

ANDRÉ SOUTHERNMAN TEIXEIRA IRSIGLER

**MACHOS DIPLÓIDES EM COLÔNIAS ENDOGÂMICAS DE
Melipona quadrifasciata (HYMENOPTERA, APIDAE):
ANÁLISES MORFOLÓGICA E GENÉTICA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de “*Magister Scientiae*”.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL**

2002

ANDRÉ SOUTHERNMAN TEIXEIRA IRSIGLER

**MACHOS DIPLÓIDES EM COLÔNIAS ENDOGÂMICAS DE
Melipona quadrifasciata (HYMENOPTERA, APIDAE):
ANÁLISES MORFOLÓGICA E GENÉTICA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de “*Magister Scientiae*”.

APROVADA: 04 de Março de 2002

Prof^a. Mara Garcia Tavares
(conselheira)

Prof. Cosme Damião Cruz
(conselheiro)

Prof^a. Sílvia das Graças Pompolo

Prof. Dejair Message

Prof. Lucio Antonio de Oliveira Campos
(Orientador)

Ao meu avô,
Mozart Geraldo Teixeira

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, pela estrutura oferecida para a realização deste trabalho.

Ao CDTN/CNEN – UFMG por viabilizar por diversas vezes a irradiação de abelhas.

Ao Prof. Lucio Antonio de Oliveira Campos que, além da amizade, orientação e apoio para a realização deste trabalho, atuou profundamente na minha formação acadêmica e pessoal.

Às Professoras Mara G. Tavares, pelo apoio no laboratório e sugestões no trabalho, Marluci Ribeiro, pela amizade, e Sílvia Pompolo, que além da amizade e incentivo, sempre foi muito acolhedora no seu laboratório.

Ao Professor Cosme Damião Cruz pelas atenções e incentivos dados.

Aos Professores José Eduardo Serrão, pelo apoio, Adilson Zacaro, pela amizade e José Lino Neto, pelas sugestões.

À Prizinha pelo grande apoio e motivações, e por ocupar um lugarzinho no lado esquerdo do meu peito.

Aos colegas do laboratório e da citogenética, dentre eles Gustavo, Simone, Denilce, Angélica, Anderson, Bruno, Marla, André Roberto, assim como ao Vander, Samuel, pela amizade e momentos de descontração, e ao velho amigo Gabriel, que mostra que está sempre aí pro que der e vier.

Ao pessoal do Apiário, Luciane, Mariana, Ronaldo e Guido, por ter feito do Apiário um agradável local de trabalho, e pelos coffee-breaks com direito a bons papos, além da amizade. Agradecimento em especial ao técnico Íris, pela grande ajuda em relações às colônias de mandaçaia, assim como aos demais técnicos do Apiário.

À minha mãe, pelo grande incentivo e apoio, à minha avó, pelo apoio e por sempre mostrar o lado bom das coisas, ao meu irmão pelo companheirismo e amizade, e a todos os meus familiares.

Aos colegas do curso de genética, pelos grupos de estudos e farras no meio tempo.

Aos meus padrinhos Cacá e Ferrari e meus primos, pela amizade e apoio em diversos momentos.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

André Southernman Teixeira Irsigler, filho de Ernesto Rodolfo Irsigler e Maria Célia Couto Teixeira, nasceu em 29 de março de 1978, na cidade de Cotia, em São Paulo. Residiu quase toda sua infância em Juiz de Fora, Minas Gerais, na casa de seus avós, Dr. Mozart Geraldo Teixeira e Célia Couto Teixeira.

No início do ano de 1996 ingressou no curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Viçosa, obtendo o título de Bacharel no início do ano 2000. Durante este período realizou diversas atividades, dentre elas a participação no Programa Especial de Treinamento, monitorias em Genética Básica e Biologia Celular e iniciação científica, se envolvendo com trabalhos sobre biologia e genética de abelhas, sob orientação do Prof. Lucio Campos.

Continuando uma linha de pesquisa com o Prof. Lucio, em fevereiro de 2000 ingressou no Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, em nível de mestrado, na mesma universidade, submetendo-se à defesa de tese no dia 4 de março de 2002.

CONTEÚDO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
1) INTRODUÇÃO.....	1
1.1. A tribo Meliponini e a espécie <i>Melipona quadrifasciata</i>	1
1.2. Sistemas de determinação do sexo nos Hymenoptera.....	2
1.3. Machos diplóides em espécies partenogéticas arrenótocas.....	4
1.4. Acasalamentos múltiplos.....	6
2) MATERIAL E MÉTODOS.....	8
2.1. Material genético.....	8
2.2. Extração de DNA.....	9
2.3. Amplificação do DNA via PCR-RAPD.....	11
2.4. Análise do loco de determinação sexual.....	11
2.5. Análise morfológica.....	12
2.6. Produção de prole em colônias endogâmicas.....	13
2.6.1. Análise de parentesco: operárias em geração endogâmica.....	14
3) RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
3.1. Diferença morfológica entre machos diplóides e haplóides.....	15
3.2. Produção de prole em colônias endogâmicas.....	20
3.3. Análise de ligação ao loco de determinação do sexo.....	33
4) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
5) APÊNDICES.....	45

RESUMO

IRSIGLER, André Southernman Teixeira, M.S., Universidade Federal de Viçosa, Março, 2002. **Machos diplóides em colônias endogâmicas de *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae): análises morfológica e genética.** Orientador: Lucio Antonio de Oliveira Campos. Conselheiros: Mara Garcia Tavares e Cosme Damião Cruz.

A espécie de abelha sem ferrão *Melipona quadrifasciata* Lep. é um importante agente polinizador, assim como um ótimo material para estudos biológicos. Nessa espécie, assim como na maioria dos Hymenoptera, os machos se desenvolvem a partir de óvulos não fecundados e são haplóides, enquanto as fêmeas se originam de óvulos fertilizados e são diplóides. *Melipona quadrifasciata* possui um sistema de determinação do sexo de um único loco e múltiplos alelos e, sob endogamia, há produção de machos diplóides. Estes machos diplóides são, geralmente, inviáveis ou estéreis, e impõem um custo significativo no sucesso reprodutivo de seus progenitores. Nesta espécie, os machos diplóides emergem como adultos, possuindo, no entanto, uma menor longevidade que os machos haplóides. Em *Melipona quadrifasciata*, estes machos se assemelham visualmente aos haplóides. Neste trabalho, buscou-se características que distinguíssem machos diplóides de haplóides de *Melipona quadrifasciata*. A característica analisada foi o tamanho dos testículos, que em outras espécies apresentou uma considerável variação entre machos diplóides e haplóides. Para realizar esta comparação, utilizou-se duas colônias fornecedoras de machos diplóides e duas fornecedoras de machos haplóides. Dez pupas de cada população foram analisadas, com medição do tamanho dos testículos e largura do tórax. Foi observado que machos haplóides possuem testículos significativamente maiores que machos diplóides, tornando esta característica útil para a diferenciação destes machos. Houve uma correlação positiva entre o

tamanho dos testículos e a largura do tórax em machos diplóides. A produção de machos diplóides em *Melipona quadrifasciata* foi acompanhada em três colônias submetidas à cruzamentos endogâmicos. Uma destas colônias foi obtida pelo cruzamento de uma rainha com um de seus filhos, resultantes de um prévio cruzamento desta rainha com um macho estéril. As outras duas foram obtidas pelo cruzamento de uma rainha com um irmão. Todas as colônias produziram machos diplóides. Na colônia resultante do cruzamento mãe x filho houve uma produção considerável de machos haplóides, aparentemente devido ao primeiro cruzamento com um macho esterilizado. Nesta colônia a proporção entre machos diplóides e fêmeas não foi estatisticamente diferente de 1:1, como esperado pelo sistema de determinação de sexo desta espécie. Em ambas as colônias de cruzamento irmã x irmão, os machos foram todos diplóides. Em uma destas colônias a proporção de machos e fêmeas foi aproximadamente 1:1. No entanto, na outra colônia houve um número significativamente maior de fêmeas. Demonstrou-se, por meio de marcadores RAPD, que parte das operárias produzida nesta colônia era resultado de um segundo acasalamento da rainha. Foi feita uma análise para identificação do loco sexual. Um total de 376 marcadores polimórficos foram obtidos pela amplificação do DNA de cinco machos haplóides com 343 primers, obtendo-se um polimorfismo médio de 1,1 bandas polimórficas por primer. Para a análise de ligação ao sexo, amplificou-se o DNA de três machos diplóides e três operárias (da mesma colônia) com 119 primers polimórficos, não se obtendo evidências de ligação de nenhum destes marcadores ao loco sexual.

ABSTRACT

IRSIGLER, André Southernman Teixeira, M.S., Universidade Federal de Viçosa, March, 2002. **Diploid males in inbred colonies of *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae): morfological and genetic analysis.** Adviser: Lucio Antonio de Oliveira Campos. Committee members: Mara Garcia Tavares and Cosme Damião Cruz.

The species of stingless bee *Melipona quadrifasciata* Lep is very important in pollination, as well as a great model for biological studies. In this species, as in the majority of Hymenoptera, males develop from non-fertilized eggs, and are haploids, while females originate from fertilized eggs, and are diploids. *Melipona quadrifasciata* has a sex determination system of one locus and multiple alleles, and under inbreeding, diploid males are produced. These diploid males usually are unviable or sterile, and decrease the reproductive success of their progenitors. In this species, diploid males emerge as adults, and have less longevity than haploid males. In *Melipona quadrifasciata*, these males visually resemble the haploids. In this study, traits that distinguish haploid from diploid drones in this species were sought. The trait analyzed was the testis length, which presented a considerable variation between diploid and haploid drones in others species. In order to do this comparison in *Melipona quadrifasciata*, two colonies that provided diploid males, and two that provided haploid males were used. Ten pupae of each colony were analyzed, by measurements of testes length and thorax width. It was observed that haploid drones had smaller testes than diploid drones, what make this trait useful to distinguish these drones. A positive correlation was observed between the length of testes and width of thorax in diploid drones. The production of diploid drones in *Melipona quadrifasciata* was analyzed in three colonies submitted to inbreeding crossings. One of these colonies was obtained by crossing a queen with one of her sons, resulted from an earlier crossing of this queen with a

sterilized drone. The other two were obtained by the crossing of a queen with her brother. All colonies produced diploid drones. In the colony resulted from mother x son crossing occurred a considerable production of haploid drones, apparently due to the first crossing with a sterilized drone. In this colony, the proportion of diploid drones and females was not statistically different from 1:1, as expected by the sex determination system of this species. In both colonies of sister x brother crossings, the drones were all diploids. In one of these colonies the proportion of males and females was 1:1. However, in the other colony the number of females was significantly greater than the number of males. It was demonstrated that part of the workers produced in this colony was resulted from a second crossing of the queen. An analysis to identify the sexual locus of the species *Melipona quadrifasciata* was done. A total of 376 RAPD markers was obtained by the DNA amplification of five haploid drones, with 343 primers, obtaining a mean polymorphism of 1,1 polymorphic bands per primer. To analyze sex linkage, DNA of three diploid males and three workers (from the same colony) was amplified with 119 polymorphic primers. However, it was not observed evidences of linkage of any markers to the sexual locus.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A tribo Meliponini e a espécie *Melipona quadrifasciata*

A tribo Meliponini, pertencente à família Apidae e ordem Hymenoptera, é um grupo de abelhas sem ferrão. A família Apidae é constituída também pelas tribos Bombini, formada pelas mamangavas sociais, Euglossini, com as abelhas de cores metálicas visitantes de orquídeas, e Apini, representada pelas abelhas melíferas (MICHENER, 1990). A tribo Meliponini é dividida em dois gêneros: *Melipona* e *Trigona* (MICHENER, 1990).

Os Meliponini se caracterizam por não construírem células reais. Todas as rainhas, operárias e machos nascem e se desenvolvem, até o estágio adulto, dentro de células de cria de igual tamanho (KERR, 1946). Além disso, a entrada dos ninhos fica quase sempre no centro de uma estrutura de terra ou de geoprópolis (argila e resinas vegetais). Esta tribo inclui apenas um gênero: *Melipona* Illiger (1806), com distribuição geográfica exclusivamente neotropical, abrangendo desde o sul da América do Sul até a América Central e ilhas do Caribe (KERR, 1969; CAMARGO *et al.*, 1988; MICHENER, 1990). Este gênero compreende mais de 40 espécies conhecidas (CAMARGO, 1979; MICHENER, 1979).

A espécie *Melipona quadrifasciata* Lep., popularmente conhecida como mandaçaia, é encontrada no território brasileiro da Paraíba ao Rio Grande do Sul (MOURE e KERR, 1950). Taxonomicamente, esta espécie pode ser dividida em duas subespécies: *Melipona quadrifasciata anthidioides* e *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* Lep., que possuem diferentes habitats e características morfológicas (CAMPOS, 1987). Machos e operárias de *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* apresentam bandas terciais amarelas e contínuas

(de três a cinco bandas) do 3º ao 5º segmento, e estas são interrompidas em *Melipona quadrifasciata anthidioides* (SCHWARZ, 1948).

Algumas características do grupo de abelhas sem ferrão revelam ser este um importante material de estudo do ponto de vista biológico e econômico. Além de muitas espécies de meliponíneos produzirem mel de diversos sabores e geoprópolis com potenciais farmacológicos, a tribo Meliponini é responsável pela polinização de cerca de 40 a 90% das plantas da flora nativa (KERR *et al.*, 1996), sendo esta atividade essencial para a manutenção da variabilidade genética de muitas espécies de plantas.

1.2. Sistemas de determinação do sexo nos Hymenoptera

Na maioria dos Hymenoptera, os machos se desenvolvem a partir de óvulos não fecundados e são haplóides, sendo que as fêmeas se originam de óvulos fertilizados e são diplóides (Dzierzon, 1899, *in* KERR, 1997). Este processo é conhecido como partenogênese arrenótoca. Além deste tipo de partenogênese, a telitoquia, a deuterotoquia e a partenogênese alternante também estão presentes em algumas espécies de Hymenoptera (CRUZ-LANDIM, 1984).

Para explicar esta forma de determinação do sexo foram propostos alguns modelos.

No modelo de determinação de sexo por complementação, WHITING (1943), baseando-se em seus estudos com *Bracon hebetor*, sugeriu que o sexo nos Hymenoptera seria determinado por uma série de alelos em um único loco gênico. Ele concluiu que o sexo nesta espécie é determinado por uma série de, pelo menos, nove alelos em um loco sexual, que em hemizigose ($xo^1, xo^2 \dots xo^9$) ou em homozigose ($xo^1xo^1, xo^2xo^2 \dots xo^9xo^9$) há determinação do desenvolvimento de machos (haplóides ou diplóides, respectivamente). Quando em heterozigose ($xo^1xo^2, \dots xo^8xo^9$), há determinação da formação de fêmeas.

Este sistema de determinação do sexo sugere que o endocruzamento aumenta a proporção de machos diplóides, já que o número de alelos sexuais em homozigose aumenta com este tipo de acasalamento. De fato já foram descritas diversas espécies nas quais ocorre a produção de machos diplóides (WHITING,

1943; CROZIER, 1975, 1977; CAMARGO, 1979; WOYKE, 1963, 1979; KERR, 1987; COOK, 1993; CROZIER *et al.*, 1996).

No entanto, algumas espécies de Hymenoptera, em geral vespas parasitóides, não produzem machos diplóides, mesmo após várias gerações de endocruzamentos, sugerindo um modelo alternativo de determinação de sexo. CROZIER (1977) propõe que nestas espécies o sexo seja determinado por dois ou mais locos sexuais, e que heterozigotos em um ou mais locos sejam fêmeas, e hemizigotos ou homozigotos em todos os locos sejam machos.

No modelo do balanço gênico proposto por CUNHA E KERR (1957), o sexo nos Hymenoptera seria determinado por um balanço entre genes feminilizantes, total ou parcialmente aditivos (F), e genes masculinizantes, total ou parcialmente não aditivos (M), espalhados pelo genoma. A relação entre M e F determinaria o sexo do indivíduo. Em indivíduos diplóides, a aditividade de dois alelos de cada loco feminilizante iria ocasionar a formação de um indivíduo fêmea ($2F > M$). Nos indivíduos haplóides, por conterem somente um alelo de cada loco feminilizante, o efeito dos genes masculinizantes prevalece, ocasionando a formação de machos ($M > F$). No entanto, em muitas espécies não haveria aditividade do efeito feminilizante se houvesse homozigose nesses locos, ocorrendo nestes casos a formação de machos diplóides.

Em relação à detecção do loco de determinação do sexo em *Apis mellifera*, já foram identificados dois marcadores moleculares intimamente ligados ao loco sexual (loco X): um marcador RAPD denominado loco Q (HUNT e PAGE, 1994) e um marcador multiloco fingerprinting (loco Z) (BEYE e MORITZ, 1994). Baseando-se no modelo de determinação do sexo por complementação, estes locos puderam ser detectados por estarem em homozigose em machos diplóides e em heterozigose em operárias, já que estaria fisicamente ligado ao loco sexual. Posteriormente, o loco Z foi clonado e utilizado como uma sonda para o mapeamento físico no genoma de *Apis mellifera*, o que possibilitou a identificação do cromossomo no qual se localiza o loco sexual (BEYE e MORITZ, 1996). O loco sexual foi então localizado na posição subtelomérica do braço longo do cromossomo 8 desta espécie.

Assim como *Apis mellifera*, *Melipona quadrifasciata* também possui um sistema de determinação do sexo de um único loco e múltiplos alelos, já que após o cruzamento artificial de uma rainha com um zangão irmão, em metade dos casos, a progênie obtida é constituída de operárias e machos diplóides, na proporção de 1:1 (CAMARGO, 1977). Em todas as colônias em que a rainha foi cruzada com um de seus filhos, machos diplóides foram obtidos. No entanto, a posição do loco sexual no genoma desta espécie ainda não é conhecida.

TAVARES (1999) realizou estudos genéticos no sentido de mapear o genoma de *Melipona quadrifasciata*. O mapa de ligação obtido possui um total de 127 marcadores RAPD, distribuídos em 22 grupos de ligação, mais 38 marcadores não ligados, cobrindo aproximadamente 1416 cM de distância de mapa. Neste mesmo estudo foi feita análise para a detecção de marcadores RAPD ligados ao loco de determinação do sexo nesta espécie. Um total de 133 primers foi utilizado, mas nenhum destes produziram marcadores associados ao loco sexual.

1.3. Machos diplóides em espécies partenogénicas arrenótocas

A produção de machos diplóides inevitavelmente ocorre em muitas populações de organismos haplo-diplóides em cada geração, mesmo sob panmixia (ADAMS *et al.*, 1977). Estes machos são, geralmente, inviáveis ou estéreis (PETTERS e METTUS, 1980), e impõem um custo significativo no sucesso reprodutivo de seus genitores (RATNIEKS, 1990), havendo uma provável seleção para mecanismos que evitem a endogamia por fêmeas de espécies sociais.

Nos Hymenoptera, a viabilidade dos machos diplóides varia de acordo com a espécie estudada. Em *Bracon hebetor* esses machos têm viabilidade baixíssima (WHITING, 1943). Em *Apis mellifera*, zangões diplóides possuem baixa viabilidade devido ao canibalismo exercido pelas operárias (WOYKE, 1965, 1986). Em *Melipona* e *Bombus*, os machos diplóides emergem como adultos, podendo, em algumas espécies de *Melipona*, serem mortos posteriormente pelas operárias, sendo morta também a rainha responsável pela

produção destes machos (GARÒFALO, 1973; KERR *et al.*, 1996). Em *Bombus atratus* (PLOWRIGHT e PALLET, 1979) e em *B. terrestris* (DUCHATEAU e MARRIEN, 1995), larvas de machos diplóides alcançam o estágio adulto. Em *Melipona quadrifasciata*, os machos diplóides têm viabilidade normal durante o estágio de desenvolvimento, mas sua longevidade máxima é de 17 dias, contrastando com a longevidade máxima de machos haplóides (30 dias) e de operárias (190 dias) (CAMARGO, 1982). Esta baixa longevidade pode estar associada à homozigose do loco Xo e de outros genes ligados, já que para o restante dos locos o grau de homozigose de machos diplóides é semelhante ao das operárias.

Machos diplóides se assemelham visualmente aos haplóides em *Bracon* (WHITING, 1943) e em *M. quadrifasciata* (CAMARGO, 1979), mas são claramente maiores que os haplóides em outras espécies de Hymenoptera (SMITH e WALLACE, 1971; WOYKE, 1978; ROSS e FLETCHER, 1985; PACKER e OWEN, 1990; NAITO e SUZUKI, 1991).

Análises morfométricas já foram realizadas para a diferenciação de machos diplóides e machos haplóides de algumas espécies do gênero *Apis*, chegando-se a diferenças significativas para algumas características medidas (WOYKE, 1977). O comprimento dos testículos é uma característica morfológica que difere entre machos haplóides e diplóides em algumas espécies. Em *A. mellifera* (WOYKE, 1974) e em *B. terrestris* (DUCHATEAU e MARIEN, 1995), os testículos de machos diplóides são menores em comparação aos dos machos haplóides. WOYKE (1973) mostrou que os testículos de zangões diplóides em *A. mellifera* têm cerca da metade do número de túbulos seminíferos, e que estes túbulos têm somente 42% do comprimento nos machos diplóides em relação aos dos haplóides.

1.4. Acasalamentos múltiplos

A frequência de acasalamentos pela rainha em muitas espécies de Hymenoptera se tornou uma importante questão acerca da evolução da sociabilidade. HAMILTON (1964) sugeriu uma relação entre o grau de parentesco e o comportamento altruístico entre indivíduos, o que levaria a elevados níveis de sociabilidade em certas espécies. Acasalamentos múltiplos pelas rainhas diminuiriam o grau de parentesco entre operárias de insetos sociais. No entanto, benefícios adaptativos relacionados à poliandria têm sido mencionados, tais como o aumento de defesa contra parasitas, tolerância à variações ambientais e redução da carga genética (quanto à produção de machos diplóides) (BOOMSMA e RATNIEKS, 1996).

Os casos mais extremos de acasalamentos múltiplos são encontrados no gênero *Apis*. Estimativas indicam que rainhas de algumas espécies desse gênero podem chegar a copular com mais de 44 machos (MORITZ, 1995). No entanto, grupos apresentando acasalamentos múltiplos são bastante raros, restringem-se, praticamente, às abelhas melíferas (STRASSMANN, 2001).

No grupo das abelhas sem ferrão, as rainhas geralmente copulam uma única vez (KERR, 1969; SILVA *et al.*, 1972; MACHADO, 1984; PETERS *et al.*, 1999), sendo esta observação feita a partir de contagens de espermatozoides na espermateca de fêmeas, permanência da genitália do macho na câmara genital da fêmea após a cópula e segregação de marcadores genéticos.

Com isso, este trabalho teve como objetivos:

- Diferenciar morfológicamente machos diplóides e haplóides de *Melipona quadrifasciata*
- Observar o padrão de produção de prole em colônias de *Melipona quadrifasciata* submetidas a cruzamentos endogâmicos
- Localizar o loco sexual no mapa genético desta espécie

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material genético

Rainhas virgens de *Melipona quadrifasciata* de colônias mantidas no Apiário Central de Viçosa, foram cruzadas em condições controladas, segundo técnica descrita por CAMARGO (1972), com machos esterilizados. Esta esterilização foi feita pelo tratamento com 60.000r de raios gama em bomba de cobalto-60, no Centro Nacional de Energia Nuclear - UFMG. Posteriormente, rainhas cruzadas foram colocadas separadamente em placas de Petri, em estufa a 28°C, com intrusão diária de operárias jovens e alimento, até as rainhas tornarem-se fisogástricas.

As rainhas fisogástricas, juntamente com operárias da mesma placa, foram transferidas para caixas de madeira para a manutenção no campo, continuando a introdução diária de operárias jovens e alimentos. Os favos produzidos por estas rainhas foram coletados para as análises.

Este primeiro cruzamento foi realizado para a obtenção de dados a respeito do estado alélico da rainha utilizada no programa de cruzamentos, já que o cruzamento de rainhas com machos estéreis produzem somente machos haplóides, que representam os gametas desta rainha.

Após obtenção do material do primeiro cruzamento, um dos machos produzidos foi cruzado com a rainha genitora para a obtenção da geração endogâmica. Todos os favos produzidos após este cruzamento foram retirados para a análise morfológica, determinação de proporções sexuais e identificação de marcadores RAPD proximamente ligados ao loco de determinação do sexo (Xo). Um esquema deste cruzamento pode ser observado na Figura 1A.

Um outro tipo de cruzamento foi realizado utilizando a mesma metodologia no que diz respeito à obtenção de colônias. No entanto, este

consistiu de cruzamento de uma rainha virgem com um macho haplóide produzido na mesma colônia, ou seja, um irmão desta rainha. Um esquema deste cruzamento está representado na Figura 1B.

2.2. Extração de DNA

Foram feitas extrações de DNA das amostras de acordo com o protocolo descrito por WALDSCHMIDT e col. (1997). Cada indivíduo foi macerado separadamente em um cadinho contendo nitrogênio líquido. O macerado foi transferido para um microtubo e adicionado 1000 µl de tampão de extração (CTAB 2%; NaCl 1,4 M; Tris/HCl 100 mM (pH 8,0); EDTA 20 mM (pH 8,0); e 100 µg/ml de proteinase K). O macerado foi incubado a 65°C por 30 min. A desproteíntização foi feita com 1 volume de clorofórmio, centrifugando a 13000 rpm. Este processo foi repetido mais uma vez. O material foi tratado com RNase e incubado a 37°C por 30 min. O DNA foi precipitado em 1 volume de isopropanol, a -20°C por 12h. Após a precipitação, a solução foi centrifugada a 14.000 rpm por 30 min. O precipitado foi lavado com etanol, seco ao ar livre, e então ressuspensionado em 100 µl de TE (Tris HCl 10 mM (pH 8,0), EDTA 1 mM). A suspensão obtida foi submetida à eletrofoerese em gel de agarose 0,8%, contendo 7 µl de brometo de etídio, para se verificar a pureza e integridade do DNA extraído.

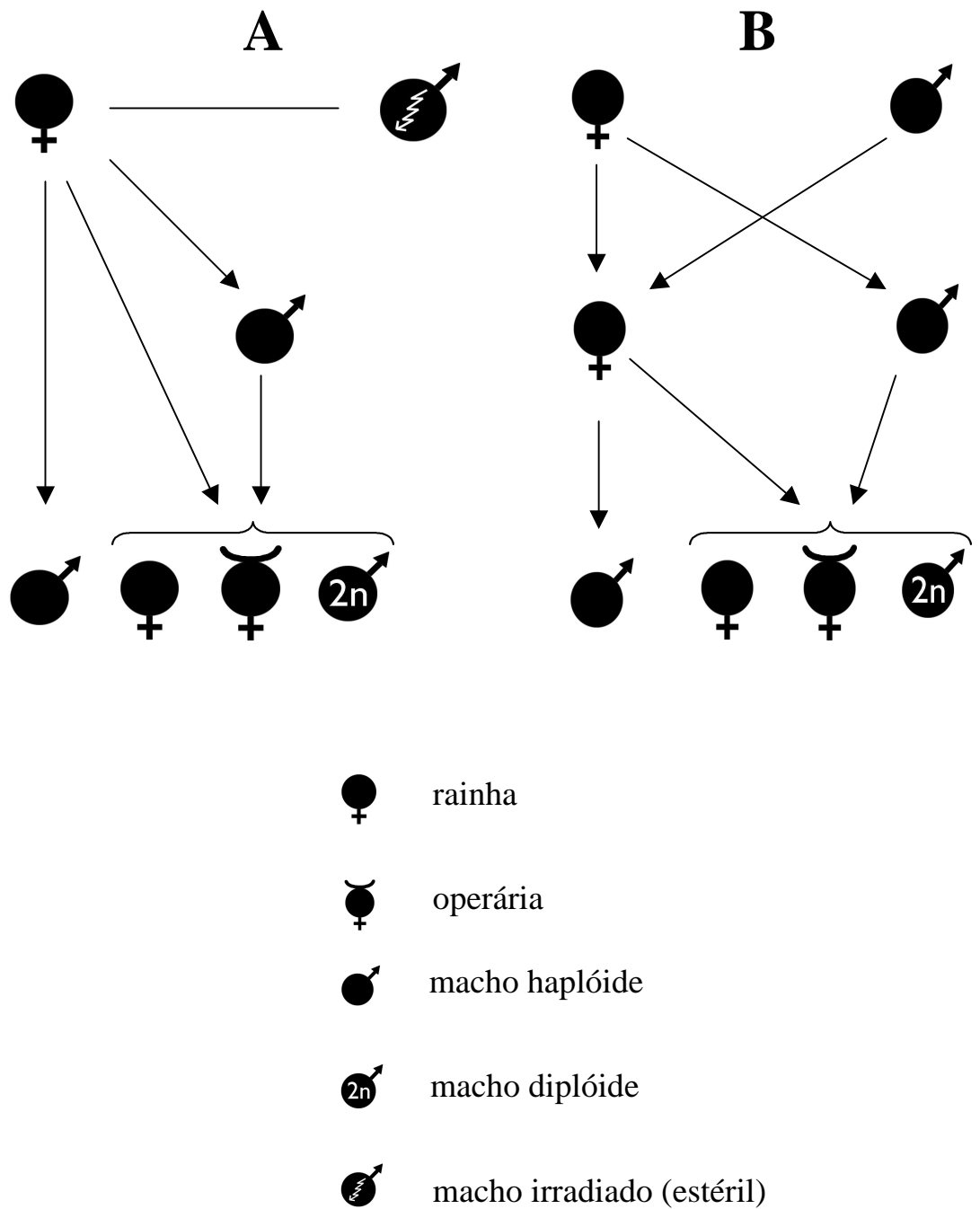


Figura. 1. Esquema dos cruzamentos realizados com *Melipona quadrifasciata*. A: Retrocruzamento. B: Cruzamento entre irmãos.

2.3. Amplificação do DNA via PCR-RAPD

Obtido o DNA de cada amostra, foram feitas amplificações utilizando-se diferentes primers decâmeros (OPERON Technologies, Alameda, CA, EUA). A amplificação do DNA foi realizada utilizando-se a técnica RAPD-PCR, de acordo com a metodologia proposta por WILLIAMS e col. (1990). A mistura de reação de 25 µl consistiu de: 3 µl de MgCl₂ 3,5 mM; 1,0 µl de dNTP 0,1 mM; 2,5 µl de Tris/KCl 10 mM / 50 mM; 1,0 µl de Taq polimerase; 13 µl de H₂O Mili Q; 2,5 µl de primers 0,4 mM e 2,0 µl de DNA. A mistura foi incubada em um termociclador modelo PTC-100 (MJ Research) programado para 40 ciclos, cada ciclo consistindo de um passo de desnaturação (15s a 94°C), um passo de anelamento do primer (30s a 35°C) e um passo de extensão (1 min a 72°C). Ao final dos 40 ciclos foi feito um passo extra de extensão (7 min a 72°C). A separação dos fragmentos (produtos de reação) foi feita por eletrofoerese em gel de agarose 1,2% contendo 7 µl de brometo de etídio por 350 ml de gel, imerso em tampão TBE (Tris-borato 90 mM, EDTA 1 mM (pH 8,0)). As bandas de DNA foram visualizadas sob luz ultravioleta e fotografadas com câmera Polaroid (Fotodyne - photographic system)

2.4. Análise do loco de determinação sexual

Com o objetivo de detectar o loco de determinação do sexo em *Melipona quadrifasciata*, foi analisada uma colônia (identificada pelo código 682I) obtida pelo esquema de cruzamento apresentado na Figura 1A.

Análises citogenéticas foram feitas em pupas para a distinção de machos diplóides e haplóides da geração endogâmica. As pupas de machos foram identificadas pela presença de gonóstilo. Para a determinação da ploidia dos machos, estes foram dissecados e os testículos esmagados em lâminas de microscopia com solução corante/fixadora deorceína acética 2%, e visualizadas sob microscopia. Foram analisados cerca de 20 machos.

Os machos utilizados na análise citogenética foram imediatamente congelados após a retirada dos testículos. Foi feita a extração de DNA de machos diplóides e operárias da mesma colônia e geração segundo protocolo já descrito.

Para identificar o loco sexual desta espécie, buscou-se marcadores RAPD que estivessem proximamente ligados a este loco. Sabendo-se que, de acordo com o sistema de determinação de sexo desta espécie, as fêmeas são heterozigotas para o loco sexual, e que os machos são hemizigotos (haplóides) ou homozigotos (diplóides) para este loco, marcadores que estivessem presentes em um grupo de operárias e ausentes em um grupo de machos diplóides de uma mesma colônia provavelmente estariam proximamente ligados ao loco sexual.

Foram utilizados machos haplóides da primeira geração para identificação de locos polimórficos. As séries de primers utilizadas foram OPA a OPZ e OPAA. Um número padronizado de cinco indivíduos foi utilizado para cada teste.

Utilizando-se primers que geraram bandas polimórficas nas amplificações do DNA de machos haplóides da primeira geração, foi feita a amplificação do DNA de operárias e machos diplóides da geração endogâmica para análise de ligação entre marcadores moleculares e o loco de determinação de sexo. Para isto, foram analisados inicialmente três machos diplóides e três operárias. Com esta amostragem há indicação dos prováveis marcadores ligados ao loco sexual. Obtendo-se a presença de um marcador no grupo das operárias e ausência deste no grupo dos machos diplóides, a amostragem é aumentada para 10 indivíduos de cada grupo para confirmação de ligação deste marcador ao loco de determinação do sexo.

2.5. Análise morfológica

Foi feita análise morfológica para obtenção de características variáveis entre machos haplóides e diplóides. A característica analisada foi o tamanho dos testículos, que em outras espécies apresentou considerável variação entre grupos de machos haplóides e diplóides (WOYKE, 1974; DUCHATEAU E MARIEN, 1995).

Para se estudar a variação desta característica em relação aos indivíduos haplóides e diplóides, foram utilizadas duas colônias fornecedoras de machos diplóides e duas fornecedoras de machos haplóides. Os zangões haplóides analisados foram progênies de duas rainhas não relacionadas, acasaladas com machos irradiados (Figura 1A). Um grupo de machos diplóides analisado resultou de acasalamento entre mãe e filho (Figura 1A), sendo que o outro foi obtida por cruzamento entre irmãos (Figura 1B).

Dez pupas de olho claro de cada grupo foram analisadas. O estágio escolhido foi de pupa devido à migração dos espermatozóides para a vasa deferentia após a emergência do indivíduo, o que poderia alterar o tamanho dos testículos. De cada indivíduo foram retirados os dois testículos em solução salina, e estes foram montados em lâminas de microscopia. Foram obtidas medidas dos quatro túbulos seminíferos de cada testículo, sob uma lupa acoplada a uma câmera digital. A imagem de cada testículo foi digitalizada, e as medidas feitas com o auxílio do software Image Pro Plus 4.0TM

Para cada macho, foram tomadas medidas da largura do tórax (distância inter-tégula), sendo esta uma medida representativa do tamanho do corpo. Isto possibilitou o estudo da correlação entre o tamanho dos testículos e do corpo do indivíduo.

As médias foram comparadas usando o teste estatístico t-student ao nível de 5% de probabilidade, e a correlação entre as características foi analisada pelo teste de correlação de Pearson. A discriminação entre machos diplóides e haplóides foi realizada utilizando a técnica de análise discriminante por meio de componentes principais.

2.6. Produção de prole em colônias endogâmicas

A razão sexual e produção de machos diplóides foi acompanhada em três colônias endogâmicas. Foi analisada a produção de uma colônia cuja rainha foi retrocruzada e duas colônias obtidas pelo cruzamento entre irmãos (Figura 1).

Com relação à colônia de retrocruzamento, foram feitas contagens periódicas das diferentes classes de sexo e ploidia na prole da segunda geração

(resultante do acasalamento mãe x filho). As pupas foram examinadas nos próprios favos, retirando-se o fundo da célula e determinando o sexo das pupas pela presença ou ausência de gonóstilo, sob microscópio estereoscópico. Posteriormente, foi feita análise citogenética dos zangões da segunda geração para a determinação da frequência de machos diplóides.

De forma semelhante, nas colônias resultantes do cruzamento irmã/irmão foi feita a sexagem dos indivíduos e análises citogenéticas dos machos para a determinação da ploidia.

2.6.1. Análise de parentesco: operárias em geração endogâmica

Devido a uma produção excessiva de operárias em relação aos machos diplóides observados na prole da colônia 833II, foi feito um teste de parentesco com base em marcadores moleculares para determinar se as operárias desta colônia eram todas irmãs, ou se houve um segundo acasalamento desta rainha com um macho externo.

Para isto, foram amostradas 20 operárias na fase de pupa, diretamente do favo, em diferentes períodos de produção da colônia. Como controle para as análises, foram amostrados 10 machos diplóides (analisados citogeneticamente), também na fase de pupa. Foi extraído DNA das amostras de acordo com o protocolo já descrito. Para uma análise inicial, foram amplificados DNA de cinco operárias e 5 machos diplóides, com primers identificados como polimórficos para outras colônias (polimórficos para pelo menos duas colônias do Apiário Central de Viçosa). Primers que geraram marcadores presentes ou ausentes em todos os machos diplóides, e parcialmente presentes ou ausentes nas operárias, foram selecionados para a análise de parentesco. Obtendo-se estes marcadores, foi feita a amplificação do DNA dos indivíduos restantes para conclusão do teste de consangüinidade e estimativas de frequências de operárias resultantes de um suposto cruzamento externo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Diferença morfológica entre machos diplóides e haplóides

O comprimento médio do testículo direito do primeiro grupo de machos haplóides foi de $7,73 \pm 0,91$ mm, e do testículo esquerdo foi de $7,57 \pm 0,87$ mm. Para o segundo grupo de machos haplóides, o comprimento médio do testículo direito foi de $6,36 \pm 0,99$ mm, e do testículo esquerdo foi de $6,34 \pm 0,82$ mm. Portanto, o comprimento médio dos testículos de zangões haplóides em diferentes grupos foi significativamente diferente (Tabela 1).

Tabela 1. Dados morfométricos do comprimento dos testículos e largura do tórax em machos haplóides e diplóides de *Melípona quadrifasciata*.

Grupo	Comprimento dos testículos direitos (média \pm dp)	Comprimento dos testículos esquerdos (média \pm dp)	Largura do tórax (média \pm dp)
1º Haplóide	$7,73 \pm 0,91^a$	$7,57 \pm 0,87^a$	$2,72 \pm 0,04^a$
2º Haplóide	$6,36 \pm 0,99^b$	$6,34 \pm 0,82^b$	$2,68 \pm 0,08^a$
Média	$7,05 \pm 0,96^{**}$	$6,96 \pm 0,87^{**}$	$2,70 \pm 0,03^{**}$
1º Diplóide	$4,66 \pm 0,64^c$	$4,69 \pm 0,72^c$	$2,86 \pm 0,11^b$
2º Diplóide	$4,20 \pm 0,60^c$	$4,19 \pm 0,72^c$	$2,79 \pm 0,13^b$
Média	$4,43 \pm 0,33^{**}$	$4,44 \pm 0,35^{**}$	$2,83 \pm 0,05^{**}$

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente ($p < 0,05$).

** médias diferem significativamente ($p < 0,01$)

No primeiro grupo de machos diplóides, o comprimento médio do testículo direito foi de $4,66 \pm 0,64$ mm, e do testículo esquerdo foi de $4,69 \pm 0,72$

mm. No segundo grupo de machos diplóides, o comprimento médio do testículo direito foi de $4,20 \pm 0,60$ mm, e do testículo esquerdo foi de $4,19 \pm 0,72$ mm. A diferença entre as médias do comprimento do testículo nos dois grupos não foi estatisticamente significativa.

Comparações estatísticas do comprimento médio do testículo direito e esquerdo entre grupos de machos haplóides e diplóides mostraram diferenças significativas (Tabela 1). Zangões diplóides e haplóides puderam, então, ser diferenciados com base nas medidas dos testículos (Figura 2).

A largura média do tórax em zangões haplóides foi de $2,72 \pm 0,04$ mm no primeiro grupo e $2,68 \pm 0,08$ mm no segundo grupo (Tabela 1). Nos zangões diplóides, a largura média do tórax foi de $2,86 \pm 0,11$ mm no primeiro grupo e $2,79 \pm 0,13$ mm no segundo grupo. A média da largura do tórax de zangões haplóides ($2,70 \pm 0,03$ mm) foi significativamente menor que a média dos zangões diplóides ($2,83 \pm 0,05$ mm). Houve correlação positiva e significativa entre o tamanho dos testículos e a largura do tórax em zangões diplóides. Nos zangões haplóides, no entanto, não foi observada correlação significativa (Tabela 2).

Tabela 2. Correlação entre a medida do tórax e comprimento dos testículos direito (TD) e esquerdo (TE), e entre comprimento dos testículos direitos (TD) e esquerdos (TE) de zangões de *M. quadrifasciata*.

Grupo	Tórax X TD	Tórax X TE	TD X TE
1ª Haplóide	0,31	0,32	0,77**
2ª Haplóide	0,58 ⁺	0,47	0,94**
1ª Diplóide	0,95**	0,92**	0,89**
2ª Diplóide	0,61 ⁺	0,87**	0,80**

** , * , + significativo a 1, 5 e 10%, respectivamente, pelo teste t

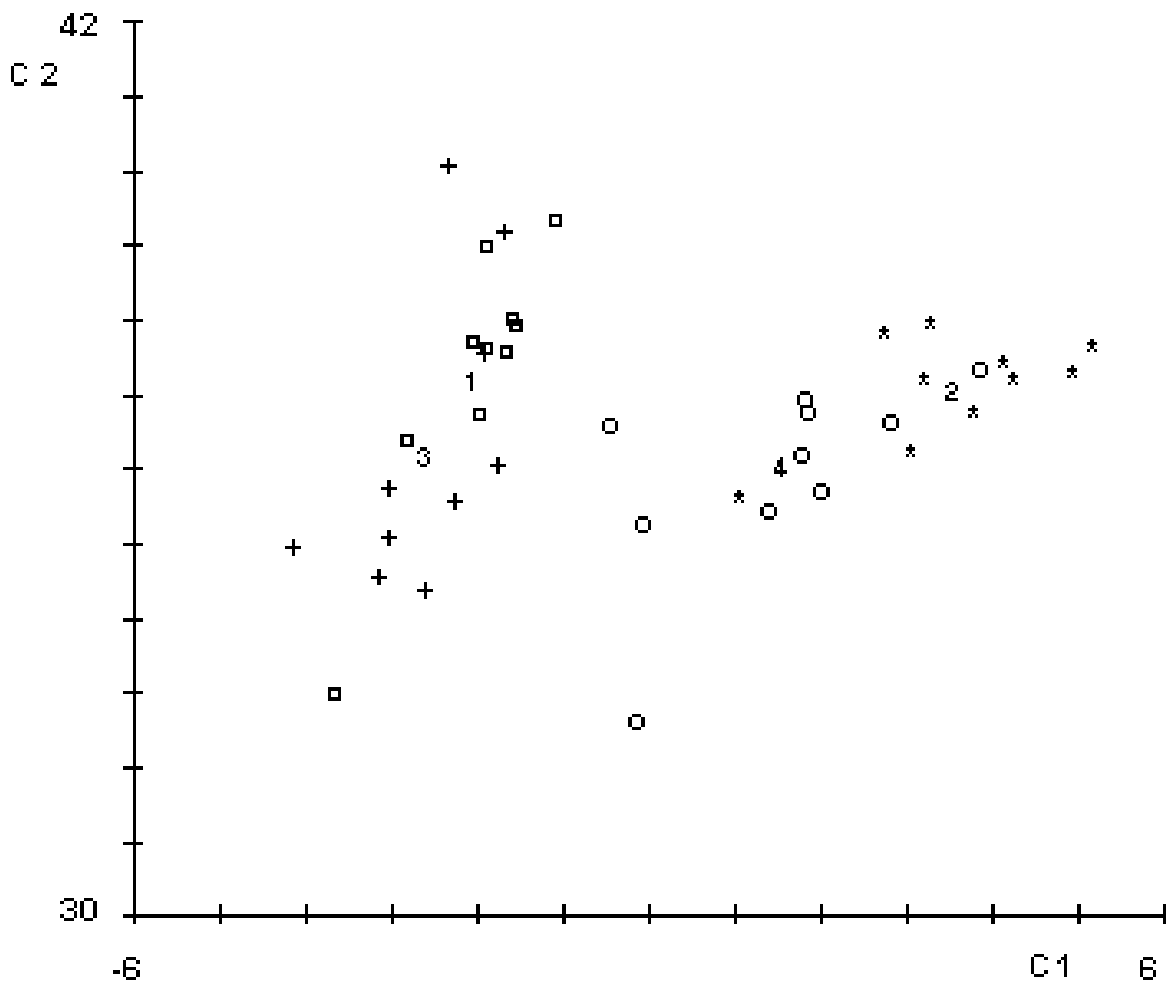


Figura 2. Discriminação de zangões haplóides e diplóides de *Melipona quadrifasciata*, baseada nas medidas dos comprimentos dos testículos. C1 e C2: escores dos componentes principais. Símbolos “ ” e “+” representam zangões dos dois grupos haplóides, enquanto que “*” e “o” representam zangões dos dois grupos diplóides. Os números 1, 3 e 2, 4 são os centróides das respectivas populações representadas.

Pupas de machos diplóides de *Melipona quadrifasciata* deram origem a adultos tão viáveis quanto suas irmãs operárias. No entanto, os resultados mostraram que pupas de machos diplóides têm testículos menores que os haplóides (Figura 3). Portanto, esta característica pode ser útil para distinguir pupas de zangões haplóides de diplóides. Machos diplóides com testículos menores também foram observados em *Apis mellifera* (WOYKE, 1973) e *Bombus terrestris* (DUCHATEAU e MARIEN, 1995).



Figura 3. Testículo de pupa de zangão haplóide (A) e diplóide (B) de *Melipona quadrifasciata*.

Foi observado também que, enquanto machos diplóides de diferentes populações tiveram testículos de tamanhos semelhantes, machos haplóides produzidos por diferentes rainhas tiveram testículos com diferenças significativas no comprimento (Tabela 1). Neste caso, as diferenças observadas entre o comprimento dos testículos em machos haplóides podem refletir diferenças individuais entre as rainhas analisadas, pois os machos haplóides são somente

produtos de seus gametas. Em relação aos machos diplóides, no entanto, WOYKE (1974) mostrou que zangões diplóides de *A. mellifera* produzidos por diferentes rainhas tinham testículos de diferentes tamanhos, sugerindo que, neste caso, a diferença poderia ser explicada pela existência de poligenes com efeitos aditivos, que influenciam o tamanho dos testículos em zangões diplóides.

No presente trabalho, verificou-se também que machos diplóides de *M. quadrifasciata* têm uma largura de tórax maior que a dos machos haplóides. DUCHATEAU e MARIEN (1995) sugeriram que diferenças nos tamanhos de machos diplóides estão relacionadas com a alimentação da larva. Por exemplo, em *Augochlorella striata*, uma abelha eusocial de alimentação massal, machos diplóides são geralmente maiores que os machos haplóides, porque os ovos fertilizados que dão origem aos machos diplóides normalmente produziram operárias (PACKER e OWEN, 1990). Neste caso é esperado que a rainha forneça quantidades semelhantes de alimento às operárias e aos machos diplóides, e que essa quantidade seja maior do que aquela fornecida aos machos haplóides. *M. quadrifasciata* é também uma abelha de provisionamento massal.

No presente caso é esperado que a quantidade de alimento fornecida aos machos haplóides e diplóides seja semelhante, pois os machos haplóides são resultado de ovos que dariam fêmeas, mas, devido ao efeito da radiação no macho parental, o conjunto cromossômico paterno é destruído, resultando no desenvolvimento de ovos haplóides, dando origem a machos haplóides. Isto sugere que outros fatores, além do provisionamento diferencial de alimento, afetem o tamanho dos machos. Uma das possibilidades seria que as colônias que produziram machos haplóides estivessem mais debilitadas que colônias que produziram machos diplóides, ocasionando um menor tamanho dos machos haplóides (e também das operárias), devido à escassez de alimento na colônia.

No entanto, WOYKE (1980) sugeriu que o maior tamanho do corpo dos machos diplóides em parte resulta dos maiores níveis de poliploidização de seus tecidos.

A falta de correlação entre a largura do tórax e o comprimento dos testículos em machos haplóides era um resultado esperado, porque o comprimento dos testículos em machos haplóides deve ser um importante fator

para o desenvolvimento de machos normais e para sua função reprodutiva. Então, o comprimento dos testículos em machos haplóides não deve relacionar-se com o tamanho do corpo, e deve haver um tamanho pré-determinado de testículos, o que tornaria o zangão capaz de exercer sua função reprodutiva, independentemente de seu tamanho.

O metabolismo de machos diplóides de *M. quadrifasciata*, entretanto, deve apresentar algumas alterações, de maneira que os processos fisiológicos não estariam direcionados à manutenção de um comprimento de testículo ótimo, resultando em correlações entre o tamanho do corpo e o comprimento dos testículos do macho adulto. Como consequência, testículos menores podem, provavelmente, produzir menos espermatozóides, o que poderia estar associado ao seu baixíssimo fitness.

3.2. Produção de prole em colônias endogâmicas

Em muitas espécies de Hymenoptera há evidências de que a determinação do sexo seja controlada por múltiplos alelos em um único loco gênico. Espécies como *Bracon hebetor* (WHITING, 1943), *Apis mellifera* (DRESCHER e ROTHENBUHLER, 1964), *Solenopsis invicta* (ROSS e FLETCHER, 1985) e *Melipona quadrifasciata* (CAMARGO, 1979) enquadram-se neste sistema de determinação do sexo. Uma predição deste modelo é o aumento de produção de machos diplóides sob endocruzamento, devido ao aumento de homozigose. Prole resultante de cruzamentos entre irmãos em 50% das vezes produzem machos diplóides, na proporção de 1 macho diplóide para 1 fêmea. A prole diplóide resultante de qualquer acasalamento entre mãe e filho deve ser 50% constituída de machos (COOK, 1993).

Na colônia retrocruzada (682I) foram observados 1305 machos e 727 fêmeas, o que dá uma proporção de 0,64 machos : 0,36 fêmeas (Figura 5A e Tabela 3). Esta proporção difere significativamente da proporção esperada de 1:1 ($\chi^2=164,4$, $p<0,001$). O número de machos diplóides e haplóides analisados citogeneticamente (Figura 4) em seis diferentes períodos de produção da colônia

foi de 56 e 51 respectivamente, correspondendo a uma proporção de 0,52:0,48 (diplóides:haplóides) (Figura 5B).

Conseqüentemente, seria esperada uma frequência de 52% machos diplóides entre os 1305 machos totais observados nesta colônia, o que dá um total de 679 machos diplóides. O número observado de fêmeas foi de 727. A relação entre o número de fêmeas e o número estimado de machos diplóides é de 0,48:0,52, o que não difere significativamente da proporção de 1:1 ($\chi^2=1,37$, $p>0,01$).

Tabela 3. Razão sexual observada em colônias de *Melipona quadrifasciata*.

Colônia	Freq. Machos	Freq. Fêmeas
682I	0,64	0,36
740	0,46	0,54
833II	0,18	0,82

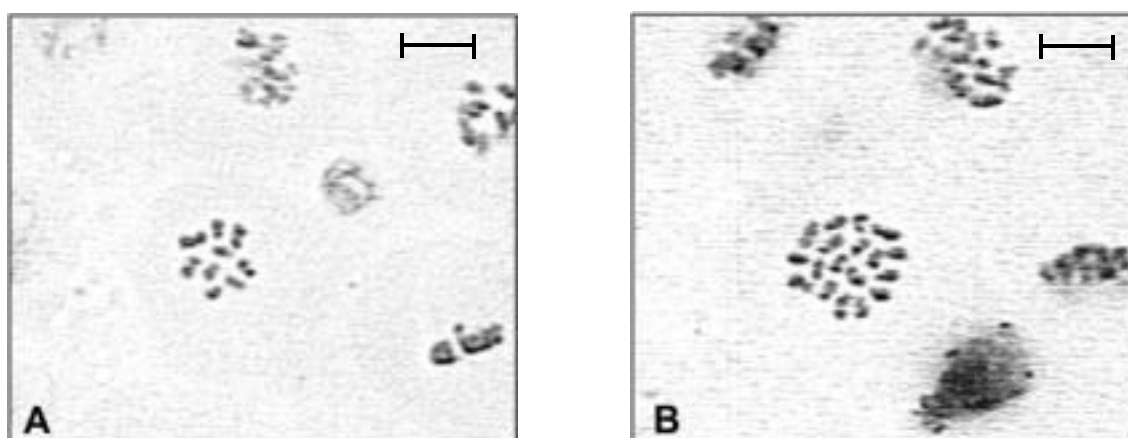


Figura 4. Metáfases de células de zangão haplóide (n=9) (A) e diplóide (n=18) (B) de *Melipona quadrifasciata*. Barra representa 14 μ m.

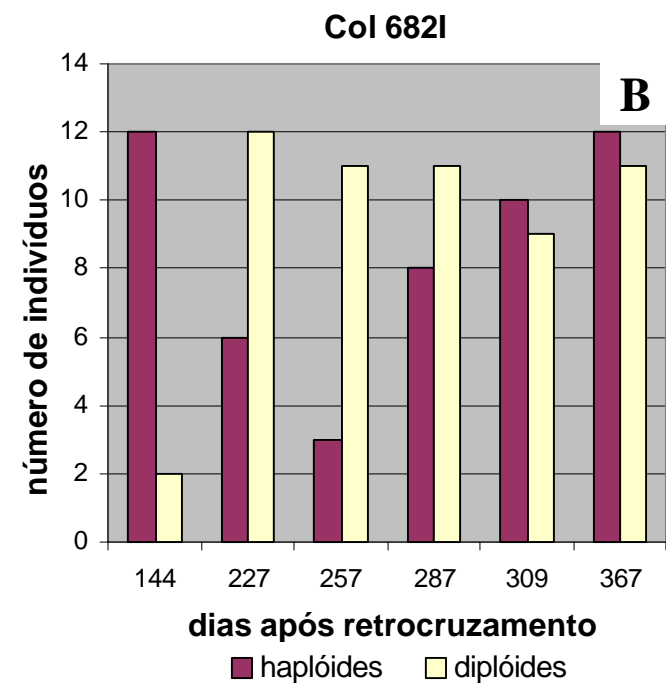
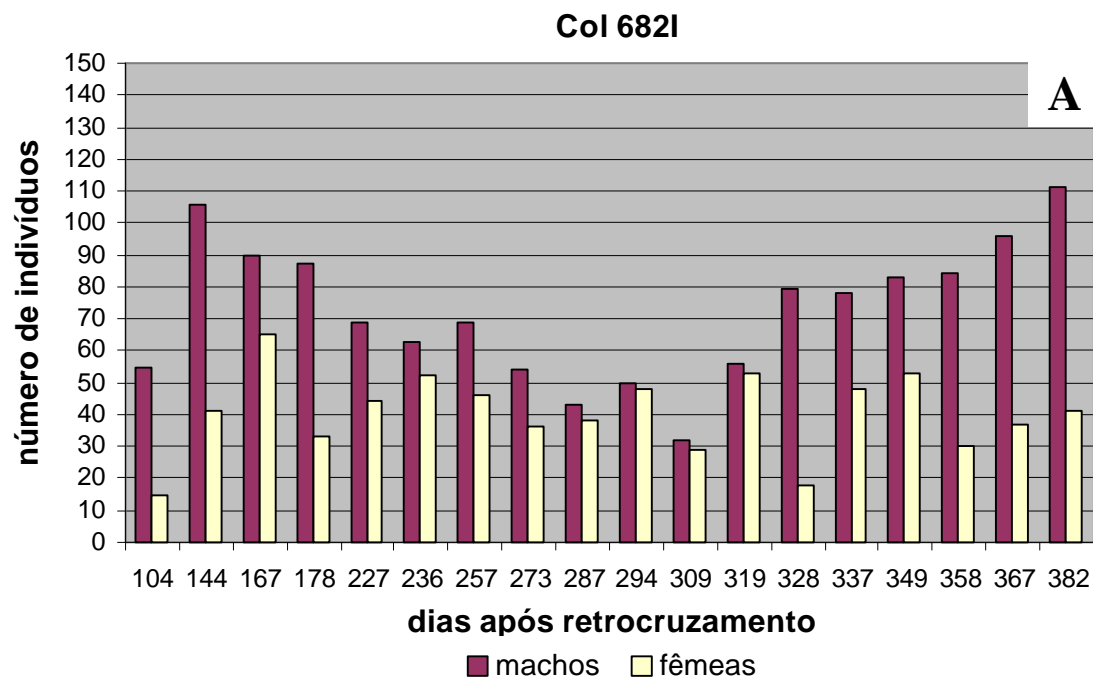


Figura 5. Prole em colônia retrocruzada (682I) de *Melipona quadrifasciata*. A) Número de machos e fêmeas. B) Número de machos haplóides e diplóides.

Nesta mesma colônia pode-se verificar dois períodos de maior produção de machos em relação ao número de fêmeas (Figura 5A). O primeiro período ocorre entre 104 e 227 dias após o retrocruzamento, e o segundo entre 328 e 382 dias após o retrocruzamento. No primeiro período, a relação de machos e fêmeas foi de 0,67:0,33, respectivamente, em um total de 605 indivíduos. No segundo período a proporção entre machos e fêmeas foi de 0,70:0,30, respectivamente, com amostragem de 758 abelhas. No intervalo entre estes dois períodos, num total de 669 indivíduos, a proporção de machos e fêmeas foi de 0,55:0,45, respectivamente, aproximando-se da proporção teórica 1:1 ($\chi^2=6,31$, $p>0,01$).

A produção de machos haplóides, às vezes, é relativamente contínua, esparsa, outras vezes ocorrem em grandes surtos, ou seja, emerge dos favos de cria um grande número de zangões, durante períodos curtos (SILVA, 1977). BENTHEM e col. (1995) observaram que em *Plebeia remota* ocorriam diversos ciclos de produção de machos haplóides por ano.

Os resultados no presente trabalho sugerem que ocorreram dois ciclos de produção de machos haplóides, evidenciado pelo excesso de machos em relação ao número de fêmeas. Há possibilidade de que esta produção de machos haplóides possa ser resultado de eventos normais que também ocorram em outras colônias.

No entanto, a produção de machos haplóides em uma colônia natural está relacionada com a qualidade desta colônia. Colônias mais fortes produzem um maior número de machos haplóides que colônias mais fracas. A colônia de retrocruzamento (682I) apresentava baixo número de operárias adultas, sendo notadamente uma colônia fraca, sendo esperado que houvesse baixa produção de machos haplóides. Por estas observações, acredita-se que nesta colônia a produção de machos haplóides não seja devida à produção normalmente encontrada em colônias naturais.

A rainha desta colônia havia sido submetida a um cruzamento inicial com um macho irradiado (estéril). Portanto, uma hipótese a ser considerada é de estar havendo o aproveitamento, pela rainha, de espermatozóides do macho esterilizado, mesmo após um segundo cruzamento desta rainha, causando a

produção dos machos haplóides. Em *Apis mellifera*, uma espécie com ocorrência de acasalamentos múltiplos, SASAKI e col. (1995) demonstraram haver uma utilização não preferencial de espermatozóides de diferentes machos copulados com uma rainha. Em *Melipona quadrifasciata*, CAMPOS e MELO (1990) observaram que após cópula de uma rainha fisogástrica, tanto espermatozóides do macho do primeiro cruzamento, quanto do macho do segundo cruzamento eram utilizados pela rainha.

Uma outra alternativa é que estes machos haplóides fossem resultado de postura realizada por operárias, situação já observada em colônias naturais de meliponíneos (KERR *et al.*, 1996). Em *Nannotrigona postica*, praticamente 90% dos machos são produzidos pelas operárias (BEIG, 1972). Em *Melipona quadrifasciata*, o ovo colocado pela operária no interior da célula de cria é igual ao ovo da rainha. Antes de fazer a oviposição nesta célula, a rainha poderá ingerir o ovo ou não. Nesta última hipótese, após a operculação os dois tipos de ovos ficam encerrados dentro da célula (SILVA *et al.*, 1972). É possível que desta célula emergirá um macho. Neste caso é difícil dizer se o macho emergiu do ovo da operária ou da rainha porque, em *Melipona*, a rainha também produz ovos que darão origem a machos haplóides.

A fim de verificar se os machos haplóides eram filhos da rainha (marcada) ou de operárias, analisou-se cinco machos haplóides da primeira geração (resultantes do cruzamento da rainha com macho estéril) e cinco machos haplóides nascidos após o retrocruzamento. Todos os 8 primers polimórficos no grupo de machos haplóides da primeira geração mantiveram-se polimórficos, para os mesmos marcadores, no grupo de machos haplóides produzidos na geração endogâmica (Figura 6). Isto forneceu evidência de que os machos haplóides produzidos após o retrocruzamento eram filhos da rainha (a mesma desde o primeiro cruzamento).

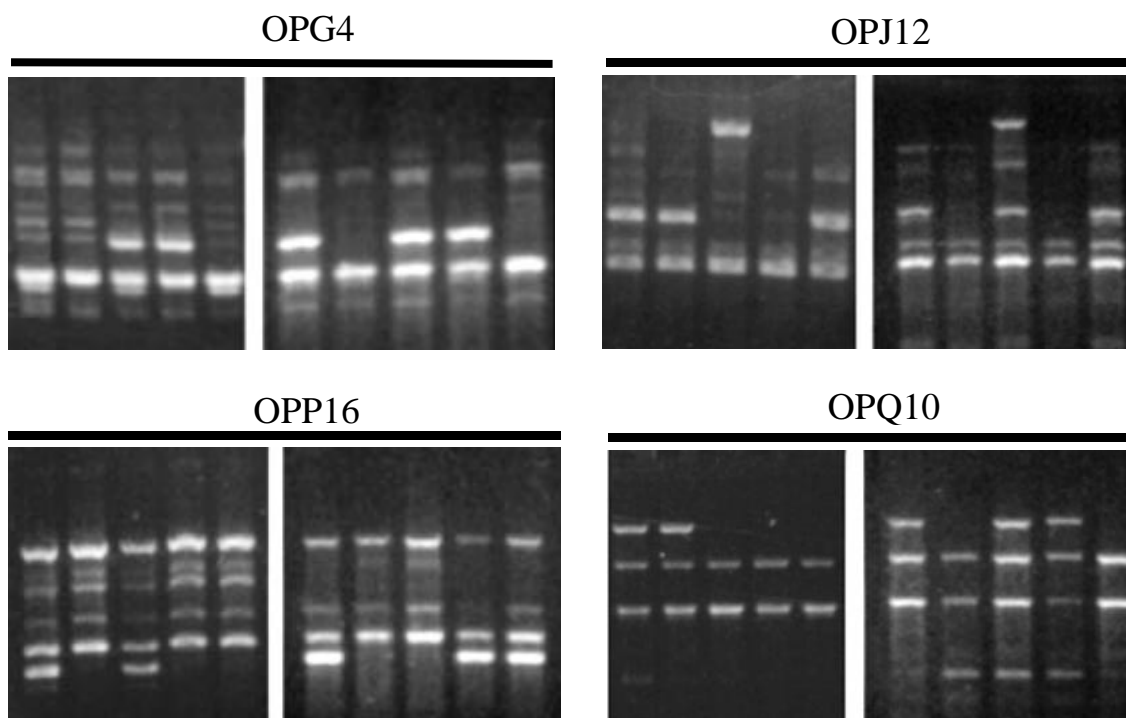


Figura 6. Comparação de produtos RAPD de cinco machos haplóides da primeira geração (esquerda) e cinco da segunda geração (direita), para 4 dos 8 primers analisados.

Na colônia 740, cuja rainha havia sido cruzada com um irmão, ocorreu a produção de machos diplóides. Um total de 18 machos foi analisado citogeneticamente, sendo todos diplóides. Quanto ao sexo, foram analisados 888 indivíduos, sendo 410 machos e 478 fêmeas (Figura 7), o equivalente a 0,46:0,54, respectivamente (Tabela 3). Esta proporção se aproxima da proporção teórica 1:1. ($\chi^2=5,2$, $p>0,01$). Houve pequena variação nas proporções sexuais, tendo ocorrido ligeiro aumento no número de fêmeas, em relação ao número de machos. Estes desvios sugerem uma provável menor viabilidade dos machos diplóides nesta espécie, fato também observado em algumas espécies, como em *Bracon hebetor* (WHITING, 1943).

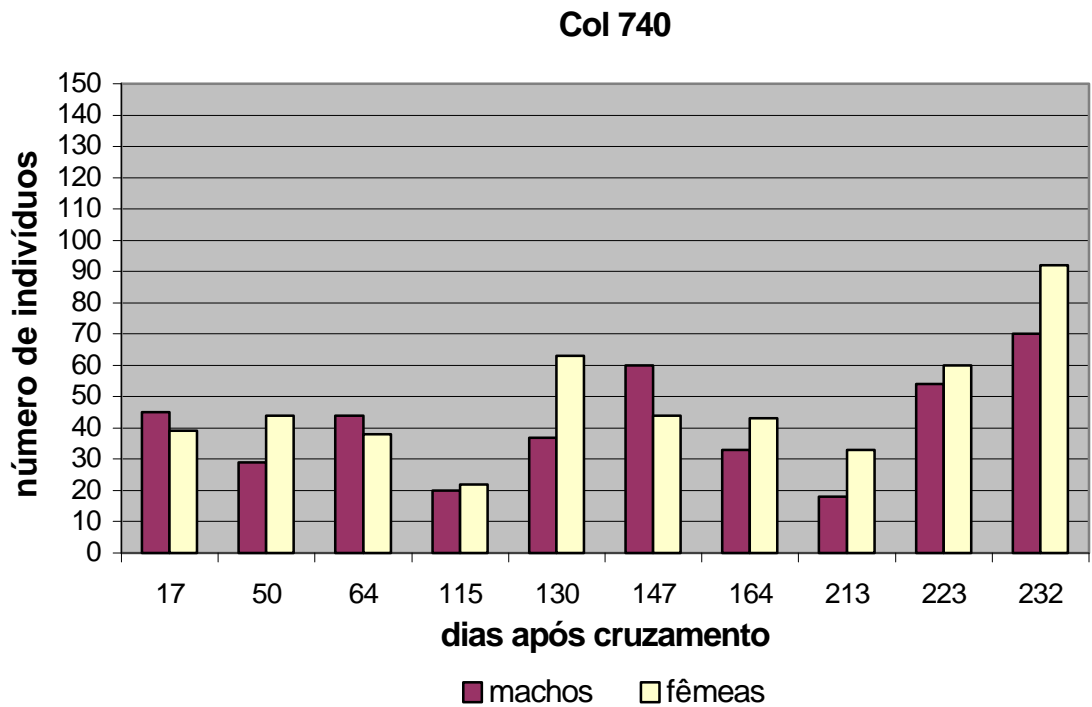


Figura 7. Número de machos e fêmeas produzidos em colônia de cruzamento entre irmãos (740) de *Melipona quadrifasciata*.

CAMARGO (1979), por meio de cruzamentos endogâmicos, obteve zangões diplóides em cinco colônias de *Melipona quadrifasciata*. Estas colônias foram obtidas pelo cruzamento, em condições controladas, de uma rainha com um macho da mesma colônia (irmã/irmão). Outras quatro colônias obtidas pelo mesmo tipo de cruzamento não produziram machos diplóides. Das cinco colônias que produziram machos diplóides, três apresentaram proporção de 1:1 (machos diplóides : operárias). Nas outras duas colônias o número de operárias foi significativamente maior que o de machos diplóides.

No presente trabalho, a colônia 833II, resultante de cruzamento irmã x irmão, também produziu machos diplóides. Todos os 19 machos analisados citogeneticamente eram diplóides. No entanto, nesta colônia o número de machos foi bem menor que o de fêmeas: 164 para 724, respectivamente, totalizando 888

indivíduos (Figura 8). Esta proporção de 0,18 machos : 0,82 fêmeas (Tabela 3) foi estatisticamente diferente da proporção de 1:1 esperada ($\chi^2=353,1$, $p<0,001$).

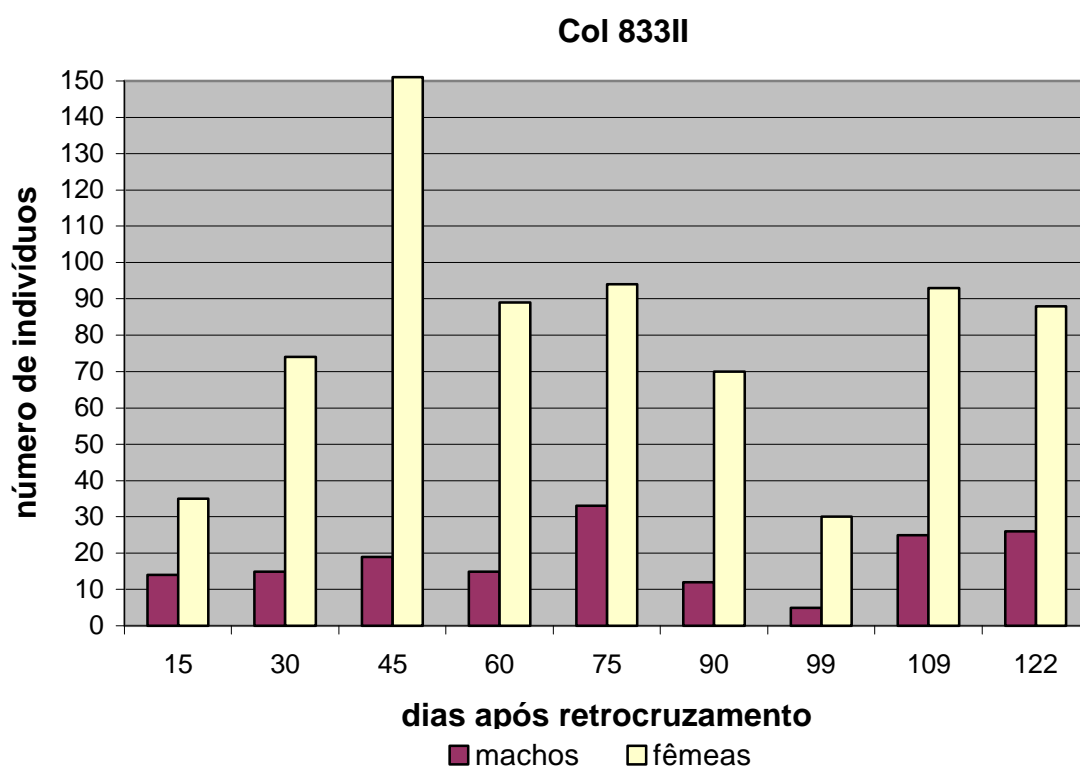


Figura 8. Número de machos e fêmeas produzidos em colônia de cruzamento entre irmãos (833II) de *Melipona quadrifasciata*.

Devido à maior produção de fêmeas que de machos observada nesta colônia, foi feita uma análise do parentesco entre as operárias. Se a maior produção de fêmeas fosse devido ao cruzamento da rainha com um segundo macho, seria esperado que as operárias produzidas não fossem todas irmãs, e que algumas operárias não fossem irmãs dos machos diplóides produzidos. Considerando-se que os machos diplóides produzidos são realmente resultantes do primeiro cruzamento da rainha, operárias que fossem resultado de um segundo cruzamento poderiam ser distinguidas por meio de marcadores moleculares.

Foram utilizadas 20 operárias para se realizar a análise de parentesco e 10 machos diplóides como controle. De uma série de marcadores RAPD obtidos, pôde-se encontrar três que forneceram dados bastante sugestivos a respeito do

parentesco entre as operárias (Figura 9 e Tabela 4). A amplificação com o primer OPI16 gerou dois marcadores úteis para a análise de parentesco. Em relação ao primeiro marcador (OPI16-1), ocorreu a ausência de banda em todos os machos diplóides analisados, ocorrendo, no entanto, a presença desta mesma banda em dezessete das 20 operárias. Com base nesta proporção, estima-se que cerca de 85% das operárias são resultantes de um segundo cruzamento.

Quanto ao segundo marcador obtido com o primer OPI16 (OPI16-2), e também um marcador obtido com o primer OPM16 (OPM16), estes estavam presentes em todos os machos diplóides e ausentes em algumas operárias. Isto sugere que a rainha seja heterozigota para estes dois locos, e que o macho do primeiro cruzamento possua um alelo dominante, e do segundo cruzamento possua um alelo recessivo, para ambos os locos (Figura 10). Desta forma, a prole resultante do primeiro cruzamento é metade duplo-dominante e metade heterozigota (ambos com presença do marcador), para ambos os locos. A prole resultante do segundo cruzamento, composta por operárias, é metade duplo-recessiva (sem marcador) e metade heterozigota (com marcador). Pelo efeito de dominância deste tipo de marcador, não foi possível detectar os heterozigotos.

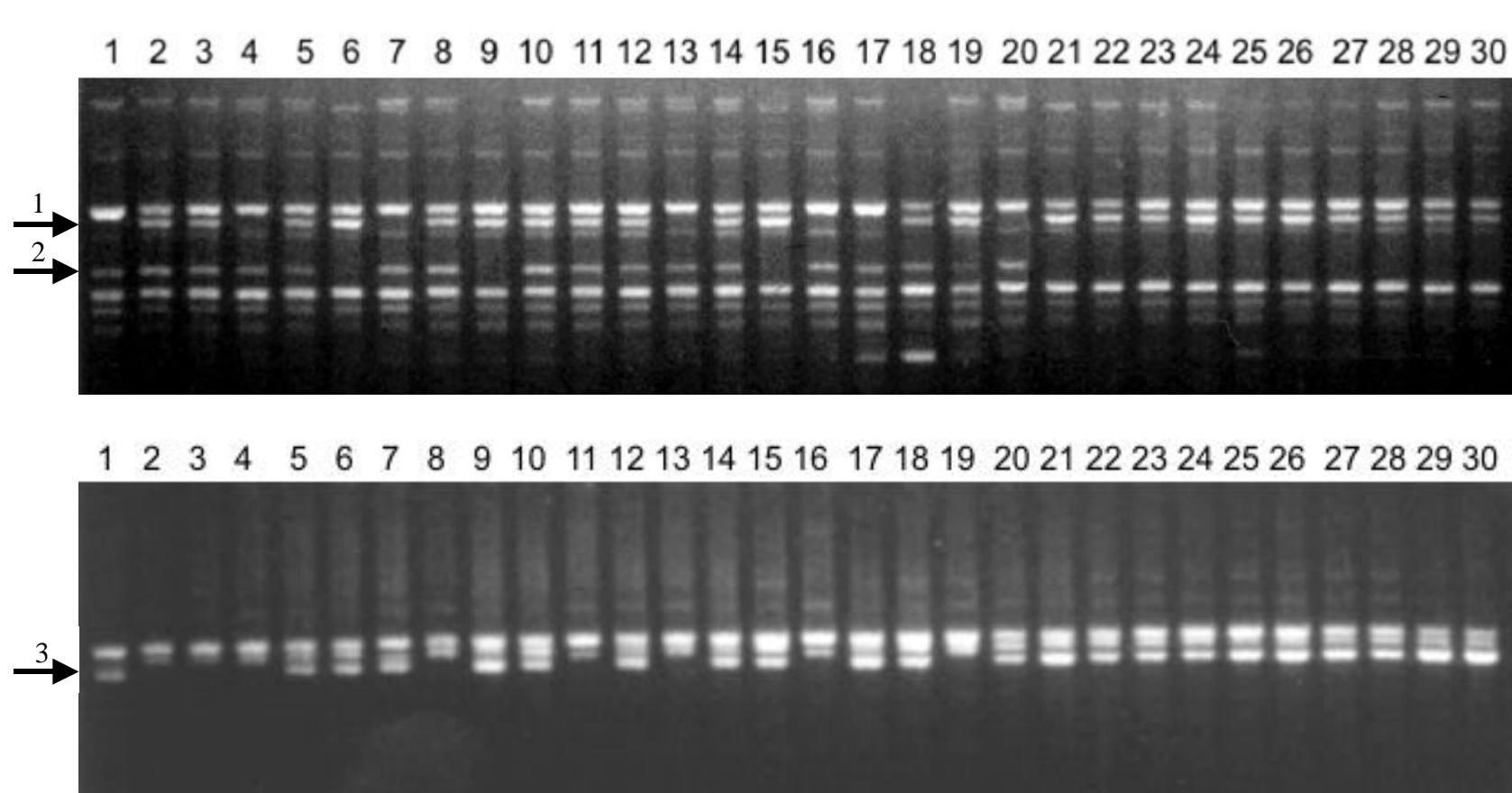


Figura 9. Comparação entre produtos de RAPD de 20 operárias (1-20) e 10 machos diplóides (21-30) obtidos pela amplificação com o primer OPI16 (acima) e OPM16 (abaixo). Seta 1: marcador OPI16-2, seta 2: marcador OPI16-1, seta 3: marcador OPM16.

Tabela 4. Presença (1) ou ausência (0) de marcadores moleculares RAPD utilizados na análise de parentesco em operárias e machos diplóides (2n). Marcador identificado pelo primer utilizado.

operárias	marcador		
	OPI16-1	OPI16-2	OPM16
1	1	0	1
2	1	1	0
3	1	1	0
4	1	0	0
5	1	1	1
6	0	1	1
7	1	0	1
8	1	1	0
9	0	1	1
10	1	1	1
11	1	1	0
12	1	1	1
13	1	0	0
14	1	1	1
15	0	1	1
16	1	0	0
17	1	0	1
18	1	1	1
19	1	1	0
20	1	0	1
machos 2n			
1	0	1	1
2	0	1	1
3	0	1	1
4	0	1	1
5	0	1	1
6	0	1	1
7	0	1	1
8	0	1	1
9	0	1	1
10	0	1	1

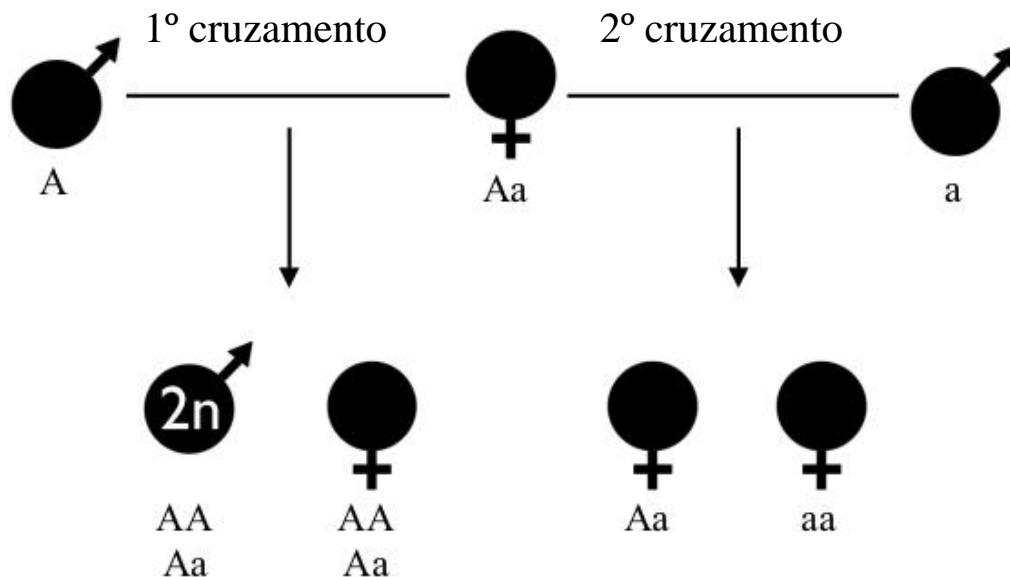


Figura 10. Esquema de duplo cruzamento da rainha da colônia 833II, representando a prole do primeiro e segundo cruzamento, e os genótipos dos indivíduos, em relação aos marcadores OPI16-2 e OPM16.

A partir da proporção observada entre machos e operárias para esta colônia (Tabela 3), e considerando-se uma proporção teórica de 1:1, pode-se relacionar a fração de machos com a fração de operárias irmãs destes machos diplóides. Desta forma, como foi obtido um total de 164 machos, considera-se uma fração equivalente de operárias irmãs destes machos. Assim, como foi obtido um total de 724 operárias dentre os 888 indivíduos, 164 destas são irmãs dos machos diplóides, e as 560 restantes não são irmãs destes machos. Isto resulta em uma proporção de 0,23:0,77 (irmãs:não irmãs) do total de operárias.

Comparando-se esta proporção com as obtidas por análise de parentesco, pode-se concluir que não houve diferença significativa entre as estimativas (Tabela 5). No entanto, as estimativas podem sofrer variações se aumentada a amostragem das operárias submetidas à análise de parentesco. Portanto, esta análise tem um caráter mais qualitativo, demonstrando ter havido pelo menos mais um cruzamento da rainha desta colônia.

Tabela 5. Comparação entre o número de indivíduos e proporção estimada de operárias irmãs (I) e não irmãs (NI) pela razão sexual (RS), e estimadas pela análise de parentesco por marcadores moleculares (APMM).

		Nº de indivíduos		Proporção	
		I	NI	I	NI
RS		164	560	0,23	0,77
	OPI16-1	3	17	0,15	0,85
APMM	OPI16-2	6	14	0,30	0,70
	OPM16	4	16	0,20	0,80

Esta evidência de duplo cruzamento da rainha desta colônia não está de acordo com a hipótese de único acasalamento para espécies de abelhas sem ferrão, e para a própria espécie *Melipona quadrifasciata* (PETERS *et al.*, 1999).

Acasalamento por rainhas fisogástricas copuladas já foi descrito em abelhas sem ferrão (ENGELS e IMPERATRIZ-FONSECA, 1999), sem haver indicação de transferência de espermatozoides neste caso. PAXTON e col. (1999) obtiveram dados com uma indicação de acasalamentos múltiplos em *Melipona breecheii* e *Scaptotrigona postica*, a partir de análise de genótipos de operárias com marcadores microsatélite, dados estes, no entanto, não confirmados pelo trabalho de PETERS e col. (1999).

Em *Melipona quadrifasciata*, acasalamento de rainhas fisogástricas já foi obtido (CAMPOS e MELO, 1990), sendo demonstrada também a baixa sobrevivência destas rainhas quando submetidas a cópulas com maior número de machos. CAMPOS e MELO (1990) observaram que os espermatozoides do macho de um segundo acasalamento misturam-se com aqueles presentes na espermateca da rainha, e que há um gradual aumento na porção de operárias resultantes do segundo acasalamento. No presente trabalho foi observada, na colônia 833II, uma alta taxa de operárias resultantes de um segundo acasalamento da rainha, confirmando a entrada de espermatozoides do macho do

segundo acasalamento na espermateca da rainha, e o alto aproveitamento destes espermatozóides pela mesma.

Possivelmente, o acasalamento desta rainha fisogástrica de *Melipona quadrifasciata* se deu devido ao manuseio e perturbação da colônia, tornando-a mais susceptível à entrada de machos e realização da cópula. Em colônia de *Schwarziana quadripunctata*, SAKAGAMI (1982) observou vários machos tentando copular com uma rainha fisogástrica quando esta colônia era acidentalmente perturbada.

3.3. Análise de ligação ao loco de determinação do sexo

Para se analisar ligação de marcadores ao loco de determinação de sexo em *Melipona quadrifasciata*, primeiramente foi observado o grau de polimorfismo existente na colônia de retrocruzamento (682I). Para isto foi zangões haplóides foram analisados por meio da técnica RAPD-PCR.

A análise por RAPD não requer conhecimento prévio do genoma, e requer pequenas quantidades de DNA nas reações, o que faz desta técnica uma eficiente ferramenta para estudos genéticos de diversas espécies. No entanto, devido a diversos fatores como a temperatura de anelamento usada durante a amplificação, número de ciclos, composição da mistura de reação, integridade do DNA molde, a reprodutibilidade dos resultados pode ser afetada, demandando rigorosos controles dos procedimentos laboratoriais.

A maioria dos marcadores RAPD são herdados de forma dominante, não se podendo distinguir os locos heterozigotos dos homozigotos dominantes, já que em ambos os casos há a presença de uma banda. Por esta razão, marcadores RAPD fornecem menos informações que marcadores co-dominantes, tais como os microssatélites (WILLIAMS *et al.* 1990). No entanto, em Hymenoptera, esta desvantagem pode ser contornada realizando-se análises de zangões haplóides, gerados por partenogênese. A análise destes zangões suprem informações sobre locos presentes na fêmea parental, distinguindo os locos homozigotos dos heterozigotos.

A amplificação do DNA genômico dos machos haplóides com 343 primers aleatórios gerou 1668 bandas, resultando em uma média de 4,86 bandas por primer. Dentre o total de bandas, 1292 eram monomórficas e 376 polimórficas, com um polimorfismo médio de 1,10 bandas polimórficas por primer (Apêndice 1).

Com relação à variabilidade genética de *Melipona quadrifasciata*, na presente análise foi verificado um nível de polimorfismos compatível com estudos previamente realizados com esta espécie. WALDSCHMIDT (1999), também utilizando-se marcadores RAPD e trabalhando com diversas colônias de *Melipona quadrifasciata* de diferentes localidades, encontrou um valor médio de polimorfismos por primer de 1,3. TAVARES (1999) ao realizar uma construção do mapa genético para a espécie *Melipona quadrifasciata*, com base em marcadores moleculares RAPD, observou uma relação média de 1,68 polimorfismos por primer. HUNT e PAGE (1992), analisando a progênie de uma rainha de *Apis mellifera* com marcadores RAPD, observaram um valor semelhante (1,3 polimorfismos por primer).

Como observado por TAVARES (1999), na presente análise puderam ser distinguidos três tipos de polimorfismos: presença/ausência de banda, intensidade de banda e tamanho de fragmento. O polimorfismo mais freqüente foi o de ausência/presença de banda. O segundo tipo de polimorfismo mais freqüente foi o de intensidade de banda. Também observado por HUNT e PAGE (1992), este tipo de polimorfismo pode ser devido à amplificação de um fragmento dentro de uma seqüência de repetição em tandem para um loco que é polimórfico para o número de cópias, ou pode ser causado por uma diferença na seqüência de homologia no sítio de ligação do primer, resultando em uma amplificação diferenciada. O polimorfismo por tamanho de fragmento resulta de pequenas inserções ou deleções de DNA (50 a 1500pb) entre sítios de ligação dos primers. No presente trabalho este foi o polimorfismo menos freqüente.

Um total de 119 primers (polimórficos para a rainha parental) foram testados quanto à ligação ao loco de determinação do sexo (Apêndice 2). Para isto foram amplificados DNA de três machos diplóides e de três operárias, todos

filhos da rainha submetida ao retrocruzamento. No entanto, não houve nenhuma situação em que uma banda estivesse presente em todas as operárias e ausente nos machos diplóides (Figura 11), já que esta espécie enquadra-se no modelo de determinação por complementação, com um único loco, sendo as operárias heterozigotas e machos diplóides homozigotos para este loco. Portanto, não houve indicação de que algum dos marcadores obtidos estivesse proximalmente ligado ao loco sexual.

Estudos já feitos no sentido de se localizar marcadores ligados ao loco sexual em *Melipona quadrifasciata* também não mostraram nenhum marcador ligado proximalmente ao loco sexual (TAVARES, 1999). Provavelmente, para haver a indicação de ligação, deve-se obter marcadores bastante próximos ao loco sexual, pois pode ser que esteja se tratando de uma região com altas taxas de recombinação, dificultando a análise. Em *Apis mellifera*, HUNT e PAGE (1995) observaram altas taxas de recombinação ao construir um mapa de ligação para esta espécie.

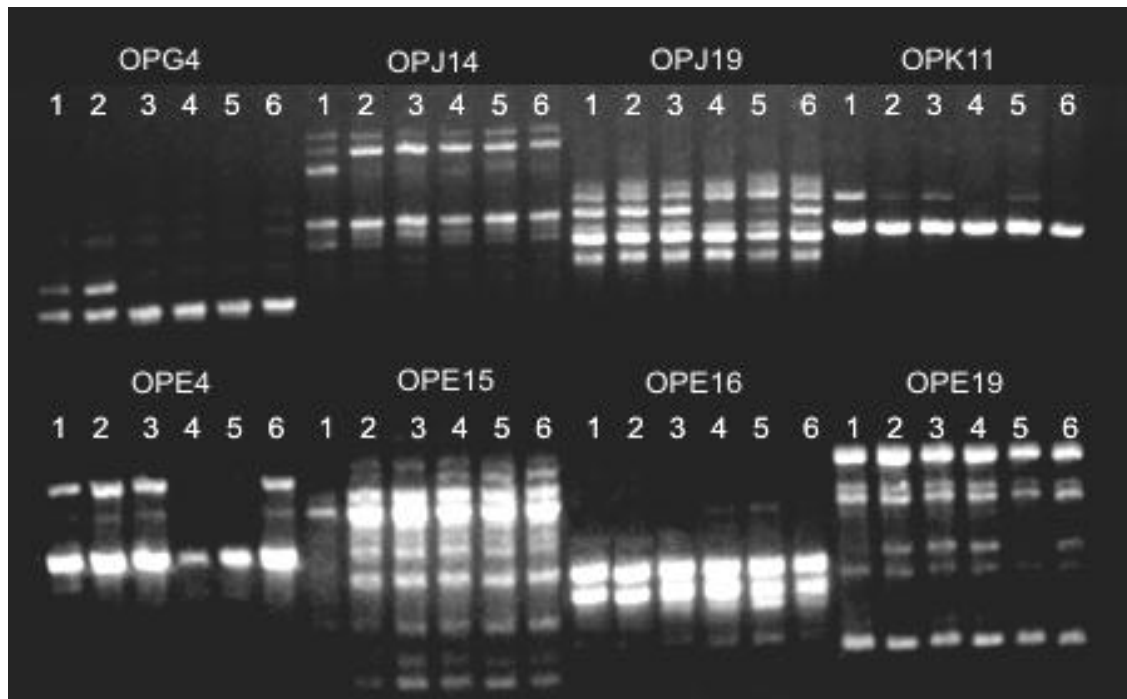


Figura 11. Comparação entre produtos de RAPD de três machos diplóides (1-3) e três operárias (4-6) de *Melipona quadrifasciata*, com os 8 primers indicados.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, J.; ROTHMAN, E. D.; KERR, W. E.; PAULINO, Z. L. 1977. Estimation of the number of sex alleles and queen matings from diploid male frequencies in a population of *Apis mellifera*. **Genetics**, **86**. 583-596.
- BEIG, D. 1972. The production of males in queenright colonies of *Trigona (Scaptotrigona) postica*. **J. Apic. Res.**, **11**. 33-39.
- BENTHEM, F. D. J.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; VELTHUIS, H. H. W. 1995. Biology of the stingless bee *Plebeia remota* (Holmberg): observations and evolutionary implications. **Ins. Soc.**, **42**. 71-87.
- BEYE, M.; MORITZ, F. A. 1994. Sex linkage in the honeybee *Apis mellifera* detected by multilocus DNA fingerprinting. **Naturwissenschaften**, **81**. 60-462.
- BEYE, M.; MORITZ, F. A. 1996. Mapping the sex locus of the honeybee (*Apis mellifera*). **Naturwissenschaften**, **83**. 424-426.
- BOOMSMA, J.J.; RATNIEKS, F.L.W. 1996. Paternity in eusocial Hymenoptera **Phil. Trans. Roy. Sc. Lond. B**, **351**. 947-975.
- CAMARGO, C.A. 1972. Mating of the social bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae) under controlled conditions. **J. Kansas Ent. Soc.**, **45**(4). 520-523.

- CAMARGO, C.A. 1977. Properties of the xo gene, sex determination in *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera: Apidae). VII Congress Int. Union for the Study of Soc. Insects. 191-192.
- CAMARGO, C.A. 1979. Sex determination in Bees. XI Production of diploid males and sex determination in *Melipona quadrifasciata*. **J. Apic. Res.**, **18**. 77-83.
- CAMARGO, C.A. 1982. Longevity of diploid males, haploid males, and workers of the social bee *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera: Apidae). **J. Kansas Entomol. Society**, **55**(1). 8-12.
- CAMARGO, C. A., MOURE, J.S., ROUBIK, D. 1988. *Melipona yucatanica*. New species (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae) stingless bee dispersal across the Caribbean Arc and Post Eocene Vicariance. **Pan Pacific Entomol.**, **64**. 147-157.
- CAMPOS, L.A.O. 1987. Reprodução em *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera, Apidae) II - Cópula com rainha fisogástrica. *Resumos do XIV Congresso Brasil. de Zoologia*, Juiz de Fora, MG.
- CAMPOS, L.A.O.; MELO, G. A. R. 1990. Physogastric-queem mating in *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera, Apidae). **Rev. Brasil. Genet.**, **13**(3). 491-500.
- COOK, J.M. 1993. Sex determination in the Hymenoptera: a review of models and evidence. **Heredity**, **71**. 421-435.
- CROZIER, R.H. 1975. *Hymenoptera*. In: John, B. (ed) *Animal Cytogenetics 3: Insecta 7*. Gebr., Borntraeger, Berlin. 1-95.

- CROZIER, R.H. 1977. Evolutionary genetics of the Hymenoptera. **Annu. Rev. Entomol.**, **22**. 263-288.
- CROZIER, R.H.; PAMILO, P. 1996. *Evolution of Social Insect Colonies: Sex Allocation and Kin Selection*. Oxford University Press Inc., New York.
- CRUZ-LANDIM, C. 1984. Haplodiploidia em Hymenoptera. **Braz. J. Genet.**, **7**(3). 433-449.
- CUNHA, A. B.; KERR, W. E. 1957. A genetical theory to explain sex determination by arrhenotokous parthenogenesis. **Forma et Functio**, **1**. 33-36.
- DRESCHER, W.; ROTHENBUHLER, W. C. 1964. Sex determination in the honeybee. **J. Hered.**, **55**. 91-96.
- DUCHATEAU M.J., MARIËN J. 1995. Sexual biology of haploid and diploid males in the bumble bee *Bombus terrestris*. **Ins. Soc.**, **42**. 255-266.
- ENGELS, W.; IMPERATRIZ FONSECA, V. 1999. Caste development, reproductive strategies, and control of fertility in honey bees and stingless bees. In: Engels W (ed), *Social Insects. An Evolutionary Approach to Castes and Reproduction*, Springer, Berlin.
- GARÓFALO, C. A. 1973. Occurrence of diploid in a neotropical bumblebee. **Experientia**, **29**. 726-727.
- HAMILTON, W.D. 1964. The genetical evolution of social behaviour. **J. Theor. Biol.**, **7**. 1-52.

- HUNT, G. J.; PAGE, R. E. Jr. 1992. Patterns of inheritance with RAPD molecular markers reveal novel types of polymorphisms in the honey bee. **Theor. Appl. Genet.**, **85**. 15-20.
- HUNT, G. J.; PAGE, R. E. Jr. 1994. Linkage analysis of sex determination in the honey bee (*Apis mellifera*). **Mol. Gen. Genet.**, **244**. 512-518.
- HUNT, G. J. e PAGE, R. E. Jr. 1995. Linkage map of the honey bee, *Apis mellifera*, based on RAPD markers. **Genetic**, **139**. 1371-1383.
- KERR, W. E. 1946. Formação de castas no gênero *Melipona*. **Anais da Esc. Sup. Agric. Luiz de Queiroz**, **2**. 299-313.
- KERR, W. E. 1969. Some aspects of the evolution of social bees (Apidae), in evolutionary biology. **Evolut. Biology**, **3**. 119-175.
- KERR, W. E. 1987. Sex determination in bees. XXI. Number of XO-heteroalleles in a natural population of *Melipona compressipes fasciculata* (Apidae). **Ins. Soc.**, **34**. 274-279.
- KERR, W. E. 1997. Sex determination in honey bees (Apinae and Meliponinae) and its consequences. **Rev. Bras. Genet.**, **20**(4). 601-611.
- KERR, W. E.; CARVALHO, G. A.; NASCIMENTO, V. A. 1996. *Abelha Uruçu: Biologia, Manejo e Conservação*. Ed. Fundação Acangaú. 144p.
- MACHADO, M. F. P.; CONTEL, E. P. B.; KERR, W. E. 1984. Proportion of males sons-of-the-queen and sons-of-the-workers in *Plebeia droryana* (Hymenoptera, Apidae) estimated from data of an MDH isozymic polymorphic system. **Genetica**, **65**. 193-198.

- MICHENER, C. D. 1979. Biogeography of the bees. **Ann. Mo. Bot. Gard.**, **66**. 277-347.
- MICHENER, C. D. 1990. Classification of Apidae (Hymenoptera). **Univ. Kansas Sci. Bull.**, **54**. 75-164.
- MORITZ, R. F. A. 1995. High degree of polyandry in *Apis dorsata* queens detected by DNA microsatellite variability. **Behav. Ecol. Sociobiol.**, **37**. 357-363.
- MOURE, J. S.; KERR, W. E. 1950. Sugestões para a modificação da sistemática do gênero *Melipona* (HYMENOPTERA, APOIDEA). **Dusenía I**, **2**. 105-129.
- NAITO T.; SUSUKI H. 1991. Sex determination in the sawfly, *Athalia rosae ruficornis* (Hymenoptera): occurrence of triploid males. **J. Hered.**, **82**. 101-104.
- PACKER L.; OWEN R.E. 1990. Allozyme variation, linkage disequilibrium and diploid male production in a primitively social bee *Augochlorella striata* (Hymenoptera: Halictidae). **Heredity**, **65**. 241-248.
- PAXTON, R. J.; WEIBSCHUH, N.; ENGELS, W.; HARTFELDER, K.; QUEZADA-EUÁN, J. J. G. 1999. Not only single mating in stingless bees. **Naturwissenschaften**, **86**. 143-146.
- PETTERS, R. M.; METTUS, R. V. 1980. Decreased diploid male viability in the parasitic wasp, *Bracon hebetor*. **J. Hered.**, **96**. 263-273.
- PETTERS, R. M.; QUELLER, D. C.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; ROUBIK, D. W.; STRASSMANN, J. E. 1999. Mate number, kin

selection, and social conflicts in stingless bees and honeybees. **Proc. R. Soc. Lond.**, **266**. 379-384.

PLOWRIGHT, R. C.; PALLET, M. J. 1979. Worker-male conflict and inbreeding in bumble bees (Hymenoptera: Apidae). **Can. Ent.**, **11**. 289-294.

RATNIEKS, E. L. W. 1990. The evolution of polyandry by queens in social Hymenoptera: the significance of the timing of removal of diploid males. **Behav. Ecol. Sociobiol.**, **26**. 343-348.

ROSS K.G., FLETCHER D.J.C. 1985. Genetic origin of male diploidy in the fire ant, *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae), and its evolutionary significance. **Evolution**, **39**. 888-903.

SAKAGAMI, S. F. 1982. Stingless bees. In: *Social Insects*, vol. III (Hermann, H.R., ed). Academic Press, New York, p. 361-423

SASAKI, K.; SATOH, T.; OBARA, Y. 1995. Sperm utilization by honey bee queens; DNA fingerprinting analysis. **Appl. Entomol. Zool.**, **30**(2). 335-341.

SCHWARZ, H. F. 1948. Stingless bees of the western hemisphere. **Bull. Amer. Museum Nat. Hist.**, **90**. 545.

SILVA, D. L. N. 1977. Estudos bionômicos em colônias mistas de Meliponinae (Hymenoptera, Apoidea). **Bol. Zool. Univ. São Paulo**, **2**. 7-106.

SILVA, D. L. N.; ZUCCHI, R.; KERR, W.E. 1972. Biological and behavioural aspects of reproduction in some species of *Melipona* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Anim. Behav.**, **20**. 123-132.

- SMITH S.G., WALLACE D.R. 1971. Allelic sex determination in a lower hymenopteran, *Neodiprion nigroscutum* Midd. **Can. J. Gent. Cytol.**, **13**. 617-621.
- STRASSMANN, J. 2001. The rarity of multiple mating by females in the social Hymenoptera. **Ins. Soc.**, **48**. 01-13.
- TAVARES, M. G. 1999. Mapa de ligação de *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) construído com base em marcadores moleculares. Tese de Doutorado, São José do Rio Preto – UNESP.
- WALDSHMIDT, A. M. 1999. Análises genética e morfométrica de populações de *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). Tese de Doutorado, Viçosa – UFV.
- WALDSHMIDT, A. M., SALOMÃO, T. M. F., BARROS, E. G., CAMPOS, LAO. 1997. Extraction of genomic DNA from *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Braz. J. Genet.**, **20**. 421-423.
- WHITING, P. W. 1943. Multiple alleles in complementary sex determination of *Habrobracon*. **Genetics**, **28**. 365-382.
- WILLIAMS, J. G. K., KUBELIK, A. R., LEVAK, K. J. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucl. Acid. Res.**, **18**. 6531-6535.
- WOYKE, J. 1963. What happens to the diploid drones larvae in a honey bee colony. **J. Apic. Res.**, **2**. 73-75.

- WOYKE, J. 1965. Study on the comparative viability of diploid and haploid larval drone honeybees. **J. Apic. Res.**, **4**. 12-16.
- WOYKE, J. 1973. Reproductive organs of haploid and diploid drone honeybees. **J. Apic. Res.**, **12**. 35-51.
- WOYKE, J. 1974. Genic balance, heterozigosity and inheritance of size of testes in diploid drone honeybees. **J. Apic. Res.**, **13**. 77-91.
- WOYKE, J. 1977. Comparative biometrical investigation on diploid drones of the honeybee. **J. Apic. Res.**, **16**(3). 131-142.
- WOYKE, J. 1978. Comparative biometrical investigation on diploid drones of the honeybee. II. The thorax. **J. Apic. Res.**, **17**. 195-205.
- WOYKE, J. 1979. Sex determination of *Apis cerana india*. **J. Apic. Res.**, **18**. 122-127.
- WOYKE, J. 1980. Genetic background of sexuality in the diploid drone of honeybee. **J. Apic. Res.**, **19**. 89-95.
- WOYKE, J. 1986. *Sex determination*. In Rinderer, T.E. (ed.) *Bee Genetics and Breeding*. New York:Academic Press. 471-472.

5. APÊNDICES

1. Primers utilizados na análise de polimorfismos, número de bandas e tipo de polimorfismo gerados por estes primers após amplificação do DNA de zangões de *Melipona quadrifasciata*. (P: polimorfismo por presença e ausência de banda; I: intensidade de banda; T: tamanho de fragmento).

Primers	Número de bandas	Tipo de polimorfismo		Primers	Número de bandas	Tipo de polimorfismo
A11	8	P / P / I		C11	10	
A12	7			D1	7	
A13	9	P / P		D3	5	
A15	3			D5	9	T / I
A16	7			D11	10	P / P
A17	10	P / P / P / P		D12	6	P
A19	10	P		D13	8	
A20	5	P		D15	6	
B1	7	P / P		D16	5	I / P
B2	1			D18	7	I
B4	9	P / P		D20	4	I
B5	12	P		E1	4	P / P
B6	7	P		E2	7	
B7	7			E4	4	P
B8	8	P / T		E5	1	
B9	1			E6	7	I
B12	8	P		E7	9	P
B13	2	P		E8	2	
B14	5			E9	4	
B15	10	P / I / I		E10	8	
B16	4			E11	7	
B17	6			E12	2	
B18	10	P / I		E15	8	P
B19	5	I		E16	6	P
B20	4			E17	4	I
C1	5	I		E19	6	P
C2	6	T		E20	5	
C3	5	I		F1	4	
C4	7			F7	8	I / P
C5	6	T / P / I		F8	3	
C6	7			F10	6	I
C7	9	P		F13	2	
C8	10	P / P		F14	6	
C9	11	I / P		F15	2	
C10	9	I		G1	7	P / I / P

Primers	Número de bandas	Tipo de polimorfismo		Primers	Número de bandas	Tipo de polimorfismo
G2	6	P		L5	4	
G3	6	I		L7	4	P
G4	6	I/P		L8	4	I
G6	4			L10	1	
G7	2	I		L11	5	P
G11	8	I/P/P/I		L13	7	I/I/P/P
H12	6	T/P		L14	3	I
H13	5	P		L15	4	
H15	7	P		L16	3	P/T
H19	9	I/T		L17	6	P/P/I
I4	3	I		L18	7	P/P/P
I5	1	T		M1	5	P/I/P
I6	5	I		M2	5	
I10	2			M5	4	P/P
I11	3			M6	6	P/I
I12	7	I		M7	5	P/I
I13	1			M8	3	P
I14	6			M9	4	P/P/P
I16	6	P/I/I/P		M10	3	I/I/I
I17	5	P/P		M11	3	I/P/I
I18	3	P		M12	4	
I19	4	P		M13	7	P/I/I/P
J6	3	I		M14	4	P/P
J10	3	P		M15	4	P
J12	3	P		M16	4	P/I/P
J13	3			M17	2	I
J14	5	P		M18	2	P
J15	3			M19	2	I
J16	1			M20	5	I/I
J19	4	P		N1	2	
K9	2			N2	5	P
K10	3			N3	6	I/P/P/I
K11	4	I/P		N4	5	I/P
K12	2			N5	6	P/P
K15	4	P		N6	1	
K16	2			N7	7	P/P/I
K18	2			N8	2	
K19	6	P		N9	5	P/I
K20	5	P		N10	4	P
L1	3			N11	10	I/P/P/P
L2	3	P		N12	8	P/P/I/P
L3	9	P/I/P		N13	6	P
L4	7	P		N14	5	I

Primers	Número de bandas	Tipo de polimorfismo		Primers	Número de bandas	Tipo de polimorfismo
N15	2	I		Q16	5	
N18	2	P		Q17	7	I/P
O1	5			Q18	1	
O2	3			Q19	3	P
O3	5			R1	7	
O4	5	P/I		R2	6	
O5	4	P		R3	6	P
O6	7	I/I/I		R4	7	P/P
O7	6	P/I/I		R5	1	
O8	3			R10	1	
O9	4	P		R11	4	I
O10	6	I/I/I/P		R12	5	
O11	1	I		R13	3	
O12	5	T/I/P/P		R14	6	
O13	1			R15	9	
O14	2			R16	6	
O15	3	I		R17	6	I
O19	2	I		R19	4	P/I
P1	5	I		S8	4	I
P2	4			S9	3	I
P3	3	P		S10	3	I
P4	5	I		S11	6	T/P/I
P5	5	P		S12	5	I
P8	4			S13	4	P
P11	5	P		S14	4	I/P
P12	5			S15	5	P/P/P/I
P13	8	P		S16	5	P/I/P
P14	6			T1	8	I/P
P15	6	P		T2	8	I/P/P/I/P
P16	6	P		T3	1	
P17	4			T4	6	P/P
P18	5			T5	8	I/I/P/P
P19	4			T11	1	
Q1	3			T13	3	P/I/T
Q2	1			T14	5	I/T/I/I
Q3	1			T15	5	P/I
Q4	5	I/I/I/T		T16	5	I
Q5	5			T17	2	I
Q6	5	P/T		T18	6	I/P
Q7	1			T19	4	I
Q8	3	P		T20	3	I/P
Q9	2			U1	2	
Q10	3	P		U2	4	I

Primers	Número de bandas	Tipo de polimorfismo		Primers	Número de bandas	Tipo de polimorfismo
U3	4			Y16	6	
U5	5	I/I/P/I/P		Y17	4	
U6	3	P		Y18	5	I/I
U8	5			Y19	5	I
U9	3	P		W1	4	
U10	3	P/I		W2	7	I
U18	3	I		W3	5	
U19	3			W4	3	
U20	7	I/P/I		W5	4	
V1	5	P		W6	8	P
V2	4	I		W7	7	I/P
V3	5	P/P		W8	7	
V4	6	I		W9	7	P
V5	1			W10	6	I/I/I/P
V6	4	I		W11	5	
V7	6	P		W12	5	
V8	8			W13	6	
V9	1			W14	2	P
V10	6			W15	6	P
V12	8	P/P/P/P/P		W16	6	P
V14	4	T		W17	3	P
V15	3			W18	4	P
V16	6	P/I/I		W19	6	I/P
X16	3	P/I		Z1	3	
X17	4	P		Z3	4	
X18	5	P/P		Z4	2	
X19	5			Z6	3	
X20	4	I/I		Z7	6	I/P/P/T
Y1	4	I		Z8	2	P
Y2	2			Z9	3	P
Y3	4			Z10	8	P
Y4	3			Z11	6	P/I
Y5	3	P		Z12	4	P
Y6	7	I		Z13	3	P/P
Y7	5	I		Z14	3	
Y8	4			Z15	8	P/P
Y9	3			Z18	7	P/P
Y10	11	P		Z19	3	
Y11	7			AA1	7	P
Y12	5	P		AA2	9	P/P/P/I
Y13	9	I		AA3	5	
Y14	7	P/P		AA4	5	I
Y15	5			AA6	6	I

Primers	Número de bandas	Tipo de polimorfismo
AA7	6	P / P
AA8	4	P / T
AA9	7	P
AA10	6	P
AA11	6	I
AA12	3	
AA13	3	
AA14	5	
AA15	6	P
AA16	3	
AA17	6	P
AA18	8	I / I / P
AA19	4	

2. Primers utilizados na análise de ligação ao sexo

OPA11	OPJ12	OPN4	OPT2
OPA13	OPJ14	OPN5	OPT4
OPA17	OPJ19	OPN7	OPT5
OPA19	OPK11	OPN9	OPT13
OPA20	OPK15	OPN10	OPT15
OPB1	OPK19	OPN11	OPT18
OPB4	OPK20	OPN12	OPU5
OPB5	OPL2	OPN13	OPU6
OPB6	OPL3	OPO4	OPU9
OPB8	OPL4	OPO5	OPU10
OPB12	OPL7	OPO7	OPU20
OPB13	OPL11	OPO9	OPV1
OPB15	OPL13	OPO10	OPV3
OPB18	OPL16	OPO12	OPV7
OPC5	OPL17	OPP3	OPV12
OPC7	OPL18	OPP11	OPV16
OPC8	OPM1	OPP13	OPX16
OPC9	OPM5	OPP15	OPX17
OPD1	OPM6	OPP16	OPX18
OPD11	OPM7	OPQ6	OPY5
OPD12	OPM9	OPQ10	OPY14
OPD16	OPM11	OPR3	OPW7
OPE1	OPM13	OPR4	OPW14
OPE4	OPM14	OPR19	OPW17
OPE15	OPM15	OPS11	OPZ7
OPE16	OPM16	OPS13	OPZ13
OPE19	OPM18	OPS14	OPZ15
OPF7	OPM19	OPS15	OPZ18
OPG2	OPN2	OPS16	OPAA2
OPG4	OPN3	OPT1	