

LARISSA FAJARDO SILVEIRA

CONTEÚDO DE DNA, PLOIDIA E DIMORFISMO SEXUAL EM *Polistes versicolor*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ecologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Karla Suemy Clemente Yotoko

Coorientadores: André Rodrigues de Souza
Nicole Estefania Ibagón Escobar

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

S587c
2022
Silveira, Larissa Fajardo, 1996-
Conteúdo de DNA, ploidia e dimorfismo sexual em *Polistes
versicolor* / Larissa Fajardo Silveira. – Viçosa, MG, 2022.
1 dissertação eletrônica (59 f.): il. (algumas color.).

Inclui anexos.

Orientador: Karla Suemy Clemente Yotoko.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Biologia Geral, 2022.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.170>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Diploidia. 2. Animais machos. 3. Citometria de Fluxo.
4. Poliploidia. 5. Morfometria. 6. Seleção natural. I. Yotoko,
Karla Suemy Clemente, 1974-. II. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de
Pós-Graduação em Ecologia. III. Título.

CDD 22. ed. 572.865

Bibliotecário(a) responsável: Renata de Fátima Alves CRB6/2578

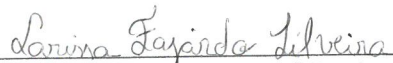
LARISSA FAJARDO SILVEIRA

CONTEÚDO DE DNA, PLOIDIA E DIMORFISMO SEXUAL EM *Polistes versicolor*

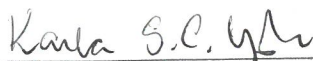
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ecologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 25 de janeiro de 2022.

Assentimento:



Larissa Fajardo Silveira
Autora



Karla Suemy Clemente Yotoko
Orientadora

AGRADECIMENTOS

Sem dúvida nunca fazemos nada sozinho, pois sempre temos em nosso caminho pessoas maravilhosas. Nesse trabalho não poderia deixar de agradecer algumas delas.

Minha mãe Andréa e meu padrasto Alex por estarem sempre comigo me apoiando nos momentos mais difíceis.

Minha irmã Amanda e minha sobrinha Valentina pelo carinho, vocês são muito importantes para mim.

Meu pai, Leonardo, pelo estímulo desde os primeiros anos escolares e por me mostrar que o estudo é o melhor caminho a ser seguido.

Minha madrinha Fabiana por sempre cuidar de mim e ser essa pessoa tão presente em minha vida.

Meu avô Vicente e minha tia Maria Helena, em memória, dois anjos especiais que sei que sempre estão comigo mesmo que a saudade ainda seja bastante forte.

Minha orientadora Karla por me dar a oportunidade de realizar esse sonho que foi estudar na UFV.

Meus coorientadores André, Nicole e colegas de laboratório que me auxiliaram desde o primeiro momento de ingresso no mestrado.

Professor Well, Fernanda e Natália pela ajuda e por darem sua contribuição valiosa.

Elenir, João, Francielly e a todos amigos queridos que Viçosa me trouxe. Com vocês foi mais fácil me aventurar em uma outra cidade.

A todos do Programa de Pós Graduação em Ecologia que me acolheram com todo carinho.

À Universidade Federal de Viçosa, Universidade de São Paulo e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior — CAPES pelos recursos fornecidos para a realização desse trabalho.

A Deus pela saúde e proteção de cada dia.

RESUMO

SILVEIRA, Larissa Fajardo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, janeiro de 2022.
Conteúdo de DNA, ploidia e dimorfismo sexual *Polistes versicolor* Orientadora: Karla Yotoko
Coorientadores: André Rodrigues de Souza e Nicole Estefania Ibagón Escobar.

Polistes versicolor (Hymenoptera: Vespidae) é uma espécie eussocial amplamente distribuída pela América do Sul que não apresenta castas morfológicamente determinadas. Estudos anteriores sugerem que apesar de ocorrerem acasalamentos entre indivíduos de um mesmo ninho, não há registros da presença de machos diploides em *P. versicolor*, que em tese pode ser evitada pela produção exclusiva de machos ou fêmeas por um ninho no período reprodutivo. O presente trabalho visou a investigação de uma população de *P. versicolor* (86 machos e 24 fêmeas oriundos de 13 ninhos diferentes) coletada na fase de pós-emergência no Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e armazenada em álcool absoluto. No Cap. 1, utilizamos morfometria geométrica para avaliar o dimorfismo sexual de forma e tamanho das asas à luz das diferenças de ploidia e das especificidades comportamentais de cada sexo. Nossos resultados sugerem que apesar dos machos apresentarem tamanho médio de asas menor do que o das fêmeas, alguns machos apresentaram asas tão grandes quanto as maiores fêmeas, de modo que a diferença de tamanho não pode ser diretamente relacionada à ploidia. A variação na forma das asas dos machos também foi muito maior que das fêmeas, sugerindo a ação de seleção estabilizadora, que limita a variação no formato das asas das fêmeas, o que impactaria negativamente o valor adaptativo da colônia. Com o intuito de quantificar a prevalência de machos diploides na população em estudo e determinar a quantidade de DNA (1C) da espécie, utilizamos, no Cap. 2, a citometria de fluxo. Comparamos os resultados obtidos de espécimes fixados com espécimes recém coletados de *P. versicolore* detectamos, em ambas as amostras, células com múltiplas ploidias, tanto em machos quanto em fêmeas. De um total de 23 machos avaliados, encontramos apenas dois machos diploides, ambos coletados nos únicos ninhos das amostras dos quais foram obtidos tanto machos quanto fêmeas. O valor 1C determinado foi 0,65 pg, o maior valor já encontrado em espécies de *Polistes*.

Palavras-chave: Machos diploides. Citometria de fluxo. Poliploidia. Morfometria geométrica. Seleção estabilizadora.

ABSTRACT

SILVEIRA, Larissa Fajardo, M.Sc., Universidade Federal Viçosa, January 2022. **DNA content, ploidy and sexual dimorphism in *Polistes versicolor*** Adviser: Karla Yotoko Co-advisers: André Rodrigues de Souza and Nicole Estefania Ibagón Escobar.

Polistes versicolor (Hymenoptera: Vespidae) is a eusocial species widely distributed throughout South America that presents no morphologically distinguishable castes. Previous studies suggest that although mating occurs between individuals from the same nest, there are no records of diploid males in *P. versicolor*, which in theory could be avoided by the production of only males or females by a nest during the reproductive period. The present work aimed to investigate a population of *P. versicolor* (86 males and 24 females from 13 different nests) collected during the post-emergence phase on the Ribeirão Preto Campus of the University of São Paulo and stored in absolute alcohol. In Chap. 1, we used geometric morphometry to assess sexual dimorphism of wing shape and size in the light of differences in ploidy and behavioral specificities of each sex. Our results suggested that although males had smaller average wing size than females, some males had wings as large as the largest females, so the size difference cannot be directly related to ploidy. Furthermore, the variation in male wing shape was also much larger than that of females, suggesting the action of stabilizing selection that limits variation in female wing shape, which would negatively impact the colony's fitness. To quantify the prevalence of diploid males in the population under study and determine the amount of DNA (1C) in the species, we used flow cytometry in Chap.2. We compared the results obtained from fixed specimens with recently collected specimens of *P. versicolor* and detected, in both samples, cells with multiple ploidies in both males and females. From a total of 23 males evaluated, we found only two diploid males, both collected from the only nests in the sample from which both males and females were obtained. The 1C value determined was 0,65 pg, the highest value ever found in *Polistes* species.

Keywords: Diploid males. Flow cytometry. Polyploidy. Geometric morphometry. Stabilizing selection.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	7
1.1 Insetos sociais.....	7
1.2 Dimorfismo sexual em Hymenoptera	8
1.3 Morfometria geométrica	10
1.4 Citometria de fluxo	11
1.5 O gênero <i>Polistes</i>	12
1.6 <i>Polistes versicolor</i>	13
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
CAPÍTULO 1: DIMORFISMO SEXUAL NO TAMANHO E FORMATO DE ASAS DE <i>Polistes versicolor</i> (HYMENOPTERA – VESPIDAE)	23
RESUMO	23
2.1 Introdução	24
2.2 Material e métodos.....	26
2.2.1 Coleta	26
2.2.2 Obtenção das imagens	26
2.2.3 Avaliação de erros procedimentais	27
2.2.4 Determinação de forma e tamanho	28
2.2.5 Subconjunto de dados	28
2.3 Resultados	29
2.3.1 Avaliação de erros	29
2.3.2 Diferenças de tamanho	29
2.3.3 Diferenças de forma.....	31
2.4 Discussão.....	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
MATERIAL SUPLEMENTAR	37
CAPÍTULO 2: PLOIDIA E CONTEÚDO DE DNA NUCLEAR EM <i>Polistes</i> <i>versicolor</i> (HYMENOPTERA – VESPIDAE)	42
RESUMO	42
3.1 Introdução	43
3.2 Material e métodos.....	45
3.2.1 Coleta	45
3.2.2 Citometria de fluxo	45
3.3 Resultados	46
3.4 Discussão.....	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
MATERIAL SUPLEMENTAR	56
CONCLUSÃO GERAL	58
PERSPECTIVAS	59

INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Insetos sociais

O surgimento de espécies sociais, foi uma das grandes transições sofridas pela vida no processo evolutivo, equivalente em importância ao surgimento dos cromossomos, dos eucariotos, da reprodução sexuada e dos organismos multicelulares (MAYNARD SMITH; SZATHMÁRY, 1995). Entre os insetos sociais, destacam-se grupos da ordem Hymenoptera, como formigas, abelhas, vespas; além dos cupins, da subordem Isoptera, ordem Blattaria.

Dos serviços ecossistêmicos realizados por insetos, os insetos sociais são responsáveis por pelo menos 10 categorias, dentre as quais se insere a polinização e dispersão de sementes, sendo essenciais para a existência de plantas no planeta (ELIZALDE *et al.*, 2020).

Em se tratando do comportamento social, a eussocialidade é o grau mais complexo que pode ser alcançado (MICHENER, 1969, *apud* Rodrigues, 2020, p. 75). Para se ter uma ideia de sua importância, estima-se que 50% da biomassa de insetos no mundo seja eussocial (WILSON, 1971), enquanto apenas 2% das espécies descritas de insetos apresentam este comportamento (FU; KOCHER; NOWAK, 2015).

Dentre as teorias que explicam a evolução da eussocialidade, a teoria da seleção de parentesco sugere que a cooperação entre a rainha e as operárias depende de altos graus de parentesco. Neste caso, operárias desistiriam da reprodução por ter aptidão indireta, pois em um sistema haplodiploide (onde machos são monoploides e fêmeas são diploides), que possui apenas uma rainha dentro do ninho (ninho monogínico) e esta copula com apenas um macho (fêmea monoândrica), o coeficiente de parentesco será de 75% (média) entre as irmãs e de 50% entre mãe e filha. Esses números explicariam, em termos de valor adaptativo, o fato de as operárias cuidarem de suas irmãs em vez de produzir a própria prole (HAMILTON, 1964).

Pela originalidade e forma como elucidou as questões que envolvem

a evolução da eussocialidade, a teoria da seleção de parentesco impulsionou muitos estudos correlativos que colocam o parentesco como princípio indispensável para o surgimento da eussocialidade. Entretanto, detalhes dessa teoria ainda são questionados já que é diretamente aplicável em organismos haplodiplóides, mas não a organismos diplodiplóides como cupins (PRESTES; CUNHA, 2012).

De fato, a eussocialidade surgiu independentemente nos mais variados organismos (GULLAN; CRANSTON, 2017), gerando diferentes sistemas que variam do solitário ao eussocial, com as seguintes classificações: a) solitário - o indivíduo vive sozinho; b) comunal - os indivíduos utilizam um sítio de nidificação coletivo; c) quase-social - sítio de nidificação coletivo e sobreposição de gerações; d) semi-social - sítio de nidificação coletivo, sobreposição de gerações e divisão de trabalho; e) eussocial - todas as características anteriores e o cuidado cooperativo com a prole (WILSON, 1971).

Nos insetos sociais, a vida em grupo maximiza a eficiência em tarefas como forrageamento, cuidado com a prole e defesa da colônia (CREMER; ARMITAGE; SCHMID-HEMPEL, 2007). Entretanto, a baixa variabilidade genética, consequência da agregação de indivíduos aparentados nos ninhos, pode torná-los susceptíveis ao ataque de patógenos. Além desses, defensivos agrícolas (PIRES *et al.*, 2016), mudanças climáticas (MESSAGE *et al.*, 2011) e perda de habitat (LOPES; FERREIRA; SANTOS, 2005) vêm causando a diminuição das populações de insetos sociais (FAITA; CHAVES; NODARI, 2021), a ponto de ameaçá-los de extinção (ICMBIO, 2018).

Dada a importância e a fragilidade desses insetos, é urgente a ampliação de estudos nas diversas linhas de pesquisas para que possamos preservar a biodiversidade de insetos sociais no planeta.

1.2 Dimorfismo sexual em Hymenoptera

O desenvolvimento da maturidade sexual é um processo marcado por mudanças morfológicas e fisiológicas no corpo dos indivíduos (HARTNOLL, 1985). Assim como na maioria dos animais, incluindo os insetos, nos Hymenoptera, machos e fêmeas costumam apresentar diferenças de tamanho, fenômeno identificado na literatura como Sexual Size Dimorphism (SSD). Em geral, organismos ectotermos apresentam fêmeas maiores que machos (ARAK, 1988; SHINE, 1988,

1989; FAIRBAIRN, 1997), mas, independentemente das generalizações, a direção e o grau de SSD variam bastante entre os diferentes *taxa* e pode estar relacionada com a plasticidade de tamanho, que tende a ser maior em um dos sexos. Dentre as causas do SSD, encontram-se a emergência dos machos antes das fêmeas o que tende a produzir machos menores, pelo menor tempo de desenvolvimento; e as diferenças de tamanhos de ovos e larvas que darão origem a machos ou fêmeas.

Em outra abordagem, Morales *et al.*, (2021) mostraram que no meliponídeo neotropical *Scaptotrigona pectoralis* (Dalla Torre, 1896), a quantidade de alimento fornecida às larvas pode impactar o desenvolvimento das larvas e conseqüentemente o tamanho do corpo da prole. Em populações com organismos que se reproduzem de forma sexuada, espera-se investimento e provisão de recursos igualitários 1:1 na produção de machos e fêmeas (FISHER, 1930). No entanto, espécies de himenópteros podem apresentar desvios desta proporção. Fêmeas da espécie *Trypoxylon rogenhoferi* Kohl, 1884, são maiores que os machos por receberem maior quantidade de alimento enquanto larvas e se beneficiam desse tamanho caçando presas maiores e completando mais rapidamente as células de cria quando adultas (PERUQUETTI; LAMA, 2003).

O dimorfismo sexual em Hymenoptera também pode ser notado pela diferença de coloração ou dicromismo, como na vespa da madeira *Sirex noctilio* Fabricius, 1773, onde as fêmeas apresentam coloração azul metálica mais escura que os machos (IEDE; ZANETTI, 2007). Já em alguns representantes da família Agaontidae, diferenças quanto ao número e forma dos segmentos antenais também auxiliam na discriminação entre indivíduos do sexo feminino e masculino (LIMA, 1960).

Os Hymenoptera geralmente são tetrápteros, possuindo dois pares de asas membranosas, sendo as asas anteriores maiores que as posteriores (BARBIERI JUNIOR, 2011). Todavia, encontram-se espécies ápteras (sem

asas) em um dos sexos, na maioria dos casos a fêmea como nas famílias Thynnidae e Mutillidae (LIMA, 1960).

Em seus estudos envolvendo a forma média da asa em vespas do gênero *Polistes* (Hymenoptera: Vespidae), Abbasi, 2009 evidenciaram o dimorfismo sexual nas asas de *Polistes dominula* (Christ, 1791) e *P. gallicus* (Linnaeus, 1767). Em um trabalho realizado com *P. simillimus* Zikan, 1951, a pigmentação facial preta mostrou ser um traço dimórfico entre os indivíduos, sendo maior e mais variável em machos que em fêmeas (SOUZA, 2015). Já na espécie *P. versicolor*, o padrão de coloração auxilia na distinção entre os sexos, uma vez que machos apresentam coxas, mesoesterno e face com coloração amarelada e as fêmeas apresentam uma coloração mais escura, no tom amarronzado (PIETROBON, 2005).

1.3 Morfometria geométrica

A morfometria geométrica é uma técnica que se baseia na comparação das coordenadas dos pontos anatômicos homólogos marcados nas estruturas morfológicas de diferentes espécimes (BOOKSTEIN, 1991). O método é acurado o suficiente para descrever as diferenças entre amostras biológicas, além de ser utilizado para inferir sobre as modificações que ocorreram durante o desenvolvimento (MITTEROECKER, 2020), causadas por tratamentos experimentais ou mesmo por forças evolutivas (JIA; ZHU, 2020).

Em estudos envolvendo a maioria das ordens de insetos, a morfometria geométrica das asas se destaca como uma das mais utilizadas (TATSUTA; TAKAHASHI; SAKAMAKI, 2017). Por serem estruturas planas que permitem análises em apenas duas dimensões, facilitam o acesso a preciosas informações com a vantagem adicional de evitar erros na delimitação dos marcos anatômicos quando comparadas a estruturas tridimensionais (DUJARDIN, 2008). Em relação a estudo envolvendo espécies de Hymenoptera, a morfometria geométrica das asas vem sendo utilizada para validar o status taxonômico de espécimes fósseis (LI *et al.*, 2022), avaliação da contaminação ambiental, que gera assimetria bilateral nas asas, (MIELCZAREK; MIELCZAREK; WOJCIECHOWICZ-ŻYTKO, 2021), modificações de forma em parasitoides em função do

hospedeiro parasitado (TORRES-MORENO; VÍCTOR; MOYA-RAYGOZA, 2021), delimitação de castas em espécies eussociais (MAHIMA *et al.*, 2021), detecção de machos diploides (GERARD *et al.*, 2015), dimorfismo sexual (PRETORIUS, 2005), entre outras aplicações.

Para dar uma ideia da relevância do método, uma busca no GOOGLE scholar, de 2020 até a presente data (06/12/2021), com as palavras-chave “Geometric Morphometrics” e Wing, retornou 5700 artigos. Acrescentando a palavra Hymenoptera, a busca retornou 1080 resultados, 110 deles publicados só em 2021.

1.4 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é um método que analisa partículas suspensas em uma solução tamponada à medida que elas passam por um ou vários lasers (CHEN; LUU, 2016). Essa metodologia pode ser utilizada para análises de células inteiras, organelas, núcleos, DNA, RNA, cromossomos, citocinas, hormônios e conteúdo proteico (ADAN *et al.*, 2017).

Para análise de citometria são utilizados fluorocromos, moléculas que emitem fluorescência quando excitadas por um comprimento de luz específico (MONTENEGRO, 2016). Dentre os fluorocromos que podem ser utilizados para corar tanto o RNA quanto o DNA, estão Brometo de Etídio (BE) e o Iodeto de Propídeo (IP) (LOUREIRO; SANTOS, 2004). Além desses, outras metodologias envolvendo o uso de partículas de semicondutores nanocristalinos desenvolvidas por empresas comerciais ampliaram as possibilidades para experimentos altamente multiplexados (CHATTOPADHYAY, 2011; MOQUIN *et al.*, 2015).

Em trabalhos com citometria é também utilizado uma espécie padrão com o conteúdo de DNA já descrito na literatura para ser comparado com o material que será analisado. Para insetos alguns padrões já foram testados e incluem *Tenebrio molitor* Linnaeus, 1758, *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830 ou *Scaptotrigona xanthotricha* Moure, 1950 (ARDILA-GARCIA; UMPHREY; GREGORY, 2010; HANRAHAN; JOHNSTON, 2011; LOPES *et al.*, 2009).

Dentre as aplicações da citometria de fluxo está a imunofenotipagem de células sanguíneas (SOUZA; PEDRAZZANI, 2019), análise de apoptose e viabilidade celular (WLODKOWIC; SKOMMER; DARZYNKIEWICZ, 2011), detecção de citocinas (FARIA, 2016), quantificação do conteúdo de DNA (SOARES, 2012) e

ploidia (SILVA, 2016).

Em Hymenoptera, dados de conteúdo de DNA em espécies de abelhas do gênero *Melipona*, obtidos por meio da citometria de fluxo, permitiram categorizar diferentes espécies em dois grandes grupos principais: o primeiro com teor relativamente baixo de DNA (média = 0,29 pg) e o segundo com alto teor de DNA (média = 0,98 pg), sendo o teor de DNA não correlacionado com o tamanho dos indivíduos (TAVARES *et al.*, 2012).

Silva (2016), utilizando a técnica de citometria de fluxo para análise de formigas do gênero *Solenopsis* mostraram que células poliploides em tecido neural é um fenômeno que não ocorre com igual frequência em todas as etapas do desenvolvimento, sendo ausentes em indivíduos adultos.

Mais recentemente a metodologia de citometria de fluxo também foi aplicada para espécies fixadas em álcool (CUNHA *et al.*, 2021), ampliando as possibilidades para se trabalhar com diferentes tipos de materiais.

1.5 O gênero *Polistes*

Polistes foi descrito pela primeira vez como um gênero por Latreille e teve como espécie-tipo *Polistes gallicus*, diagnosticável pelo formato cônico do Tergo I (LATREILLE, 1802, *apud* SOMAVILLA, 2016, p. 3).

Espécies do gênero *Polistes* apresentam colônias constituídas por castas que apresentam diferenças morfológicas mínimas entre os indivíduos (COWAN, 1991). Os ninhos podem ser fundados por uma ou várias fêmeas (VIRGÍNIO; MACIEL; BARBOSA, 2016), cuja posição hierárquica é determinada pela agressividade (TANNURE; NASCIMENTO, 1999). A fêmea mais agressiva (dominante) realiza a postura dos ovos, enquanto as fêmeas subordinadas se dividem nas tarefas de forrageamento, alimentação das larvas e manutenção do ninho (TORRES; ANTONIALLI-JUNIOR; GIANNOTTI, 2009).

Polistes constroem seus ninhos utilizando material vegetal (WESTEBERHARD, 1969), o que as tornou popularmente conhecidas como “Vespas de Papel” (JEANNE, 1975; WENZEL, 1998). Seus ninhos têm como característica um pedúnculo preso ao substrato, sem a construção de envelope protetor (SOMAVILLA; OLIVEIRA; SILVEIRA, 2012).

A duração do ciclo de uma colônia em vespas sociais pode variar muito e

depende da disponibilidade de alimento, do clima e do risco de predação (GIANNOTTI, 1977). Em regiões de clima temperado, as espécies de *Polistes* apresentam ciclo colonial curto e em sincronia com as estações do ano, de modo que ninhos são fundados e abandonados em épocas bem definidas. Nas regiões de clima tropical, os ciclos são assíncronos e as colônias podem se manter ativas por vários meses (MONTAGNA, 2009).

1.6 *Polistes versicolor*

P. versicolor é uma espécie de vespa social neotropical que ocorre desde a Costa Rica até a Argentina (RICHARDS, 1978). Vive em colônias que podem variar de sete fêmeas, em associação de fundadoras; a 100 fêmeas, em colônias maduras (GOBBI, 1977) (Fig. 1). Em todas as colônias, as operárias iniciam as tarefas de campo a partir da segunda semana de vida (ZARA; BALESTIERI, 2000).

Operárias de *P. versicolor* permanecem em atividade de forrageio das 8h às 17h (GOBBI, 1977) e apresentam média de 35 minutos de atividade por hora (SOUZA; PREZOTO, 2012). Embora seja uma importante predadora com potencial para controle biológico, seus ninhos podem sofrer ataques constantes de pássaros e formigas (GOBBI *et al.*, 2009).

A cópula em *P. versicolor* pode durar entre 30 e 40 segundos (PIETROBON, 2005). Uma vez fertilizada, a fêmea faz a oviposição e suas larvas são alimentadas com recurso proteico animal, fornecido pelas outras fêmeas da colônia. Em ninhos coletados no município mineiro de Juiz de Fora, foram encontradas 89 espécies de presas de *P. versicolor*, sendo 95,4% larvas de Lepidoptera e 1,1% larvas de Coleoptera. As demais presas não puderam ser identificadas (PREZOTO *et al.*, 2006).

Como ocorre em outras espécies de *Polistes*, a dominância hierárquica se dá por interações comportamentais agressivas protagonizadas pelas fêmeas de um mesmo ninho. Brocanelli (2015) sugeriu que o sistema de hierarquia de *Polistes versicolor* é linear, com uma fêmea dominante, uma segunda fêmea que domina todas outras exceto a primeira e assim sucessivamente.

De acordo com Oliveira, Lopes e Prezoto (2006), a frequência de interações de dominância em *P. versicolor* é maior em colônias em estágio de pós-emergência do que pré-emergência, apresentando correlação positiva com o número de

indivíduos. Itô (1987) sugeriu que a menor frequência de interações de dominância em colônias de pré-emergência favorece a permanência de subordinadas. No entanto, a fêmea dominante pode manter seu *status* praticando oofagia, ou a ingestão dos ovos de outras fêmeas durante a fase de pré-emergência (ZARA; BALESTIERI, 2000). Estes mesmos autores mostraram que as atividades realizadas dentro da colônia não são definidas em função da idade dos indivíduos.



Figura 1: Ninho da vespa *Polistes versicolor*. Foto: Frank Bungartz, CDF, 2008.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBASI, R. Sexual dimorphism in the wing morphology of social vespid wasps – a case study on the genus *Polistes Latreille* using geometric morphometrics. **Zoology in the Middle East**, vol. 47, no 1, p. 83–92, 2009.
- ADAN, A; ALIZADA, G; KIRAZ, Y; BARAN, Y; NALBANT, A. Flow cytometry: basic principles and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, vol. 37, no. 2, p. 163–176. 2017.
- ARAK, A. Sexual dimorphism in body size: a model and a test. **Evolution**, vol. 42, p. 820-825, 1988.
- ARDILA-GARCIA, A. M; UMPHREY, G. J; GREGORY, T. R. An expansion of the genome size dataset for the insect order Hymenoptera, with a first test of parasitism and eusociality as possible constraints. **Insect Molecular Biology**, vol. 19, p. 337-346, 2010.
- BARBIERE JUNIOR, C. A. **Levantamento das subfamílias de Braconidae (Hymenoptera, ichneumonoidea) em área de diferentes estágios de conservação, no vale do paraíba, Estado de São Paulo, Brasil.** 2011. Tese (doutorado e ecologia e recursos naturais), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2011.
- BOOKSTEIN, F. L. Morphometric tools for landmark data. Geometry and Biology. **Cambridge University Press: New York.** 1991. 435 p.
- BROCANELLI, F. G. **Diferenças individuais no comportamento forrageiro de *Polistes versicolor* Olivier, 1872 (Vespidae, Polistinae).** 2015. Tese (mestrado em Ciências Biológicas), Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, SP, 2015.
- CHATTOPADHYAY, P. K. Quantum dot technology in flow cytometry. **Methods in Cell Biology**, vol 102, p. 463–77, 2011.
- CHEN, W; LUU, H.S. Immunophenotyping by Multiparameter Flow Cytometry. **In: Acute Myeloid Leukemia. Humana Press, New York, NY.** 2017. 278 p.
- COWAN, D. P. The solitary and presocial Vespidae. In: Ross. K. G.; Matthews, R. W. (edit.) The social biology of wasps. **Comstock Publishing Associates**, 1991. 678 p.
- CREMER, S; ARMITAGE, S. A. O; SCHMID-HEMPEL, P. Social Immunity. **Current Biology**, vol. 17, no. 16, p. 693–702, 2007.
- CUNHA, M. S; SOARES, F. A. F; CLARINDO, W. R; CAMPOS, L. A. O; LOPES, D. M. Robertsonian rearrangements in Neotropical Meliponini karyotype evolution (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). **Insect Molecular Biology**, vol. 30, no. 4, p. 379–389, 2021.

DUJARDIN, J. P. Morphometrics applied to medical entomology. *Infection, Genetics and Evolution*, vol. 8, no. 6, p. 875–890, 2008.

ELIZALDE, L; ARBETMAN, M; ARNAN, X; EGGLETON, P; LEAL, I. R; LESCO, M. N; SAEZ, A; WERENKRAUT, V; PIRK, G. I. The ecosystem services provided by social insects: traits, management tools and knowledge gaps. **Biological reviews**, vol. 95, p. 1418-1441, 2020.

FAIRBAIRN, D. J. Allometry for sexual size dimorphism: pattern and process in the coevolution of body size in males and females. **Annual Review of Ecology and Systematics**, vol. 28, p. 659–687, 1997.

FAITA, M. R; CHAVES, A; NODARI, R. O. A expansão do agronegócio: impactos nefastos do desmatamento, agrotóxicos e transgênicos nas abelhas. **Desenvolvimento e Meio Ambiente**, vol. 57, p. 79-105, 2021.

FARIA, B. G. **Avaliação da produção de citocinas intracelulares por monócitos e neutrófilos do sangue periférico humano infectados com L. BRAZILIENSIS: incorporação de um novo parâmetro ao ensaio pré-clínico funcional multiparamétrico baseado em citometria de fluxo.** 2016. Tese (Mestrado em ciências biológicas - Fisiologia e Farmacologia), Universidade do Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2016.

FISHER, R. A. The genetical theory of natural selection. **Clarendon Press**, 1930. 286 p.

FU, F; KOCHER, S. D; NOWAK, M. A. The risk-return trade-off between solitary and eusocial reproduction. **Ecology Letters**, vol. 18, no. 1, p. 74-84, 2015.

GERARD, M; MICHEZ, D; FOURNIER, D; MAEBE, K; SMAGGHE, G; BIESMEIJER, J. C; MEULEMEESTER, T. D. Discrimination of haploid and diploid males of *Bombus terrestris* (Hymenoptera; Apidae) based on wing shape. **Apidologie**, vol. 46, p. 644-653, 2015.

GIANNOTTI, E. Biology of the wasp *Polistes* (*Epicnemius*) *cinerascens* Saussure (Hymenoptera: Vespidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, vol. 26, no. 1, p. 61–67, 1997.

GOBBI, N. **Ecologia de *Polistes versicolor*.** 1977. Tese (Doutorado em Genética), Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 1977.

GOBBI, N; GOVONE, J. S; PINTO, N. P. O; PREZOTO, F. Produtividade em colônias de *Polistes* (*Aphanilopterus*) *versicolor* Olivier, 1791 (Hymenoptera: Vespidae, Polistinae). **Zoociências**, vol.11, no. 3, p. 191-199, 2009.

GREGORY, T. R. 2022. **Animal Genome Size Database.** Disponível em: <http://www.genomesize.com>. Acesso em: 18 de fevereiro de 2022.

GULLAN, P. J; CRANSTON, P. S. Insetos: fundamentos da entomologia. **5ª Ed. Rio de Janeiro: ROCA**, 2017. 460 p.

HAMILTON, W. D. The genetical theory of social behaviour. II. **Journal of Theoretical Biology**, vol. 7, p. 17–52, 1964.

HANRAHAN, S. J; JOHNSTON, J. S. New genome size estimates of 134 species of arthropods. **Chromosome Research**, vol. 19, p. 809–823, 2011.

HARTNOLL, R. G. Growth, sexual maturity and reproductive output. **Wenner, A. M. (ed.), Crustacean Issues. Factors in Adult Growth. A.A. Balkema, Rotterdam**, p. 101–128, 1985.

ICMBIO, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção Volume VII — Invertebrados. **ICMBio/MMA**, Brasília, DF, 2018. 727 p.

IEDE, E. T; ZANETTI, R. Ocorrência e recomendações para o manejo de *Sirex noctilio Fabricius* (Hymenoptera, Siricidae) em plantios de *Pinus patula* (Pinaceae) em Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**, vol. 51, p. 529–531, 2007.

ITÔ, Y. Roles and pleometrosis in the evolution of eusociality in wasp. **Itô, Y; Brown, J.L; Kikkawa, J. (Ed.). Animal societies: theories and facts**, p. 17- 34, 1987.

JEANNE, R. L. The adaptivness of social wasps nest architecture. **Quarterly Review of Biology**, vol. 50, p. 267–287, 1975.

JIA, T; ZHU, W. Research progress of geometric morphometrics in animals: A review. **Octa Journal of Biosciences**, vol. 8, no. 2, p. 137-142, 2020.

LI, L; SHIH, P, J. M; ZHANG, X; PENG, C; LI, D; REN, D. Geometric Morphometric Analysis of two genera confirm three new wasps from the mid-Cretaceous of Myanmar (Hymenoptera: Aulacidae). **Cretaceous Research**, vol. 130, p. 1-7, 2022.

LIMA, A. C. Insetos do Brasil. **Escola nacional de agronomia. Série didática**, no. 13, 1960. 393 p.

LOPES, M; FERREIRA, J. B; SANTOS, G. Abelhas sem-ferrão: a biodiversidade invisível. **Agriculturas**, vol. 2, no. 4, p. 1-3, 2005.

LOPES, D. M; CARVALHO, C. R. D; CLARINDO, W. R; PRAÇA, M. M; TAVARES, M. G. Genome size estimation of three stingless bee species (Hymenoptera, Meliponinae) by flow cytometry. **Apidologie**, vol. 40, p. 517-523, 2009.

LOUREIRO, J; SANTOS, C. Aplicação da Citometria de Fluxo ao estudo do Genoma Vegetal. **Boletim de Biotecnologia**, vol. 77, p. 18-29, 2004.

MAHIMA, K. V; ANAND, P. P; SEENA, S; SHAMEEMA, K; MANOGEM, E. M; VARDHANAN, Y. S. Caste-specific phenotypic plasticity of Asian weaver ants: Revealing the allometric and non-allometric component of female caste system of *Oecophylla smaragdina* (hymenoptera: Formicidae) by using geometric morphometrics. **Sociobiology**, vol. 68, no. 2, p. 1-11, 2021.

MAYNARD SMITH, J; SZATHMÁRY, E. The major transitions in evolution. **NY:W. H. Freeman and Company**, 1995, 346 p.

MESSAGE, D; GUIDUGLI-LAZZARINI, K. R; FREITAS, N. H; SIMÕES, Z. L. P; DE JONG, D; SILVA, I. C; TEIXEIRA, É. W. Colapso de colônias de abelhas africanizadas *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae) no Brasil. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**, vol. 9, no. 3, p. 59-59, 2011.

MIELCZAREK, A; MIELCZAREK, L; WOJCIECHOWICZ-ŻYTKO, E. The influence of heavy metals on the shape and asymmetry of wings of female *Polistes nimpha* (Hymenoptera, Vespidae) living on contaminated sites. **Ecotoxicology**, vol. 30, p. 1854–1861, 2021.

MITTEROECKER, P. Morphometrics in Evolutionary Developmental Biology. **Nuno de la Rosa L., Müller G. (eds) Evolutionary Developmental Biology, Springer Nature Switzerland**, 2020. 11 p.

MONTAGNA, T. D. S. **Aspectos da biologia social da vespa Neotropical *Mischocyttarus consimilis* Zikán, 1949 (Hymenoptera, Vespidae)**. 2009. Tese (Mestrado em entomologia e conservação da biodiversidade), Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, 2009.

MONTENEGRO, F. S. **Associação entre células progenitoras endoteliais, reestenose coronariana e eventos cardiovasculares após angioplastia coronariana percutânea**. 2016. Tese (mestrado em ciências cardiovasculares), Instituto Nacional de Cardiologia, Rio de Janeiro, RJ, 2016.

MOQUIN, A; NEIBERT, K. D; MAYSINGER, D; WINNIK, F. M. Quantum dot agglomerates in biological media and their characterization by asymmetrical flow field-flow fractionation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, vol. 89, p. 290-299, 2015.

MORALES, A; HARTFELDER, K; MEDINA-PERALTA, S; QUEZADA-EUÁN, J. J. G. Larval food provisions affect developmental time, body size and vitellogenin titers of *Scaptotrigona pectoralis* gynes (Hymenoptera: Meliponini). **Insectes Sociaux**, vol. 68, no. 1, p. 93-100, 2021.

OLIVEIRA, S. A. D; LOPES, J. F. S; PREZOTO, F. Dominance hierarchy in different stages of development in colonies of the neotropical eusocial paper wasp *Polistes versicolor* (Hymenoptera, Vespidae). **Sociobiology**, vol. 48, p. 515-526, 2006.

PERUQUETTI, R. C; LAMA, M. A. D. Alocação sexual e seleção sexo- dependente para tamanho de corpo em *Trypoxylon rogenhoferi* Kohl (Hymenoptera, Sphecidae). **Revista brasileira de entomologia**, vol. 47, p. 581-588, 2003.

PIERRE, P. M. O. **Poliploidia em acesso de *Lippia alba* (Mill) NE.Br (Verbenacea)**. 2008. Tese (doutorado em genética e melhoramento), Universidade Federal de Lavras. Lavras, MG, 2008.

PIETROBON, T. A. O. **Glândula ectomandibular e comportamento de *Polistes versicolor* (Olivier) (Hymenoptera, Vespidae)**. 2005. Tese (doutorado em ciências biológicas), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, 2005.

PIRES, C. S. S; PEREIRA, F. M; LOPES, M. T. R; NOCELLI R. C. F; MALASPINA O; PETTIS, J. S; TEIXEIRA, É. W. Enfraquecimento e perda de colônias de abelhas no Brasil: há casos de CCD? **Pesquisa agropecuária brasileira**, vol. 51, no.5, p. 422-442, 2016.

PRESTES, A. C; CUNHA, H. F. D. Interações entre cupins (Isoptera) e formigas (Hymenoptera) co-habitantes em cupinzeiros epígeos. **Revista de Biotecnologia e Ciência**, vol. 1, no. 1, p. 50-60, 2012.

PRETORIUS, E. Using geometric morphometrics to investigate wing dimorphism in males and females of Hymenoptera — a case study based on the genus *Tachysphex* Kohl (Hymenoptera: Sphecidae: Larrinae). **Australian Journal of Entomology**, vol. 44, no. 2, p. 113-121, 2005.

PREZOTO, F; SANTOS-PREZOTO, H. H; MACHADO, V. L. L; ZANUNCIO, J.C. Prey captured and used in *Polistes versicolor* (Olivier) (Hymenoptera: Vespidae) Nourishment. **Neotropical Entomology**, vol. 35, no. 5, p. 707-709, 2006.

RICHARDS, O. W. The social wasps of the Americas, excluding the Vespinae. **London: British Museum (Natural History), London. U.K**, 1978. 580 p.

RODRIGUES, D. D. A. **Evolução do comportamento social: dinâmica evolutiva dos animais eussociais**. 2020. Tese (mestrado em ciências), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2020.

SHINE, R. The evolution of large body size in females: a critique of Darwin's "fecundity advantage model." **American Naturalist**, vol. 131, p. 124–131, 1988.

SHINE, R. Ecological causes for the evolution of sexual dimorphism: a review of the evidence. **Quarterly Review of Biology**, vol. 64, p. 419–461, 1989.

SILVA, A. P. A. **Descrição citogenética de 13 morfoespécies de *Solenopsis Westwood, 1840* (Hymenoptera: Formicidae)**. 2016. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2016.

SOARES, F. A. F. **Determination of the AT GC base composition by flow cytometry in bees**. 2012. Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2012.

SOMAVILLA, A; OLIVEIRA, M. L. D; SILVEIRA, O. T. Guia de identificação dos ninhos de vespas sociais (Hymenoptera, Vespidae, Polistinae) na Reserva Ducke, Manaus, Amazonas, Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**, vol. 56, p. 405-414, 2012.

SOMAVILLA, A. **Evidência total das espécies de *Polistes Latreille, 1802* donovo mundo (Vespidae:Polistinae): uma abordagem filogenética**. 2016. Tese (doutorado em entomologia), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM, 2016.

SOUZA, A. A. D; PEDRAZZANI, F. S. Importância do painel de screening de imunofenotipagem por citometria de fluxo para o diagnóstico de leucemias agudas. **Revista Inova Saúde**, vo. 9, no. 1, p. 155-175, 2019.

SOUZA, A. R. D; PREZOTO, F. Regulation of worker activity in the social wasp *Polistes versicolor*. **Insectes Sociaux**, vol. 59, p. 193–199, 2012.

SOUZA, A. R. D. **After all, what do wasps want? : the choice of sexual partner in the paper wasps *Polistes***. 2015. (Tese doutorado em entomologia), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2015.

TANNURE, I. C; NASCIMENTO, F. S. Influência do conflito de dominância entre fundadoras em colônias de vespas sociais pertencentes ao gênero *Polistes* (Hymenoptera: Vespidae). **Revista Brasileira de Zoociências**, vol. 1, p. 31-40, 1999.

TATSUTA, H; TAKAHASHI, K. H; SAKAMAKI, Y. Geometric morphometrics in entomology: Basics and applications. **Entomological Science**, vol. 21, no. 2, p. 164–184, 2017.

TAVARES, M. G; CARVALHO, C. R; SOARES, F. A. F; CAMPOS, L. A. D. O. Genome size diversity in stingless bees (Hymenoptera: Apidae, Meliponini). **Apidologie**, vol. 43, p. 731–736, 2012.

TORRES-MORENO, R; VÍCTOR, J; MOYA-RAYGOZA, G. Morphological variation of the parasitic wasp *Paracentrobia subflava* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) emerged from different leafhopper species. **Zoologischer Anzeiger**, vol. 294, p. 20-27, 2021.

TORRES, V. D. O; ANTONIALLI-JUNIOR, W. F; GIANNOTTI, E. Divisão de trabalho em colônias da vespa social neotropical *Polistes canadensis canadensis* Linnaeus (Hymenoptera, Vespidae). **Revista Brasileira de entomologia**, vol. 53, no. 4, p. 593–599, 2009.

VIRGÍNIO, F; MACIEL, T. T; BARBOSA; B. C. Hábitos de Nidificação de *Polistes canadensis* (Linnaeus) (Hymenoptera: Vespidae) em Área Urbana. **EntomoBrasilis**, vol. 9, p. 81-83, 2016.

WENZEL, J. W. A generic key to the nests of hornets, yellowjackets, and paper wasps worldwide (Vespidae: Vespinae, Polistinae). **American Museum Novitates**, no. 3224, p. 1–39, 1998.

WEST-EBERHARD, M. J. The social biology of the Polistinae wasps. **Miscellaneous Publications of the Museum of Zoology**, no. 140, p. 1-101, 1969.

WILSON, E. O. The insect societies. **Cambridge, MA: Belknap, Harvard University Press**, 1971. 562 p.

WLODKOWIC, D; SKOMMER, J; DARZYNKIEWICZ, Z. Rapid quantification of cell viability and apoptosis in B-cell lymphoma cultures using cyanine SYTO probes. **Mammalian Cell Viability. Humana Press, New York, NY**, 2011. 240 p.

ZARA, F. J; BALESTIERI, J. B. P. Behavioural catalogue of *Polistes versicolor* Olivier (Vespidae: Polistinae) post-emergence colonies. **Naturalia**, vol. 25, p. 301-319, 2000.

CAPÍTULO 1: DIMORFISMO SEXUAL NO TAMANHO E FORMATO DE ASAS DE *Polistes versicolor* (HYMENOPTERA – VESPIDAE)

Larissa Fajardo Silveira, André Rodrigues de Souza, Nicole Estefania Ibagón Escobar e Karla Yotoko

RESUMO

As características que diferenciam machos e fêmeas foram classificadas por Darwin como primárias, secundárias e ecológicas, sendo as primárias relativas aos órgãos reprodutores, as secundárias expressas na morfologia externa e as ecológicas referentes a hábitos de vida. Nos Hymenoptera, as diferenças começam no fato de machos serem monoploides e as fêmeas diploides. Há também diferenciação morfológica e comportamental entre os sexos. Neste trabalho, utilizamos ferramentas de morfometria geométrica para avaliar as diferenças de forma e tamanho das asas anteriores e posteriores entre machos e fêmeas de *Polistes versicolor* (Olivier, 1791) na tentativa de associar os padrões encontrados à ploidia e às especificidades comportamentais de cada sexo. Nossos resultados sugerem que as fêmeas são em média maiores que os machos, mas que essa diferença não pode ser diretamente creditada à haplodiploidia, uma vez que as maiores asas de machos da amostra são tão grandes quanto as maiores fêmeas. Por outro lado, a menor variância encontrada nas asas das fêmeas sugere a ação de seleção estabilizadora, que limita a variação de forma nas asas das fêmeas, que realizam a maior parte das tarefas dentro do ninho, o que impactaria negativamente o valor adaptativo da colônia.

Palavras-chave: Morfometria geométrica. Haplodiploidia. Diferenças comportamentais.

2.1 Introdução

Com o desenvolvimento da maturidade sexual, os organismos sofrem profundas mudanças morfológicas e fisiológicas (HARTNOLL, 1985). Darwin (1871) classificou as características que diferenciam machos e fêmeas em primárias, secundárias e ecológicas. As primárias incluem as diferenças nos órgãos reprodutores, as secundárias são as diferenças expressas na morfologia externa do indivíduo e as ecológicas se referem a diferentes hábitos de vida.

Nos Hymenoptera, as diferenças começam na produção de embriões, onde machos nascem de óvulos não fecundados e são, portanto, monoploides, enquanto as fêmeas são diploides. De acordo com Short e Balaban (1994), isso permite que as fêmeas tenham controle da razão sexual, algo não disponível para a grande maioria dos animais. Esses mesmos autores relataram desde diferenças extremas de morfologia entre os sexos até machos e fêmeas morfologicamente indistinguíveis. Eles reforçaram ainda que machos e fêmeas vivem vidas muito diferentes, já que as fêmeas acumulam uma série de tarefas, que vão da construção à manutenção de ninhos, provimento e alimentação de larvas, enquanto os machos se limitam a inseminar as fêmeas.

Dentre as ferramentas utilizadas para investigar diferenças entre machos e fêmeas está a morfometria geométrica (CAMARGO *et al.*, 2015), que consiste no estudo estatístico das variações de forma e tamanho entre organismos (MONTEIRO; REIS, 1999). É possível estudar a morfometria de qualquer estrutura anatômica, mas, entre os insetos, a morfometria das asas é considerada simples e eficaz por se limitar ao estudo de duas dimensões, o que minimiza os erros de digitalização dos marcos anatômicos (DUJARDIN, 2008).

Vespas da espécie *Polistes versicolor* são amplamente distribuídas pela América do Sul (GOBBI; ZUCCHI, 1980), constroem seus ninhos utilizando material vegetal (WEST-EBERHARD, 1969), sendo também bem adaptadas a áreas urbanas (OLIVEIRA; CASTRO; PREZOTO, 2010). Nesta espécie, fêmeas reprodutoras e operárias não são claramente distinguíveis entre si (COWAN, 1991) e a dominância hierárquica é mantida por meio da agressividade (TANNURE; NASCIMENTO, 1999).

A maioria dos estudos envolvendo espécimes de *P. versicolor* versam sobre a ecologia e o comportamento desses animais. Pietrobon (2005) elaborou etogramas a partir da observação de ninhos pós-emergência que evidenciam uma grande

diferença no número e no tipo de comportamento exibido por machos e fêmeas. Como em várias outras espécies de Hymenoptera, as fêmeas são as responsáveis pela manutenção da colônia, alimentação das larvas e dos indivíduos reprodutores (fêmeas poedeiras e machos). Já os machos permanecem no ninho materno por um período que variou entre um e cinco dias e se limitaram a comportamentos como autolimpeza, interação com outros membros para obter trofolaxia (transferência de alimento de fêmeas forrageadoras e larvas para os machos), cópula com as companheiras de ninho e curtos vôos de reconhecimento da área onde se encontra o ninho. Beani e Zaccaroni (2014), argumentaram que machos de Hymenoptera também apresentam comportamentos complexos, que são normalmente negligenciados dada a impressionante complexidade do comportamento das fêmeas. Especificamente, machos de *P. dominula* (Christ, 1791) precisam detectar fêmeas disponíveis, fazer a corte (que às vezes se faz em grupos) e copular. Há registros de machos engajados na defesa dos ninhos, que Pietrobon (2005) relatou como um bater de asas que gera um zumbido capaz de alertar outros indivíduos de ataques ao ninho de *P. versicolor*.

Diferenças no padrão morfométrico das asas se relacionam à capacidade de dispersão e reprodução. Nas fêmeas, o formato das asas pode estar associado à habilidade de voar longas distâncias, enquanto nos machos o formato aerodinâmico das asas auxilia na maior aptidão para alcançar a fêmea e acasalar (SOUZA *et al.*, 2018). Partindo do princípio de que diferentes ploidias, bem como diferentes comportamentos e pressões seletivas moldam o tamanho e o formato das asas, esse estudo avaliou, utilizando ferramentas de morfometria geométrica, o tamanho e o formato das asas de machos e fêmeas adultos de *P. versicolor* para verificar se é possível associar os padrões encontrados à haplodiploidia da espécie e às especificidades comportamentais de cada sexo.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Coleta

Foram coletados 110 indivíduos de uma população *Polistes versicolor*, provenientes de 13 ninhos do campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP) em 2019. Os espécimes foram mantidos em álcool absoluto e sob refrigeração (-20 °C) no Laboratório de Bioinformática e Evolução da Universidade Federal de Viçosa (UFV), MG.

2.2.2 Obtenção das imagens

As imagens de pelo menos uma asa anterior e uma posterior de cada espécime foram obtidas com o celular Samsung Galaxy A01 modelo — SM-A015M/DS, utilizando a função “temporizador” para evitar movimentos bruscos que poderiam comprometer a qualidade das imagens. As asas foram dispostas entre duas lâminas histológicas juntamente com uma escala de 5,0 mm, necessária para aferir o tamanho de cada asa. Todas as imagens foram obtidas paralelamente às lâminas, com distância focal e zoom fixos para evitar interferências de posição e ampliação no formato das asas.

Cada imagem foi identificada pelas letras PV (de *P. versicolor*) seguida por um número, único para cada espécime, letras M ou F, para demarcar o sexo de cada um e A ou P, indicando asa posterior ou anterior. As imagens foram convertidas para o formato “.tps” no programa TpsUtil versão 1.78 e exportadas para o programa TpsDig versão 2.31, com o qual digitalizamos a escala e os marcos anatômicos que basearam o estudo da forma e tamanho das asas, realizado com o auxílio do software MorphoJ versão 1.07.

A Figura 2 mostra uma asa anterior (A) e uma posterior (B) com os marcos anatômicos homólogos identificados e digitalizados em toda a amostra. Foram considerados marcos anatômicos os pontos de encontro entre pelo menos duas nervuras que estavam presentes em todos os indivíduos da amostra (seguindo as orientações de BOOKSTEIN, 1991). No total, foram delimitados 13 marcos anatômicos nas asas anteriores e sete nas asas posteriores. Indivíduos que estavam com as asas danificadas foram excluídos das análises (Tabela S1 - Suplementar), de modo que avaliamos 109 asas anteriores e 105 asas posteriores dos 110 indivíduos amostrados.



Figura 2: Asa anterior (A) e posterior (B) de *Polistes versicolor* contendo respectivamente 13 e 7 pontos anatômicos digitalizados no programa tpsDig, versão 2.31.

2.2.3 Avaliação de erros procedimentais

A análise morfométrica se baseia na marcação de pontos anatômicos homólogos para a comparação de forma e tamanho entre espécimes. É necessário que a marcação seja a mais precisa possível, de modo que as diferenças entre as asas de dois indivíduos sejam significativamente maiores que as diferenças de marcação feitas em duas ocasiões na asa de um indivíduo, conhecida como erros de digitalização. Esse tipo de erro pode ocorrer por problemas na resolução das imagens ou por precisão dos equipamentos utilizados. Para testar o erro de digitalização dos marcos anatômicos, fizemos duas cópias de cada imagem e os marcos anatômicos foram digitalizados duas vezes, independentemente, para aferir o erro na marcação (VISCOSI; CARDINI, 2011). O programa MorphoJ foi utilizado para particionar as variâncias de forma (multivariada) e tamanho (univariado) entre imagens obtidas de um mesmo indivíduo e imagens obtidas a partir de indivíduos diferentes.

2.2.4 Determinação de forma e tamanho

A determinação do tamanho de uma estrutura pode ser feita a partir da determinação do tamanho do centroide de cada asa. A medida do tamanho do tamanho do centroide, deve ser calculada pela raiz quadrada da soma dos quadrados das distâncias de cada marco anatômico ao centroide da imagem (BOOKSTEIN, 1991).

Para avaliar a forma, é preciso fazer com que todas as estruturas homólogas tenham o mesmo tamanho, ou seja, a raiz quadrada soma dos quadrados das distâncias de cada marco anatômico ao centroide da imagem deve ser a mesma para todas as estruturas (SOUZA, 2016). Esse procedimento elimina o efeito do tamanho na medida das diferenças de forma.

Além de uniformizar o tamanho, todas as estruturas devem ser posicionadas no mesmo sentido e orientação, de modo a minimizar a distância entre os diferentes marcos anatômicos das imagens (minimiza as distâncias do marco 1 de todas as imagens ao mesmo tempo que minimiza as distâncias dos marcos 2, 3, ..., n; sendo n o número de marcos anatômicos em estudo). Uma vez feitas essas modificações iniciais, o restante das diferenças é computado como diferenças de forma entre as estruturas. A partir da sobreposição das imagens, é calculada uma forma média, que corresponde à imagem formada pelos pontos médios de cada um dos marcos anatômicos. A forma de cada indivíduo é então comparada com a forma média para gerar uma matriz de covariância e avaliada por uma Análise de Componentes Principais (PCA).

Para aferir as diferenças de tamanho entre os sexos, fizemos uma análise de variância do tamanho do centroide dos espécimes em estudo, que foi precedida por um teste de normalidade (Shapiro-Wilk).

2.2.5 Subconjunto de dados

A amostra em estudo é composta por 110 indivíduos, dos quais 86 são machos e apenas 24 são fêmeas. Diante disso, fizemos o sorteio de uma subamostra de 30 machos (Tabela S1 — suplementar) que foi comparada com todas as fêmeas com os mesmos métodos utilizados no conjunto total de dados para comparar a significância e retirar o efeito da superamostragem de machos em relação às fêmeas.

2.3 Resultados

2.3.1 Avaliação de Erros

A Anova multivariada comparando a variância gerada pelas diferenças entre os indivíduos e as diferenças devidas a erros de digitalização dos pontos (ver métodos) revelou que os erros de digitalização não foram significativos tanto na variação de forma quanto de tamanho (Tabela 1).

Tabela 1: Variância (dada pela soma de quadrados, SS e média da soma de quadrados MS) da forma e tamanho dos indivíduos (I) e do erro de digitalização (E) das asas anterior (A) e posterior (P) de *Polistes versicolor*. df se refere ao número de graus de liberdade, e p ao p-valor, que foi significativo para a variação individual e não significativo (NS) para o erro de digitalização, em todas as medidas.

	Asa	Efeito	%SS	SS	MS	df	F	p
Forma	A	I	94,33	0,147612	6,21E-05	2376	16,78	<.0001
		E	5,67	0,008877	3,70E-06	2398		NS
	P	I	95,66	0,122506	0,000118	1040	22,26	<.0001
		E	4,34	0,005556	5,29E-06	1050		NS
Tamanho	A	I	99,74	78,59121	0,7277	108	394,7	<.0001
		E	0,26	0,200938	0,00184	109		NS
	P	I	99,7	27,83664	0,26766	104	340,9	<.0001
		E	0,3	0,082453	0,00079	105		NS

2.3.2 Diferenças de tamanho

Antes de testar se *P. versicolor* apresenta dimorfismo sexual de tamanho, fizemos o teste de normalidade e vimos que a distribuição de tamanhos das asas anteriores (A) e posteriores (P) é normal tanto para machos (p -valor_(A) = 0,2345; p -valor_(P) = 0,3315) quanto para fêmeas (p -valor_(A) = 0,1096; p -valor_(P) = 0,4328) permitindo o teste de ANOVA, que revelou diferenças significativas de tamanho entre machos e fêmeas tanto nas asas anteriores ($F_{(1,107)} = 12,54$, $p = 0,00059$) quanto posteriores ($F_{(1,103)} = 12,175$, $p = 0,00071$). Em ambos os testes, os resíduos também apresentaram distribuição normal para asas anteriores e posteriores respectivamente $p = 0,1045$ e $p = 0,1156$. A Figura S1 (material suplementar) mostra que tanto asas anteriores como as posteriores são maiores nas fêmeas que nos machos, tanto quando consideramos o conjunto total de dados quanto quando consideramos apenas a subamostra de 30 machos.

As Figuras 3 e 4 mostram a distribuição de tamanhos da asa anterior e posterior para o conjunto total de machos e fêmeas amostrados, respectivamente em azul e vermelho, onde foi possível constatar que a variância no sexo masculino é muito grande, de modo que há machos com tamanho igual às maiores fêmeas da amostra. Esses machos de tamanho maior provinham de ninhos que foram coletados apenas indivíduos do sexo masculino (notadamente o ninho 1 e o ninho 7) e os machos de tamanho menor são oriundos de ninhos dos quais foram coletados fêmeas e machos (notadamente os ninhos 2 e 4).

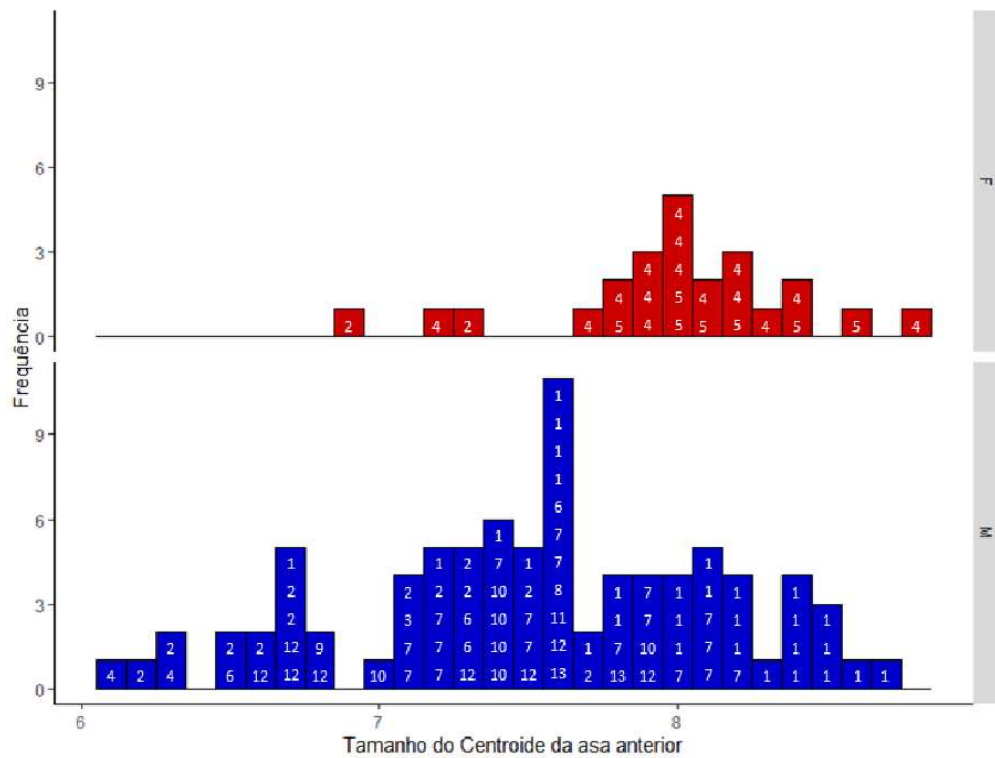


Figura 3: Distribuição de tamanho da asa anterior de fêmeas (F) e machos (M) de *Polistes versicolor*. Os números dentro das barras correspondem ao ninho de origem de cada indivíduo.

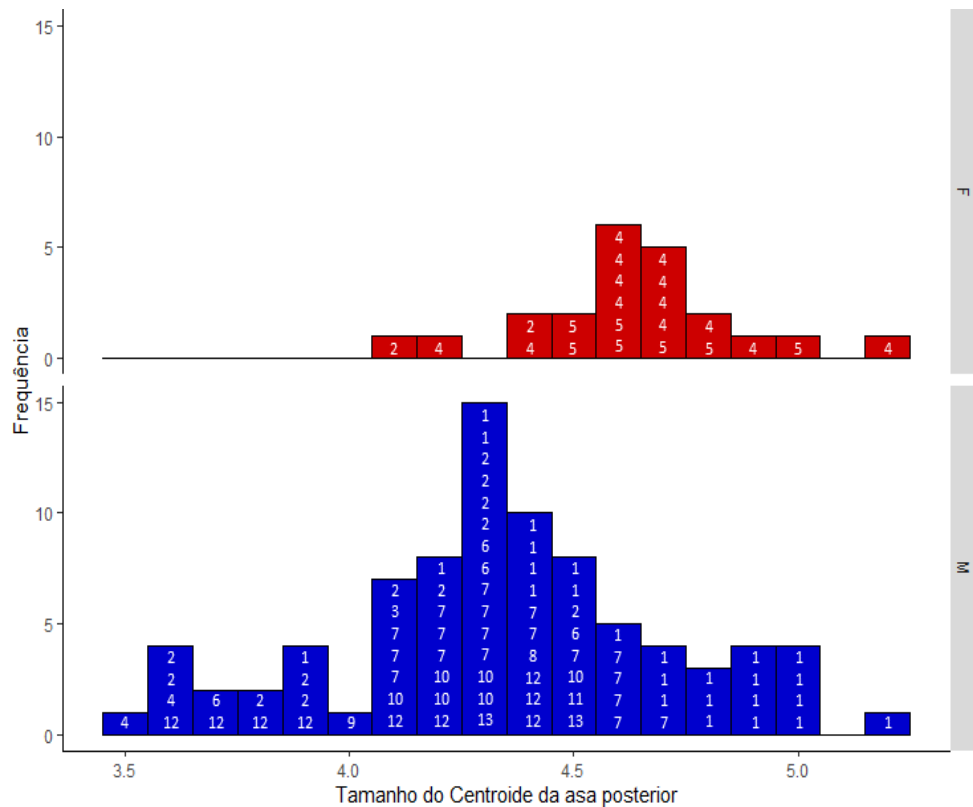


Figura 4: Distribuição de tamanho da asa posterior de fêmeas (F) e machos (M) de *Polistes versicolor*. Os números dentro das barras correspondem ao ninho de origem de cada indivíduo.

2.3.3 Diferenças de forma

A Análise dos Componentes Principais revelou que os três primeiros componentes respondem por 53,22% da variação de forma das asas anteriores (PC1=23,53%; PC2=18,46%; PC3=11,23%) e 76,28% da variação de forma das asas posteriores (PC1=32,00%; PC2=30,24%; PC3=14,04%) no conjunto total de indivíduos amostrados. Para o subconjunto de dados feito com 30 machos e 24 fêmeas, a Análise dos Componentes Principais revelou que os três primeiros componentes respondem por 59,82% (PC1=30,06%, PC2=17,46%, PC3=12,30%) da variação de forma das asas anteriores e 81,19% (PC1=34,32%, PC2=31,20%, PC3=15,67%) da variação nas asas posteriores. A Figura 5 mostra a plotagem dos dois componentes principais das asas anteriores e posteriores de machos e fêmeas de *P. versicolor* utilizando o conjunto completo de indivíduos (Fig. 5A e 5C), e apenas o subconjunto de dados (Fig. 5B e 5D).

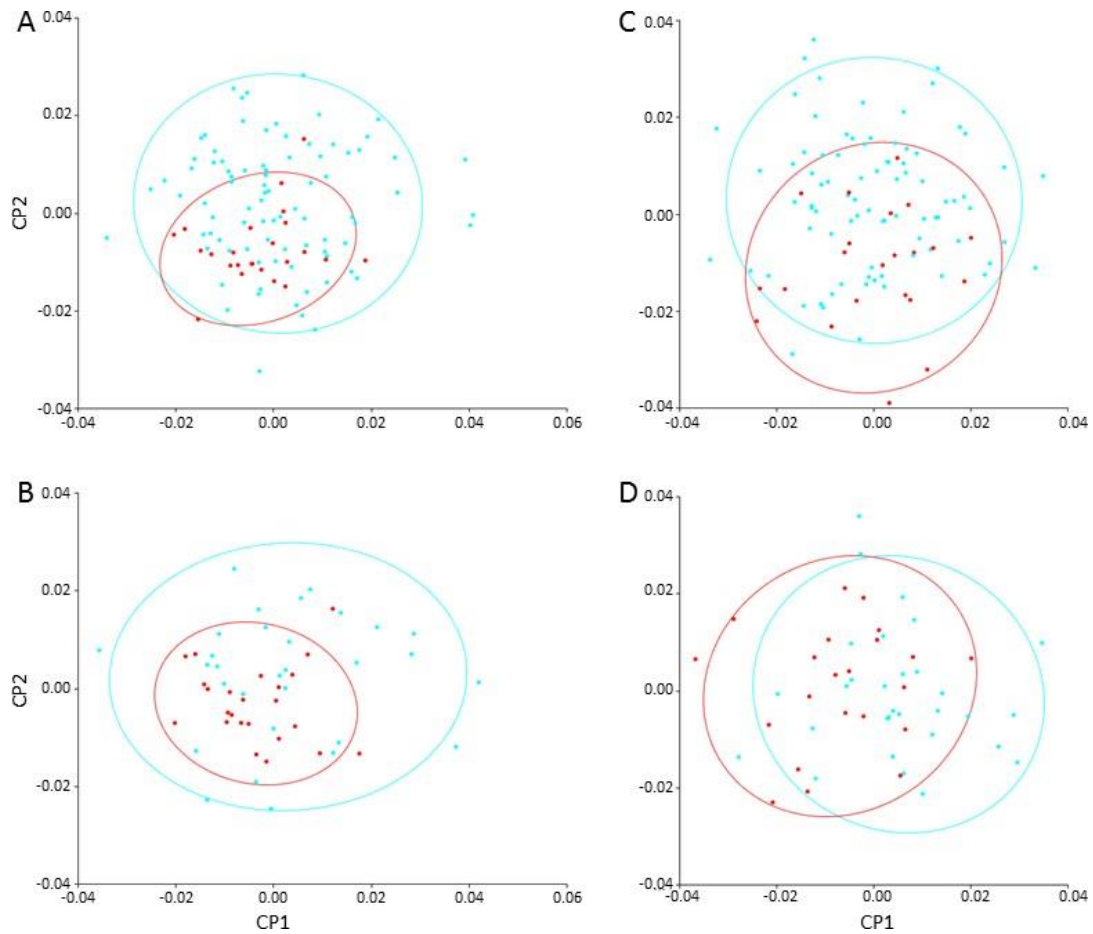


Figura 5: Plot das formas das asas anteriores (A,B) e posteriores (C,D) nos componentes principais (CP) 1 e 2 dos machos (pontos em azul) e fêmeas (pontos em vermelho) de *Polistes versicolor*. Em A e C foram considerados todos os indivíduos da amostra e em B e D o conjunto de machos foi reduzido a apenas 30, para reduzir o impacto das diferenças no tamanho amostral de machos e fêmeas.

2.4 Discussão

A população estudada de *Polistes versicolor* apresentou diferenças significativas no tamanho das asas entre machos e fêmeas, sendo que as fêmeas apresentam uma média maior de tamanho que os machos. Considerando que o tamanho da asa é uma aproximação apropriada para o tamanho corporal, *P. versicolor* apresenta o padrão observado para a ordem Hymenoptera (SHORT; BALABAN, 1994).

O dimorfismo sexual no tamanho que favorece as fêmeas é geralmente

interpretado como resultante de seleção a favor da fecundidade e quando machos são maiores que fêmeas esse padrão é interpretado como resultado de seleção sexual (STILLWELL *et al.*, 2010). Pardi (1948) mostrou que a hierarquia nos ninhos de espécies *Polistes*, que indica qual fêmea será a dominante, é definida pelo tamanho e desenvolvimento dos ovários, revelando que a fecundidade das fêmeas está sob seleção mais forte que a seleção sexual nos machos.

Na maioria dos animais e plantas, existe uma correlação consistente entre o conteúdo de DNA de uma célula e suas atividades metabólicas, o que impõe uma pressão seletiva nos machos de Hymenoptera, que precisam se adaptar ao fato de receberem apenas metade do conteúdo de DNA destinado às fêmeas da mesma espécie (NAGL, 1978 *apud* ARON *et al.*, 2005, p. 824). Aron *et al.*, (2005) relataram que os machos da maioria das famílias de Hymenoptera (exceto *Xyeloidea*, grupo irmão dos outros Hymenoptera) apresentam duplicação do DNA nos tecidos musculares, o que os autores atribuíram à necessidade de se igualar às fêmeas (diploides) em atividade metabólica e eficiência muscular. É possível também que a duplicação do DNA nessas células favoreça o crescimento dos machos, a ponto de potencialmente apresentarem o mesmo tamanho que as fêmeas. Em nossos resultados, observamos que, apesar do tamanho dos machos ser em média menor, a variância é muito grande, de modo que há machos com tamanho igual às maiores fêmeas da amostra (Figuras 3 e 4).

Curiosamente, quando identificamos os ninhos dos quais machos e fêmeas foram coletados, notamos que machos oriundos de ninhos dos quais foram coletados apenas indivíduos machos (ninhos 1 e 7) apresentaram um tamanho maior de asas que os machos oriundos de ninhos dos quais foram coletados fêmeas e machos (ninhos 2 e 4). Helms (1994), estudando a relação entre o grau de dimorfismo de tamanho sexual e investimento em espécies de vespas e abelhas, mostrou que apesar dessa relação não ser direta ainda é visto um maior investimento no sexo feminino. Além disso, há registros de que em *P. versicolor*, alguns ninhos se especializam na produção de fêmeas e outros na produção de machos (MAULE-RODRIGUES, 1968, *apud* SOUZA *et al.*, 2017). Juntas, essas observações apontam para a hipótese de que ninhos que produzem machos e fêmeas investem menos na alimentação das larvas que darão origem a machos que ninhos que produzem apenas machos, explicando a variação de tamanho dos

machos.

Ainda com relação aos resultados de tamanho, uma vez que a hierarquia no ninho de espécies de *Polistes* é definida pela maior agressividade (PARDI, 1948), esperávamos encontrar grande variância de tamanho das fêmeas. De fato, Gobbi, Noll e Penna (2006) sugeriram que fêmeas maiores tenderiam a ser as fêmeas dominantes em um ninho de *P. versicolor*, também coletado na região de Ribeirão Preto, SP. A menor variação de tamanho encontrada para as fêmeas que para os machos pode portanto pode ser resultado do pequeno número de fêmeas coletadas ou indicar que nossa amostra consiste apenas de fêmeas operárias.

Na avaliação de forma, a PCA revelou que as asas anteriores das fêmeas apresentou menor variância que as dos machos, o que não aconteceu com as asas posteriores (Figura 5). Nos Hymenoptera, as asas posteriores são menores e apresentam um padrão de inervação mais simples que as asas anteriores (LIMA, 1960). Considerando que fêmeas de *P. versicolor* apresentam numerosos comportamentos relacionados à capacidade de vôo, como a predação e a habilidade em trazer presas, pólen e água para o ninho; enquanto os machos limitam seus vôos à atividade reprodutiva, é possível inferir modificações formato das asas anteriores das fêmeas têm mais impacto na sobrevivência do ninho que o dos machos. Com isso, o formato das asas anteriores das fêmeas, diferente das dos machos, estariam sob seleção estabilizadora.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARON, S; MENTEN, L, D; BOCKSTAELE, D. R. V; BLANK, S. M; ROISIN, Y. When Hymenopteran Males Reinvented Diploidy. **Current Biology**, vol. 15, no. 9, p. 824–827, 2005.
- BEANI, L; ZACCARONI, M. Experimental male size manipulation in *Polistes dominula* paper wasps: being the right size. **Ethology Ecology e Evolution**, vol. 27, no. 2, p.185-199, 2014.
- BOOKSTEIN, F. L. Morphometric tools for landmark data: geometry and biology. **Cambridge University Press**, 1991. 435 p.
- CAMARGO, W. R. D; CAMARGO, N. F. D; CORREA, D. D. C. V; CAMARGO, A. J. A. D; DINIZ, I. R. Sexual dimorphism and allometric effects associated with the wing shape of seven moth species of Sphingidae Lepidoptera: Bombycoidea. **Journal of Insect Science**, vol. 15, no. 1, p. 1-9, 2015.
- COWAN, D. P. The solitary and presocial Vespidae. In: Ross. K. G.; Matthews, R. W. (edit.) The social biology of wasps. **Comstock Publishing Associates**, 1991. 678 p.
- DARWIN, C. R. The descent of man, and selection in relation to sex. (Ed. J. Murray, London, reprinted 1981). **Princeton University Press, New Jersey**, 1871. 477 p.
- DUJARDIN, J. P. Morphometrics applied to medical entomology. **Infection, Genetics and Evolution**, vol. 8, no. 6, p. 875–890, 2008.
- GOBBI, N; ZUCCHI, R. On the ecology of *Polistes versicolor* (Olivier) in southern Brazil (Hymenoptera, Vespidae, Polistini). **I Phenological Account. Naturalia**, vol. 5, p. 97-104, 1980.
- GOBBI, N; NOLL, F. B; PENNA, M. A. H. “Winter” aggregations, colony cycle, and seasonal phenotypic change in the paper wasp *Polistes versicolor* in subtropical Brazil. **Naturwissenschaften**, vol 93, p. 487- 494, 2006.
- HARTNOLL, R. G. Growth, sexual maturity and reproductive output. **Factors in Adult Growth. A.A. Balkema, Rotterdam**, 1985. 28 p.
- HELMS, K. R. Sexual Size Dimorphism and Sex Ratios in Bees and Wasps. **The American Naturalist**, vol. 143, no. 3, p. 418-434, 1994.
- LIMA, A. D. C. Insetos do Brasil. Escola nacional de agronomia. **Série didática**, 1960. 393 p.
- MONTEIRO, L. R; REIS, S. F. D. Princípios de morfometria geométrica. **Holos editora**, 1999. 189 p.
- OLIVEIRA, S. A. D; CASTRO, M. M. D; PREZOTO, F. Foundation pattern, productivity and colony success of the paper wasp, *Polistes versicolor*. **Journal of Insect Science**, vol. 10, p. 1–10, 2010.

PARDI, L. Dominance order in *Polistes* wasps. **Physiological Zoölogy**, vol.21, no. 1, p. 1-13, 1948.

PIETROBON, T. A. O. **Glândula ectomandibular e comportamento de *Polistes versicolor* (Olivier) (Hymenoptera, Vespidae)**. 2005. Tese (doutorado em ciências biológicas), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, 2005.

SOUZA, A. R. D; BARBOSA, B. C; SILVA, R. C. D; PREZOTO, F; LINO-NETO, J; NASCIMENTO, F. S. D. No Evidence of Intersexual Kin Recognition by Males of the Neotropical Paper Wasp *Polistes versicolor*. **Journal of Insect Behavior**, vol. 30, no. 2, p. 180–187, 2017.

SOUZA, A. V; NUNES, L. A; MACHADO, C. S; SODRÉ, G. D. S; CARVALHO, C. A. L. D. Sexual dimorphism and morphometric characterization of *Centris tarsata* Smith, 1874, Hymenoptera: Apidae in different environments. **Acta Agronômica**, vol. 67, no. 3, p. 438-445, 2018.

SOUZA, V. B. D. **Variação do crânio e da mandíbula em *Callitrix Erxleben, 1777* (Platyrrhini, Callitrichidae): resultados de uma abordagem através de morfometria geométrica**. 2016. Tese (mestrado em biologia animal), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2016.

STEARNS, S. C; KAWECKI, T. J. Fitness Sensitivity and the Canalization of Life-History Traits. **Evolution**, vol. 48, no. 5, p. 1438–1450, 1994.

STEARNS, S. C; KAISER, M; KAWECKI, T. J. The differential genetic and environmental canalization of fitness components. **Journal of evolutionary biology**, vol. 8, p. 539–557, 1995.

STILLWELL, R. C; BLANCKENHORN, W. U; TEDER, T; DAVIDOWITZ, G; FOX, C. W. Sex differences in phenotypic plasticity affect variation in sexual size dimorphism in insects: from physiology to evolution. **Annu Review of Entomology**, vol. 55, p. 227-245, 2010.

SHORT, R. V; BALABAN, E. The differences between the sexes. **Cambridge University Press**. 1994. 479 p.

TANNURE, I. C; NASCIMENTO, F. S. Influência do conflito de dominância entre fundadoras em colônias de vespas sociais pertencentes ao gênero *Polistes* (Hymenoptera: Vespidae). **Revista Brasileira de Zociências**, vol. 1, p. 31-40, 1999.

VISCOSI, V; CARDINI A. Leaf morphology, taxonomy and geometric morphometrics: a simplified protocol for beginners. **Plos One**, vol. 6, p. 1-20, 2011.

WEST-EBERHARD, M. J. The social biology of the Polistinae wasps. **Miscellaneous Publications of the Museum of Zoology**, no. 140, 1- 101, 1969.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1: Lista dos espécimes utilizados nas análises morfométricas desse estudo indicando o “Ninho” de onde cada espécime foi coletado, a “Localização” geográfica do ninho, o “Sexo” de cada espécime e “Data” de coleta. Espécimes cujas asas anteriores ou posteriores foram aproveitadas nas análises apresentam um X nas colunas “A” e “P”, respectivamente. Os 30 machos sorteados para o estudo da sub-amostra também apresentam um X na coluna “30 ♂”.

ID	Ninho	Coordenadas	Sexo	Data	A	P	30 ♂
Pv1	N1	-21.16230481931092, -47.86423556810371	♂	26/02/19	x	x	x
Pv2	N1	-21.16230481931092, -47.86423556810371	♂	26/02/19	x	x	
Pv3	N1	-21.16230481931092, -47.86423556810371	♂	26/02/19	x	x	
Pv4	N1	-21.16230481931092, -47.86423556810371	♂	26/02/19	x	x	
Pv5	N1	-21.16230481931092, -47.86423556810371	♂	26/02/19	x	x	x
Pv6	N1	-21.16230481931092, -47.86423556810371	♂	26/02/19	x	x	
Pv7	N1	-21.16230481931092, -47.86423556810371	♂	26/02/19	x	x	x
Pv8	N1	-21.16230481931092, -47.86423556810371	♂	26/02/19	x	x	x
Pv9	N1	-21.16230481931092, -47.86423556810371	♂	26/02/19	x	x	x
Pv10	N1	-21.16230481931092, -47.86423556810371	♂	26/02/19	x	x	
Pv11	N1	-21.16230481931092, -47.86423556810371	♂	26/02/19	x	x	
Pv12	N1	-21.16230481931092, -47.86423556810371	♂	26/02/19	x		
Pv13	N1	-21.16230481931092, -47.86423556810371	♂	26/02/19	x	x	x
Pv14	N1	-21.16230481931092, -47.86423556810371	♂	26/02/19	x	x	
Pv15	N1	-21.16230481931092, -47.86423556810371	♂	26/02/19	x	x	
Pv16	N1	-21.16230481931092, -47.86423556810371	♂	26/02/19	x	x	x
Pv17	N1	-21.16230481931092, -47.86423556810371	♂	26/02/19	x		
Pv18	N1	-21.16230481931092, -47.86423556810371	♂	26/02/19	x	x	
Pv19	N1	-21.16230481931092, -47.86423556810371	♂	26/02/19	x	x	x
Pv20	N1	-21.16230481931092, -47.86423556810371	♂	26/02/19	x	x	
Pv21	N1	-21.16230481931092, -47.86423556810371	♂	26/02/19	x	x	

Pv22	N1	-21.16230481931092,	-47.86423556810371	♂	26/02/19	x	x	x
Pv23	N1	-21.16230481931092,	-47.86423556810371	♂	26/02/19	x	x	
Pv24	N1	-21.16230481931092,	-47.86423556810371	♂	26/02/19	x	x	
Pv25	N1	-21.16230481931092,	-47.86423556810371	♂	26/02/19	x	x	
Pv26	N1	-21.16230481931092,	-47.86423556810371	♂	26/02/19	x	x	
Pv27	N1	-21.16230481931092,	-47.86423556810371	♂	26/02/19	x	x	x
Pv28	N1	-21.16230481931092,	-47.86423556810371	♂	26/02/19	x	x	x
Pv29	N1	-21.16230481931092,	-47.86423556810371	♂	26/02/19	x	x	
Pv30	N2	-21.16230481931092,	-47.86423556810371	♂	26/02/19	x	x	x
Pv31	N2	-21.16230481931092,	-47.86423556810371	♂	26/02/19	x	x	
Pv32	N2	-21.16230481931092,	-47.86423556810371	♂	26/02/19	x	x	
Pv33	N2	-21.16230481931092,	-47.86423556810371	♂	26/02/19	x	x	
Pv34	N2	-21.16230481931092,	-47.86423556810371	♂	26/02/19	x	x	x
Pv35	N2	-21.16230481931092,	-47.86423556810371	♂	26/02/19	x	x	
Pv36	N2	-21.16230481931092,	-47.86423556810371	♂	26/02/19	x	x	
Pv37	N2	-21.16230481931092,	-47.86423556810371	♂	26/02/19	x	x	x
Pv38	N2	-21.16230481931092,	-47.86423556810371	♂	26/02/19	x	x	
Pv39	N2	-21.16230481931092,	-47.86423556810371	♂	26/02/19	x	x	x
Pv40	N2	-21.16230481931092,	-47.86423556810371	♂	26/02/19	x	x	x
Pv41	N2	-21.16230481931092,	-47.86423556810371	♂	26/02/19	x	x	
Pv42	N2	-21.16230481931092,	-47.86423556810371	♂	26/02/19	x	x	
Pv43	N2	-21.16230481931092,	-47.86423556810371	♂	26/02/19	x	x	
Pv44	N3	-21.16370579753724,	-47.85906556024271	♂	27/02/19	x	x	
Pv45	N4	-21.16536031976876,	-47.86045926024265	♂	27/02/19	x	x	x
Pv46	N4	-21.16536031976876,	-47.86045926024265	♂	27/02/19	x	x	
Pv47	N4	-21.16536031976876,	-47.86045926024265	♀	27/02/19	x	x	
Pv48	N4	-21.16536031976876,	-47.86045926024265	♀	27/02/19	x	x	
Pv49	N4	-21.16536031976876,	-47.86045926024265	♀	27/02/19	x	x	
Pv50	N4	-21.16536031976876,	-47.86045926024265	♀	27/02/19	x	x	
Pv51	N4	-21.16536031976876,	-47.86045926024265	♀	27/02/19	x	x	
Pv52	N4	-21.16536031976876,	-47.86045926024265	♀	27/02/19	x	x	
Pv53	N4	-21.16536031976876,	-47.86045926024265	♀	27/02/19	x	x	
Pv54	N4	-21.16536031976876,	-47.86045926024265	♀	27/02/19	x		
Pv55	N4	-21.16536031976876,	-47.86045926024265	♀	27/02/19	x	x	
Pv56	N4	-21.16536031976876,	-47.86045926024265	♀	27/02/19	x	x	

Pv57	N4	-21.16536031976876,	-47.86045926024265	♀	27/02/19	x	x	
Pv58	N4	-21.16536031976876,	-47.86045926024265	♀	27/02/19	x		
Pv59	N4	-21.16536031976876,	-47.86045926024265	♀	27/02/19	x	x	
Pv60	N4	-21.16536031976876,	-47.86045926024265	♀	27/02/19	x	x	
Pv61	N4	-21.16536031976876,	-47.86045926024265	♀	27/02/19	x	x	
Pv62	N5	-21.16230481931092,	-47.86423556810371	♀	27/02/19	x	x	
Pv63	N5	-21.16230481931092,	-47.86423556810371	♀	27/02/19	x	x	
Pv64	N5	-21.16230481931092,	-47.86423556810371	♀	27/02/19	x	x	
Pv65	N5	-21.16230481931092,	-47.86423556810371	♀	27/02/19	x	x	
Pv66	N5	-21.16230481931092,	-47.86423556810371	♀	27/02/19	x	x	
Pv67	N5	-21.16230481931092,	-47.86423556810371	♀	27/02/19	x	x	
Pv68	N5	-21.16230481931092,	-47.86423556810371	♀	27/02/19	x	x	
Pv69	N6	-21.16950796135277,	-47.85966086651627	♂	02/04/19	x	x	
Pv70	N6	-21.16950796135277,	-47.85966086651627	♂	02/04/19	x	x	
Pv71	N6	-21.16950796135277,	-47.85966086651627	♂	02/04/19	x	x	
Pv72	N7	-21.16950796135277,	-47.85966086651627	♂	02/04/19	x	x	x
Pv73	N7	-21.16950796135277,	-47.85966086651627	♂	02/04/19	x	x	x
Pv74	N7	-21.16950796135277,	-47.85966086651627	♂	02/04/19	x	x	
Pv75	N7	-21.16950796135277,	-47.85966086651627	♂	02/04/19	x	x	
Pv76	N7	-21.16950796135277,	-47.85966086651627	♂	02/04/19	x	x	
Pv77	N7	-21.16950796135277,	-47.85966086651627	♂	02/04/19	x	x	x
Pv78	N7	-21.16950796135277,	-47.85966086651627	♂	02/04/19	x	x	
Pv79	N7	-21.16950796135277,	-47.85966086651627	♂	02/04/19	x	x	
Pv80	N7	-21.16950796135277,	-47.85966086651627	♂	02/04/19	x	x	
Pv81	N7	-21.16950796135277,	-47.85966086651627	♂	02/04/19	x	x	
Pv82	N7	-21.16950796135277,	-47.85966086651627	♂	02/04/19	x	x	
Pv83	N7	-21.16950796135277,	-47.85966086651627	♂	02/04/19	x	x	
Pv84	N7	-21.16950796135277,	-47.85966086651627	♂	02/04/19	x	x	
PV85	N7	-21.16950796135277,	-47.85966086651627	♂	02/04/19	x	x	x
Pv86	N7	-21.16950796135277,	-47.85966086651627	♂	02/04/19	x	x	
Pv87	N7	-21.16950796135277,	-47.85966086651627	♂	02/04/19	x	x	
Pv88	N7	-21.16950796135277,	-47.85966086651627	♂	02/04/19	x	x	x
Pv89	N7	-21.16950796135277,	-47.85966086651627	♂	02/04/19	x	x	
Pv90	N8	-21.16950796135277,	-47.85966086651627	♂	02/04/19	x	x	x
Pv91	N9	-21.16950796135277,	-47.85966086651627	♂	02/04/19	x	x	

Pv92	N10	-21.162791484581767, -47.86052064225074	♂	02/04/19	x	x	
Pv93	N10	-21.162791484581767, -47.86052064225074	♂	02/04/19	x	x	
Pv94	N6	-21.16950796135277, -47.85966086651627	♂	06/05/19	x	x	x
Pv95	N10	-21.162791484581767, -47.86052064225074	♂	06/05/19	x	x	
Pv96	N10	-21.162791484581767, -47.86052064225074	♂	06/05/19	x	x	
Pv97	N10	-21.162791484581767, -47.86052064225074	♂	06/05/19	x	x	
Pv98	N10	-21.162791484581767, -47.86052064225074	♂	13/05/19	x	x	
Pv99	N11	-21.162791484581767, -47.86052064225074	♂	06/05/19	x	x	x
Pv100	N12	-21.16171969947098, -47.857904231406785	♂	06/05/19	x	x	
Pv101	N12	-21.16171969947098, -47.857904231406785	♂	06/05/19	x	x	
Pv102	N12	-21.16171969947098, -47.857904231406785	♂	06/05/19	x	x	
Pv103	N12	-21.16171969947098, -47.857904231406785	♂	13/05/19	x	x	x
Pv104	N12	-21.16171969947098, -47.857904231406785	♂	13/05/19	x		
Pv105	N12	-21.16171969947098, -47.857904231406785	♂	13/05/19	x	x	x
Pv106	N12	-21.16171969947098, -47.857904231406785	♂	13/05/19	x	x	x
Pv107	N12	-21.16171969947098, -47.857904231406785	♂	13/05/19	x	x	x
Pv108	N12	-21.16171969947098, -47.857904231406785	♂	13/05/19		x	
Pv109	N13	-21.16370579753724, -47.85906556024271	♂	29/05/19	x	x	
Pv110	N13	-21.16370579753724, -47.85906556024271	♂	29/05/19	x	x	x

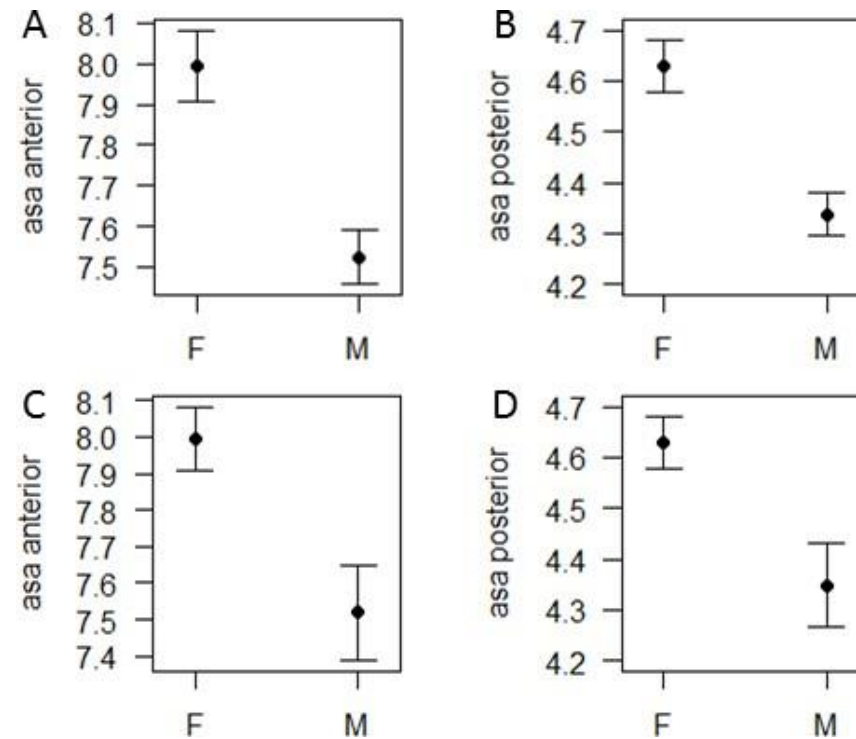


Figura S1: Média \pm erro padrão do tamanho do centroide das asas anteriores (A,C) e posteriores (B,D) de machos (M) e fêmeas (F) de *Polistes versicolor* considerando todas as amostras coletadas (A,B) ou apenas o subconjunto de 30 machos e todas as 24 fêmeas (C,D). Note que a barra de erro é maior em C e D devido ao menor tamanho amostral dos machos. A distribuição dos tamanhos das asas do subconjunto de 30 machos é normal tanto na asa anterior (AA) quanto na posterior (AP) ($p_{AA} = 0,09508$; $p_{AP} = 0,2726$).

CAPÍTULO 2 – PLOIDIA E CONTEÚDO DE DNA NUCLEAR EM *Polistes versicolor* (HYMENOPTERA – VESPIDAE)

Larissa Fajardo Silveira, André Rodrigues de Souza, Fernanda Aparecida Ferrari, Wellington Clarindo e Karla Yotoko

RESUMO

Os Hymenoptera, grupo que agrega abelhas, vespas e formigas, têm o sexo determinado por um sistema haplodiploide mediado por um locus sexual, *sl-CSD*, no qual indivíduos heterozigotos são fêmeas, enquanto homo ou hemizigotos são machos. Nesse sentido, colônias de insetos sociais podem ser mais ameaçadas pela redução das populações, que além dos efeitos gerais da endogamia, podem gerar machos diploides, que são em geral estéreis ou podem gerar fêmeas estéreis. Estudos anteriores revelaram que machos de *P. versicolor* podem acasalar dentro do ninho em que emergiram e que não há discriminação entre indivíduos aparentados ou não para a cópula, o que pode dar origem machos diploides, apesar de não haver evidências deles em estudos genéticos. Com o intuito de quantificar a prevalência de machos diploides em uma população de *P. versicolor* (Olivier, 1791) coletada anteriormente para estudos moleculares com os indivíduos fixados em álcool e mantidos sob refrigeração, submetemos o conteúdo interno da cabeça de 98 amostras fixadas (74 machos e 24 fêmeas) à citometria de fluxo para verificar se o método gera resultados relevantes para nossa pergunta. Utilizamos ainda 27 amostras frescas (3 machos e 24 fêmeas) para comparar a qualidade dos resultados e concluímos que, em ambos os casos, foi possível detectar numerosas células poliploides na cabeça tanto de machos quanto de fêmeas. Em nossa amostra, encontramos evidências de apenas dois machos diploides, ambos coletados em ninhos dos quais foram obtidos tanto machos quanto fêmeas. A aferição da quantidade de DNA em *P. versicolor* revelou que a espécie tem o maior genoma entre as espécies já medidas do gênero.

Palavras-chave: Macho diploide. Poliploidia. Tamanho de genoma. Citometria de fluxo.

3.1 Introdução

Os Hymenopteras são organismos haplodiploides (compostos de machos monoploides e fêmeas diploides). Entretanto a presença de machos diploides podem ocorrer um vez que o sexo é determinado por um locus sexual, o *sl-CSD* (WHITING, 1943) que gera fêmeas heterozigotas (diploides), machos hemizigotos (monoploides) ou machos homozigotos (diploides), sendo este último bastante provável em populações com tamanho efetivo reduzido que podem ocorrer acasalamentos endogâmicos entre indivíduos aparentados.

Machos diploides são em geral estéreis e a formação dos mesmos pode comprometer a sobrevivência da população a que pertencem (AYABE; HOSHIBA; ONO, 2004) por reduzir a produção de fêmeas, tanto operárias quanto reprodutoras, fundamentais para o cuidado do ninho e a manutenção das populações (HEIN; POETHKE; DORN, 2009). Apesar de serem considerados raros em vespas sociais (LIEBERT; SUMANA; STARKS, 2005), já foi relatada a produção de machos diploides em *Polistes dominula* (Christ, 1791) e *Polistes chinensis antennalis* Perkins, 1905 (LIEBERT; SUMANA; STARKS, 2005; TSUCHIDA; NAGATA; KOJIMA, 2002).

Vespas do gênero *Polistes* (Hymenoptera) se agregam em colônias fundadas por uma ou mais fêmeas cuja hierarquia é mantida pela agressividade da (s) fêmea (s) dominante (s) (TANNURE; NASCIMENTO, 1999). Em *Polistes versicolor*, uma espécie neotropical do gênero, os ninhos são fundados por uma associação de fêmeas (OLIVEIRA; CASTRO; PREZOTO, 2010). Em um estudo envolvendo eletroforese de isozimas, Nagamati-Júnior *et al.*, (2010) encontraram que a maioria dos ninhos de *P. versicolor* apresenta mais variabilidade genética que a esperada em ninhos eusociais monogínicos (com apenas uma fêmea reprodutora), que muitos ninhos apresentam mais de uma fêmea poedeira e não encontraram evidências de machos diploides.

Ainda que mais de uma fêmea produza prole em um ninho de *P. versicolor*, indivíduos oriundos de um mesmo ninho apresentam mais chances de ser aparentados que indivíduos oriundos de ninhos diferentes, e que, portanto, o reconhecimento químico ou visual entre os indivíduos de um mesmo ninho é adaptativo no sentido de evitar acasalamentos endogâmicos (BARACCHI *et al.*, 45

2015; BARACCHI; TURILLAZZI; CHITTKA, 2016). No entanto, Souza *et al.*, (2017) não encontraram qualquer evidência de que indivíduos oriundos do mesmo ninho se reconheçam e que evitem acasalar, de modo que a produção de machos diploides pode ser mais comum do que se acredita, uma vez que há registros de cópula entre indivíduos de um mesmo ninho (PIETROBOM, 2005).

No presente estudo, utilizamos a técnica de citometria de fluxo para analisar uma população de machos e fêmeas adultos de *P. versicolor* de uma amostra de 13 ninhos coletados na fase de pós emergência, acondicionados em álcool absoluto e mantidos em baixa temperatura, suficiente para a manutenção da integridade do DNA das amostras. Um dos nossos objetivos foi testar um protocolo em espécimes acondicionados em álcool. Para isso, comparamos os histogramas obtidos a partir da suspensão nuclear do material fixado com a suspensão nuclear obtida de um material fresco recém coletado. Dada a possibilidade de acasalamentos endogâmicos levantada por Souza *et al.*, (2017), nosso segundo objetivo foi avaliar a ploidia dos indivíduos e verificar a existência de machos diploides em *P. versicolor*. Como terceiro objetivo, visamos quantificar o conteúdo de DNA em *P. versicolor* e compará-lo com o descrito na literatura para outras espécies do gênero.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Coleta

Foram utilizados noventa e oito (98) espécimes de *Polistes versicolor* (74 machos e 24 fêmeas) daqueles coletados no capítulo 1 no ano de 2019, provenientes de 13 ninhos do campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP). Essas amostras estavam armazenadas individualmente em álcool absoluto e acondicionados em tubos de congelamento a -20 °C no Laboratório de Bioinformática e Evolução da Universidade Federal de Viçosa e foram tratados no trabalho como espécimes fixados. Além desses, foram coletadas outras 17 fêmeas na mesma localidade e mais 7 fêmeas e três machos na sede da Universidade Federal de Viçosa, MG no ano de 2020. Estes espécimes foram tratados como espécimes frescos.

3.2.2 Citometria de fluxo

Os espécimes fixados tiveram as cabeças retiradas e reidratadas em água destilada por 10 min para a retirada completa do álcool. Os espécimes frescos (vivos) foram adormecidos por congelamento e tiveram suas cabeças retiradas. Os gânglios cefálicos dos indivíduos de ambas amostras (tecido fixado e fresco) foram dissecados e seguidos os mesmos protocolos.

Foram adicionados 100 µl de solução de Lise OTTO I (OTTO, 1990), contendo ácido cítrico 0,2 M (Merk), 0,5% Tween 20 (Merck) e 50 µg/ml de RNAase (Sigma-Aldrich), pH 2,3 para maceração com pistilo (15 giros por amostra). O tampão OTTO I foi escolhido em função da alta resolução que confere aos histogramas, que devem apresentar coeficiente de variação, calculado pela razão do desvio padrão sobre a média (DOLEŽEL, 1991), inferior a 5% (GALBRAITH *et al.*, 2002).

Após esse procedimento, as amostras foram filtradas em filtro de nylon de 30 µm (Partec), lavadas duas vezes com 0,5 ml de OTTO I e centrifugadas a 1100 RPM por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuscitado em 100 µl de OTTO I. A solução foi acrescida de 500 µl de tampão de coloração OTTO II (LOUREIRO *et al.*, 2006), contendo Iodeto de Propídeo (PI), 75 M e 50 µg/µl de RNAase, pH 7,8, sendo mantida no escuro por 15 min. e posteriormente filtrada em filtro de nylon de 20 µm (Partec).

As medidas foram feitas com um Citômetro de Fluxo (BD Accuri C6, Bélgica) equipado com uma fonte de laser que detecta emissões em FL3 (> 670 nm). O laser detecta os núcleos celulares e gera um resultado que consiste na contagem de núcleos com uma determinada intensidade de fluorescência. Esta contagem gera histogramas de densidade, de modo que o eixo X mostra a intensidade de fluorescência e o eixo Y mostra o número de núcleos que apresentaram aquela intensidade. Os histogramas foram avaliados com o software BD CSampler™, onde inicialmente utilizou-se como padrão fêmeas de *Scaptotrigona xanthotricha* cujo conteúdo de DNA é 1C = 0,44 pg (LOPES *et al.*, 2009) e posteriormente com fêmeas de *Drosophila melanogaster*, cujo conteúdo de DNA 1C = 0,18 pg (RASCH; BARR; RASCH, 1971). Parte das amostras foi avaliada sem padrão, para obter apenas a ploidia de cada indivíduo.

Todos procedimentos de citometria de fluxo foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Citogenética e Citometria da Universidade Federal de Viçosa, coordenado pelo Professor Wellington Clarindo.

3.3 Resultados

Dos 98 espécimes fixados de *Polistes versicolor* que tiveram os núcleos dos gânglios cerebrais utilizados, apenas 28, 20 machos e oito fêmeas, puderam ser avaliados. Dentre os motivos que acarretaram a perda dessas amostras está a qualidade dos histogramas gerada pelo material fixado e o fato de que o histograma do padrão *Scaptotrigona xanthotricha* se sobrepôs ao da amostra, não permitindo a visualização dos picos. O padrão foi então trocado após o início das aferições. A avaliação da ploidia mostrou que os núcleos celulares dessas amostras contêm células poliploides. A Tabela 2 mostra o resultado, em termos de número de núcleos detectados em cada pico de ploidia das amostras fixadas. Dessas, todas as oito fêmeas apresentaram tanto núcleos 2C quanto 4C, e uma delas (PV 52) apresentou também núcleos 8C. Entre os machos, três apresentaram apenas núcleos 1C (PV34, PV81 e PV106), um apresentou núcleos 1C e 2C (PV102), 12 apresentaram picos 1C, 2C e 4C. Dois machos apresentaram núcleos 1C e 4C (PV82 e PV83), e dois outros núcleos 2C e 4C (PV30 e PV46), constatando a presença de machos diploides. A Figura S2 do material suplementar, exibe alguns dos histogramas obtidos com espécimes fixados.

Tabela 2: Contagem de núcleos contendo os picos 1C, 2C, 4C e 8C de amostras de machos (M) e fêmeas (F) de indivíduos de *Polistes versicolor* fixados em álcool absoluto. (*0,5 % < CV < 0,6 %; **CV= 7,32 %). Em negrito machos diploides.

Indivíduo	Ninho	Sexo	1C	2C	4C	8C
30	2	M		74	72	68*
32	2	M	211	100*	106*	
33	2	M	170	102	106	
34	2	M	167			
36	2	M	221	127	95*	
37	2	M	104	69*	63*	
40	2	M	172	86	107*	
42	2	F		158	160	
43	2	F		231	154*	
44	3	M	182	83	63	
46	4	M		101	153*	
50	4	F		115	102	
52	4	F		53	54*	29*
54	4	F		144*	126	
59	4	F		93*	71	
67	5	F		183	152*	
68	5	F		109	74	
72	7	M	148*	69	142	
81	7	M	122			
82	7	M	153*		53*	
83	7	M	57		33*	
85	7	M	115	59	101	
90	8	M	131	46	32*	
91	9	M	77	36	84*	
95	10	M	58	53	58*	
96	10	M	57	48	46*	
102	12	M	147**	46*		
106	12	M	103			

A Tabela 3 mostra o resultado, em termos de número de núcleos detectados em cada pico de ploidia das amostras frescas. Nesta avaliação todos os 27 espécimes analisados (24 fêmeas e três machos) apresentaram núcleos 8C o que confirmou a presença de células com múltiplas ploidias no gânglio cefálico de *P. versicolor*. A Figura S3 do material suplementar, apresenta alguns dos histogramas obtidos com espécimes frescos.

Tabela 3: Contagem de núcleos contendo os picos 1C, 2C, 4C e 8C de amostras de machos (M) e fêmeas (F) de amostras frescas de *Polistes versicolor*. (*0,5 % < CV < 0,6%).

Indivíduo	Ninho	Sexo	1C	2C	4C	8C	16C
111	14	F		981	99	29	
112	14	F		494	648	77	
113	14	F		1885	134	53	
114	14	F		8714	1076	257	
115	14	F		3721	643	122	
116	15	F		7058	729	111	
117	15	F		6373	598	180	
118	16	F		5388	381	41	
119	16	F		8225	950*	202	
120	17	F		2299	237	53	
121	18	F		12303	1236	529	287
122	19	F		4729	261	83	
123	20	F		3061	256	53	
124	21	F		5115	798	199	
125	21	F		3569	583	155	
126	21	F		4889	302	57	
127	23	F		2489	206	51	
128	24	F		3855	1109	362	
129	24	F		6319	1478	276	573
130	24	F		7224*	1022	438	
131	24	F		1150*	315	109	
132	24	F		6416	1147*	446	
133	24	F		8258	1103*	333	
134	24	F		870*	333*	93*	
135	24	M	311	112	247	41	
136	24	M	7647	232	906*	251	427
137	24	M	4684	485	1348	278	

A Tabela 4 mostra o tamanho do genoma estimado em indivíduos frescos coletados em Ribeirão Preto e em Viçosa, no ano de 2020.

Tabela 4: Tamanho médio do genoma (1C) estimado de N espécimes de *Polistes versicolor* (material fresco) coletado na Universidade de São Paulo – USP (*campus* de Ribeirão Preto) e na Universidade Federal de Viçosa – MG (*campus* de Viçosa).

Amostras/localidade	N	1C (pg)	Desvio padrão
Machos/Viçosa	3	0,62	0,02
Fêmeas/Viçosa	7	0,67	0,048
Fêmeas/Ribeirão Preto	13	0,64	0,031

O conteúdo de DNA de *P. versicolor* foi comparado ao de outras espécies de *Polistes*. Até então, o conteúdo 1C de DNA no gênero variava de 0,24 pg em *Polistes metricus* Say, 1831 a 0,55 pg em *Polistes exclamans* Viereck, 1906 (Tabela 5), de modo que o conteúdo inferido nesse estudo para *P. versicolor* apresenta o maior valor entre as espécies de *Polistes*.

Tabela 5: Tamanhos do genoma em diferentes espécies do gênero *Polistes* avaliados a partir de métodos diferentes de quantificação: Citometria de fluxo (1) e Análise de Densitometria de Imagem de Feulgen (2). N é o número de indivíduos avaliados em cada trabalho.

Espécie	1C (pg)	Met.	N
<i>P. carolina</i> ¹	0,38	1	7
<i>P. dominula</i> ²	0,29	1	6
<i>P. dominula</i> ³	0,31	1	4
<i>P. dorsalis</i> ²	0,48	2	7
<i>P. exclamans</i> ¹	0,55	1	3
<i>P. fuscatus</i> ²	0,31	2	2
<i>P. fuscatus</i> ²	0,41	1	4
<i>P. metricus</i> ²	0,24	2	4
<i>P. versicolor</i> ⁴	0,65	1	23

1-Hanrahan e Johnston, 2011; 2 - Ardila-Garcia; Umphrey; Gregory, 2010; 3 - Johnston *et al.*, 2004; 4 – este estudo.

3.4 Discussão

Um dos objetivos desse trabalho foi metodológico: testar se é possível utilizar espécimes fixados em álcool para a aferição do tamanho dos genomas e/ou ploidia em *P. versicolor*. Nesse sentido, podemos sugerir que na impossibilidade de fazer novas coletas, é possível utilizar a citometria de fluxo em espécimes armazenados em álcool, mas que os dados são limitados no sentido da qualidade dos histogramas gerados, pelo menos com o protocolo utilizado nesse trabalho. A utilização de amostras fixadas para citometria de fluxo também já foram realizadas por Cunha *et al.*, (2021) que obtiveram resultados satisfatórios na avaliação do tamanho de genoma nuclear em espécies de abelhas Meliponini.

Os resultados das amostras fixadas sugeriram um padrão inesperado, que foi confirmado com as amostras frescas: uma grande quantidade de núcleos com múltiplas ploidias tanto em amostras de machos quanto de fêmeas. O uso de amostras fixadas, ainda que com resultados limitados, pode, portanto, ser útil em laboratórios que tenham amostras em álcool coletadas para outros fins, como por exemplo a extração de DNA para trabalhos de taxonomia molecular, filogenia e filogeografia.

Núcleos com múltiplas ploidias são produzidos por endomitose, quando a célula inicia a divisão celular que é abortada na anáfase (LORDIER *et al.*, 2008), ou por endoreplicação, quando ocorrem apenas as fases S e G1 do ciclo celular (FOX; DURONIO, 2013). Em sua revisão sobre ploidia, Edgar e Weaver (2001) salientaram que o tamanho da célula é proporcional à sua ploidia, já Nagl, 1978, *apud* Johnston *et al.*, 2004, p. 584, ressaltaram que o aumento do conteúdo de DNA nas células é atribuído à necessidade de aumentar o tamanho das células e a produção de mRNA em células especializadas. Aron *et al.*, (2005) em um estudo envolvendo diferentes tecidos de machos de *Bombus terrestris* (Linnaeus, 1758), mostraram que as células retiradas do tórax, dos músculos das mandíbulas, dos músculos das asas e das pernas posteriores de machos apresentam pico 2C idêntico ao das fêmeas e não apresentam o pico 1C esperado nos machos. Eles atribuíram a diploidização das células musculares dos machos a uma adaptação no sentido de serem maiores e mais fortes do que seriam com células monoploides.

Aron *et al.* (2005) também mostraram que a diploidização de alguns tecidos é comum entre os Hymenoptera e está presente em todas as famílias testadas exceto

em Xyelidae, o grupo irmão de todos os outros Hymenoptera, de modo que supuseram que a habilidade de diploidizar células musculares surgiu logo no início da evolução do grupo. Mais tarde, Scholes, Suarez, Paige, (2013) mostraram que os machos de formigas apresentam índices mais altos de endoreplicação que as fêmeas, provavelmente para compensar sua origem haploide.

Lee, Davidson, Duronio, (2009) argumentaram que diferentes tipos celulares adotam a endoreplicação como parte da finalização da diferenciação de células especializadas. Estes autores argumentaram ainda que perturbações na endoreplicação de determinadas células frequentemente causam mal funcionamento de órgãos. Em nosso trabalho com *P. versicolor*, foi possível constatar que tanto machos quanto fêmeas apresentam uma alta frequência de células 4C e 8C.

Nandakumar, Grushko, Buttitta, (2020) observaram que células poliploides se acumulam no cérebro de indivíduos adultos de *D. melanogaster* (de três linhagens distintas) à medida que os adultos envelhecem, mais especificamente, do sétimo ao vigésimo primeiro dia após a emergência dos adultos. As autoras atribuíram o acúmulo de células poliploides a um mecanismo adaptativo que auxilia na defesa contra danos no DNA que podem acarretar a morte celular.

A segunda questão abordada nesse trabalho foi verificar a existência machos diploides em *P. versicolor*. Apesar de praticamente todas as amostras terem apresentado picos de múltiplas ploidias, apresentar picos 1C nas células provenientes da cabeça parece ser uma característica diagnóstica dos machos de *P. versicolor*. Aron *et al.* (2005), mostraram que apesar de apresentarem núcleos 2C nos tecidos musculares, machos de *Bombus* apresentam núcleos 1C nas células provenientes da cabeça. No entanto, em dois espécimes, PV30 e PV46, encontramos apenas núcleos 2C e 4C, compatíveis aos encontrados em fêmeas, evidenciando a presença de machos diploides.

No capítulo 1 dessa dissertação, mostramos que a variância de tamanho das asas entre os machos dessa população de *P. versicolor* é muito maior que das fêmeas. Mostramos também que os machos que provinham de ninhos que foram coletados apenas indivíduos do sexo masculino tinham asas de tamanho equivalente às maiores fêmeas, enquanto machos coletados de ninhos de onde pudemos coletar tanto machos quanto fêmeas apresentaram os menores tamanhos de asas. Curiosamente, os únicos machos diploides detectados em nossa amostra provêm

dos ninhos 2 e 4, ninhos dos quais coletamos tanto machos quanto fêmeas e que também produziram os menores machos.

A produção de machos diploides em *Polistes versicolor* é um evento raro que parece ser evitado pelo fato de ocorrer a produção preferencialmente de machos ou fêmeas na estação reprodutiva dentro dos ninhos (MAULERODRIGUES, 1968, *apud* SOUZA *et al.*, 2017, p. 185) o que reduz os efeitos da endogamia. Entretanto, em ninhos de *Polistes*, algumas das fêmeas subordinadas podem deixar o ninho materno para começar seu próprio ninho. Devido à filopatria característica de *Polistes*, essa fundação tende a ser próxima do ninho original, e esses ninhos são chamados ninhos satélites (STRASSMANN, 1981), o que pode favorecer o cruzamento entre indivíduos aparentados.

Nossa terceira questão diz respeito à aferição do tamanho do genoma de *P. versicolor*, que apresentou como média 0,65 pg, o maior valor encontrado até então no gênero *Polistes*. Chamou a atenção o fato de que poucos indivíduos foram utilizados para a aferição do genoma em outras espécies. Nos artigos onde esses genomas foram publicados (ARDILA-GARCIA; UMPHREY; GREGORY, 2010; JOHNSTON *et al.*, 2004 e HANRAHAN; JOHNSTON, 2011), não foi mencionada a existência de núcleos poliploides nessas outras espécies, embora todos os trabalhos tenham se baseado no tecido neural ou da cabeça dos espécimes avaliados. Johnston *et al.* (2004), estudaram a endoreplicação em parasitoides de *P. dominula*, mas não relataram a endoreplicação no tecido neural da espécie, o que indica que não observaram picos poliploides como os encontrados nesse trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARDILA-GARCIA, A. M; UMPHREY, G. J; GREGORY, T. R. An expansion of the genome size dataset for the insect order Hymenoptera, with a first test of parasitism and eusociality as possible constraints. **Insect Molecular Biology**, vol. 19, p. 337-346, 2010.
- ARON, S; MENTEN, L. D; BOCKSTAELE, D. R. V; BLANK, S. M; ROISIN, Y. When Hymenopteran Males Reinvented Diploidy. **Current Biology**, vol. 15, no.9, p. 824–827, 2005.
- AYABE, T; HOSHIBA, H; ONO, M. Cytological evidence for triploid males and females in the bumblebee, *Bombus terrestris*. **Chromosome Research**, vol. 12, p. 215–223, 2004.
- BARACCHI, D; PETROCELLI, I; CHITTKA, L; RICCIARDI, G; TURILLAZZI, S. Speed and accuracy in nest-mate recognition: a hover wasp prioritizes face recognition over colony odour cues to minimize intrusion by outsiders. **Proceedings of the royal society B**, vol. 282, p. 1-7, 2015.
- BARACCHI, D; TURILLAZZI, S; CHITTKA, L. Facial patterns in a tropical social wasp correlate with colony membership. **The Science of Nature**, vol. 103, p. 1-6, 2016.
- CUNHA, M. S; SOARES, F. A. F; CLARINDO, W. R; CAMPOS, L. A. O; LOPES, D. M. Robertsonian rearrangements in Neotropical Meliponini karyotype evolution (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). **Insect Molecular Biology**, vol. 30, no. 4, p. 379–389, 2021.
- DOLEŽEL, J. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. **Phytochemical Analysis**, vol. 2, no. 4, p. 143–154, 1991.
- EDGAR, B. A; ORR-WEAVER, T. L. Endoreplication Cell Cycles: More for Less. **Cell**, vol. 105, p. 297–306, 2001.
- FOX, D. T; DURONIO, R. J. Endoreplication and polyploidy: insights into development and disease. **Development**, vol. 140, no. 1, p. 3–12, 2013.
- GALBRAITH, D; LAMBERT, G; MACAS, J; DOLEŽEL, J. Analysis of nuclear DNA content and ploidy in higher plants. **Current Protocols in cytometry**, Eds Robinson, J., Azmi, A. e Tutois, S. **John Wiley & Sons, Inc.**, vol. 2, no. 1, p.761-7622, 2002.
- HANRAHAN, S. J; JOHNSTON, J. S. New genome size estimates of 134 species of arthropods. **Chromosome Research**, vol. 19, p. 809–823, 2011.
- HEIN, S; POETHKE, H. J; DORN, S. What stops the ‘diploid male vortex’? a simulation study for species with single locus complementary sex determination. **Ecological Modelling**, vol. 220, p. 1663 — 1669, 2009.

JOHNSTON, J. S; ROSS, L. D; BEANIT, L; HUGHES, D. P; KATHIRITHAMBY, J. Tiny genomes and endoreduplication in Strepsiptera. **Insect Molecular Biology**, vol. 13, no. 6, p. 581–585, 2004.

LEE, H. O; DAVIDSON, J. M; DURONIO, R. J. Endoreplication: polyploidy with purpose. **Genes e Development**, vol. 23, no. 21, p. 2461–2477, 2009.

LIEBERT, A. E; SUMANA, A; STARKS, P. T. Diploid males and their triploid offspring in the paper wasp *Polistes dominulus*. **Biology Letters**, vol. 1, p. 200-203, 2005.

LOPES, D. M; CARVALHO, C. R. D; CLARINDO, W. R; PRAÇA, M. M; TAVARES, M. G. Genome size estimation of three stingless bee species (Hymenoptera, Meliponinae) by flow cytometry. **Apidologie**, vol. 40, p. 517-523, 2009.

LORDIER, L; JALIL, A; AURADE, F; LARBRET, F; LARGHERO, J; DEBILI, N; VAINCHENKER, W; CHANG, Y. Megakaryocyte endomitosis is a failure of late cytokinesis related to defects in the contractile ring and Rho/Rock signaling. **Blood**, vol. 112, no. 8, p. 3164–3174, 2008.

LOUREIRO, J; RODRIGUEZ, E; DOLEŽEL, J; SANTOS, C. Flow Cytometric and Microscopic Analysis of the Effect of Tannic Acid on Plant Nuclei and Estimation of DNA Content. **Annals of Botany**, vol. 98, no. 3, p. 515–527, 2006.

NAGAMATI-JÚNIOR, K; SIMOKOMAKI, K; GRUBER, C. V; LAMA, M. A. D. Sociogenetic structure of *Polistes (Aphanilopterus) versicolor* Olivier, 1971 colonies (Hymenoptera, Vespidae, Polistini). **Genetics and Molecular Biology**, vol. 33, no. 4, p. 669–675, 2010.

NANDAKUMAR, S; GRUSHKO, O; BUTTITTA, L. A. Polyploidy in the adult *Drosophila* brain. **ELife**, vol. 9, p. 1-25, 2020.

OLIVEIRA, S. A. D; CASTRO, M. M. D; PREZOTO, F. Foundation pattern, productivity and colony success of the paper wasp, *Polistes versicolor*. **Journal of Insect Science**, vol. 10, p. 1-10, 2010.

OTTO, F. J. DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. **Darzynkiewicz Z, Crissman HA and Robinson JP (eds) Methods in Cell Biology, Academic Press, San Diego**, vol. 33, 1990. 6 p.

PIETROBON, T. A. O. **Glândula ectomandibular e comportamento de *Polistes versicolor* (Olivier) (Hymenoptera, Vespidae)**. 2005. Tese (doutorado em ciências biológicas), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, 2005.

RASCH, E. M; BARR, H. J; RASCH, R. W. The DNA content of sperm of *Drosophila melanogaster*. **Cromosoma**, vol. 33, p. 1-18, 1971.

STRASSMANN, J. E. Evolutionary implications of early male and satellite nest production in *Polistes exclamans* colony cycles. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, vol. 8, p. 55-64, 1981.

SCHOLES, D. R; SUAREZ, A. V; PAIGE, K. N. Can endopolyploidy explain body size variation within and between castes in ants? **Ecology and Evolution**, vol. 3, no.7, p. 2128–2137, 2013.

SOUZA, A. R. D; BARBOSA, B. C; SILVA, R. C. D; PREZOTO, F; LINO-NETO, J; NASCIMENTO, F. S. D. No Evidence of Intersexual Kin Recognition by Males of the Neotropical Paper Wasp *Polistes versicolor*. **Journal of Insect Behavior**, vol. 30, no. 2, p. 180–187, 2017.

TANNURE, I. C; NASCIMENTO, F. S. Influência do conflito de dominância entre fundadoras em colônias de vespas sociais pertencentes ao gênero *Polistes* (Hymenoptera: Vespidae). **Revista Brasileira de Zociências**, vol. 1, p. 31-40, 1999.

TSUCHIDA, K; NAGATA, N; KOJIMA, J. Diploid males and sex determination in a paper wasp, *Polistes chinensis antennalis* (Hymenoptera, Vespidae). **Insectes Sociaux**, vol. 49, p. 120–124, 2002.

WHITING, P. W. Multiple Alleles in Complementary Sex Determination of *Habrobracon*. **Genetics**, vol. 28, p. 365–382, 1943

Material Suplementar

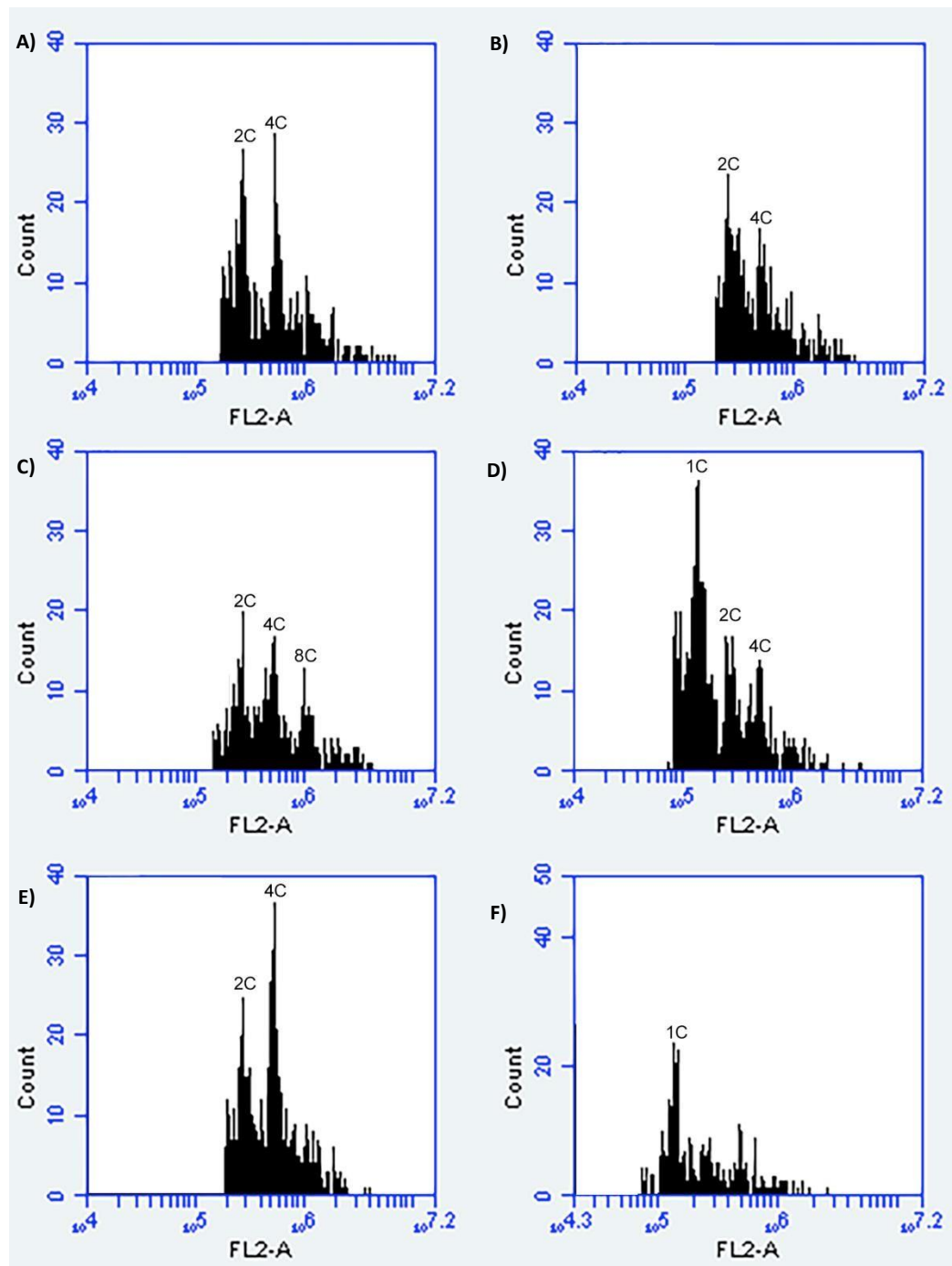


Figura S2: Histogramas obtidos na análise da suspensão nuclear de células do gânglio cerebral de espécimes de *Polistes versicolor* (PV), fêmeas e machos obtidos de tecido fixado em álcool absoluto. Núcleos corados com iodeto de propídeo. A) PV50 – fêmea diploide 2C, CV=4,60. B) PV68 – fêmea diploide 2C, CV=4,67. C) PV30 – macho diploide 2C, CV=3,70. D) PV44 – macho haploide 1C, CV=4,32. E) PV46 - macho diploide 2C, CV=4,43. F) PV81– macho haploide 1C, CV=4,87.

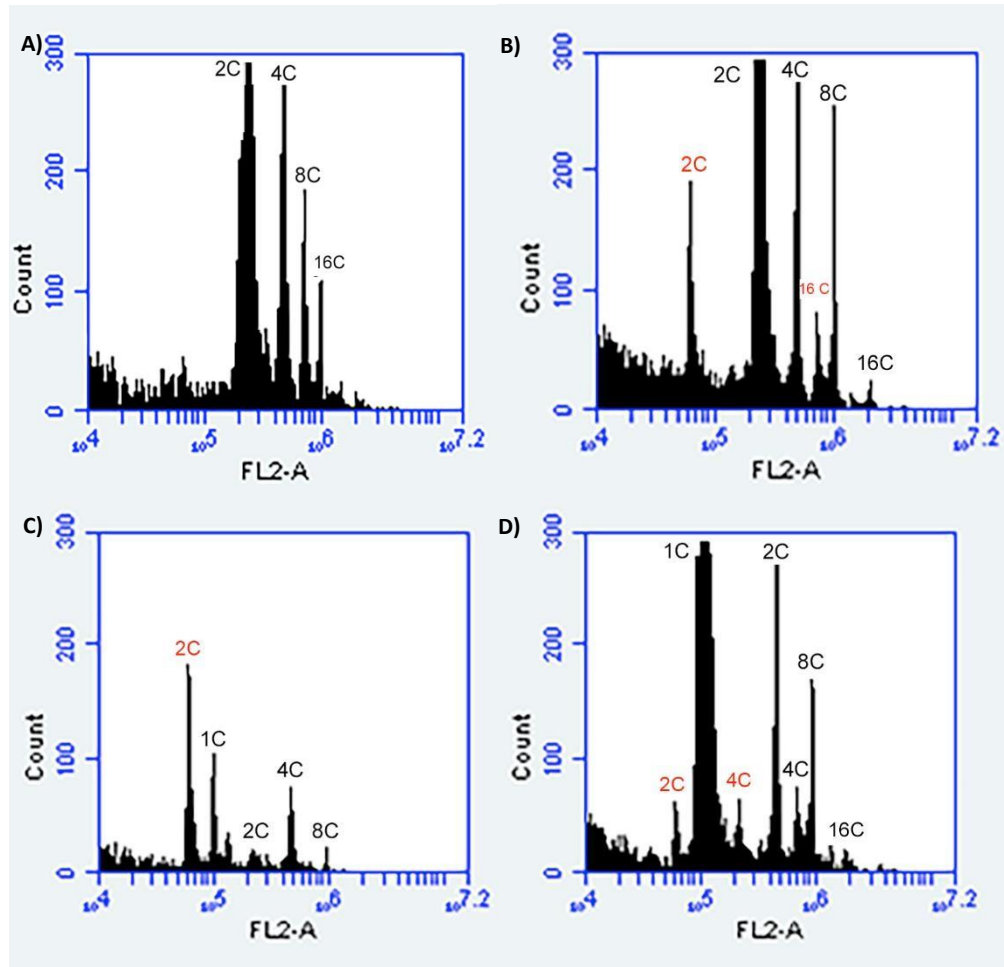


Figura S3: Histogramas obtidos na análise da suspensão nuclear de células do gânglio cerebral de espécimes de *Polistes versicolor* (PV), fêmeas e machos obtidos de tecido fresco. Núcleos corados com iodeto de propídeo. **A)** PV121 — fêmea diploide 2C, CV=4,83. **B)** PV129 – fêmea diploide 2C, CV=3,24. **C)** PV135 - macho haploide 1C, CV=3,67 **D)** PV136 - macho haploide 1C, CV=4,31. Em vermelho padrão interno fêmeas de *Drosophila melanogaster*.

CONCLUSÃO GERAL

Neste trabalho, utilizamos dois métodos diferentes para investigar o dimorfismo sexual em *Polistes versicolor*: A morfometria geométrica (para detectar dimorfismo na forma e no tamanho das asas anteriores e posteriores) e a citometria de fluxo (para mensurar a quantidade de DNA e aferir a ploidia dos indivíduos).

A morfometria geométrica revelou que embora as asas das fêmeas sejam em média maiores que as dos machos, a diferença não pode ser atribuída unicamente ao caráter haplodiploide da espécie, uma vez que a variância de tamanho das asas dos machos é muito maior que as das fêmeas e que as maiores asas de machos apresentam o mesmo tamanho das maiores asas das fêmeas. O resultado sugeriu ainda que os ninhos nos quais foram coletados apenas indivíduos do sexo masculino produziram machos maiores que os ninhos que produziram machos e fêmeas, indicando que os recursos podem não ser igualmente disponibilizados para machos e fêmeas em um mesmo ninho.

Em relação à forma, a morfometria revelou que o formato das asas anteriores das fêmeas varia muito menos que o dos machos, sugerindo a ação de seleção estabilizadora, que atua mais fortemente em estruturas que afetam diretamente o *fitness* do organismo, o que está de acordo com os diferentes comportamentos executados por machos e fêmeas e suas influências na sobrevivência do ninho.

A citometria de fluxo mostrou que as células presentes no tecido neural de *Polistes versicolor* apresentam múltiplas ploidias, tanto em machos quanto em fêmeas. A presença de machos diploides foi detectada em nossa amostra, o que já foi constatado em outras espécies de *Polistes*, mas ainda não investigado em *Polistes versicolor*. A citometria também estimou o valor 1C (quantidade de DNA no genoma haploide) de *Polistes versicolor* em 0,65 pg, o maior tamanho de genoma dentro do gênero *Polistes*. Outras espécies de *Polistes* já tiveram seus valores estimados, porém a partir de amostras pequenas de indivíduos por espécie, sem qualquer registro de poliploidia nas células nervosas.

PERSPECTIVAS

Em *Polistes versicolor*, vimos que os ninhos em que foram coletados apenas indivíduos do sexo masculino produziram os maiores machos do que ninhos que foram coletados machos e fêmeas, o que pode indicar que os recursos não são igualmente disponibilizados para machos e fêmeas em um mesmo ninho. Desta forma, novos trabalhos para o teste dessa hipótese podem ser feitos no sentido de investigar a distribuição de recursos alimentares.

A presença de células poliploides em gânglios neurais de indivíduos adultos de *P. versicolor* foi constatada, mas não sabemos se ela proporcionaria os mesmos benefícios de defesa contra danos do DNA como visto em *Drosophila*. O que também pode ser testado por meio de experimentos que envolvam processos de danos oxidativos ao DNA e analisam sua relação com o produção de células poliploides.

Nos ninhos 2 e 4 que coletamos tanto machos quanto fêmeas e produziram os menores machos amostrados, foi encontrado a presença de 2 machos diploides. Uma hipótese a ser testada é a de que as fêmeas subordinadas poderiam indiretamente dificultar o pleno desenvolvimento desses machos por se dedicarem mais atenção à alimentação das fêmeas que à dos machos. O que prever um desenho experimental específico para apurar a subnutrição de machos diploides.