microssatélites A88 e A24) representadas na próxima geração (zangões), na condição de orfandade do ninho 67. Deve-se observar que nesta análise com os microssatélites A88 e A24 (4 alelos identificados em cada microssatélite), o número máximo de genótipos (patrilineas) que poderiam ter sido transmitidas seria de 16 genótipos diferentes:

Foram encontrados 14 genótipos (patrilineas), indicando-nos que praticamente todas as patrilineas foram transmitidas, mesmo em condição de orfandade. Porém, deve-se notar que a frequência de transmissão dos alelos (conseqüentemente patrilineas) foi muito diferenciada, de patrilinea para patrilinea. Enquanto duas patrilineas não foram transmitidas (genótipos 1/2 e 4/2) à geração seguinte (zangões), as patrilineas 1/4 e 2/4 apresentaram-se com as frequências mais elevadas (16,4% e 14,6% respectivamente). Outro aspecto interessante é que, ao considerarmos as patrilineas que possuem o alelo 2 do microssatélite A88, notamos que estas representam quase um terço de todos os indivíduos (32,7%). Esses dados indicam que possam existir diferenças no potencial reprodutivo entre as patrilineas.

4.5.3. Patrilineas na amostra populacional do ninho 67

Posteriormente, os genótipos tanto da amostra populacional, quanto dos zangões filhos das operárias órfãs, foram transformados em todas possíveis patrilineas, através da exclusão dos alelos maternos. Em outras palavras, após a identificação dos respectivos alelos maternos de cada *locus*, os alelos paternos foram inferidos por subtração. Os resultados podem ser observados na tabela 16.

Além do cálculo manual de subtração dos alelos maternos (tabela 16), para detecção das patrilineas, os genótipos também foram inseridos no programa GENEPOP (Version 3.3), e analisados pelo programa de cálculo de frequências alélicas e genotípicas, além de fornecer o número de homozigotos e heterozigotos de cada *locus* (anexo V).

Tabela 16: Possíveis patrilineas em operárias da amostra populacional do ninho 67

Rainha # Patrilineas	A88 Alelos maternos 1/3	A24 Alelos maternos 1/3	Amostra Nº de operárias
1	1	1	1
2	1	2	4
3	1	3	7
4	1	4	1
5	1	1/3	1
6	1/3	1	3
7	1/3	2	2
8	1/3	3	2
9	1/3	4	1
10	1/3	1/3	1
11	2	1	7
12	2	2	4
13	2	3	6
14	2	4	2
15	2	1/3	6
16	3	1	9
17	3	2	10
18	3	3	8
19	3	4	7
20	3	1/3	10
21	4	1	3
22	4	2	1
23	4	3	5
24	4	4	2
25	4	1/3	1
Total	A88	A24	104

Como citado anteriormente, devido à formatação exigida pelo programa GENEPOP, os alelos foram transformados da denominação inicial do nosso projeto (letras A-D), para denominação de números (1-4). Os dados obtidos pelo emprego do programa GENEPOP (Version 3.3) nessa amostra populacional podem ser vistos no anexo V.

A função principal dessa tabela 16, é identificar a frequência das patrilineas na amostra populacional. Observa-se que o número de possíveis patrilineas na amostra populacional do ninho 67 foi de 25. Porém, deve-se notar que muitas dessas patrilineas certamente não existem, devido aos dois alelos em cada microssatélite (4 no total) que os zangões possuem em comum com a rainha. Então existem amostras (como indivíduos da patrilinea 10) onde não pode se afirmar qual alelo é o paterno, e qual é o materno. Esse problema, em saber-se com certeza qual o número mínimo de patrilineas presente no ninho (e se esses alelos não vieram de outro ninho), foi solucionado através de quatro estratégias, já mencionadas antes (tópico 4.4.3), (1) através da análise estatística da (item 4.5.4) probabilidade do mesmo alelo ter vindo de 2 diferentes zangões, (2) o cálculo da (item 4.5.5) probabilidade de que 2 operárias tenham um alelo em comum, apesar de serem filhas de duas rainhas distintas. Ainda assim, foi feita a (3) análise das patrilineas na amostra de operárias marcadas (item 4.5.6), onde se pode afirmar com certeza que todas as patrilineas são deste ninho. E finalmente, as patrilineas dos (4) zangões filhos das operárias órfãs (item 4.5.7) é que nos forneceram a resposta definitiva à pergunta de qual o número mínimo de patrilineas, e quais patrilineas realmente estão presentes e pertencem ao ninho.

Além da análise das patrilineas dos zangões filhos das operárias órfãs fornecer-nos a resposta, de qual era o número mínimo de patrilineas presentes no ninho (e quais alelos realmente pertenciam a esse ninho), mais importante ainda ao nosso trabalho foi à comparação da representatividade das patrilineas dos zangões filhos dessas operárias, com a representatividade das patrilineas da amostra populacional. Essa comparação nos indicou quais patrilineas predominaram após a orfandade (item 4.5.7). Já se observou que com os dois microssatélites A88 e A24, detectou-se uma representatividade proporcionalmente significativa (item 4.5.2) de algumas patrilineas. Porém, no

item 4.5.7, ainda fizemos o “Fisher’s exact test” considerando as patrilineas, dos dois microssatélites utilizados para amplificação das amostras do ninho 67.

Por fim, ainda foram analisadas as relações entre, patrilineas e a ativação ovariana nas operárias órfãs (item 4.5.8), e também entre patrilineas e o número de ovariolos (item 4.5.10) nessas mesmas operárias do ninho 67, para que essas novas abordagens, também viessem a reforçar quais patrilineas predominaram após a orfandade.

4.5.4. Probabilidade do mesmo alelo ter vindo de dois diferentes zangões (ninho 67)

No anexo VI pode ver visto em detalhes como foi feito o cálculo da probabilidade de que um mesmo alelo pudesse ter vindo de 2 diferentes zangões, ou seja, de que patrilineas pudessem ser contadas como as mesmas:

$$P \text{ à } q_i^2 = 0,0625$$

4.5.5. Probabilidade de duas operárias possuírem um alelo em comum (ninho 67)

Cálculo da probabilidade de que duas operárias tenham um alelo em comum (anexo VII), apesar de virem de duas rainhas diferentes:

$$4 \text{ à } p_i^2 - 2(\text{à } p_i^2)^2 - 4 \text{ à } p_i^3 + 3 \text{ à } p_i^4 = 0,45$$

4.5.6. Frequência de patrilineas em operárias marcadas do ninho 67

Nas amostras dos microssatélites amplificadas pela reação de PCR com os primers A88 e A24 conseguimos distinguir até 14 patrilineas (tabela 17) diferentes nas operárias marcadas do ninho 67.

Tabela 17: Frequência de patrilineas analisadas pelos microssatélite A88 e A24 nas operárias marcadas do ninho 67. Destacadas estão as patrilineas cuja representatividade foi acima de 9 operárias.

# das Patrilineas	Alelos		Frequência em operárias marcadas do ninho 65	
	A88	A24	Número	%
1	1	2	3	4,22
2	1	3	10	14,09
3	1	4	3	4,22
4	2	1	4	5,65
5	2	2	3	4,22
6	2	3	6	8,45
7	2	4	5	7,04
8	3	1	6	8,45
9	3	2	2	2,82
10	3	3	8	11,27
11	3	4	11	15,49
12	4	1	1	1,41
13	4	3	6	8,45
14	4	4	3	4,22
Total=14	A88	A24	71	100

Pode-se observar que assim como na amostra populacional, aqui na amostra de operárias marcadas, as patrilineas que possuem alelo 3 do microssatélite A88 representam uma alta porcentagem. Enquanto que na amostra populacional, essas patrilineas representavam 42,31% de todas as operárias, nas operárias marcadas representam 38,03%. Outra patrilinea que também possuiu alta representatividade em ambas amostras, foi a patrilinea 1/3, para os microssatélites **A88/A24**. Na amostra de operárias marcadas, essa patrilinea representa 14,08% dos indivíduos capturados, e na amostra populacional representava 6,73%. Deve-se notar, que tanto na amostra

populacional (1,92%), quanto na amostra de operárias marcadas (7,04%), a patrilinea **2/4** não possuiu representatividade que se destacasse.

As patrilineas **1/1** e **4/2** não foram encontradas nessa amostra. Deve-se salientar que, no ninho 65 a patrilinea **4/2** também não havia sido encontrada, mas que ambas patrilineas foram encontradas nas amostras populacionais dos dois ninhos, apesar de suas frequências terem sido baixas.

4.5.7. Patrilineas na amostra populacional e amostra de zangões produzidos por operárias órfãs no ninho 67

As patrilineas identificadas na amostra populacional podem ser consideradas “patrilineas não 100% identificáveis”, devido aos indivíduos, cujos alelos das patrilineas analisadas eram os mesmos alelos maternos 1 e 3. Conseqüentemente em várias patrilineas não se pôde afirmar se o “alelo 1” ou o “alelo 3” é que vinha do zangão (e o outro da rainha). Mas aqui no ninho 67 pode-se perceber que (devido a não utilização do microsatélite A7) houve uma redução considerável (número de patrilineas caiu para 25) de “patrilineas não 100% identificáveis”, sendo que no ninho 65, eram de 49 possíveis patrilineas. Mesmo assim, a resposta de qual era o mínimo de patrilineas presentes no ninho 67, não pode ser obtida através da análise da amostra populacional. Esta resposta foi novamente obtida através (das patrilineas) dos zangões filhos das operárias órfãs. As patrilineas dos zangões consideradas como “patrilineas 100% identificáveis” pois foram as possíveis de identificação com os 2 microsatélites. Sabemos também, que todos esses zangões realmente pertenciam ao ninho 67 (por terem sido coletados ainda na fase de pupa).

Tabela 18: Patrilineas na amostra populacional e na amostra de zangões produzidos por operárias órfãs no ninho 67. Na análise foram utilizados dois microssatélites (A88/A24). As patrilineas destacadas (4 e 14) representam linhagens cujo valor observado de indivíduos contendo esses alelos foi muito superior a frequência esperada. O valor observado foi calculado a partir das frequências das patrilineas encontradas na amostra de zangões filhos das operárias órfãs, e o valor esperado foi calculado a partir das frequências das mesmas patrilineas, mas na amostra populacional.

Patrilineas		Operárias		Zangões			
Amostra populacional	Zangões			Observado		Esperado	
				Nº	%	Nº	%
1	1	1	0,96	2	3,64	0,53	0,96
2		4	3,85	0	0	2,11	3,85
3	2	7	6,73	3	5,45	3,70	6,73
4	3	1	0,96	9	16,36	0,53	0,96
5		1	0,96	0	0	0,53	0,96
6		3	2,89	0	0	1,59	2,89
7		2	1,92	0	0	1,06	1,92
8		2	1,92	0	0	1,06	1,92
9		1	0,96	0	0	0,53	0,96
10		1	0,96	0	0	0,53	0,96
11	4	7	6,73	4	7,27	3,70	6,73
12	5	4	3,85	3	5,45	2,11	3,85
13	6	6	5,77	3	5,45	3,17	5,77
14	7	2	1,92	8	14,55	1,06	1,92
15		6	5,77	0	0	3,17	5,77
16	8	9	8,65	7	12,72	4,76	8,65
17	9	10	9,62	1	1,82	5,29	9,62
18	10	8	7,69	6	10,91	4,23	7,69
19	11	7	6,73	5	9,10	3,70	6,73
20		10	9,62	0	0	5,29	9,62
21	12	3	2,89	1	1,82	1,59	2,89
22		1	0,96	0	0	0,53	0,96
23	13	5	4,81	2	3,64	2,64	4,81
24	14	2	1,92	1	1,82	1,06	1,92
25		1	0,96	0	0	0,53	0,96
Total=25	Total=14	104	100	55	100	55	100

Portanto, aqui sim se pode inferir que o mínimo de patrilineas (identificadas com A88 e A24) presentes no ninho 67 foi de 14 patrilineas (tabela 18).

Por fim, realizamos o teste exato de Fisher (“Genepop version 3.1c, Prog. Struc.exe”) que acusou diferença entre a representatividade das patrilineas antes e após a orfandade como **“NÃO ALEATÓRIA”**, pois a **probabilidade de aleatoriedade foi igual a 0,04086 e S.E. igual a 0,00493** (anexo VIII - Fisher dos zangões).

Ainda assim, para reforçar a existência de patrilinea com representatividade diferenciada após a orfandade, fizemos outras análises (item 4.5.8 a 4.5.11) utilizando-se apenas os microssatélites A24 e A88 (pois nesses microssatélites os alelos predominantes após a orfandade não eram os mesmos presentes na rainha), que podem ser vistas a seguir.

4.5.8. Relação entre patrilineas e ativação ovariana nas operárias do ninho 67

Analizamos o “*status* ovariano” das operárias marcadas, cujos genótipos foram apresentados no item (4.5.6) e estabelecemos a relação entre essas patrilineas apresentadas anteriormente, com a ativação ovariana dessas operárias marcadas do ninho 67 (tabela 19).

Deve-se notar que houve também a preocupação em calcular-se o peso de cada genótipo observado. Esse cálculo do “peso” é o resultado da divisão do total de indivíduos analisados, pelo número de indivíduos de cada genótipo.

$$\text{Peso} = \frac{\text{Número total de indivíduos analisados}}{\text{número de indivíduos de cada patrilinea}}$$

Esse peso aqui calculado foi posteriormente empregado no cálculo da tabela 20 normalizada pela frequência das patrilineas do ninho 67.

Tabela 19: Relação patrilineas – ativação ovariana no ninho 67. O *status* ovariano aumenta de A para C, sendo de inativo (A) para ovogênese evidente (C). Destacadas estão as patrilineas cuja ovogênese era evidente (*status* C).

P A T R I L I N E A	A L E L O S	A L E L O S	Status ovariano			T o t a l	P e s o
	A88	A24	A	B	C		
1	1	2	3			3	23,67
2	1	3	6	2	2	10	7,10
3	1	4	2	1		3	23,67
4	2	1	2	2		4	17,75
5	2	2	1		2	3	23,67
6	2	3	4	2		6	11,83
7	2	4		3	2	5	14,2
8	3	1	6			6	11,83
9	3	2	2			2	35,5
10	3	3	8			8	8,87
11	3	4	5	2	4	11	6,45
12	4	1	1			1	71
13	4	3	6			6	11,83
14	4	4	3			3	23,67
Total	A88	A24	49	12	10	71	

Mais uma vez, assim como no ninho 65, a maioria das operárias analisadas não apresentava ovário ativado. Deve-se notar que os indivíduos das patrilineas 1, 8, 9, 10, 12, 13 e 14 representam significativos 40,85% de indivíduos analisados (29 operárias, de 71 operárias analisadas), sendo que, todas essas operárias possuíam ovários completamente inativos (*status* A). Podemos observar também que, em termos numéricos, as patrilineas 2, 5, 7 e 11 foram às únicas que apresentaram o “*status* ovariano C”. Também no ninho 65, as patrilineas 7 e 11 (que contém o alelo 4, do microsatélite A24) apresentaram indivíduos com “*status* ovariano C”. Os indivíduos da patrilinea 7 representam 22,77% das operárias com ovário ativado (*status* B e *status* C).

Porém, mais interessante ainda, é que 100% dos indivíduos da patrilinea 7 apresentava ovário ativado. Ainda salienta-se que 50% dos indivíduos com ovários ativados, apresentavam o alelo 4 do microssatélite A24. Foram encontrados 22 indivíduos com ovário ativado, sendo que 11 indivíduos possuíam o alelo 4 do microssatélite A24 (5 operárias da patrilinea 7, e 6 operárias da patrilinea 11). A partir dessa tabela, construiu-se a figura 15.

Figura 15: Relação patrilineas - ativação ovariana nas operárias marcadas do ninho 67

Deve-se notar ainda, a diferença do número de indivíduos encontrados em cada patrilinea. Devido a essa diferença numérica, apresentaremos a seguir uma tabela normalizada desses mesmos dados, para possibilitar visualização e análise mais nítidas.

4.5.9. Freqüências normalizadas da relação entre patrilineas e a ativação ovariana nas operárias marcadas do ninho 67

A tabela 20 apresenta as freqüências das patrilineas e o seu “*status* ovariano” normalizado pelo “peso”, calculado na tabela 19. A tabela normalizada pelas freqüências das patrilineas é resultado da multiplicação da classe “*status* ovariano” pelo “peso”.

Tabela 20: Frequências normalizadas das patrilineas e o *status* ovariano nas operárias do ninho 67. Destacadas estão as patrilineas cuja ovogênese era evidente (*status* C).

P A T R I L I N E A	A L E L O S	A L E L O S	<i>Status</i> ovariano		
	A88	A24	A	B	C
1	1	1	71		
2	1	2	42,6	14,2	14,2
3	1	3	47,33	23,67	
4	2	1	35,5	35,5	
5	2	2	23,67		47,33
6	2	3	47,33	23,67	
7	2	4		42,6	28,4
8	3	1	71		
9	3	2	71		
10	3	3	71		
11	3	4	32,3	12,9	25,8
12	4	1	71		
13	4	3	71		
14	4	4	71		

Com a normalização dos dados da tabela 19, observa-se mais nitidamente a diferença existente entre as 4 patrilineas que apresentaram operárias com *status* ovariano C, e as 7 patrilineas cujas operárias não apresentavam ativação ovariana (*status* A).

Esses dados podem ser visualizados melhor na figura 16:

Figura 16: Frequências normalizadas das patrilineas e a ativação ovariana nas operárias marcadas do ninho 67

Observa-se que enquanto todas as operárias da patrilinea 7 apresentaram ativação ovariana (status B e status C), as operárias das patrilineas 1, 8, 9, 10, 12, 13 e 14 apresentaram operárias cujos ovários estavam completamente inativados (status A). Salienta-se ainda, as semelhanças entre essa figura 16, do ninho 67, com a figura 12 do ninho 65.

4.5.10. Relação entre patrilineas e o número de ovariolos nas operárias do ninho 67

Além da análise do status ovariano, também fizemos a contagem do número de ovariolos que cada abelha marcada apresentava.

Tabela 21: Relação entre patrilinea e o número de ovariolos em operárias marcadas no ninho 67. O peso de cada patrilinea foi calculado através da divisão do total de indivíduos analisados, pelo número de indivíduos de cada patrilinea. Destacadas estão as patrilineas cujo número de ovariolos por ovário foi elevado.

Patrilineas	Número de ovariolos						P e s o
	2-3	4-5	6-7	8-10	11-12	Total	
1	1	2				3	23,67
2	5	2	2	1		10	7,10
3		1	2			3	23,67
4		2	2			4	17,75
5	1	2				3	23,67
6	2	2	2			6	11,83
7		1	4			5	14,2
8	3	3				6	11,83
9	1	1				2	35,5
10	2	6				8	8,87
11	3	1	6		1	11	6,45
12	1					1	71
13	3	1	2			6	11,83
14	2	1				3	23,67
Total	24	25	20	1	1	71	

Observamos nesses resultados que a maioria (69%) dos indivíduos apresentaram de 2 a 5 ovariolos. Destacou-se nesse contexto a patrilinea 7, onde 80% dos seus membros (4 das 5 operárias) apresentaram número de ovariolos acima de 5. Este resultado foi similar ao observado no ninho 65, onde 77,8% das operárias da mesma patrilinea 7, apresentaram número de ovariolos acima de 5. A patrilinea 11 também se destacou por 63,6% de seus indivíduos (7 operárias, de 11 analisadas) possuírem ovários com mais de 5 ovariolos, sendo a única patrilinea onde se encontrou uma operária com 12 ovariolos por ovário. Já a patrilinea 2, apesar de ser a única a possuir operárias com 8 ovariolos por ovário, destaca-se também por 70% de suas operárias (7 de 10 indivíduos) terem possuído número de ovariolos menor ou igual a 5.

Figura 17: Relação patrilineas - número de ovários nas operárias marcadas do ninho 67

Deve-se notar ainda que apesar da existência dessas patrilineas 7 e 11, cujas operárias apresentaram um número elevado de ovários, 50% das patrilineas (1, 5, 8, 9, 10, 12 e 14) não apresentaram sequer uma operária com número de ovários acima de 5, por ovário. Salienta-se aqui, que as mesmas patrilineas 5, 10, 12 e 14 também se destacaram no ninho 65, por não apresentarem sequer um indivíduo com número de ovários acima de 5. Já as patrilineas 7 e 11, além de terem se destacado no ninho 65 por possuírem número elevado de ovários, possuem o mesmo alelo 4, do microssatélite A24.

4.5.11. Frequências normalizadas da relação entre patrilineas e o número de ovários nas operárias marcadas do ninho 67

A tabela normalizada desses dados é apresentada logo a seguir.

Tabela 22: Frequências normalizadas das patrilineas e o número de ovariolos nas operárias do ninho 67. Destacadas estão as patrilineas cujo número de ovariolos foi elevado.

Patrilineas	Número de ovariolos				
	2-3	4-5	6-7	8-10	11-12
1	23,67	47,33			
2	35,5	14,2	14,2	7,1	
3		23,67	47,33		
4		35,5	35,5		
5	23,67	47,33			
6	23,66	23,66	23,66		
7		14,2	56,8		
8	35,5	35,5			
9	35,5	35,5			
10	17,75	53,25			
11	19,35	6,45	38,75		6,45
12	71				
13	35,5	11,83	23,67		
14	47,33	23,67			

A figura 18 representa esses dados numéricos da tabela 22, em um gráfico da normalização dos dados da tabela 21.

Figura 18: Frequências normalizadas das patrilineas e o número de ovariolos nas operárias do ninho 67

Observamos portanto, que assim como no ninho 65, no ninho 67 também existem operárias (patrilinea 7 e 11) que se destacaram devido ao número elevado de ovários, enquanto que a maioria das operárias apresentou menos de 6 ovários por ovário.

Estabelecendo-se uma relação entre *status* ovariano e número de ovários, pôde-se analisar 99 operárias do ninho 67. A mediana do ninho 67, como observado na figura 2 e tabela 2, foi de 3,5 ovários por ovário, nas operárias. Apesar de 61,62% dessas operárias (61 de 99 operárias) apresentarem número superior a 3,5 ovários por ovário, apenas 32,32% desses indivíduos (32 das 99 operárias), possuía ovário ativado (*status* B e C). Porém, 81,25% dessas operárias (26 das 32 operárias) com ovário ativado, apresentavam também número de ovários por ovário, superior a 3,5.

E mais interessante ainda é que 100% das operárias da patrilinea 7 apresentaram ovário ativado (*status* B e C) e número de ovários elevado (acima de 3,5 ovários por ovário), representando 15,65% de todas operárias (5 das 32 operárias) com alto *status* e número de ovários. A patrilinea 11 também representou 15,65% (5 das 32 operárias) das operárias com alto *status* ovariano e número de ovários, somando juntamente com a patrilinea 7, quase um terço de todas operárias com esta característica. Deve-se salientar que, ambas patrilineas (patrilinea 7 e 11) apresentavam o alelo 4 do microssatélite 24.

4.6. Análise estatística comparada entre os ninhos

Foi feita a comparação em ambos ninhos, da (1) ativação ovariana e número de ovários nas operárias marcadas, relacionando esses dados (tabela 23) com as respectivas patrilineas, além de compararmos os (2) zangões filhos das operárias órfãs que foram transmitidos a próxima geração em ambos ninhos (Tabela 24).

4.6.1. Tabela das frequências das patrilineas e o número de ovários e ativação ovariana nas operárias dos ninhos 65 e 67

Tabela 23: Frequência de patrilineas analisadas pelos microssatélite A88 e A24 em operárias marcadas dos ninhos 65 e 67, relacionadas a suas respectivas ativações ovarianas e número de ovários por ovário. Destacadas estão as patrilineas cujo número de ovários, e *status ovariano*, foram elevados. Somente as patrilineas 1 e 3 não eram correspondentes em ambos ninhos, devido aos diferentes alelos dos microssatélites. Todas as outras 12 patrilineas são equivalentes em ambos ninhos.

Patrilinea	Alelos A88/A24	Freq. pop. ninho 65			Freq. pop. ninho 67		
		Nº	%	Status	Nº	%	Status
1	-	Possuía alelos 1/1 (A88/A24)			Possuía alelos 1/2 (A88/A24)		
2	1/2	4	4,7	A	10	14,09	C
3	-	Possuía alelos 1/3 (A88/A24)			Possuía alelos 1/4 (A88/A24)		
4	2/1	4	4,7	A	4	5,65	A+B
5	2/2	5	5,8	A+B	3	4,22	C
6	2/3	2	2,4	C	6	8,45	A+B
7	2/4	9	10,6	C	5	7,04	C
8	3/1	11	12,9	A	6	8,45	A
9	3/2	8	9,4	A+B	2	2,82	A
10	3/3	8	9,4	C	8	11,27	A
11	3/4	9	10,6	C	11	15,49	C
12	4/1	2	2,4	A	1	1,41	A
13	4/3	7	8,2	A	6	8,45	A
14	4/4	2	2,4	A	3	4,22	A
Total		85	100	Status	71	100	Status

Observa-se que nas patrilineas 8, 12, 13, 14 em ambos ninhos 100% dos indivíduos apresentaram ovários não ativados (status A), e as patrilineas 7 e 11 apresentaram indivíduos com folículos em ativação máxima (status C) em ambos os ninhos. Deve-se salientar que, em ambas patrilineas o alelo do microssatélite A24 era o alelo 4.

4.6.2. Tabela das frequências das patrilineas transmitidas após a orfandade nos ninhos 65 e 67

Tabela 24: Análise das patrilineas nos zangões filhos de operárias produzidas em condição de orfandade nos ninhos 65 e 67, do apiário experimental do Depto. de Genética da USP de Ribeirão Preto.

Patrilinea			Nº zangões			Patrilinea			Nº zangões		
Alelos	Ninho	Ninho	Alelos	Ninho	Ninho	Alelos	Ninho	Ninho	Alelos	Ninho	Ninho
A88/A24	65	67	A88/A24	65	67	A88/A24	65	67	A88/A24	65	67
1/1	4	2	2/1	1	4	3/1	-	7	4/1	1	1
1/2	1	-	2/2	-	3	3/2	-	1	4/2	-	-
1/3	5	3	2/3	11	3	3/3	4	6	4/3	6	2
1/4	28	9	2/4	10	8	3/4	2	5	4/4	6	1

Observamos nesses dados que as patrilineas **1/4** e **2/4** (referente aos alelos dos microssatélites **A88/A24**) foram as que apresentaram maior número de indivíduos em ambos ninhos. Já a patrilinea **4/2** não teve sequer um indivíduo encontrado após a orfandade, em ambos ninhos.

4.6.3. Teste exato de Fisher em ambos ninhos

Ao analisarmos comparativamente as tabelas do ninho 65 (tabela 9) e do ninho 67 (Tabela 18), observamos que as patrilineas cuja representatividade após a orfandade (amostra de zangões) se destacaram, em ambos ninhos, foram as patrilineas com os alelos **1/4** e **2/4** (referentes aos microssatélites **A88** e **A24** respectivamente).

Observa-se no ninho 65 (Tabela 9), que a patrilinea **1/4** (denominada de 15 e 16 na amostra populacional, e 7 e 8 na amostra de zangões) após a orfandade teve representatividade de 23 zangões (14 + 9), enquanto que o esperado seria 2,95 (1,77 + 1,18); a patrilinea **2/4** (denominada de 23 na amostra populacional, e 11 na amostra de zangões) após a orfandade teve representatividade de 8 zangões, enquanto que o esperado seria 0,59. Portanto, observamos que no ninho 65 as patrilineas **1/4** e **2/4** tiveram maior representatividade após a orfandade, e o teste exato de Fisher (anexo IV) acusou que essa diferença de representatividade não era aleatória ($P=0,00124$ e $S.E.=0,00057$).

Já no ninho 67 (tabela 18), a patrilinea **1/4** (denominada de 4 na amostra populacional, e 3 na amostra de zangões) após a orfandade teve

representatividade de 9 zangões, enquanto que o esperado seria 0,53; a patrilinea **2/4** (denominada de 14 na amostra populacional, e 7 na amostra de zangões) após a orfandade teve representatividade de 8 zangões, enquanto que o esperado seria 1,06. Portanto, observamos que também no ninho 67, assim como no ninho 65, as patrilineas **1/4** e **2/4** tiveram maior representatividade após a orfandade. O teste exato de Fisher (anexo VIII) também acusou que essa diferença de representatividade não era aleatória ($P=0,04086$ e $S.E.=0,00493$).

Discussão

5. DISCUSSÃO

É de extrema importância citar-se que somente os alelos paternos são responsáveis pelos diferentes genótipos caracterizando as subfamílias de operárias encontradas nas colônias de *Apis mellífera* pois, os alelos maternos, são sempre de uma mesma rainha. Com isso, esperava-se obter evidências da existência (ou não) de diferenças reprodutivas dentre as linhagens paternas nas colônias. Tais resultados terão implicações consideráveis para modelos da organização social de abelhas e para interpretação desses possíveis conflitos reprodutivos.

Na fase inicial do projeto, comparou-se o número de ovariolos nas operárias com o nível de ativação dos ovários. Pôde-se notar nitidamente que apesar de nossos ninhos terem sido escolhidos por terem alto número de ovariolos nas operárias, estes apresentaram diferenças, sendo que, o ninho 65 e 67 apresentaram maior número de operárias com ativação, que os ninhos 27 e 127.

Nos géis apresentados, pode-se observar a grande eficácia da metodologia de análise por microssatélites pois se observa pelo menos 14 patrilineas (representados por alelos diferentes deste microssatélite) no ninho 65, e 14 patrilineas no ninho 67. Vale lembrar que apesar das análises de várias amostras serem realizadas com três microssatélites, as patrilineas puderam ser melhor distinguidas através da utilização dos microssatélites A24 e A88.

Por exemplo, deve-se notar que tanto a figura 3, quanto as figuras 4, 5 e figura 6, representam genótipos de um mesmo ninho (ninho 65), apresentando assim os mesmos alelos maternos. Na figura 3, encontram-se os citados alelos maternos, aqui denominados de 1 e 3 (para o microssatélite A88), identificados através da análise dos genótipos dos filhos (haplóides) da própria rainha do ninho 65.

A figura 9 apresenta patrilineas na amostra de operárias marcadas do ninho 67, cujo *status* ovariano foi analisado. O método mostrou-se bastante eficaz nessas análises correlacionando genótipos com número de ovariolos.

Tanto no ninho 65, quanto no 67, conseguimos detectar um genótipo (**2/4** – patrilinea 7 das operárias marcadas de ambos ninhos) que aparentemente transmite alta probabilidade de maior número de ovários, além de estar relacionado com maior ativação ovariana (*status* ovariano B+C). Esses resultados trouxeram, portanto, evidência para uma correlação funcional entre o genótipo, número de ovários e a sua ativação em condições órfãs.

Já a figura 10 apresenta amostras dos zangões filhos de operárias poedeiras que foram coletados no ninho 67. Através da análise de suas patrilineas, pudemos identificar a existência de linhagens paternas que foram predominantes na reprodução dessa colmeia em condições órfãs. A patrilinea, que se destacou devido sua alta frequência, foi a patrilinea contendo o alelo 2 (do microssatélite A88) e alelo 4 (do microssatélite A24). Após essas análises pôde-se afirmar que houve maior representação da patrilinea 7 (alelos **2/4**) sob condição de orfandade na amostra de zangões filhos das operárias.

Enquanto que a “patrilinea **2/4**” (“alelo 2” do microssatélite **A88** e “alelo 4” do microssatélite A24), em ambos ninhos, possuiu grande representatividade entre os filhos de operárias órfãs, a patrilinea **4/2** não foi encontrada em ambos ninhos, entre os zangões produzidos na orfandade. As patrilineas **4/1**, **4/3** e **4/4** além de baixa representatividade em filhos de operárias órfãs, quando encontradas em operárias marcadas (patrilineas denominadas na amostra de operárias marcadas de 12, 13 e 14), sempre estavam relacionadas ao baixo número de ovários e baixa ativação ovariana. Já a patrilinea **2/4**, além da alta representatividade após a orfandade, sempre que encontrada em operárias marcadas, estava relacionada a alto *status* ovariano e alto número de ovários por ovário.

Patrilineas em colmeias de *Apis mellífera*, já foram e continuam sendo motivo de pesquisas com abelhas em diversas partes do mundo (Estoup et al., 1994; Estoup et al., 1995a; Estoup et al., 1995b). Estes pesquisadores obtiveram resultados expressivos no que diz respeito ao número de acasalamentos inferidos através de linhagens paternas em colmeias de *Apis mellífera*. Ao empregar-se de 2 a 4 microssatélites, tais análises detectaram de 7 a 20 patrilineas diferentes nas colmeias. Estes números altos de patrilineas correspondem aos números de acasalamentos maiores que 17, inferidos a partir da frequência de zangões diplóides em colmeias (Adams et al., 1977).

Em nosso trabalho detectou-se um mínimo de 14 patrilineas diferentes com a utilização de dois primers, o primer A88 e primer A24 (Estoup et al. 1994). Portanto, assim como em outros trabalhos realizados nessa área de pesquisa, ao empregarmos mais de um microssatélite, foi possível a detecção de alto número de patrilineas diferentes em nossos ninhos. A estrutura populacional da colmeia (frequência de patrilineas) mostrou-se constante já logo após o início da oviposição da rainha. Este fato deve-se a utilização randomizada do esperma (Haberl e Tautz, 1998).

Dentre as consequências desse elevado número de patrilineas (devido a poliandria), está o comportamento de policiamento das operárias, que dentro das colmeias sob circunstâncias normais (em presença da rainha) reforça a esterilidade funcional das operárias (Barron et al., 2001). Do ponto de vista da teoria de *kin selection*, estas operárias devem portanto abdicar quase totalmente do componente *individual fitness*, para reforçar o componente *inclusive fitness*. A poliandria leva a uma forte discrepância no que diz respeito ao grau de parentesco entre operárias e zangões produzidos pelas mesmas. Operárias pertencentes à mesma patrilinea, por exemplo, teriam grau de parentesco muito maior com os filhos das suas irmãs ($r=0,375$) do que com os filhos de operárias pertencentes a outras patrilineas (meio-irmãs; $r=0,15$). Esta discrepância e o fato de que todas as operárias têm grau de parentesco igual a 0,25 com os seus irmãos (zangões filhos da rainha) explicaria a eliminação indiscriminada de ovos produzidos por operárias no comportamento de policiamento. Em alguns casos o policiamento pode chegar inclusive a agressão contra operárias com ovários ativados, i.e., operárias reconhecem o *status* ovariano das companheiras (Visscher e Dukas, 1995). Além deste comportamento observado nas operárias, a rainha também restringe a reprodução das mesmas através do seu feromônio (Ratnieks e Boomsma, 1995; Foster et al., 2000).

Do ponto de vista evolutivo, o acasalamento múltiplo da rainha, que mantém alto o número de patrilineas na colmeia, age (1) como um “tampão” genético nas colônias contra variações do meio ambiente, (2) flexibiliza a divisão de trabalho, pois já foi observado também, que a organização da divisão de trabalho pode estar sendo geneticamente determinada, já que certas

patrilineas apresentam maior probabilidade de realizar certas tarefas (Fraser et al., 2000).

Devido a poliandria, ainda há (3) uma redução da carga genética e a diminuição do parentesco entre as operárias, cuja consequência acaba sendo o nepotismo dessas operárias. Ainda sobre o aspecto evolutivo, a maior diversidade genética aumenta (4) a resistência da colméia, como um todo, contra patógenos.

Um interessante fenômeno relacionado ao conflito reprodutivo foi descrito por Oldroyd e colaboradores, onde mesmo em presença da rainha, operárias denominadas de anarquistas tiveram a capacidade de ativar seus ovários e ovipositar (Oldroyd et al., 1994). Detectou-se, que na presença da rainha apenas 13% de operárias do tipo selvagem tiveram capacidade de ativar seus ovários, enquanto 41% de operárias anarquistas apresentaram ativação ovariana (Oldroyd et al., 2001). Operárias anarquistas sempre tem probabilidade maior de ativação ovariana que o tipo selvagem (operárias não anarquistas), sugerindo que o feromônio da rainha tem menor efeito inibidor sobre o ovario em abelhas anarquistas, que em operárias do tipo selvagem (Barron e Oldroyd, 2001). Essas abelhas anarquistas caracterizam-se portanto, como um fenótipo raro que contribui significativamente na produção de zangões, não se tratando de um epifenômeno da orfandade, pois produzem zangões na presença da rainha e, exceto por seu alto *status* ovariano, as abelhas anarquistas possuem comportamento normal (Oldroyd et al., 1999). Além disso, após a orfandade, observou-se uma redução acentuada da participação das abelhas anarquistas na produção de zangões, sendo que um outro genótipo de operárias foi observado como predominante após a retirada da rainha (Montague e Oldroyd, 1998).

Essas operárias órfãs detectadas pelo grupo de Oldroyd (Montague e Oldroyd, 1998), cuja participação não era significativa na presença da rainha e, após a orfandade tornou-se significativa (acusado também pelo teste exato de Fisher), consideramos como sendo patrilineas similares às detectadas em nosso trabalho. Pôde-se observar em nossos ninhos, ausência de operárias poedeiras na presença da rainha, ou seja, não foram detectadas abelhas anarquistas em nosso experimento. Portanto, os sinais emitidos pela rainha (feromônio) apresentavam resultado eficaz sobre as operárias, que não eram

responsáveis pela reprodução antes da orfandade. Conseqüentemente, as operárias que se tornaram poedeiras em nosso trabalho, não se tratavam de “abelhas anarquistas”, mas sim, de “patrilineas” cuja ativação ovariana predominou em relação às outras linhagens paternas, após a orfandade.

Ainda sobre esse contexto de fenótipos que fogem ao padrão considerado normal com relação à reprodução em abelhas melíferas, detectou-se um comportamento ainda mais extremo, ao comportamento das abelhas anarquistas. Stephen e colaboradores (Stephen et al., 2002) detectaram que operárias de *Apis mellifera capensis* estabeleciam-se em colméias de *Apis mellifera scutellata* e, comportando-se como parasita social, eliminavam a “rainha *scutellata*” dessa colmeia. Essas “operárias *capensis*” iniciavam o processo de ovogênese, na ausência da “rainha *scutellata*”, produzindo porém, ovos diplóides por telitoquia (Moritz et al., 1998). Essa reprodução pseudo-clonal das “operárias *capensis*” acabava por causar a perda da colmeia para o apicultor (Stephen et al., 2002).

Portanto, apesar de ser principalmente uma questão de interesse teórico para elucidar esses conflitos reprodutivos em um inseto social com complexo esquema reprodutivo, existe também um interesse mais relacionado à prática de apicultura na América Latina. A abelha *Apis mellifera* sempre foi e continua sendo de importância econômica relevante no mundo inteiro, devido, principalmente, a sua alta produtividade de mel. Porém, esta relevante importância econômica, viu-se ameaçada com a importação de linhagens de *Apis mellifera* de origem africana, *Apis mellifera scutellata*, na década de 60, que hibridizou-se com diversas linhagens européias no Brasil; tal preocupação deu-se, principalmente, devido a maior agressividade das abelhas africanizadas (híbridas) que, por melhor adaptação (aproveitamento dos recursos naturais) e rápida introgressão do genótipo africanizado, rapidamente dispersaram-se por quase todo o continente Americano. Hoje em dia as abelhas africanizadas são as preferidas pela maioria dos apicultores devido a sua melhor produtividade e resistência contra parasitas.

Tentativas de controlar a expansão do genótipo africanizado para evitar o seu ingresso nos EUA não obtiveram resultados satisfatórios (Danka et al., 1994, Hellmich et al., 1991) devido a um conjunto de fatores, dentre eles, os relacionados a ontogenia e fisiologia reprodutiva destas abelhas. Neste

contexto, aspectos importantíssimos são os fatores que determinam a fertilidade tanto das rainhas, quanto das operárias e também dos zangões, uma vez que já se mostrou recentemente a fertilidade elevada em operárias de abelhas africanizadas em comparação com abelhas de origem européia (Zillikens et al., 1999). Consideramos que, neste ponto, nossos estudos podem ter sua relevância também. Como pudemos observar, assim como houve patrilineas cuja ativação ovariana e número de ovários foi baixo, também se encontrou patrilinea onde ambos aspectos foram elevados. E essas mesmas patrilineas foram mais representadas após a orfandade, através de seus filhos. E por fim, através da análise estatística, pôde-se comprovar pelo teste exato de Fisher, que essas diferenças de representatividade das patrilineas antes, e após a orfandade, não ocorreram aleatoriamente.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

- 1- Patrilineas: pode-se perceber nesses resultados a grande eficácia da metodologia utilizada pois se observa um alto número de patrilineas (representados por alelos diferentes dos microssatélites A7, A88 e A24) nos ninhos. Conseguiu-se identificar um mínimo de 14 linhagens paternas no ninho 65, e 14 linhagens paternas no ninho 67.

- 2- *Status* ovariano e número de ovários: Pode-se notar uma relação entre ativação ovariana, e número de ovários nos ovários das operárias, pois tanto no ninho 65, quanto no ninho 67, a patrilinea **2/4** apresentou alto *status* ovariano e também alto número de ovários, sendo que, as patrilineas **4/1** e **4/2** apresentaram baixo *status* ovariano e baixo número de ovários. Fato muito interessante é que foram as mesmas patrilineas em ambos ninhos.

- 3- Zangões filhos de operárias órfãs: Nota-se que ao comparar as patrilineas (representadas pelos alelos dos microssatélites **A88/A24**) presentes na amostra de operárias dos ninhos 65 e 67, e na amostra de zangões filhos dessas operárias (na condição de orfandade), proporcionalmente houve um aumento da representatividade da patrilinea **2/4**, em ambos os ninhos. No ninho 65 a representatividade da patrilinea **2/4** na amostra de operárias era de 0,83%, e na amostra de zangões filhos dessas operárias passou a representar 11,26%. No ninho 67 fato semelhante foi observado, pois a representatividade da patrilinea

2/4 na amostra de operárias era de 1,92%, e na amostra de zangões filhos dessas operárias passou a representar 14,55%.

- 4- Análise estatística: A análise estatística foi feita através da utilização do teste exato de Fisher, que possibilitou a afirmação com um grau de probabilidade acima de 95% de certeza em ambos ninhos ($P=0,0012$ no ninho 65, e $P=0,041$ no ninho 67), que a patrilinea **2/4** apresentou ativação ovariana e oviposição após a orfandade superior das demais patrilineas, e de forma não aleatória.

- 5- Finalmente, pôde-se constatar que a patrilinea **2/4** após a orfandade teve uma representatividade elevada (e não aleatória), enquanto que as patrilineas **4/1**, **4/2**, **4/3** e **4/4**, apresentaram-se em número ínfimo após a orfandade. Portanto, concluiu-se que há diferenças genéticas na probabilidade de operárias se tornarem poedeiras em condição órfã.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, J.; Rothman, E.; Kerr, W.E.; Paulino, Z. L. (1977) Estimation of the number of sex alleles and queen mating from diploid male frequencies in a population of *Apis mellifera*. *Genetics* 86, 583-596.
- Augusto, S.C. (1999) Bionomia e organização social de *Euglossa (Euglossa) fimbriata*. Dissertação Doutorado, Depto. Biologia, FFCLRP-USP, Ribeirão Preto.
- Barron, A.B. e Oldroyd, B.P. (2001) Social regulation of ovary activation in “anarchistic” honeybees (*Apis mellifera*). *Behav. Ecol. Sociobiol.* 49, 214-219.
- Barron, A.B., Oldroyd, B.P. e Ratnieks, F.L.W. (2001) Worker reproduction in honey-bees (*Apis*) and the anarchic syndrome: a review. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 50 (3), 199-208.
- Beye, M., Neumann, P., Schmitzová, J., Klaudiny, J., Albert, S., Simúth, J., Felder, M. e Moritz R.F.A. (1998) A simple, non-radioactive DNA fingerprinting method for identifying patriline in honeybee colonies. *Apidologie* 29, 255-263.
- Bloch, G., Borst, D.W., Huang, Z.Y., Robinson, G.E. e Hefetz, A. (1996) Effects of social conditions on juvenile hormone-mediated reproductive development in *Bombus terrestris* workers. *Physiol. Entomol.* 21, 257-267.
- Bloch, G., Borst, D.W., Huang, Z.Y., Robinson, G.E. e Hefetz, A. (2000) Haemolymph JH titer, biosynthesis rates, ovarian development and the social environment in *Bombus terrestris*. *J. Insect Physiol.* 46, 47-57.
- Boomsma, J.J e Ratnieks, F.L.W. (1996) Paternity in eusocial Hymenoptera. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 351, 947-975.
- Contel, E.P.B. e Kerr, W.E. (1976) Origin of males in *Melipona subnitida* estimated from data of an isozymic polymorphic system. *Genética* 46, 271-277.
- Danka, R. G., Loper, G. M., Villa, J. D., Williams, J. L., Sugden, E. A., Collins, A. e Rinderer, T. E. (1994) Abating feral Africanized honey bees (*Apis mellifera* L.) to enhance mating control of European queens. *Apidologie* 25, 520-529.

- Dedej, S., Hartfelder, K., Aumeier, P., Rosenkranz, P. e Engels, W. (1998) Caste determination is a sequential process: Effect of larval age at grafting on ovariole number, hindleg size, and cephalic volatiles in the honey bee (*Apis mellifera carnica*). J. Apic. Res. 37, 193-200.
- Duchateau, M.J. e Velthuis, H.H.W. (1988) Development and reproductive strategies in *Bombus terrestris* colonies. Behaviour 107, 186-207.
- Duchateau, M.J. e Velthuis, H.H.W. (1989) Ovarian development and egg laying in workers of *Bombus terrestris*. Entom. exp. appl. 51, 199-213.
- Engels, W.E. e Imperatriz-Fonseca, V.L. (1990) Caste development, reproductive strategies, and control of fertility in honey bees and stingless bees. em: Social Insects - an evolutionary approach to castes and reproduction. (W. Engels, ed.), Springer Verlag, Berlin, 167-230.
- Estoup, A., Solignac, M. e Cornuet, J-M. (1994) Precise assessment of the number of patriline and of genetic relatedness in honeybee colonies. Proc. R. Soc. London, Ser. B 258, 1-7.
- Estoup, A., Garnery, L., Solignac, M. e Cornuet, J-M. (1995a) Microsatellite variation in honey bee (*Apis mellifera* L.) populations: hierarchical genetic structure and test of the infinite allele and stepwise mutation models. Genetics 140, 679-695.
- Estoup, A., Scholl, A., Pouvreau, A. e Solignac, M. (1995b) Monoandry and polyandry in bumble bees (Hymenoptera-Bombinae) as evidenced by highly variable microsatellites. Mol. Ecol. 4 (1), 89-93.
- Estoup, A. e Turgeon, J. (1996) Microsatellite marker isolation with non-radioactive probes and amplification.
<http://www.inapg.inra.fr/dsa/microsat/microsat.htm>
- Evers, C.A. e Seeley, T.D. (1986) Kin discrimination and aggression in honey bee colonies with laying workers. Anim. Behav. 34, 924-944.
- Foster, K.R., Ratnieks, F.L.W. e Raybould, A.F. (2000) Do hornets have zombie workers? Mol. Ecol. 9 (6), 735-742.
- Franck, P., Koeniger, N., Lahner, G., Crewe, R.M. e Solignac, M. (2000) Evolution of extreme polyandry: an estimate of mating frequency in two African honeybee subspecies, *Apis mellifera monticola* and *A. m. schutellata*. Insectes soc. 47, 364-370.

- Fraser, V.S., Kaufmann, B., Oldroyd, B.P. e Crozier, R.H. (2000) Genetic influence on caste in the ant *Camponotus consobrinus*. Behav. Ecol. Sociobiol. 47 (3), 188-194.
- Free, J.B. (1987) Pheromones of Social Bees. Chapman and Hall, London.
- Gadagkar, R. (1997) The evolution of communication and the communication of evolution: The case of the honey bee queen pheromone. Orientation and Communication in Arthropods. (M. Lehrer, ed.), Birkhäuser Verlag, Basel, 375-395.
- Garófalo, C.A. (1985) Social structure of *Euglossa cordata* nests (Hymenoptera; Apidae; Euglossini). Entom. Gener. 11, 77-83.
- Haberl, M. e Tautz, D. (1998) Sperm usage in honeybees. Behav. Ecol. Sociobiol. 42, 247-255.
- Hellmich, R. L., Rinderer, T. E., Danka, R. G., Collins, A. M. e Boykin, D. L. (1991) Flight times of Africanized and European honey-bee drones (Hymenoptera, Apidae). J. Econ. Entom. 84, 61-64.
- Imperatriz-Fonseca, V.L., Matos, E.T., Ferreira, F. e Velthuis, H.H.W. (1998) A case of multiple mating in stingless bees (Meliponinae). Ins. Soc. 45, 231-233.
- Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. e White, T.J. (1990) PCR Protocols. Academic Press, San Diego.
- Jay, S.C. (1968) Factors influencing ovary development of worker honey bees under natural conditions. Can. J. Zool. 46 (3), 345-349.
- Jay, S.C. (1970) The effect of various combinations of immature queen and worker bees on the ovary development of worker honey bees in colonies with and without queens. Can. J. Zool. 48 (1), 169-173.
- Kaatz, H.-H. Hildebrandt, H. e Engels, W. (1992) Primer effect of queen pheromone on juvenile hormone biosynthesis in adult worker honey bees. J. Comp. Physiol. B 162, 588-592.
- Keller, L. e Nonacs, P. (1993) The role of queen pheromones in social insects: Queen control or queen signal? Anim. Behav. 45, 787-794.
- Kerr, W.E., Zucchi, R., Nakadaira, J.T. e Butolo, J.E. (1962) Reproduction in social bees (Hymenoptera: Apidae). J. N. Y. Entom. Soc. 70, 265-276.
- Kerr, W.E. (1969) Some aspects of the evolution of social bees. Evol. Biol. 3, 119-175.

- Kropacova, S. e Halsbachova, H. (1969) The development of ovaries in worker honey bees in a queenright colony. *J. Apicult. Res.* 8, 57-64.
- Machado, M.F.P.S., Contel, E.P.B. e Kerr, W.E. (1984) Proportion of males sons-of-the-queen and sons-of-the-workers in *Plebeia droryana* (Hymenoptera, Apidae) estimated from data on an MDH isozymic system. *Genética* 65, 193-198.
- Makert, G.R. e Hartfelder, K. (2000) Diferenças na capacidade reprodutiva entre patrilineas presentes em colméias de *Apis mellifera* podem resultar em conflito reprodutivo. *Gen. Mol. Biol.* 23 (3), 148.
- Makert, G.R. e Hartfelder, K. (2002) Ovários em operárias órfãs de *Apis mellifera* exibem ativação diferenciada, relacionada às diferentes linhagens paternas da colmeia. 13o Encontro de Biólogos do CRBio, São Pedro, SP.
- Michener, C.D. (1974) *The Social Behavior of the Bees*. Belknap Harvard Press of Harvard University, Cambridge, Mass.
- Montague, C.E. e Oldroyd, B.P. (1998) The evolution of worker sterility in honey bees: an investigation into a behavioral mutant causing failure of worker policing. *Evolution* 52 (5), 1408-1415.
- Moritz, R.F.A. (1985) The effects of multiple mating on the worker-queen conflict in *Apis mellifera* L. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 16, 376-377.
- Moritz, R.F.A. e Southwick, E.E. (1992) *Bees as Superorganisms. An Evolutionary Reality*. Springer Verlag, Berlin.
- Moritz, R.F.A., Beye, M. e Hepburn, H.R. (1998) Estimating the contribution of laying workers to population fitness in African honeybees (*Apis mellifera*) with molecular markers. *Ins. Soc.* 45 (3), 277-287.
- Moritz, R.F.A. e Hillesheim, E. (1985) Inheritance of dominance in honeybees (*Apis mellifera capensis* Esch.). *Behav. Ecol. Sociobiol.* 17, 87-89.
- Oldroyd, B.P., Smolenski, A.J., Cornuet, J.-M. e Crozier, R.H. (1994) Anarchy in the beehive. *Nature* 371, 749.
- Oldroyd, B.P., Halling, L. e Rinderer, T.E. (1999) Development and behaviour of anarchistic honeybees. *Proc. R. Soc. Lond. B* 266, 1875-1878.
- Oldroyd, B.P., Wossler, T.C. e Ratnieks, F.L.W. (2001) Regulation of ovary activation in worker honey-bees (*Apis mellifera*): larval signal production

- and adult response thresholds differ between anarchistic and wildtype bees. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 50 (4), 366-370.
- Page, R.E. e Erickson, E.H. (1988) Reproduction by worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Behav. Ecol. Sociobiol.* 23, 117-126.
- Pamilo, P. (1987) Sex ratios and the evolution of eusociality in the Hymenoptera. *J. Genet.* 66, 111-122.
- Pamilo, P., Gertsch, P., Thoren, P. e Seppa, P. (1997) Molecular population genetics of social insects. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 28, 1-25.
- Paxton, R.J., Weißschuh, N., Engels, W., Hartfelder, K. e Quezada-Euan, J.J.G. (1999) Not only single mating in stingless bees. *Naturwissenschaften* 86, 143-146.
- Paxton, R.J. (2000) Genetic structure of colonies and a male aggregation in the stingless bee *Scaptotrigona postica*, as revealed by microsatellite analysis. *Ins. Soc.* 47, 63-69.
- Peters, J.M., Queller, D.C., Imperatriz-Fonseca, V.L., Roubik, D.W., Strassmann, J.E. (1999) Mate number, kin selection and social conflict in stingless bees and honeybees. *Proc. R. Soc. London, Ser. B* 266, 379-384.
- Plettner, E., Slessor, K.N., Winston, M.L., Robinson, G.E. e Page, R.E. (1993) Mandibular gland components and ovarian development as measures of caste differentiation in the honey bee (*Apis mellifera* L.). *J. Insect Physiol.* 39, 235-240.
- Plettner, E., Slessor, K.N., Winston, M.L. e Oliver, J.E. (1996) Caste-specific pheromone biosynthesis in honeybees. *Science* 271, 1851-1853.
- Queller, D. C., Strassmann, J. E. e Hughes, C. R. (1993) Microsatellites and kinship. *Trends Ecol. Evol.* 8, 285-288.
- Ratnieks, F.L.W. e Boomsma, J.J. (1995) Facultative sex allocation by workers and the evolution of polyandry by queens in social Hymenoptera. *Amer. Nat.* 145, 969-993.
- Ratnieks, F.L.W. e Visscher, P.K. (1989) Worker policing in the honeybee. *Nature* 342, 796-797.
- Robinson, G. E.; Page, R. E; Fondrk, M. K. (1990) Intracolony behavioral variation in worker oviposition, oophagy and larval care in queenless honey bee colonies. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 26, 315-323.

- Röseler, P.-F. e van Honk, C.G.J. (1990) Castes and reproduction in bumblebees. em: Social Insects - an evolutionary approach to castes and reproduction. (W. Engels, ed.), Springer Verlag, Berlin, 147-166.
- Ruttner, F. e Hesse, B. (1981) Rassenspezifische Unterschiede in Ovaentwicklung und Eiblage von weisellosen Arbeiterinnen der Honigbiene *Apis mellifera* L. Apidologie 12, 159-183.
- Sakagami, S.F. (1954) Occurrence of an aggressive behavior in queenless hives, with considerations on the social organization of honeybees. Ins. Soc. 1, 221-343.
- Sakagami, S. F. (1958) The false queen: fourth adjustive response in dequeened honeybee colonies. Behaviour 13, 280-295.
- Sanguinetti, C., Dias Neto, E. e Simpson, A.J.G. (1994) Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. Biotechniques 17, 209-214.
- Snodgrass, R.E. (1956) Anatomy of the Honey Bee. Comstock Publ. Ass. Ithaca. New York.
- Sommeijer, M.J., Chinh, T.X. e Meeuwsen, F.J.A.J. (1999) Behavioural data on the production of males by workers in the stingless bee *Melipona favosa* (Apidae, Meliponinae). Ins. Soc. 46, 92-93.
- Stephen, J.M., Beekman, M., Wossler, T.C. e Ratnieks, L.W. (2002) Parasitic Cape honeybee workers, *Apis mellifera capensis*, evade policing. Nature 415, 163-165.
- Strambi, A. (1990) Physiology and reproduction in social wasps. em: Social Insects - an evolutionary approach to castes and reproduction. (W. Engels, ed.), Springer-Verlag, Berlin, 59-75.
- Visscher, P.K. (1989) A quantitative study of worker reproduction in honey bee colonies. Behav. Ecol. Sociobiol. 25, 247-254.
- Visscher, P.K. (1996) Reproductive conflict in honey bees: a stalemate of worker egg-laying and policing. Behav. Ecol. Sociobiol. 39, 237-244.
- Visscher, P.K. e Dukas, R. (1995) Honey bees recognise development of nestmates' ovaries. Anim. Behav. 49, 542-544.
- Wilson, E.O. (1971) The Insect Societies. Belknap Harvard Press of Harvard University, Cambridge, Mass.

- Winston, M.L. e Slessor, K. N. (1993) The essence of royalty: The honey bee queen pheromone. *Amer. Sci.* 80, 374-385.
- Zillikens, A., Simões, Z.L.P. e Engels, W. (1999) Higher fertility of queenless workers in the Africanized honey bee. *Ins. Soc.* 45, 473-476.

APÊNDICE

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e/ou divulgação total ou parcial da presente obra, por qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte. Os dados originais podem ser disponibilizados mediante requerimento ao autor.

Makert, G. R.

Assinatura do Autor: _____

Gustavo Rodrigues Makert dos Santos

Instituição: FMRP / Universidade de São Paulo

Local: Ribeirão Preto, SP

Endereço: Av. Bandeirantes 3900 – Depto Genética

E-Mail: gustavo@rge.fmrp.usp.br