

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO

DAVIS JOÃO ALVES

**Análise genética de populações naturais de *Polybia paulista*
Ihering, 1896 (Hymenoptera: Epiponini)**

MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
AGOSTO - 2011

DAVIS JOÃO ALVES

**Análise genética de populações naturais de *Polybia paulista*
Ihering, 1896 (Hymenoptera: Epiponini)**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki

**MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
AGOSTO – 2011**

Aos meus dois maiores tesouros, razões da minha existência, minha esposa Jamile e minha pequena filha Lorena.

Aos meus pais, Silvio e Vanda, que sempre me incentivaram e se orgulharam das minhas vitórias.

Ao meu avô, João, que já não nos brinda com sua incrível presença, de quem herdei a vontade de vencer.

Com muito amor, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre se fez presente em todos os momentos desta árdua caminhada, confio a ti minha vida.

À Universidade Estadual de Maringá e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento pelo suporte.

Ao Professor Doutor Edilberto Giannotti, pelas colaborações mesmo a distância, e pelo auxílio com a biologia das vespas.

À minha Orientadora, Maria Cláudia Colla Ruvolo Takasusuki, pelas horas de trabalho sem descanso, incluindo finais de semana, pela competência, respeito, paciência e principalmente pelas longas horas de maravilhosas conversas a mim dedicadas.

À minha Coorientadora, professora e amiga, Claudete Aparecida Mangolin, que colaborou em todos os momentos da minha caminhada, sempre pronta para apontar a melhor direção a seguir.

Ao meu Coorientador, professor e grande amigo, Erasmo Renesto, que enriqueceu grandemente meu perfil profissional, graças a sua vasta experiência, disponibilidade e acima de tudo carinho e dedicação para com minhas dúvidas e questionamentos.

A todos os professores da pós-graduação e do Departamento de Biologia Celular e Genética, em especial aos professores Maria de Fátima P. da Silva Machado, Ana Silvia Lapenta, José Ricardo P. Falco, Sandra A. Collet, pela convivência, ensinamentos e auxílio técnico sempre presente.

À amiga Suzana Paiva, pelo apoio e auxílio incondicional que prestou todos estes anos, e principalmente pela ajuda para o término deste trabalho.

Aos amigos do laboratório, por todos os momentos agradáveis que passamos juntos, em especial a Liriana, que foi uma grande amiga e companheira durante os períodos difíceis de trabalhos e disciplinas.

Ao “Chico”, funcionário do PGM, sempre dedicado e presente quando precisamos dele, e aos funcionários do Departamento de Biologia Celular e Genética, em especial ao Sérgio pela ajuda e trabalho indispensáveis.

Ao meu irmão por escolha, Edner Abellini, que esteve comigo em todos os finais de semana de trabalho, ajudando no que fosse necessário, a quem sempre

recorri nos momentos difíceis e que com certeza estará comigo neste momento de alegria.

Aos ex-alunos e amigos Pablo Hugo Dartibale e Ana Paula Giroto, pela ajuda com a coleta dos ninhos das vespas.

A todos os amigos de Maringá e Umuarama, que sempre se preocupam comigo quando estou nas estradas, e lembram-se de mim em suas orações.

Enfim, a todos que contribuíram de algum modo para a realização de mais uma etapa da minha vida.

BIOGRAFIA

Davis João Alves, filho de Silvio Alves e Vanderlei Isaura Bolim Alves, nasceu em 15 de Janeiro de 1980, na cidade de Umuarama, Estado do Paraná.

Em dezembro de 1994, concluiu o Ensino Fundamental no Colégio Estadual Pedro II, na cidade de Umuarama, estado do Paraná.

Concluiu o Ensino Médio, em dezembro de 1997, no Colégio Estadual Pedro II, na cidade de Umuarama, estado do Paraná.

Ingressou no Curso de Licenciatura Plena em Ciências/Biologia, em março de 1998, na Universidade Paranaense, na cidade de Umuarama, estado do Paraná, obtendo o título de Licenciado em Ciências/Biologia em janeiro de 2002.

Ingressou no Curso de Pós-Graduação *lato sensu* em Biologia: Bases morfológicas e fisiológicas da integração do Homem com o meio, em março de 2002, na Universidade Estadual de Maringá, na cidade de Maringá, estado do Paraná, obtendo o título de Especialista em junho de 2003.

Ingressou no Curso de Pós-Graduação *stricto sensu* em Genética e Melhoramento, em março de 2005, na Universidade Estadual de Maringá, na cidade de Maringá, estado do Paraná, obtendo o título de Mestre em Genética e Melhoramento em dezembro de 2006.

Em março de 2007, ingressou no Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (PGM), da Universidade Estadual de Maringá, estado do Paraná, Brasil.

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO GERAL	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	04
2.1. Aspectos gerais dos Hymenoptera sociais	04
2.2. Biologia das vespas do gênero <i>Polybia</i>	05
2.3. Marcadores moleculares – isoenzimas em insetos sociais	11
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15
CAPÍTULO I – Caracterização do perfil isoenzimático das esterases e das proteínas totais em <i>Polybia paulista</i> (Ihering, 1896)	20
RESUMO	20
ABSTRACT	22
1. INTRODUÇÃO	23
2. MATERIAL E MÉTODOS	25
2.1. Material	25
2.2. Preparo das amostras – esterases	26
2.2.1. Fases do desenvolvimento - imaturos	26
2.2.2. Adultos.....	26
2.2.3. Formigas Dolichoderinae parasita da vespa <i>P. paulista</i> – larva e adulto.....	27
2.3. Fracionamento das esterases.....	27
2.4. Testes de inibição	28
2.5. Eletroforese das proteínas totais (SDS-PAGE).....	29
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
3.1. Caracterização das esterases em <i>P. paulista</i>	31
4. CONCLUSÕES	38
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
CAPÍTULO II – Análise genética em populações de <i>Polybia paulista</i> (Ihering, 1896) utilizando marcadores moleculares	41
RESUMO	41
ABSTRACT	42

1. INTRODUÇÃO.....	43
2. MATERIAL E MÉTODOS	46
2.1. Material	46
2.2. Métodos	47
2.2.1. Preparação das amostras.....	47
2.2.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida das esterases.....	48
2.2.3. Eletroforese em gel de amido	48
2.2.4. Análise de dados	50
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4. CONCLUSÕES.....	59
5. CONCLUSÕES GERAIS	60
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

RESUMO

ALVES, Davis João, D.Sc. Universidade Estadual de Maringá, agosto de 2011. **Análise genética de populações naturais de *Polybia paulista* Ihering, 1896 (Hymenoptera: Epiponini)**. Professora Orientadora: Maria Cláudia Colla Ruvolo-Takasusuki. Professores conselheiros: Claudete Aparecida Mangolin e Erasmo Renesto.

A vespa social *Polybia paulista* (Hymenoptera: Epiponini) é um importante agente polinizador das plantas cultivadas, bem como um predador natural de pragas devido ao seu hábito alimentar herbívoro-carnívoro, que facilmente é encontrada nidificando nas cidades e ambientes construídos. Devido a sua importância econômica e ecológica, o presente trabalho utilizou marcadores moleculares para caracterizar o sistema isoenzimático das esterases nas diversas fases do desenvolvimento ontogênico do inseto, sendo observadas dez esterases (EST - nº E.C. 3.1.1.1) na análise eletroforéticas de extratos de cabeça/tórax de adultos, pupas, pré-pupas e larvas, denominadas numericamente de acordo com sua mobilidade eletroforética em EST-1 para a que apresentou maior mobilidade e EST-10 para a que apresentou menor mobilidade. A EST-9 foi classificada como β -esterase enquanto as demais foram classificadas como $\alpha\beta$ -esterases. Para a análise das populações de *P. paulista*, foram coletados dez ninhos em três municípios paranaenses (Maringá, Umuarama e Maria Helena, sendo estes dois últimos considerados uma única população) e as vespas foram analisadas para suas enzimas. Em géis de amido, foram avaliados 4 sistemas enzimáticos: malato desidrogenase (MDH – nº E.C. 1.1.1.37), isocitrato desidrogenase (IDH - nº E.C. 1.1.1.42), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (G3PDH - nº E.C. 1.1.1.8) e fosfoglucomutase (PGM - nº E.C. 2.7.5.1). Também foram realizadas análises utilizando eletroforese em géis de poliacrilamida para revelação das esterases. Como resultados, foram observados quatorze locos isoenzimáticos dos quais cinco foram polimórficos (35,71%). A diversidade genética foi estimada pelo Índice de Shannon (I) e apresentou um valor médio, considerando todos os indivíduos analisados, de 0,2416; já para cada população, os valores detectados foram próximos (0,2321 para a população de Maringá e 0,2389 para a população de Umuarama. O índice de fixação (F_{IS}) estimado para as populações foi positivo (0,2747), mostrando um excesso de homozigotos na população. O grau de diferenciação (F_{ST}) foi baixo (0,0352),

indicando que as populações não estão diferenciadas. Os valores estimados de identidade e distância genética de Nei (1978) foram respectivamente 0,9862 e 0,0139, corroborando com o fato de que essas populações possuem grande proximidade genética.

Palavras-chave: *Polybia paulista*, marcadores moleculares, isoenzimas.

ABSTRACT

ALVES, Davis João, D.Sc. Universidade Estadual de Maringá, August, 2011. **Genetic analyses of natural populations of *Polybia paulista* Ihering, 1896 (Hymenoptera: Epiponini)**. Adviser: Maria Cláudia Colla Ruvolo-Takasusuki. Committee Members: Claudete Aparecida Mangolin and Erasmo Renesto.

The social wasp *Polybia paulista* (Hymenoptera: Epiponini) is an important agent pollinator of the cultivated plants, as well as a natural predator of pests, due to its herbivorous-carnivorous food habits, easily found nidifying in urban areas and built environments. Due to its economic and ecological importance, the present work used molecular markers to characterize the isoenzymatic system of the esterases in the several stages of the ontogenic development of the insect, showing ten esterases (EST - n° E.C. 3.1.1.1) in the electrophoretic analysis of extracts of head/thorax of adults, pupae, prepupae and larvae, numerically designated according to the electrophoretic mobility in EST-1 to the one that presented the highest mobility and EST-10 to the one that presented the lowest mobility. EST-9 was classified as β -esterase, while the others were classified as $\alpha\beta$ -esterases. To analyze the populations of *P. paulista*, ten nests were collected in three municipalities of the state of Paraná (Maringá, Umuarama and Maria Helena, being the latter two considered as a single population) and analyzed through starch gel isoenzyme electrophoresis, showing 4 enzymatic systems: malate dehydrogenase (MDH – n° E.C. 1.1.1.37), isocitrate dehydrogenase (IDH - n° E.C. 1.1.1.42), glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (G3PDH - n° E.C. 1.1.1.8) and phosphoglucomutase (PGM - n° E.C. 2.7.5.1). Analyses using polyacrylamide gel electrophoresis were also performed to indicate the esterases. The results showed fourteen isoenzymatic loci, of which five were polymorphic (35,71%). The genetic diversity was calculated using the Shannon index (I), and presented an average value of 0.2416, considering all the individuals analyzed; considering each single population, the values detected were close (0.2321 to the population of Maringá and 0.2389 to the population of Umuarama). The fixation index calculated to the populations was positive value (0.2747), indicating an excess of homozygotes in the population. The level of differentiation presented a low value (0.0352), indicating that the populations are not differentiated. The calculated values of Nei's genetic distance and identity (1978) were 0.9862 and

0.0139, respectively, confirming the fact that these populations have a significant genetic proximity.

Key words: *Polybia paulista*, molecular markers, isoenzymes.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Atualmente, existe uma crescente preocupação acerca das relações entre animais e vegetais nos mais variados ecossistemas, devido às atividades antrópicas, como a agropecuária, que muitas vezes promove a fragmentação de ambientes naturais que abrigam muitas espécies.

A fragmentação e destruição de ambientes naturais levam ao isolamento de populações. Essa destruição acaba determinando a migração de populações de animais para outras áreas, naturais e/ou construídas, onde tais populações acabam encontrando condições favoráveis ao desenvolvimento e acabam virando pragas (Futuyma, 2009).

Os insetos constituem a principal classe de animais com potencialidade para transformar-se em pragas em determinados ambientes, devido à facilidade de locomoção, reprodução e alimentação. Fatores como o clima, disponibilidade de alimento e ausência de inimigos naturais favorecem a proliferação de insetos (Ruppert e Barnes, 1996). Com o aumento de sua população, muitas espécies acabam causando danos ao homem, tornando-se pragas agrícolas, transmitindo doenças e causando desequilíbrio nas cadeias alimentares (Hyckel e Schuck, 1995).

Ainda assim, muitos insetos são considerados úteis ao homem. Na ordem Hymenoptera, por exemplo, estão classificados insetos sociais e não sociais, de interesse para o homem.

A importância econômica dos himenópteros reside nas espécies úteis (abelhas e vespas), produtoras do mel, da cera e da geleia real, além de serem os principais agentes polinizadores das flores, predadoras e parasitas dos insetos nocivos às plantas cultivadas, sendo utilizados no controle biológico de pragas agrícolas (Costa Lima, 1960).

Dentre as espécies sociais, estão abelhas, formigas e algumas espécies de vespas, como as pertencentes ao gênero *Polybia*, vespas altamente sociais, reconhecidas pela ocorrência de castas e arquitetura do ninho que é totalmente fechado (Jeanne e Bouwma, 2002). Nos Himenópteros sociais, geralmente as fêmeas são diploides e os machos são haploides, pois as fêmeas originam-se de ovos fecundados enquanto os machos originam-se de ovos não fecundados (partenogênese arrenótoca). Essa constituição genética haplodiploide seria

responsável por reduzir a recombinação e o efeito de dominância, causando alterações oscilatórias temporárias nas frequências genéticas entre os sexos (Noll et al., 2004).

Em geral, os Hymenoptera eussociais apresentam partenogênese e haplodiploidia como forma de reprodução, o que determina uma menor variabilidade genética nestes insetos do que em insetos diplóides não sociais (Pamilo et al., 1978).

Populações com sistema haplodiploide teriam poucos locos polimórficos por causa da seleção contra genes recessivos deletérios expressos nos machos. Além da haplodiploidia, vários outros fatores, como a endogamia e o pequeno tamanho efetivo de população, podem determinar os baixos níveis de variabilidade genética em Hymenoptera, o que possivelmente está relacionado com a estrutura social dos ninhos e a ocorrência de afunilamentos populacionais (O'Donnell, 1998; Schmitz e Moritz, 1998). Baixos níveis de variabilidade genética ocorrem nas análises de isoenzimas, pois, nesse caso, apenas locos cujos produtos são proteínas enzimáticas são analisados, e como a quantidade detectável desses locos não é alta, consegue-se observar pouco polimorfismo. Por outro lado, as isoenzimas correspondem aos produtos primários dos genes, sendo de fácil manipulação e reprodutibilidade dos experimentos, além de permitir o estudo de como o ambiente interfere na expressão destes genes.

As vespas *Polybia*, pertencem à família Vespidae, tribo Epiponini, e apresentam colônias fundadas por enxames com pequeno número de rainhas e um grande número de operárias (Jeanne e Bouwma, 2002); sendo que as rainhas são responsáveis pela reprodução e desenvolvimento do enxame (Noll et al., 2004).

Populações de vespas sociais chegam à casa dos milhões de indivíduos, ocorrendo a formação de castas bem definidas e de múltiplas rainhas (Gastreich et al., 1993; Strassmann et al., 1998).

Estas vespas são muito comuns na natureza e atualmente também nas áreas urbanas, sendo encontrados com alta frequência nas cidades, por causa da grande facilidade que apresentam na nidificação em habitações urbanas (Jeanne e Bouwma, 2002). Devido à presença de ferrão e peçonha, frequentemente ocorrem acidentes com humanos envolvendo esses insetos e por isso seus ninhos próximos às residências na área urbana são considerados um transtorno, o que acaba possibilitando a classificação destes insetos como pragas urbanas.

No entanto, as vespas são muito importantes, pois como apresentam hábitos carnívoro-herbívoros realizam polinização eficiente de algumas espécies vegetais (Quirino e Machado, 2001) e atuam no controle biológico de algumas pragas de plantas cultivadas, como a lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*), principal praga que ataca o milho cultivado no Brasil (Santos et al., 2003).

Assim, o presente trabalho teve como objetivos caracterizar o perfil eletroforético das isoenzimas esterases e das proteínas totais da vespa social *Polybia paulista* durante o seu desenvolvimento ontogenético, e utilizando marcadores moleculares, avaliar as características genéticas das populações coletadas da vespa, no intuito de fornecer subsídios para o entendimento e compreensão de sua socialidade.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos gerais dos Hymenoptera sociais

A ordem Hymenoptera é um dos maiores grupos dentre os insetos, compreendendo as vespas, abelhas e formigas. Possui cerca de 115.000 espécies descritas (Hanson e Gauld, 1995), distribuídas em 99 famílias taxonômicas (Goulet e Huber, 1993).

Dentro da ordem Hymenoptera classificam-se inúmeras espécies de insetos sociais. Tal classificação é centrada na divisão de trabalho dos organismos pertencentes à colônia, tendo sido proposto que o sucesso evolutivo e ecológico de tais grupos deve-se principalmente à habilidade das colônias em coordenar a alimentação, reprodução, limpeza e defesa do ninho (Beshers e Fewell, 2001; Wilson e Holldobler, 2005). Tal habilidade depende fundamentalmente da determinação de castas da espécie.

A diferenciação das castas é um recurso crucial na avaliação da evolução da socialidade nas espécies de vespas, sendo que as diferenças entre rainhas e operárias podem ser resultantes de diferenças nutricionais durante o desenvolvimento larval, da atividade diferenciada do hormônio juvenil em resposta as diferenças nutricionais (Wilson, 1971; O'Donnell, 1998), e também da ação de alguns genes envolvidos na determinação de castas (Hoffman e Goodisman, 2007).

Segundo Noll e Wenzel (2008) existem duas formas de organização social dos vespídeos neotropicais, sendo que a primeira ocorre nos gêneros *Polistes* (tribo Polistini) e *Mischocyttarus* (tribo Mischocyttarini), que apresentam suas colônias sendo iniciadas por apenas uma fundadora e algumas cofundadoras, e a organização social se dá por meio de hierarquias de dominância baseadas em agressões; e a outra forma é observada na tribo Epiponini, onde as colônias são fundadas por enxames e a organização social é muito mais complexa e os mecanismos reguladores são menos conhecidos.

Atualmente, em vespas sociais da tribo Epiponini são observadas cinco formas de diferenciação de castas devido a influências do ciclo da colônia: as diferenças morfológicas entre rainhas e operárias são ausentes durante o ciclo colonial inteiro, com ativação ovariana em rainhas imaturas (intermediárias);

ausência de diferenças morfológicas pronunciadas em rainhas e operárias durante o ciclo colonial inteiro, mas com clara distinção fisiológica; presença de diferença morfológica relacionada ao tamanho, com maturação do ovário em rainhas imaturas ocorrendo durante todo o ciclo da colônia ou ainda em apenas algumas fases do ciclo de vida da colônia; as diferenças morfológicas entre castas são evidentes durante o ciclo inteiro e rainhas são sempre diferentes das operárias (Noll e Zucchi, 2002).

2.2. Biologia das vespas do gênero *Polybia*

A família Vespidae é constituída por três subfamílias: Stenogastrinae, Vespinae e Polistinae. No Brasil, apenas a subfamília Polistinae é encontrada, sendo esta constituída, segundo Carpenter (1993), por três tribos: Epiponini, Mischocyttarini e Polistini. Dentro da tribo Epiponini encontram-se as vespas do gênero *Polybia*.

O gênero *Polybia* foi primeiramente classificado por Richards (1978), juntamente com outros 22 gêneros na família Vespidae, subfamília Polistinae e tribo Polybiini. Carpenter (1993) definiu uma nova classificação quanto às tribos que compõem a subfamília Polistinae de ocorrência na América do Sul em: Polistini (gênero *Polistes*), Mischocyttarini (gênero *Mischocyttarus*) e Epiponini (gêneros *Apoica*, *Agelaia*, *Angiopolybia*, *Asteloeca*, *Brachygastra*, *Chartegellus*, *Charteginus*, *Chartergus*, *Clypearia*, *Epipona*, *Leipomeles*, *Marimbonda*, *Metapolybia*, *Nectarinella*, *Occipitalia*, *Parachartergus*, *Polybia*, *Protonectarina*, *Protopolybia*, *Pseudopolybia*, *Synoeca* e *Synoecoides*).

As vespas do gênero *Polybia* são insetos altamente sociais, apresentando ampla distribuição geográfica, ocorrendo em grande parte da América do Sul, sendo que no Brasil elas são encontradas em praticamente todos os estados (Richards, 1978).

Os adultos apresentam como principais características morfológicas a presença de dois pares de asas membranosas, aparelho bucal do tipo mandibulado, ou mastigador, dotado de mandíbulas mais ou menos desenvolvidas; abdômen visivelmente metamerizado terminando em um ferrão conectado a uma glândula de veneno (Costa Lima, 1960).

A introdução do ferrão e liberação da peçonha causando dor intensa e alergias é um mecanismo de defesa da colônia. Esta forma de atacar inimigos

naturais é muito importante para os Hymenoptera, pois a colônia vive por muito tempo e não pode se deslocar rapidamente quando ameaçada, uma vez que, toda a progênie, em estágio imaturo, seria deixada para trás, e haveria mais gastos de energia na construção de uma nova colônia (Schmidt, 1982).

O veneno de vespas do gênero *Polybia* tem sido utilizado em estudos para identificação de toxinas (pequenos peptídeos) que possam ser empregados na produção de medicamentos com ação antibiótica contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Souza et al., 2009).

A *Polybia* é popularmente conhecida como marimbondo e seus ninhos como casas de marimbondos. Porém, nas vespas sociais, cada espécie constrói um ninho de aspecto característico, de modo que, por ele, é possível identificar a espécie (Costa Lima, 1960).

O vespeiro de *Polybia* comumente é constituído por vários favos protegidos por uma capa ou invólucro de cor acinzentada clara, fato que facilita a identificação da vespa para sua coleta (Richards, 1978). Em geral, tais vespas apresentam facilidade de nidificação, tanto nas cidades como nas áreas rurais, sendo que nas cidades, geralmente procuram construir seus ninhos nos cantos dos forros de varandas e beirais das construções, preferindo construções de madeira, ou alvenaria com cobertura feita de telhas de barro, com a fixação do ninho preferencialmente nestes materiais (Machado, 1984; Kudô et al., 2005).

Segundo Machado (1984) a espécie *P. paulista* foi denominada sucessivamente como *Polybia scutellaris* var. *paulista* H. von Ihering, 1896; *Polybia occidentalis* var. *scutellaris* forma *paulista* (Ducke, 1910), e por fim sendo denominada *Polybia (Myrapetra) paulista* H. von Ihering (1896). Ainda segundo a autora, a espécie *P. paulista* pouco difere da *P. scutellaris*, sendo ambas inteiramente pretas com o escutelo intensamente amarelo (Figura 1), distinguindo-se apenas pela maneira como constroem o ninho e pela ligeira diferença na cor do ninho (Figura 2).

Os ninhos de vespas do gênero *Polybia* apresentam ciclo colonial, que é descrito como sendo o período de desenvolvimento que dura do final de um período de reprodução até o final de um próximo período reprodutivo, sendo fortemente influenciado pelo ambiente. Em zonas temperadas, os ciclos coloniais de vespas são, em geral, anuais e sincrônicos, com início da fundação do ninho limitado ao começo da estação favorável (Jeanne, 1991).



Figura 1 – Vista dorsal da vespa *Polybia paulista*. Fonte: <http://www.chiba-muse.or.jp/NATURAL/special/hachi/bee/species/fo/polybia.html>



Figura 2 – Ninho de *P. paulista*. Fonte: Prof. Dr. Edilberto Giannotti

O ninho de *Polybia* pode apresentar um número variável de rainhas, podendo chegar a centenas delas (poliginia), e ainda, quando ocorre falta de condições para a sobrevivência da colônia, as vespas intermediárias (rainhas em potencial) podem ser fecundadas para gerar um número maior de operárias para a colônia (Machado, 1977; Kudô et al., 2005). Tal variação é um fator que chama atenção. Hamilton (1972) propõe a teoria da seleção por parentesco (*Kin-selection*), citando que a ordem Hymenoptera estaria pré-disposta a eussocialidade devido ao elevado parentesco genético entre irmãs produzido pela haplodiploidia. Porém, a poliginia observada em *Polybia* diminui o ganho via cooperação (*fitness*) em relação ao crescimento do número de rainhas.

West-Eberhard (1978 e 1981) propuseram que em Epiponini, uma colônia madura seja capaz de emitir enxames compostos por muitas rainhas e operárias, estabelecendo uma nova colônia de fase poligínica. À medida que a colônia se desenvolve, algumas rainhas desaparecem ou assumem papéis de operárias, reduzindo pouco a pouco a população de rainhas até poucas ou apenas uma fêmea fértil, constituindo a fase monogínica, embora nem sempre o número de rainhas se reduza a uma só. Devido a essa alternância entre um alto e baixo número de rainhas durante a ontogênese da colônia, criou-se o termo oligoginia cíclica. Segundo Strassmann et al. (1998), como a produção de novas rainhas ocorre apenas em colônias maduras (oligogínicas), as rainhas filhas são sempre altamente aparentadas e assim acabam se enquadrando dentro das previsões da teoria de seleção por parentesco (Hamilton, 1964 a e b).

A complexidade dos ciclos coloniais em *Polybia* acaba determinando também uma alta complexidade na diferenciação de castas. Richards (1978) observou três formas de diferenciação entre castas em Epiponini: (1) rainhas maiores que operárias; (2) dimorfismo evidente, com rainhas menores que operárias em algumas partes do corpo e maiores em outras, com ausência de rainhas intermediárias, que são caracterizadas por serem rainhas virgens ou operárias que se desenvolvem em rainhas; (3) diferenças morfológicas leves ou ausentes e diferenças intermediárias presentes.

Jeanne et al. (1995) propuseram que o padrão de diferenciação em que as rainhas apresentam parte do corpo maiores ou menores que as operárias podem ser resultado de uma reprogramação ontogenética dos padrões de crescimento dos

discos imaginais, sendo tal característica uma condição ancestral do sistema de castas em Epiponini.

Segundo Noll et al. (2004), é possível estabelecer cinco padrões de diferenciação de castas nos Epiponini: 1) ausência de diferenciação de castas; 2) presença de diferenças morfológicas apenas; 3) rainhas maiores que as operárias, com ocorrência de rainhas intermediárias; 4) rainhas e operárias diferentes morfológicamente e ausência de intermediárias; e 5) rainhas menores em alguns aspectos que as operárias; porém, o ciclo colonial pode interferir na diferenciação das castas.

As vespas sociais, como a *Polybia*, participam de forma decisiva no equilíbrio trófico das comunidades, devido a sua ambiguidade alimentar (herbívorocarnívora), atuando como herbívoras quando coletam néctar e exudados açucarados, e como carnívoras, quando predadoras de outros insetos; o que as coloca em situação privilegiada para estudos sobre teias alimentares (Raposo-Filho e Rodrigues, 1983). Vários estudos demonstram a ação de *Polybia* como controladores biológicos de pragas em condições naturais e agrícolas (Resende et al., 2001), apesar de também terem sido citadas como pragas agrícolas (Silva et al., 1968; Hyckel e Schuck, 1995).

Santos et al. (2003) citam que a importância econômica de vespas sociais como a *Polybia sericea* está diretamente relacionada ao comportamento trófico destes organismos, pois, como outros predadores generalistas, apresenta amplo espectro alimentar, dando preferência à presa mais abundante, o que auxilia no controle de explosões populacionais de inseto-praga. Machado et al. (1988), estudando o material capturado e utilizado na alimentação de *P. sericea* constataram que além desta espécie de vespa não apresentar especificidade quanto à presa, predavam na maioria das vezes larvas de Lepidoptera consideradas importantes pragas agrícolas, como a lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*).

Foram realizados muitos estudos com o intuito de fornecer informações básicas para permitir a utilização das vespas sociais como agentes controladores biológicos. Muitos destes estudos estão relacionados à utilização de inseticidas seletivos em conjunto com o controle biológico realizados pelas vespas sociais (Picanço et al., 1998; Moura et al., 2000; Santos et al., 2003).

Nestes estudos sobre utilização de inseticidas, foram encontrados indivíduos resistentes e indivíduos suscetíveis à ação dos inseticidas, e quando os vespídeos

eram todos suscetíveis a ação do inseticida, no período seguinte de plantio da cultura analisada, o inseto-praga voltava a atacar com uma população ainda maior, sendo necessário à utilização de inseticidas ainda mais tóxicos. Santos et al. (2003) avaliaram o nível de seletividade de inseticidas utilizados para o controle da lagarta do cartucho, importante praga do cultivo do milho, em relação à vespa social *Polybia sericea*, espécie potencialmente útil para o manejo integrado de insetos. Verificou-se que devido à tolerância a um dos agrotóxicos utilizados (lufenuron) no cultivo de milho, a vespa *P. sericea* pode ser utilizada como controlador biológico da lagarta do cartucho do milho.

O estudo do polimorfismo das populações de *Polybia* pode contribuir no futuro para o manejo e conservação de populações resistentes a inseticidas utilizados para controle de pragas agrícolas.

Além dos trabalhos que demonstram a atuação das vespas sociais como agentes controladores biológicos de insetos-pragas, muitos trabalhos tem demonstrado a atuação destes himenópteros como agentes polinizadores muito eficientes.

Barros (1998), estudando a polinização em espécies simpátricas de *Erythroxylum*, considerou vespas dos gêneros *Brachygastra*, *Polistes*, *Polybia* e *Pepsis* como polinizadores efetivos. Nesse estudo o autor verificou que vespas destes gêneros visitavam frequentemente as flores de *Erythroxylum* durante todo o dia de forma demorada, além disso, eram capazes de contactarem os órgãos reprodutivos das flores.

Quirino e Machado (2001) evidenciaram que três espécies de vespas do gênero *Polybia* eram os visitantes mais frequentes de *Combretum pisonioides*, sendo que a espécie *P. scutellaris* foi a mais frequente dentre elas, com aproximadamente 70% das visitas. Estes autores citaram ainda que devido à forma com que estas vespas coletam o néctar, elas podem ser consideradas os principais agentes polinizadores de *C. pisonioides*.

O seu papel como polinizador reforça ainda mais a necessidade de estudos genéticos em populações do gênero *Polybia* visando seu manejo e manutenção das populações nativas e também urbanas.

Segundo O'Donnell e Jeanne (2002), estas vespas apresentam uma estrutura social bastante complexa, sendo que o número de indivíduos dentro da colônia pode ficar muito grande e o ninho ter várias rainhas, e muitas vezes, ocorre a

formação de grupos dentro do mesmo ninho, o que determina comportamentos diferentes entre estes grupos. O fato de um mesmo ninho apresentar várias rainhas diminui o grau de parentesco entre as operárias irmãs, aumentando o polimorfismo dentro da população, o que em himenópteros geralmente é muito baixo.

Segundo Machado (1984), muitos estudos foram realizados com intuito de compreender melhor a organização social e a biologia das vespas neotropicais, entretanto, são poucos os estudos básicos de análise populacional em diferentes fases do desenvolvimento, duração do ciclo e sazonalidade das colônias.

2.3. Marcadores moleculares – isoenzimas em insetos sociais

A técnica de eletroforese foi desenvolvida pelo geneticista norte americano Oliver Smithies na década de 1950, como ferramenta para a análise de proteínas do soro sanguíneo humano (Smithies, 1955). Posteriormente, tal técnica foi ampliada com o acoplamento de procedimentos bioquímicos de coloração que eram capazes de identificar a atividade enzimática das proteínas inicialmente separadas pela eletroforese, procedimento que se tornou de grande valia no estudo da variabilidade genética empregado para a análise de genética de populações naturais (Hunter e Markert, 1957).

Em 1959, Markert e Möller definiram as isoenzimas ou isozimas como formas moleculares múltiplas de uma mesma enzima, ocorrendo em vários tecidos e órgãos, que atuam sobre um mesmo substrato, porém podendo apresentar variações nas sequências polipeptídicas, pesos moleculares, cargas elétricas entre outras características. Segundo Grattapaglia e Ferreira (1996), a difusão do uso de isoenzimas ocorreu pelo desenvolvimento de métodos eficientes para a visualização do produto enzimático.

As isoenzimas, bem como as proteínas totais, representam os produtos primários dos genes, pois são frações polipeptídicas resultantes do processo de transcrição do DNA e tradução dos RNAs (Grattapaglia e Ferreira, 1996). Assim, a caracterização isoenzimática é mais precisa que a caracterização morfológica, pois a morfologia sempre é resultante de interações entre mais de um gene, mecanismos diferenciais de expressão e regulação, e a fatores ambientais (Arévalo et al., 2004).

A eletroforese de isoenzimas tem sido utilizada como ferramenta para estudo de populações naturais e cultivadas principalmente por ser uma técnica

relativamente barata e acessível, por fornecer ampla informação genética para várias aplicações, ter alta reprodutibilidade e por que vários locos podem ser analisados de forma rápida e simultânea (Augustin et al., 1999).

Outros fatores importantes, como a quantificação de níveis de variabilidade genética, estimativas de fluxo gênico, elucidação de limites interespecíficos e o estabelecimento de relações evolutivas entre diferentes táxons também contribuíram para a popularização da utilização desta técnica (Solferini e Selivon, 2001).

Algumas enzimas são determinadas por mais de um loco gênico estrutural, cada um dos quais codifica a sequência primária de um determinado polipeptídeo, que podem formar de maneira independente os componentes de um conjunto de isoenzimas; podendo ainda combinar-se com diferentes polipeptídios, para formar uma série mais complexa de isoenzimas (Hunter e Markert, 1957; Soltis e Soltis, 1990).

Diferentes tecidos podem apresentar diferenças marcantes nas quantidades dos polipeptídios produzidos pelos diferentes locos, o que pode ser caracterizado pela técnica de eletroforese.

Entre as limitações da técnica de eletroforese de enzimas está a disponibilidade de tecidos frescos ou congelados, devido ao fato de que as enzimas são rapidamente degradadas após a morte do organismo. Este fato limita a utilização desta técnica para organismos vivos e não pode ser usada para comparar indivíduos fixados em etanol ou formalina (Thorpe e Solé-Cava, 1994).

Outras limitações das isoenzimas são o polimorfismo enzimático em resposta a condições ambientais (influência das condições ambientais na atividade enzimática) e a dificuldade na interpretação de zimogramas quando isoenzimas com mobilidades eletroforéticas idênticas representam os produtos de dois locos enzimáticos distintos do mesmo sistema enzimático (Grattapaglia e Ferreira, 1996).

Dentre os sistemas isoenzimáticos mais estudados, encontram-se as esterases, devido a suas diferentes formas geneticamente determinadas por locos distintos, e por sua expressão diferencial em tecidos durante os diferentes estágios do desenvolvimento ontogenético, além da alta frequência das variantes genéticas frequentemente detectadas (Bitondi e Mestriner, 1983).

Por apresentar ampla distribuição tecidual durante o desenvolvimento dos insetos, as esterases são importantes fontes de informação genética para o estudo deste grupo, principalmente dos insetos sociais. Os autores citam ainda que as

esterases são eficientes em catalisar a hidrólise de uma ampla variedade de ésteres alifáticos e aromáticos, amidas e tioésteres, bem como em processos diferentes, como a degradação de acetatos que ocorrem entre os componentes de ferormônios (Bitondi e Mestriner, 1983).

O papel fisiológico das esterases nos insetos foi descrito através de alguns estudos, como o da esterase hormônio juvenil que participa do controle da ecdise (muda) dos insetos e artrópodes em geral (Yoo et al., 1996), da colinestrases e carboxilases que participam do processo de detoxificação de agroquímicos (Hemingway, 2000) e em outros processos como o metabolismo de lipídios (Zhu e Brindley, 1990).

A genética de populações naturais de insetos sociais vem sendo estudada por meio de isoenzimas desde os anos de 1980 até os anos atuais. Contudo, a sua aplicação no estudo de populações de vespas sociais ainda é pouco observada.

O estudo desenvolvido por Bitondi e Mestriner (1983) foi o primeiro a descrever o número de regiões de atividade das esterases ao longo do desenvolvimento ontogenético de *Apis mellifera* africanizadas.

Ruvolo-Takasusuki et al. (1997) identificaram pela primeira vez uma esterase denominada EST-1a em extratos de zangões de *Apis mellifera*, classificando-a como uma arilesterase, devido aos padrões de inibição.

Stuchi (2009) realizou a caracterização bioquímica das esterases de populações de *Tetragonisca angustula*, diferenciando suas duas subespécies: *T. angustula angustula* e *T. angustula fiebrigi*, e avaliou as alterações ocorridas na expressão gênica destas isoenzimas após a contaminação das abelhas por agroquímicos, no intuito de avaliar sua aplicabilidade como bioindicadores da presença destes agroquímicos no meio.

Importantes pesquisas envolvendo marcadores bioquímicos foram realizadas em *T. angustula* visando analisar a estrutura genética de populações desta espécie.

Castanheira e Contel (1995) avaliaram diferenças genéticas em seis sistemas isoenzimáticos em 228 colônias de *T. angustula* de cinco estados brasileiros (Mato Grosso, Bahia, Minas Gerais, São Paulo e Paraná), encontrando variação na expressão da hexoquinase, glicerol-3-fosfatase desidrogenase e malato desidrogenase, sendo que o alelo *Hk*⁸⁸ da hexoquinase foi considerado um marcador para subespécie de *T. angustula fiebrigi*. Em 2005, Castanheira e Contel

analisaram a coloração do mesepisterno e a frequência do alelo *HK*⁸⁸ em abelhas *Tetragonisca*. Este estudo permitiu verificar que há uma distribuição clinal ou mistura racial entre *T. angustula angustula* e *T. angustula fiebrigi*. Foi observado ainda, uma alta correlação entre a cor amarela do mesepisterno e a frequência do alelo *HK*⁸⁸.

Ruiz (2006) avaliou a variabilidade genética de *T. angustula* da região noroeste do Paraná por meio de isoenzimas, analisando sete sistemas enzimáticos em gel de amido: malato desidrogenase (MDH), isocitrato desidrogenase (IDH), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (G3PDH), glucose desidrogenase (GDH), glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), superóxido dismutase (SOD), glucose-fosfato-isomerase (GPI) e também o sistema isoenzimático das esterases em gel de poliacrilamida, sendo possível com a análise, separar as populações da subespécie *T. a. angustula* das populações de *T. a. fiebrigi*.

A avaliação dos padrões isoenzimáticos de esterases, malato desidrogenase, isocitrato desidrogenase, α -glicerofosfato desidrogenase (α -GPDH) e amilase (AMY) foram realizadas em colônias de formigas do gênero *Acromyemex* (Augustin et al., 1999; Diehl et al., 2002) observando uma baixa taxa de polimorfismo, fato observado frequentemente em Himenópteros sociais.

Hunt et al. (2010) avaliaram as diferenças na expressão gênica e na abundância de proteínas durante o desenvolvimento ontogenético de castas da vespa primitivamente social *Polistes metricus*, constatando diferenças na expressão gênica e na quantidade de proteínas nas larvas de fundadoras da colônia, em comparação com operárias.

O uso de marcadores moleculares em populações de insetos eussociais tem se mostrado útil para o entendimento das relações de parentesco entre as populações, para a avaliação de bioindicadores de resistência a pesticidas, no entendimento da evolução e diferenciação das castas, e pode ser útil para monitorar os padrões de desenvolvimento e migração das colônias.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AREVALO, E.; ZHU, Y.; CARPENTER, J.M.; STRASSMANN, J.E. The phylogeny of the social wasp subfamily Polistinae: evidence from microsatellite flanking sequences, mitochondrial COI sequence, and morphological characters. **Evolutionary Biology**, 4:8, 2004.

AUGUSTIN, E.; LOECK, A.E.; STORCH, G.; GRÜTZMACHER, D.D.; AFONSO, A.P.S.; GUSMÃO, L.G. Identificação de formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex* (Hymenoptera: Formicidae) através de isoenzimas. **Revista Brasileira de Agrociências**, 5:217-220, 1999.

BARROS, M.G. Sistemas reprodutivos e polinização em espécies simpátricas de *Erythroxyllum* P. Br. (Erythroxyllaceae) do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, 21:159-166, 1998.

BESHERS, S.N.; FEWELL, J.H. Models of division of labour in social insects. **Annual Review of Entomology**, 46:413-440, 2001

BITONDI, M.M.G.; MESTRINER, M.A. Esterase isozymes of *Apis mellifera*: substrate and inhibition characteristics, developmental ontogeny, and electrophoretic variability. **Biochemical Genetics**, 21:985-1002, 1983.

CARPENTER, J.M. Biogeographic patterns in the Vespidae (Hymenoptera): Two views of Africa and South America. *In*: GOLDBLATT, P. (editor). **Biological relationships between Africa and South America**. New Haven, Yale University Press, 139-155, 1993.

CASTANHEIRA, E.B.; CONTEL, E.P.B. Isoenzymes related to flight activity in *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae): Evidence of posttranslational modification of the hexokinase and detection of new glycerol-3-phosphate dehydrogenase variants. **Biochemical Genetics**, 33:365-375, 1995.

CASTANHEIRA E.B.; CONTEL E.P.B. Geographic variation in *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Journal of Apicultural Research**, 44:101-105, 2005.

COSTA-LIMA, A. **Insetos do Brasil – Hymenopteros**. São Paulo: Escola Nacional de Agronomia, 1960, 366p.

DIEHL, E.; CAVALI-MOLINA, S.; ARAÚJO, A.M. Isoenzyme variation in the leafcutting ants *Acromyrmex hayeri* and *Acromyrmex striatus* (Hymenoptera, formicidae). **Genetic and Molecular Biology**, 25(2):173-178, 2002.

DUCKE, A. Révision des guêpes sociales polygames d'Amérique. **Annales du Museun Naturelle di Hungria**, 8:449-544, 1910.

FUTUYMA, D.J. **Biologia Evolutiva**. 3. ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. Funpec, 2009. 832p.

GASTREICH, K.R.; STRASSMANN, J.E.; QUELLER, D.C. Determinants of high genetic relatedness in the swarm-founding wasp, *Protopolybia exigua*. **Ethology, Ecology & Evolution**, 5:529-539, 1993.

GOULET, H.; HUBER, J.T. **Hymenoptera of the World: An identification guide to families**. Ottawa: Agriculture Canada, 1993. 668p.

GRATTAPAGLIA, D.; FERREIRA, E.M. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa, 1996. 220p.

HANSON, P.E.; GAULD, I.D. **The Hymenoptera of Costa Rica**. New York: Oxford University Press, 1995. 893p.

HAMILTON, W.D. The genetical evolution of social behavior I. **Journal of Theoretical Biology**, 7:1-16, 1964a.

HAMILTON, W.D. The genetical evolution of social behavior II. **Journal of Theoretical Biology**, 7:17-52, 1964b.

HAMILTON, W.D. Altruism and related phenomena, mainly in the social insects. **Annual Review of Ecological Systematics**, 3:193-232, 1972.

HEMINGWAY, J. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 30:1009-1015, 2000.

HOFFMAN, E.A.; GOODISMAN, M.A.D. Gene expression and the evolution of phenotypic diversity in social wasps. **BMC Biology**, 5:23, 2007.

HUNT, J.H.; WOLSCHIN, F.; HENSHAW, M.T.; NEWMAN, T.C.; TOTH, A.L.; AMDAM, G.V. Differential gene expression and protein abundance evince ontogenetic bias toward castes in a primitively eusocial wasp. **PLoS ONE**, 5(5):1-10, 2010.

HUNTER, R.L.; MARKERT, C.L. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. **Science**, 125:1294-1295, 1957.

HYCKEL, E.R.; SCHUCK, E. Vespas e abelhas atacando a uva no alto do Vale do Rio do Peixe: o que fazer quando insetos benéficos passam a ser “pragas”. **Revista Agropecuária Catarinense**, 8:38-40, 1995.

IHERING, H. L'état des guêpes sociales du Brésil. **Bulletin de la Société Zoologique de France**. 21:159-162, 1896.

JEANNE, R.L. The swarm-founding Polistinae. *In*: ROSS, K. G.; MATTHEWS, R. W. **The Social Biology of Wasps**. Ithaca: Ed. Cornell University Press, 1991. p.191-231.

JEANNE, R.L.; GRAF, C.A.; YANDEL, B.S. Non-size-based morphological castes in a social insect. **Naturwissenschaften**, 82:296-298, 1995.

JEANNE, R.L.; BOUWMA, A.M. Scaling in nests of a social wasp: A property of the social Group. **The Biological Bulletin**, 202:289-295, 2002.

KERR, W.E. Population genetics studies in bees. II. Sex-linked genes. **Evolution**, 30:94-99, 1976.

KUDÔ, K.; TSUJITA, S.; TSUCHIDA, K.; GOI, W.; YAMANE, S.; MATEUS, S.; ITÔ, Y.; MIYANO, S.; ZUCCHI, R. Stable relatedness structure of the large-colony swarm-founding wasp *Polybia paulista*. **Behavior Ecology Sociobiology**, 58:27–35, 2005.

MACHADO, V.L.L. Aspectos da biologia de *Protopolybia pumila* (Saussure, 1863) (Hym. - Vespidae). **Revista Brasileira de Biologia**, 87:771-784, 1977.

MACHADO, V.L.L. Análise populacional de colônias de *Polybia (Myrapetra) paulista* (Ihering, 1896) (Hymenoptera, Vespidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, 2:187-201, 1984.

MACHADO, V.L.L., GOBBI, N., ALVES-JUNIOR, V.V. Material capturado e utilizado na alimentação de *Polybia sericea*. **Revista Brasileira de Zociências**, 5:261-266, 1988.

MARKET, L.; MÖLLER, F. Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic and species specific patterns. **Proceedings of the National Academy Science of the United States of America**, 45:753-763, 1959.

MOURA, M.F.; PICANÇO, M.; GONRING, A.H.R.; BRUCKNER, C.H. Seletividade de inseticidas a três vespidae predadores de *Dione juno juno* (Lepidóptera: Heliconidae). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 35:251-257, 2000.

NOLL, F.B.; ZUCCHI, R. Castes and the influence of the colony cycle in swarm-founding polistine wasps (Hymenoptera: Vespidae; Epiponini). **Insects Socioux** 49:62-74, 2002.

NOLL, F.B.; WENZEL, J.W.; ZUCCHI, R. Evolution of caste in neotropical swarm-founding wasps (Hymenoptera: Vespidae; Epiponini). **American Museum of Hystory Natural**, 3467:1-24 , 2004.

NOLL, F.B.; WENZEL, J.W. Caste in the swarming wasps: 'queenless' societies in highly social insects. **Biological Journal of the Linnean Society**, 93:509–522, 2008.

O'DONNELL, S. Dominance and polyethism in the eusocial wasp *Mischocyttarus mastigophorus* (Hymenoptera: Vespidae). **Behavioral Ecology and Sociobiology**, 43:327-331, 1998.

O'DONNELL, S.; JEANNE, R.L. The nest as fortress: defensive behavior of *Polybia emaciata*, a mud-nesting eusocial wasp. **Journal of Insect Science**, 2:3, 2002.

PAMILO, P.; ROSENGREN, R.; VEPSÄLÄINEN, K.; VARVIO-AHO, S.L.; PISARSKI, B.. Population genetics of *Formica* ants. I. Patterns of enzymes gene variation. **Hereditas**, 89:233-248, 1978.

PICANÇO, M.; RIBEIRO, L.J.; LEITE, G.L.D.; GUSMÃO, M.R. Seletividade de inseticidas a *Polybia ignobilis* (Haliday) (Hymenoptera: Vespidae) Predador de *Ascia monuste orseis* (Godart) (Lepidoptera: Pieridae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, 27:85-90, 1998.

QUIRINO, Z.G.M.; MACHADO, I.C. Biologia da polinização e da reprodução de três espécies de *Combretum* Loefl. (Combretaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, 24:181-193, 2001.

RAPOSO-FILHO, J.R.; RODRIGUES, V.M. Comportamentos tróficos de *Myschocyttarus (Monocyttarus) extinctus* Zikán, 1935 (Polistini, Vespinae). II. Alimentação Glucídica. **Naturalia**, 8:105-107, 1983.

RESENDE, J.J.; SANTOS, G.M.M.; BICHARA-FILHO, C.C.; GIMENES, M. Atividade diária de busca de recursos pela vespa social *Polybia occidentalis occidentalis* (Olivier, 1791) (Hymenoptera, Vespidae). **Revista Brasileira de Zoociências**, 3:105-115, 2001.

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

RUIZ, J.B. **Análise genética de populações em *Tetragonisca angustula* na região noroeste do Paraná por meio de isoenzimas**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2006. 59p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento).

RUPPERT, E.E.; BARNES, R.T. **Zoologia dos Invertebrados**. 6ª ed. São Paulo: Roca, 1996. 1029p.

RUVOLO-TAKASUSUKI, M.C.C.; DEL LAMA, M.A.; SOARES, A.E. Genetic characterization of a new *Apis mellifera* esterase. **Apidologie**, 28:259-267, 1997.

SANTOS, L.P.; RESENDE, J.J.; SANTOS, G.M.M.; BICHARA-FILHO, C.C.; REIS, V.P.G.S. Seletividade de inseticidas a *Polybia (Trichothorax) sericea* (Olivier, 1791) (Hymenoptera, Vespidae) em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Zoociências**, 5:33-44, 2003.

SCHMIDT, J.O. Biochemistry of insect venoms. **Annual Review of Entomology**, 27:339-368, 1982.

SCHMITZ, J.; MORITZ, R.F.A. Molecular phylogeny of Vespidae (Hymenoptera) and the evolution of sociality in wasps. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 9(2):183–191, 1998.

SILVA, A.G.A.; GONÇALVES, C.R.; GALVÃO, D.M.; GONÇALVES, A.J.L.; GOMES, J.; SILVA, M.N.; SIMONI, L. **Quarto catálogo dos insetos que vivem nas plantas**

do Brasil – seus parasitos e predadores. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura, Departamento de Defesa e Inspeção Agropecuária, 1968. 622p.

SMITHIES, O. Zone electrophoresis in starch gels: group variation in the serum proteins of normal human adults. **Biochemical Journal**, 61:620-641, 1955.

SOLFERINI, V.N.; SELIVON, D. Polimorfismo de isozimas. In: MATIOLI, S.R. (ed.). **Biologia molecular e evolução.** Ribeirão Preto: Holos, 2001, 137-142.

SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S. Isozyme evidence for ancient polyploidy in primitive angiosperms. **Systematic Botany**, 15:328-337, 1990.

SOUZA, B.M.; SILVA, A.V.R.; RESENDE, V.M.F.; ARCURI, H.A.; SANTOS-CABRERA, M.P.; RUGGIERO-NETO, J.; PALMA, M.S. Characterization of two novel polyfunctional mastoparan peptides from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. **Peptides**, 30(8):1387-1395, 2009.

STRASSMANN, J.E.; GOODNIGHT, K.F.; KLINGER, C.J.; QUELLER, C.R. The genetic structure of swarms and the timing their production in the queens cycles of Neotropical wasps. **Molecular Ecology**, 7:709-718, 1998.

STUCHI, A.L.P.B. **Toxicidade e expressão gênica em abelhas do gênero *Tetragonisca* após a contaminação com agrotóxicos.** Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2009. 101p. Tese (Doutorado em Zootecnia – Produção Animal).

THORPE, J.P.; SOLE-CAVA, A. M. The use of electrophoresis in Invertebrate taxonomy. **Zoologica Scripta**, 23:3-18, 1994.

WEST-EBERHARD, M.J. Temporary queens in *Metapolybia* wasps: non-reproductive helpers without altruism? **Science**, 200:441-443, 1978.

WEST-EBERHARD, M. J. Intragroup selection and the evolution of insects societies. In: ALEXANDER, R. D. **Tinkle Natural selection and social behavior.** New York: Ed Chiron Press, 3-17, 1981.

WILSON, E.O. **The insect societs.** Cambridge, Mass; London: Harvard University, 1971. 548p.

WILSON, E.O.; HOLLDOBLER E. Eusociality: Origin and consequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 102(38):13367-13371, 2005.

YOO, C.M.; CHUN, B.B.; HYUNG, C.L. Substrate and inhibitor specificities of esterase in *Lucilia illustris*. **Korean Journal of Zoology**, 39:110-117, 1996.

ZHU, K.Y.; BRINDLEY, W.A. Properties of esterases from *Lygus Hesperus* Knight (Hemiptera: Miridae) and the roles of the esterases in insecticide resistance. **Journal of Economic Entomology**, 83:725-727, 1990.

CAPÍTULO I - Caracterização do perfil eletroforético das esterases e proteínas totais em *Polybia paulista* (Ihering, 1896)

RESUMO

O estudo de populações de Himenópteros, principalmente insetos sociais, através de marcadores moleculares tem sido conduzido com o objetivo de caracterizar e compreender a estrutura genética das populações, o desenvolvimento das castas durante a ontogênese e melhorar a compreensão sobre os ciclos reprodutivos da colônia. O uso de marcadores moleculares como as isoenzimas e de frações de proteínas totais, que representam os produtos primários dos genes, é mais eficiente e refinado que as caracterizações morfológicas, além de ser uma técnica versátil para detectar variação genética e auxiliar no estudo da genética de populações. Neste estudo, foi utilizada a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) para caracterizar o perfil eletroforético das esterases e proteínas totais (SDS-PAGE) em *Polybia paulista*, observando as fases do desenvolvimento ontogenético do inseto (larvas de último instar, pré-pupas, pupas de olho branco, pupas de olho marrom, pupas de olho preto e adulto) obtendo um total de dez esterases, denominadas de acordo com a mobilidade eletroforética em EST-1 para a esterase que apresentou maior mobilidade e EST-10 para a de menor mobilidade. Através dos testes de inibição, foi possível classificar as esterases em Carboxilesterase (EST-2, EST-3, EST-4 e EST-5), Acetilesterase (EST-7 e EST-8), Arilesterase (EST-9) e Colinesterase do tipo II (EST-10). Durante a análise das esterases da vespa *P. paulista*, foram observadas três esterases, que aparecem em região intermediária entre as enzimas EST-6 e EST-7. Tais esterases apareciam esporadicamente nos géis, e uma investigação mais profunda revelou tratar-se de esterases de larvas de formigas da subfamília Dolichoderinae, que se desenvolviam dentro do abdome da vespa *P. paulista*. Tais esterases foram denominadas EST-P1 a EST-P3, também de acordo com sua mobilidade eletroforética. Quanto às análises das proteínas totais, foram observadas 36 bandas, sendo que cada banda corresponde a uma cadeia polipeptídica. As proteínas reveladas mostraram variação entre 20 kDa a mais de 220 kDa, com polipeptídios mostrando polimorfismo entre 50 e 60 kDa, entre 70 e 80 kDa e entre 100 e 120 kDa. O estabelecimento do perfil eletroforético das esterases

permitirá trabalhos futuros voltados para a bioindicação da presença de xenobióticos no ambiente, bem como o polimorfismo das proteínas totais podem ser utilizados como marcadores moleculares para esta espécie de vespa eussocial.

Palavras-chave: Marcadores moleculares, vespas, variabilidade genética.

ABSTRACT

The study of populations of Hymenoptera, particularly social insects, through the use of molecular markers, has been conducted with the aim of characterizing and understanding the genetic structure of the populations, the development of the castes during the ontogenesis and enhancing the knowledge on the reproductive cycles of the colony. The use of molecular markers, such as isoenzyme and total protein fractions, which represent the primary products of the genes, is more efficient and refined than the morphological characterizations. Moreover, it is a versatile technique to detect genetic variation and to help the study of the genetics of populations. In this study, the polyacrylamide gel electrophoresis technique (PAGE) was used to characterize the electrophoretic profile of the esterases and total proteins (SDS-PAGE) in *Polybia paulista*, observing the stages of the ontogenetic development of the insect (last instar larvae, prepupae, white-eyed pupae, brown-eyed pupae, black-eyed pupae and adult), obtaining ten esterases, identified according to the electrophoretic mobility in EST-1 to the esterase that presented the highest mobility and EST-10 to the one that presented the lowest mobility. Through inhibition tests, the esterases were classified in Carboxylesterase (EST-2, EST-3, EST-4 and EST-5), Acetylerase (EST-7 and EST-8) and Arylerase (EST-9), and Type II Cholinesterase (EST-10). During the analysis of the esterases of wasps *P. paulista*, three esterases were observed, appearing in the intermediate region between the enzymes EST-6 and EST-7. These esterases appeared occasionally in the gels, and further investigation showed that they were esterases of ant larvae of the subfamily Dolichoderinae, developed inside the abdomen of the wasp *P. paulista*. These esterases were designated EST-P1 to EST-P3, also according to the electrophoretic mobility. Regarding the total protein analyses, 36 bands were observed, each band corresponding to a polypeptide chain. The proteins showed a variation between 20 kDa to over 220 kDa, with polypeptides showing polymorphism between 50 and 60 kDa, between 70 and 80 kDa and between 100 and 120 kDa. The establishment of the electrophoretic profile of the esterases will enable future works concerning the bioindication of the presence of xenobiotics in the environment, as well as the polymorphism of the total proteins can be used as molecular markers to this type of eusocial wasp.

Key words: Molecular markers, wasps, genetic variability.

1. INTRODUÇÃO

As vespas neotropicais sociais estão entre os principais agentes polinizadores das plantas nativas e cultivadas encontradas na Região Neotropical, sendo que algumas destas vespas constituem os únicos agentes polinizadores de algumas plantas, como a *Spondias tuberosa* e *Ziziphus joazeiro*, ambas são espécies endêmicas de regiões de caatinga (Quirino e Machado, 2001). Além disso, devido ao hábito herbívoro-carnívoro das vespas, estas são muito úteis no controle biológico de pragas (Quirino e Machado, 2001). Como ocorre no controle da praga do maracujá (*Passiflora edulis*) a lepidóptera *Dione juno juno*, cujas lagartas servem de alimento para várias espécies do gênero *Polybia* (Moura et al., 2000).

Dentre as espécies de vespas sociais encontradas no Brasil, está a *Polybia (Myrapetra) paulista* (Ihering, 1896), encontrada em vários estados brasileiros, principalmente no Paraná, São Paulo e Minas Gerais.

No Brasil, as vespas do gênero *Polybia* são, de uma maneira geral, conhecidas como Marimbondo Inchu (origem da palavra: inseto que pica; em Tupi-Guarani: mel de abelha rugoso, devido ao mel de sabor desagradável fabricado pela vespa), denominação atribuída pelos povos indígenas e incorporada pela população em geral.

A morfologia da vespa *Polybia paulista* apresenta um ferrão na porção terminal do abdome, ligada a uma glândula produtora de veneno, que a vespa utiliza na defesa do ninho. Souza et al. (2005) caracterizaram a estrutura molecular de duas toxinas peptídicas presentes no veneno destas vespas como substâncias com ação anti-inflamatória e antibiótica.

Quanto ao ciclo de vida das colônias, frequentemente a *P. paulista* tem sido caracterizada como uma espécie que apresenta poliginia (varias rainhas), porém, tem sido observado padrão de oligoginia (poucas rainhas) em algumas fases do ciclo de vida do ninho (Noll et al., 2004).

O estudo de populações de Himenópteros, principalmente insetos sociais, através de marcadores moleculares tem sido conduzido com o objetivo de caracterizar e compreender a estrutura genética das populações.

A caracterização e o estudo de populações naturais com uso de marcadores moleculares, isoenzimas e de frações de proteínas totais, que representam os

produtos primários dos genes, é mais eficiente e refinado que as caracterizações morfológicas, além de ser uma técnica versátil para detectar variação genética e auxiliar no estudo da genética de populações.

Em *P. paulista* ainda não foram realizados estudos utilizando marcadores moleculares isoenzimáticos e, apesar da evidente importância ecológica e econômica desta vespa, nada se sabe sobre as características genéticas que determinam os padrões isoenzimáticos das populações de *P. paulista*. Assim faz-se necessário a realização de estudos visando elucidar o papel de isoenzimas, como as esterases, na determinação de castas e seu funcionamento na tolerância de agroquímicos presentes no ambiente, determinando a possibilidade de utilização de tais vespas como bioindicadores da presença de xenobióticos, por exemplo.

Desta forma, o presente trabalho utilizou a técnica de eletroforese de proteínas com objetivo de caracterizar o perfil das isoenzimas esterases e das proteínas solúveis presentes na vespa *P. paulista* visando ampliar a compreensão das características genéticas da espécie.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Material

Doze ninhos de *P. paulista* foram coletados nos municípios de Umuarama-PR (5 ninhos), em sua área urbana (3 ninhos) e rural (2 ninhos), Maria Helena-PR (2 ninhos) e Maringá-PR (5 ninhos), apenas na área urbana. A análise de ninhos coletados em área urbana e rural foi realizada com a finalidade de avaliar se havia discrepância nos padrões isoenzimáticos das esterases observadas, devido ao fato de agentes ambientais (como agroquímicos) interferirem na expressão destas isoenzimas.

Os materiais coletados (ninhos e indivíduos) foram submetidos ao congelamento, com posterior separação dos indivíduos por estágio de desenvolvimento.

Para caracterizar o perfil eletroforético das esterases da espécie nos diversos estágios de desenvolvimento, todos os ninhos coletados foram submetidos a corrida eletroforética, utilizando em cada corrida três indivíduos adultos, três pupas de olhos pretos, três pupas de olhos marrons, três pupas de olho branco, três pré-pupas e três larvas de último instar de cada ninho. No total, cada gel contava com 18 amostras provenientes de um único ninho. Cada amostra utilizada para caracterizar o perfil das esterases foi utilizada também para caracterização das proteínas totais em gel SDS-PAGE.

Para realização dos testes de inibição, foram utilizados 20 indivíduos adultos de cada ninho. Foram feitas seis repetições dos testes de inibição, utilizando em três delas, indivíduos coletados em Umuarama-PR e nas outras três, indivíduos coletados em Maringá-PR, com a finalidade de observar possíveis variações nos dois pontos de coleta.

Para confirmar a identificação das vespas, amostras de todos os ninhos coletados foram acondicionadas em solução de álcool à 70% e enviadas para o Prof. Dr. Edilberto Giannotti (Universidade Estadual Paulista, campus Rio Claro-SP). Todos os demais indivíduos que não foram utilizados nas análises iniciais foram estocados a -20°C.

2.2. Preparo das amostras – esterases

2.2.1. Fases do desenvolvimento – imaturos

Para as análises eletroforéticas das esterases foram utilizadas vespas adultas imaturas, pupas de olho preto, pupas de olho marrom, pupas de olho branco, pré-pupas e larvas de último instar, sendo três indivíduos de cada fase, perfazendo um total de 18 amostras por eletroforese em gel de poliacrilamida. Para estudo das isoenzimas nos adultos foram utilizadas as cabeça/tórax das vespas, devido à presença de proteases no trato digestivo que poderiam degradar as esterases. Já para o estudo das pupas, pré-pupas e larvas, foi utilizado o indivíduo inteiro.

As amostras foram colocadas individualmente em tubos de propileno contendo 60 μL de solução contendo β -mercaptoetanol a 0,1% mais glicerol a 10% para adultos, e 30 μL de solução contendo β -mercaptoetanol a 0,1% mais glicerol 10%, acrescidos de 30 μL de tetracloreto de carbono, com a finalidade de precipitar a gordura presente no corpo gorduroso das pupas e larvas. Em seguida as amostras foram maceradas em banho de gelo, com auxílio de um bastão de vidro e centrifugadas em centrífuga refrigerada a 4°C por 10 minutos a 12000xg.

Após a centrifugação, foram aplicados nos poços do gel, 20 μL do sobrenadante de cada uma das 18 amostras e estas foram submetidas à separação por eletroforese.

2.2.2. Adultos

Nesse teste foram utilizados seis adultos, onde cabeça, tórax e abdome foram separados, e macerados em banho de gelo, individualmente em tubos de propileno contendo 30 μL de solução contendo β -mercaptoetanol a 0,1% mais glicerol a 10%, para cabeça e tórax, e 40 μL da solução para macerar o abdome. As amostras foram maceradas com auxílio de um bastão de vidro e centrifugadas a 4°C por 10 minutos a 12000xg. Após a centrifugação, foram aplicados nos poços do gel, 20 μL do sobrenadante de cada amostra e estas foram submetidas à separação por eletroforese.

2.2.3. Formigas Dolichoderinae parasita da vespa *P. paulista* – larva e adulto

Larvas de formigas da subfamília Dolichoderinae foram encontradas dentro do abdome das vespas *P. paulista* de todos os ninhos coletados em Umuarama e Maria Helena, e de dois ninhos coletados em Maringá. Já as formigas aladas adultas, foram encontradas apenas dentro de um ninho coletado na zona rural de Umuarama.

A identificação das esterases de Dolichoderinae foi realizada utilizando abdomes de vespas *P. paulista* parasitados pelo inseto, larvas retiradas do abdome das vespas e o inseto adulto parasita do ninho de *P. paulista*.

Para a preparação das amostras de abdomes de *P. paulista* parasitado com as larvas de Dolichoderinae, repetiu-se o procedimento descrito no item 2.2.2. acrescentando a solução 20 μ L de tetracloreto de carbono, para precipitar a gordura presente no corpo gorduroso da larva do parasita.

Para o isolamento das amostras de larvas de Dolichoderinae, abdomes de *P. paulista* adultas foram dissecados com auxílio de um estereoscópio, e as larvas retiradas dos abdomes. As amostras foram colocadas em tubo de propileno contendo 15 μ L de solução contendo β -mercaptoetanol a 0,1% mais glicerol a 10% e 15 μ L de solução de tetracloreto de carbono para precipitar a gordura presente no corpo gorduroso da larva.

Já as amostras de formigas Dolichoderinae adultas, encontradas no ninho coletado em Umuarama, foram homogeneizadas em tubo de propileno contendo 30 μ L de solução contendo β -mercaptoetanol a 0,1% mais glicerol a 10%.

Todas as amostras foram maceradas com auxílio de um bastão de vidro e centrifugadas a 4°C por 10 minutos a 12000xg. Após a centrifugação, foram aplicados nos poços do gel aproximadamente 20 μ L do sobrenadante de cada amostra e estas foram submetidas à separação por eletroforese.

2.3. Fracionamento das esterases

O fracionamento das esterases em gel de poliacrilamida 9% (PAGE - Polyacrylamide Gel Electrophoresis) foi realizado em 200V por 5 horas, e o tampão empregado foi Tris-Glicina 0,1M pH 8,3.

Após o fracionamento das esterases, o gel foi incubado por 30 minutos em 50 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 6,2. Durante o período de incubação do gel, a solução de coloração foi preparada da seguinte forma: 0,06g de Fast Blue RR Salt foi dissolvido em 50 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 6,2 e 5 mL de N-propanol; após a dissolução, a solução foi filtrada em algodão e adicionada a ela 0,02g β -naftil acetato e 0,03g de α -naftil acetato, dissolvidos em 1 mL de acetona.

Após a retirada do tampão de incubação, as esterases foram evidenciadas adicionando-se a solução de coloração, mantendo o gel incubado no escuro até a completa visualização das bandas.

Após a revelação das esterases os géis foram mantidos em temperatura ambiente, durante 24 horas em uma solução fixadora contendo 7,5% de ácido acético e 0,1% de glicerol dissolvidos em 1000mL de água destilada. Após a fixação, os géis foram embebidos em gelatina a 5% acondicionados entre duas folhas esticadas de papel celofane e colocados para secagem num período de 24-48 horas.

A esterase que apresentou maior mobilidade eletroforética foi denominada de EST-1 e a de menor mobilidade EST-10.

2.4. Testes de inibição

Utilizando a mesma metodologia de preparação de amostras empregada para os indivíduos adultos, foram preparadas as amostras para realização dos testes de inibição. A mesma amostra foi aplicada duas vezes no mesmo gel, uma utilizada como controle e outra para o teste de inibição. Foram feitos três testes de inibição. Para realizar a coloração, inicialmente o gel foi cortado em duas partes (controle e inibição), e cada parte do gel foi incubada por 30 minutos em 50mL da solução de tampão fosfato de sódio (0,1M; pH 6,2). Neste tampão de incubação para o teste foi acrescentado o inibidor a ser testado: o organofosforado Malathion (20 μ L), para-cloromercuriobenzoato (p -CMB – 0,020g) ou sulfato de eserina (0,0324 g). Após o período de incubação, o tampão foi descartado, e o gel foi corado acrescentando a solução de coloração conforme descrita no item 2.3; os inibidores foram adicionados à solução de coloração dos géis de teste nas concentrações citadas anteriormente. Após a visualização das bandas no gel de controle, foi realizada uma comparação com os géis de teste de inibição para classificação das esterases.

Segundo Healy et al. (1991), as esterases em insetos podem ser classificadas em quatro classes baseadas na sensibilidade aos inibidores organofosforados, sulfato de eserina e reagentes sulfidríla. Conforme a classificação proposta, as carboxilesterases são inibidas pelos organofosforados, mas são insensíveis ao sulfato de eserina; as colinesterases são sensíveis aos organofosforados e ao sulfato de eserina; as arilesterases não são inibidas por organofosforados, mas são sensíveis aos reagentes sulfidríla e as acetilesterases não são inibidas pelos três grupos de inibidores.

Ainda segundo Healy et al. (1991), as colinesterases podem ser divididas em duas subclasses (I e II) de acordo com seu padrão de inibição com relação ao p-CMB. Colinesterase inibida pelo p-CMB pertence à subclasse II, e a não inibida pertence à subclasse I.

2.5. Eletroforese das proteínas totais (SDS-PAGE)

Para a análise das proteínas totais foram utilizadas as cabeças/tórax de indivíduos adultos de *P. paulista*. As amostras foram maceradas individualmente com o auxílio de bastão de vidro em microtubos de propileno, contendo 35 µL da solução de β-mercaptoetanol a 0,1% mais glicerol a 10%, sendo centrifugadas a seguir a 12.000xg por 30 min, a uma temperatura de 4°C. Após a centrifugação, 20 µL do sobrenadante foram transferidos para microtubos de 200 µL e acrescentada a mesma quantidade de tampão Tris-HCl (1,5M, pH 8.8) contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) 10%, glicerol 20%, β-mercaptoetanol 2%, azul de bromofenol 0,01%. A seguir, as amostras foram aquecidas em banho-maria à 100°C por 3 min, após este tratamento as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida à 9% para o fracionamento das proteínas sob um campo elétrico.

A eletroforese vertical foi realizada utilizando gel SDS-PAGE a 10% e gel de empilhamento a 5%. A corrida eletroforética foi realizada em uma voltagem de 90V com tampão Tris-Glicina 0,1 M pH 8,3 mais SDS a 10%, até que o fronte com azul de bromofenol saísse do gel.

A coloração foi feita incubando-se os géis em solução preparada com 100 mg de comassie brilhante blue e 100 mL de solução PAGE (etanol 45%, ácido acético glacial 10% e água destilada 45%) por um período mínimo de 36 horas.

Após esse período, os géis foram descorados com sucessivas lavagens com solução PAGE até a completa visualização das proteínas.

Após a coloração, os géis foram acondicionados em solução conservante por 24 horas e submetidos a secagem como descrito no item 2.3.

As análises dos géis foram feitas por meio de comparação com um marcador de peso molecular de proteínas (Benchmark Protein Ladder – Invitrogen, 10 a 220 KDa).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização das esterases em *P. paulista*

Em *P. paulista* foram observadas dez esterases na análise eletroforética de extratos de cabeça/tórax de adultos, pupas, pré-pupas e larvas, denominadas numericamente de acordo com sua mobilidade eletroforética (Figura 1).

O número de esterases identificadas em insetos tem se mostrado muito variável. Segundo Stuchi (2009), em estudo utilizando marcadores isoenzimáticos em abelha sem ferrão *Tetragonisca angustula* foi possível identificar quatro esterases quanto ao padrão de migração. Já em *Acromirmex niger*, Cantagalli et al. (2010) identificaram oito regiões de atividade esterásica. Em vespas são escassos os trabalhos utilizando isoenzimas. Machado e Contel (1991) analisaram a variação da enzima glicose-3 fosfato desidrogenase (G3PDH) na abelha *Tetragona clavipes* e nas vespas *Polybia paulista* e *P. sericea*, não observando a presença de mais de um alelo da enzima nas abelhas, e encontrando variação apenas nas larvas das vespas.

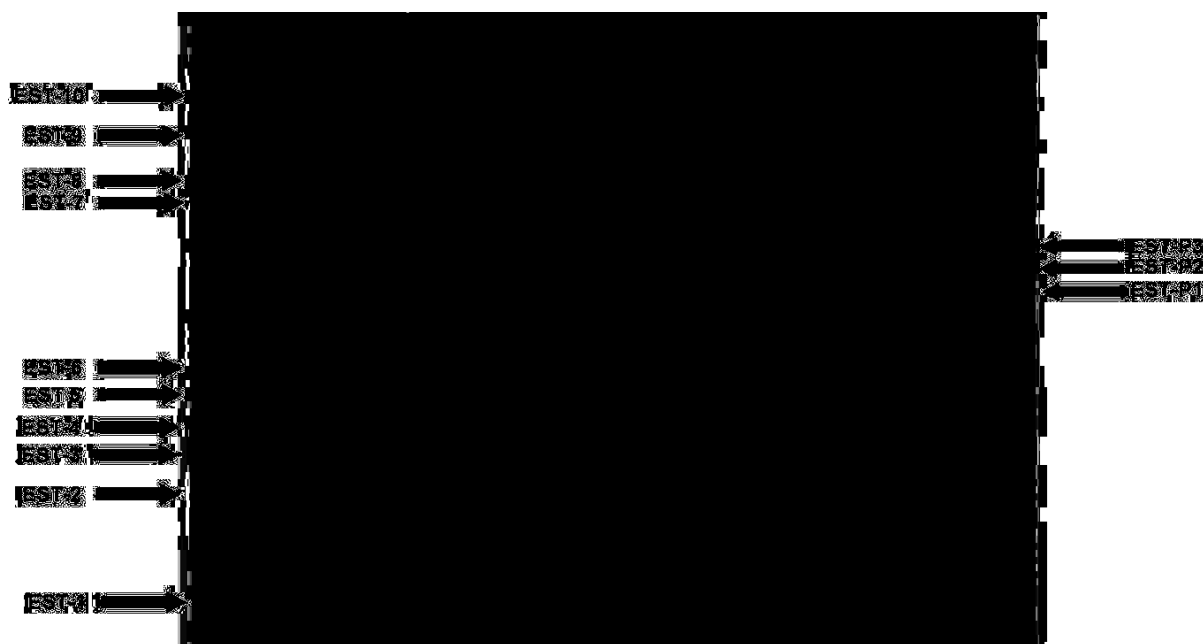


Figura 1 – Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida de esterases detectadas em *P. paulista* utilizando os substratos α e β -naftil acetato. Indivíduos 1-3: adultos utilizando apenas cabeça/tórax; 4-6: pupas de olho preto; 7-9 pupas de olho marrom; 10-12 pupas de olho branco; 13-15 pré-pupas; 16-17 larvas.

A EST-9 é uma β -esterase, pois hidrolisou apenas o substrato β -naftil acetato, enquanto as demais esterases utilizaram os substratos α e β -naftil acetato sendo consideradas $\alpha\beta$ -esterases.

As EST-1, EST-2, EST-3, EST-4 foram detectadas nas fêmeas adultas. As EST-5 e EST-6 tiveram maior intensidade em pupa de olho preto e fêmeas adultas. A atividade das EST-7 e EST-8 foi observada com maior intensidade nas pupas e pré-pupas, com intensidade muito baixa em adultos e não foram detectadas nas larvas. A EST-10 foi detectada nas larvas de último instar e nas pré-pupas. Tais resultados sugerem a existência de relação de expressão específica entre o estágio do desenvolvimento e a esterase.

Extratos de cabeça, tórax e abdome das fêmeas adultas foram submetidos a eletroforese para verificar se há expressão diferencial das esterases dependendo da parte do corpo. EST-1 é instável tendo sido detectada em algumas análises, principalmente nos géis realizados com extratos de tórax. As esterases 2, 3, 4 e 5 foram melhor visualizadas em extratos de tórax. A EST-6 foi identificada em extratos de cabeça, tórax e abdome, sem alteração na sua intensidade. A EST-9 foi melhor visualizada em extratos de abdome.

Um zimograma (Figura 2) foi elaborado para demonstrar o perfil eletroforético das esterases de fêmeas adultas, das pupas e das larvas de *P. paulista*, bem como para evidenciar as esterases das formigas parasitas.

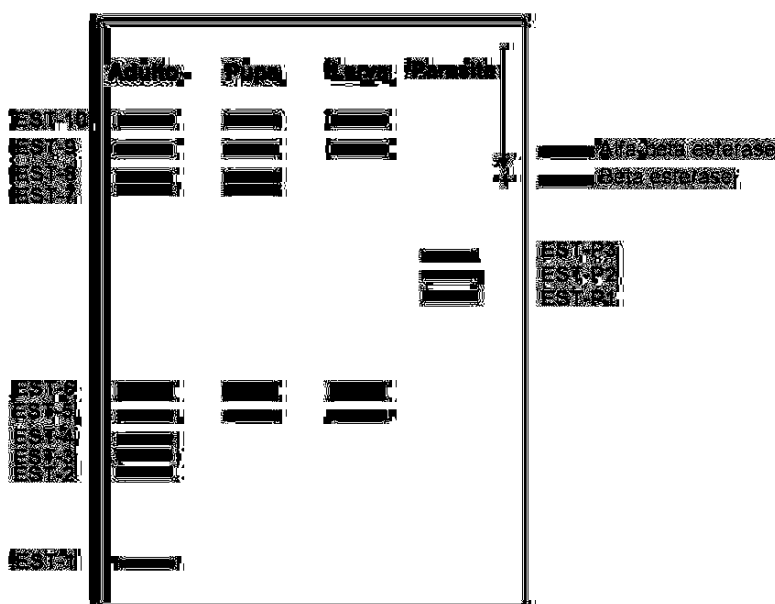


Figura 2 - Zimograma do perfil eletroforético das esterases de *P. paulista* e do inseto parasita.

Em um ninho de *P. paulista* coletado em Umuarama, foi verificado a presença de formigas da subfamília Dolichoderinae. Nesse ninho foi observado ainda que muitas fêmeas de vespa estavam parasitadas por essas formigas. As análises eletroforéticas de fêmeas adultas parasitadas, das formigas adultas presentes nos ninhos e das formas jovens que estavam parasitando as vespas, permitiram identificar o perfil eletroforético das esterases das Dolichoderinae. Até o momento não foi possível identificar a espécie pelo fato das asas dos adultos estarem danificadas.

Na figura 3, pode ser observado que as formigas Dolichoderinae apresentaram três esterases denominadas de EST-P1 (maior mobilidade eletroforética), EST-P2 e EST-P3 (menor mobilidade eletroforética). As três isoenzimas são $\alpha\beta$ -esterases. Nessa figura pode-se observar que os indivíduos 9, 12 e 13 são heterozigotos para a EST-P1 apresentando padrão de duas bandas, permitindo sugerir que esta isoenzima é monomérica. As outras duas esterases não apresentaram polimorfismo impossibilitando até o momento inferir sobre a sua estrutura tridimensional.

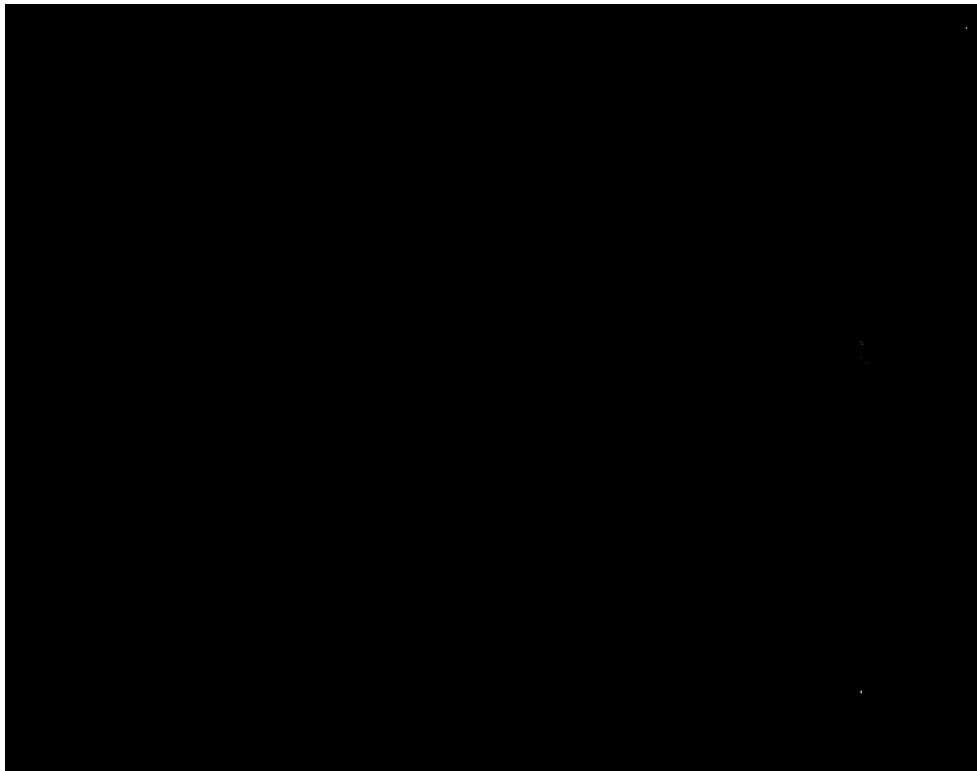


Figura 3 - Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida de esterases detectadas em *P. paulista*, no inseto invasor do ninho das vespas e na vespa parasitada, utilizando os substratos α e β -naftil acetato: 1-6 e 15: *P. paulista* adulta sem parasita, 7-14: formigas Dolichoderinae adultas, 16: *P. paulista* adulta parasitada.

Fato que chamou a atenção nessa análise foi que as esterases das formigas apresentaram padrão de migração entre as isoenzimas de *P. paulista* não havendo sobreposição de regiões. Essas observações requerem o desenvolvimento de um estudo mais detalhado sobre a genética e a interação entre esses dois grupos de Hymenoptera.

A análise eletroforética submetendo as amostras aos inibidores Malathion (organofosforado), paracloromercuriobenzoato (ρ -CMB), e Sulfato de Eserina permitiu classificar as esterases de acordo com Healy et al. (1991), em quatro grupos: EST-2, EST-3, EST-4 e EST-5 como Carboxilesterases, pois foram inibidas pelo Malathion, mas se mostraram insensíveis ao Sulfato de Eserina; a EST-10 foi classificada como Colinesterase da subclasse II, pois mostrou-se sensível ao Malathion, ao Sulfato de Eserina e ao ρ -CMB; as EST-7 e EST-8 foram classificadas como Acetilesterase por não terem sido inibidas por nenhum dos três grupos de inibidores; e a EST-9 foi classificada como Arilesterase por ser insensível ao Malathion, porém inibida pelo ρ -CMB, conforme mostra o Quadro 1. Não foi possível classificar a EST-6, pois o padrão de inibição não seguiu o proposto por Healy et al. (1991), já a EST-1 não foi visualizada nos testes realizados.

Quadro 1 - Classificação das esterases detectadas em extratos de cabeça/tórax de adultos de *P. paulista*, de acordo com o padrão de inibição com organofosforado malathion, sulfato de eserina e ρ -CMB (paracloromercurioben-zoato). (+) inibição; (+/-) inibição parcial; (-) sem inibição; (nv) não visualizado

Esterases	Malathion	ρ -CMB	Sulfato de Eserina	Classificação
EST-1	nv	nv	nv	-
EST-2	+/-	-	-	Carboxilesterase
EST-3	+/-	-	-	Carboxilesterase
EST-4	+/-	-	-	Carboxilesterase
EST-5	+/-	-	-	Carboxilesterase
EST-6	-	-	+	-
EST-7	-	-	-	Acetilesterase
EST-8	-	-	-	Acetilesterase
EST-9	-	+	+/-	Arilesterase
EST-10	+	+	+	Colinesterase (II)

As colinesterases e as carboxilesterases têm sido relatadas como as mais frequentes em insetos devido ao seu papel na detoxificação de compostos

xenobióticos, participando da resistência aos inseticidas em diversos grupos de insetos (Beckel et al., 2006). Portanto, as enzimas detectadas podem estar agindo em resposta ao contato ou ingestão de inseticidas. Essa hipótese poderá ser considerada em futuros estudos empregando bioensaios com inseticidas.

Hsu et al. (2008) verificaram alterações na estrutura e atividade em uma acetilcolinesterase da mosca da fruta *Bactrocera dorsalis*, que conferia a esta espécie resistência ao organofosforado fenitrothion. Para Hemingway (2000), a atividade das esterases constitui o mecanismo metabólico primário que confere tolerância a diversos inseticidas, principalmente aos organofosforados, carbamatos e piretróides. Paiva (2006) analisando linhagens de *Aedes aegypti* resistentes a inseticidas, verificou alteração nos níveis de α e β -esterases em resposta ao organofosforado temephos, demonstrando a atividade das esterases nos mecanismos de resistência a este inseticida.

Segundo Santana-Reis (2000) e Santos et al. (2003), vespas do gênero *Polybia* são ferramentas úteis no controle de pragas agrícolas, sendo utilizadas em conjunto com pesticidas seletivos, que atacam a praga, sem prejuízo ou com pouco prejuízo ao agente controlador biológico. Alguns estudos têm sido conduzidos com o intuito de determinar pesticidas seletivos, para uso em conjunto com vespas do gênero *Polybia* para o controle de pragas como a *Dione Juno juno* (Lepidoptera que ataca o maracajueiro), entre outras (Picanço et al., 1998; Moura et al., 2000; Prezoto et al., 2006). Conhecer as esterases que tais vespas apresentam pode permitir compreender os mecanismos de resposta a contaminação com agroquímicos, inclusive a utilização desses insetos sociais como bioindicadores.

A análise das frações de proteínas totais, obtidas a partir dos extratos de cabeça/tórax de adultos de *P. paulista*, revelou um grande número de peptídeos (bandas), num total foram detectadas 36 bandas. O tamanho dos peptídeos variou entre 20 kDa a mais de 220 kDa, com polipeptídios mostrando polimorfismo (Figura 4). As regiões polimórficas apresentaram tamanhos entre 50 e 60 kDa, entre 70 e 80 kDa e entre 100 e 120 kDa (setas – Figura 4).

Albert et al. (1996) caracterizaram em operárias nutrizes de *A. mellifera* polimorfismo para as proteínas principais da geleia real-3 (MRJP3). Essas proteínas fazem parte da constituição da geleia real apresentando peso molecular entre 60 e 70 kDa. Baitala et al. (2010) desenvolveram estudo com a MRJP3 e associaram os polimorfismos dessas proteínas com a produção de geleia real. Esses resultados

mostram a importância das informações obtidas através da análise das proteínas totais da espécie. Stuchi (2009) realizou um bioensaio com populações de *T. angustula* visando a utilização dessas abelhas como bioindicadores da presença de agroquímicos no ambiente. Nos bioensaios com os agrotóxicos fipronil, neem, malathion e thiamethoxan, verificou que o malathion na concentração 0,0017% causou o desaparecimento de um peptídeo denominada p19 (70-80 kDa), peptídeo que poderá ser utilizado como marcador para a presença do agroquímico no meio.



Figura 4 - Perfil eletroforético das proteínas totais de extratos de cabeça/tórax de fêmeas adultas de *P. paulista*. M = Marcador de peso molecular, 1-19 = extratos de cabeça/tórax submetidos a eletroforese SDS-PAGE.

No presente estudo também foi possível observar uma variação na intensidade das bandas com peso molecular entre 20 e 40 kDa, 70 a 90 kDa e também nos polipeptídeos de 120 kDa. Tais variações podem ser explicadas pela presença de machos entre as amostras, pois como a espécie apresenta sistema reprodutivo haplodiploide, machos (haplóides) devem apresentar os mesmos peptídeos, porém em intensidade menor que as fêmeas (diplóides).

Sendo assim, os polimorfismos detectados nas análises das proteínas totais de *P. paulista* necessitam de novos estudos para identificação e caracterização do papel dessas moléculas no desenvolvimento e na fisiologia dessas vespas.

4. CONCLUSÕES

O perfil eletroforético das esterases de *P. paulista*, durante o desenvolvimento ontogenético mostrou que há uma variação no número de esterases desde a fase larval até o adulto. O padrão de inibição permitiu verificar que as 10 esterases identificadas podem ser classificadas e agrupadas como carboxilesterases, colinesterases (II), acetilesterases e arilesterases. As carboxilesterases e colinesterases poderão contribuir com estudos sobre a utilização dessas isoenzimas como bioindicadores da presença de inseticidas.

O perfil eletroforético de proteínas totais mostrou que há polimorfismo para seis peptídeos detectados.

Em um ninho de *P. paulista* de Umuarama foi observado parasitismo com formiga alada da subfamília Dolichoderinae. A análise eletroforética das esterases permitiu identificar três esterases para esta formiga, sendo que um dos locos apresentou polimorfismo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERT, S.; KAUDINY, J.; SIMÚTH, J. Newly discovered features of the updated sequence of royal jelly protein RJP57-1; longer repetitive region on C-terminus and homology to *Drosophila melanogaster* yellow protein. **Journal of Apicultural Research**, 35:63-68, 1996.
- BAITALA, T.V.; FAQUINELLO, P.; TOLEDO, V.A.A.; MANGOLIN, C.A.; MARTINS, E.N.; RUVOLO-TAKASUSUKI, M.C.C. Potential use of major royal jelly proteins (MRJPs) as molecular markers for royal jelly production in Africanized honeybee colonies. **Apidologie**, 41(2):160-168, 2010.
- BECKEL H.S.; LORINI I.; LAZZARI S.M.N. Efeito do sinergista butóxido de piperonila na resistência de *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Coleoptera, Silvanidae) a deltametrina e fenitrothion. **Revista Brasileira de Entomologia**, 50:110-114, 2006.
- CANTAGALLI, L.B.; MANGOLIN, C.A.; RUVOLO-TAKASUSUKI, M.C.C. Isoenzymatic Polymorphism in the Leaf-Cutting Ant *Atta capiguara* Gonçalves (Hymenoptera: Formicidae). **Neotropical Entomology**, 39(1):46-49, 2010.
- HEALY, M.J.; DUMANCIC, M.M.; OAKESHOTT, J.G.; Biochemical and physiological studies of soluble esterases from *Drosophila melanogaster*. **Biochemical Genetics**, 29:365-387, 1991.
- HEMINGWAY, J. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 30:1009-1015, 2000
- HSU, J.C.; WU, W.J.; HAYMER, D.S.; LIAO, H.Y.; FENG, H.T. Alterations of the acetylcholinesterase enzyme in the oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis* are correlated with resistance to the organophosphate insecticide fenitrothion. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 38(2):146-154, 2008.
- IHERING, H. L'état des guêpes sociales du Brésil. **Bulletin de la Société Zoologique de France**. 21:159-162, 1896.
- JEANNE, R.L.; BOUWMA, A.M. Scaling in nests of a social wasp: A property of the social Group. **The Biological Bulletin**, 202:289-295, 2002.
- MACHADO, M.F.P.S.; CONTEL, E.P.B. Glycerol-3phosphate dehydrogenase (EC 1.1.1.8) variation in brazilian stingless bees and wasp species. **Biochemical Genetics**, 29(5/6):255-260, 1991.
- MOURA, M.F.; PICANÇO, M.; GONRING, A.H.R.; BRUCKNER, C.H. Seletividade de inseticidas a três vespidae predadores de *Dione juno juno* (Lepidoptera: Heliconidae). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 35:251-257, 2000.

NOLL, F.B.; WENZEL, J.W.; ZUCCHI, R. Evolution of caste in neotropical swarm-founding wasps (Hymenoptera: Vespidae; Epiponini). **American Museum of History Natural**, 3467:1-24, 2004.

PAIVA, M.H.S. **Monitoramento do gene, que codifica a esterase, envolvido na resistência a inseticidas organofosforados em populações naturais de *Aedes aegypti* do Brasil**. Recife: Fundação Oswaldo Cruz, 2006. 72p. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública).

PICANÇO, M.; RIBEIRO, L.J.; LEITE, G.L.D.; GUSMÃO, M.R. Seletividade de inseticidas a *Polybia ignobilis* (Haliday) (Hymenoptera: Vespidae) Predador de *Ascia monuste orseis* (Godart) (Lepidoptera: Pieridae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, 27:85-90, 1998.

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**, 35:707-709, 2006.

QUIRINO, Z.G.M.; MACHADO, I.C. Biologia da polinização e da reprodução de três espécies de *Combretum* Loefl. (Combretaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, 24:181-193, 2001.

SANTANA-REIS, S.G.P.V. **Seletividade de Inseticidas á vespa social predadora *Polistes canadensis canadensis* (L. 1758) (Hymenoptera: Vespidae)**. Salvador: Universidade Federal da Bahia, 2000. 38p. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal)

SANTOS, L.P.; RESENDE, J.J.; SANTOS, G.M.M.; BICHARA-FILHO, C.C.; REIS, V.P.G.S. Seletividade de inseticidas a *Polybia (Trichothorax) sericea* (Olivier, 1791) (Hymenoptera, Vespidae) em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Zoociências**, 5:33-44, 2003.

SOUZA, B.M.; MENDES, M.A.; SANTOS, L.D.; MARQUES, M.R.; CÉSAR, L.M.; ALMEIDA, R.N.; PAGNOCCA, F.C.; KONNO, K.; PALMA, M.S. Structural and functional characterization of two novel peptide toxins isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. **Peptides**, 26(11):2157-2164, 2005.

STUCHI, A.L.P.B. **Toxicidade e expressão gênica em abelhas do gênero *Tetragonisca* após a contaminação com agrotóxicos**. Maringá-Pr: Universidade Estadual de Maringá, 2009. 101p. Tese (Doutorado em Zootecnia – Produção Animal).

CAPÍTULO II - Análise genética em populações de *Polybia paulista* (Ihering, 1896) utilizando marcadores moleculares

RESUMO

O presente estudo foi realizado com o objetivo de fornecer informações sobre a estrutura genética de populações naturais da vespa social *Polybia paulista* Ihering 1896 (Hymenoptera: Epiponini) empregando marcadores moleculares isoenzimáticos. Para tanto, foram analisadas vespas de duas populações (quatro ninhos de Maringá-PR e seis ninhos de Umuarama-PR) totalizando dez ninhos. Foram analisados cinco sistemas enzimáticos Fosfoglucomutase (PGM), Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (G3PDH), Isocitrato desidrogenase (IDH), Malato desidrogenase (MDH) e Esterase (EST). Um total de quatorze locos foi identificado, dos quais cinco apresentaram-se polimórficos: *Est-9*, *Est-10*, *Idh-1*, *G3pdh-1*, com dois alelos cada e o loco *Pgm-1* com quatro alelos. A heterozigosidade média observada nas duas populações foi considerada alta (0,1165). A população de Umuarama apresentou a menor heterozigosidade observada (0,1143). A diversidade genética foi estimada pelo Índice de Shannon (I), que considerando todos os indivíduos analisados apresentou valor médio de 0,2416; enquanto que os valores obtidos para Maringá e Umuarama foram muito próximos (0,2321 e 0,2389 respectivamente). O índice de fixação (F_{IS}) estimado para as populações mostrou que há um excesso de homozigotos (0,2747), provavelmente ocorrendo endogamia. As duas populações analisadas não estão diferenciadas ($F_{ST}=0,0352$). A identidade genética estimada entre as populações de Maringá e Umuarama foi de 0,9862. Os ninhos de *P. paulista* analisados eram oligogênicos e provavelmente há fluxo gênico entre as populações de Maringá e Umuarama. As duas populações dessas vespas não estão diferenciadas mesmo com a urbanização e derrubada da mata natural da região.

Palavras-chave: Vespa social, diversidade genética, marcadores moleculares.

ABSTRACT

The present study was conducted with the aim of providing information on the genetic structure of natural populations of the social wasp *Polybia paulista* Ihering 1896 (Hymenoptera: Epiponini) using isoenzymatic molecular markers. To this end, a total of ten nests of wasps of two populations (four nests in Maringá-PR and six nests in Umuarama-PR) were analyzed. Five enzymatic systems were analyzed: Phosphoglucomutase (PGM), Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (G3PDH), Isocitrate dehydrogenase (IDH), Malate Dehydrogenase (MDH) and Esterase (EST). A total of fourteen loci was identified, of which five presented polymorphism: *Est-9*, *Est-10*, *Idh-1*, *G3pdh-1*, with two alleles each, and the locus *Pgm-1* with four alleles. The average heterozygosity observed in both the populations was considered high (0.1165). The population from Umuarama presented the lowest heterozygosity observed (0.1143). The genetic diversity was calculated through the Shannon index (I), which, considering all the individuals analyzed, presented average value of 0.2416, while the values obtained for Maringá and Umuarama were very close (0.2321 and 0.2389, respectively). The fixation index calculated to the populations showed an excess of homozygotes (0.2747), possibly occurring endogamy. Both the populations analyzed are not differentiated ($F_{ST} = 0.0352$). The genetic identity calculated between the populations of Maringá and Umuarama was 0.9862. The nests of *P. paulista* analyzed were oligogenic and there is possibly a genic flow between the populations of Maringá and Umuarama. Both populations of this wasp are not differentiated, despite the urbanization and the clearing of natural forests of the region.

Key words: Social wasp, genetic diversity, molecular markers.

1. INTRODUÇÃO

A vespa social *Polybia paulista*, pertencente à família Vespidae, tribo Epiponini, é amplamente encontrada no Brasil, tanto em áreas rurais quanto de vegetação nativa. Essa espécie é considerada fundamental para a reprodução das plantas nativas e cultivadas, pois realiza o processo de polinização (Barros, 1998). Essas vespas são consideradas controladores biológicos de algumas pragas da agricultura, como a lagarta do cartucho do milho (*Spodoptera frugiperda*) (Machado et al., 1988). Nas áreas urbanas são consideradas praga, principalmente devido aos acidentes que ocorrem envolvendo a peçonha inoculada em humanos através de ferroada.

A colônia dessa espécie tem estrutura fechada, com organização em castas. As colônias podem ser poligínicas (presença de muitas fêmeas reprodutoras) em algumas fases do seu ciclo de desenvolvimento. Contudo, a maioria possui uma ou poucas fêmeas reprodutoras durante o maior período de desenvolvimento do ninho (Machado et al., 1988).

A organização em castas é uma das características fundamentais da evolução dos insetos sociais, pois a presença de uma grande diferenciação entre as castas indica uma maior divisão de trabalho e conseqüentemente maior grau de socialidade (Bourke, 1999).

Para Noll e Wenzel (2008), os Epiponini devem ser considerados insetos altamente sociais, mesmo com poliginia, pois apresentam importantes características na sua história natural que são muito parecidas com as observadas em abelhas altamente eussociais, como a reprodução através de enxames, colônias muito populosas, cuidado exclusivamente alop parental, tarefas de construção do ninho e defesa de colônia que envolve a cooperação de centenas ou milhares de indivíduos.

O'Donnell (1998) propôs que o termo casta deveria ser empregado a um polifenismo reprodutivo, não necessariamente refletido em diferenças morfológicas externas, sendo que os aspectos morfológicos não deveriam ser o principal critério para delimitação de castas.

A importância das vespas sociais é destacada pelos seus ninhos complexos, formando grandes colônias, e por serem agentes polinizadores e atuarem como inimigos naturais de vários grupos de insetos, tendo grande potencial para estudos de controle biológico, ecologia e comportamento (Souza e Prezoto, 2006).

O gênero *Polybia* revela um importante potencial como controlador biológico de várias espécies de insetos, destacando larvas de Lepidoptera, larvas de pernilongos, lagartas desfolhadoras em ambiente rural, e também formigas aladas em ambientes urbanos (Gobbi e Machado, 1986; Prezoto et al., 2005)

Como tem sido amplamente encontradas em território nacional, e atualmente suas nidificações tem se concentrado nas áreas urbanas, fato resultante principalmente das fragmentações nas áreas de floresta. Santos et al. (2007) verificaram que ambientes com estrutura mais complexa possibilitam o estabelecimento e sobrevivência de mais espécies de vespas sociais.

A vegetação exerce uma influência direta muito grande nas populações de vespas sociais, pois fornecem suporte para nidificação e recursos alimentares, afetando de forma indireta estas populações pelas variações causadas na temperatura e umidade do ar (Santos et al., 2007).

A fragmentação das áreas de mata acaba por determinar uma preferência dos insetos sociais em nidificar nas cidades, onde encontram facilidade para implantação dos ninhos, além de facilidade na obtenção de alimentos, além de interferir na relação planta-polinizador que existe entre estas vespas e as plantas que polinizam (Machado, 1984; Walker, 1992; Santos et al., 2007).

Assim, estudos para conhecer a estrutura populacional da vespa *P. paulista* são necessários, pois podem ser úteis no monitoramento da espécie em ambientes naturais e construídos.

Marcadores moleculares tem se mostrado ferramentas úteis no estudo genético de populações dos insetos, principalmente insetos sociais, que apresentam uma estrutura genética diferencial e única, relacionada com os hábitos e características reprodutivas de cada espécie.

Os marcadores moleculares são frequentemente utilizados na caracterização e estudo de populações naturais de himenópteros sociais. A técnica de eletroforese de isoenzimas tem sido amplamente utilizada em estudos populacionais em vários tipos de organismos, uma vez que é uma técnica versátil na detecção de variação genética através do estudo destes produtos primários dos genes, sendo

caracterizada como uma forma mais eficiente e refinada de estudo que as caracterizações morfológicas. Além disso, a eletroforese de isoenzimas é uma metodologia consistente que fornece inúmeros parâmetros para estudos de populações naturais (Augustin et al., 1999; Costa et al., 2005; Stuchi et al., 2008; Cantagalli et al., 2010).

Pela possibilidade de analisar vários locos de forma simultânea e rápida, a eletroforese de isoenzimas é utilizada em estudos populacionais visando quantificar a variação genética em populações de um modo geral (Augustin et al., 1999), porém, a referida técnica ainda não tinha sido empregada para o estudo de populações naturais da vespa social *P. paulista*.

Tal técnica pode ser útil na identificação de marcadores específicos para monitorar o desenvolvimento e migração de populações da espécie *P. paulista*.

Assim, no presente estudo foi realizada uma análise da estrutura de populações da vespa *P. paulista* presentes em três localidades no noroeste do Paraná, contribuindo com o melhor entendimento sobre o comportamento social dessas vespas. Esses resultados permitirão novos estudos sobre a utilização de *P. paulista* no controle biológico de pragas que afetam a agricultura regional bem como no biomonitoramento dessas áreas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Material

Para realização deste trabalho, foram coletados dez ninhos de vespas do *P. paulista* em três municípios: cinco ninhos em Umuarama-PR (três ninhos na área urbana, dois na área rural), um ninho em Maria Helena-PR e quatro ninhos em Maringá-PR (todos em área urbana) (Figura 1), sendo que os ninhos coletados em Umuarama-PR e Maria Helena-PR, devido a proximidade das duas localidades, foram considerados uma só população, ver Quadro 1.

Os ninhos foram coletados completos, durante a noite, período em que todos os indivíduos estão dentro do ninho, utilizando sacos de tecido revestidos com sacos plásticos, para evitar acidentes com a peçonha dos insetos. O material coletado (ninhos e indivíduos) foi submetido ao congelamento, com posterior separação dos indivíduos por estágio de desenvolvimento, sendo que para esta análise foram utilizadas apenas as vespas adultas.

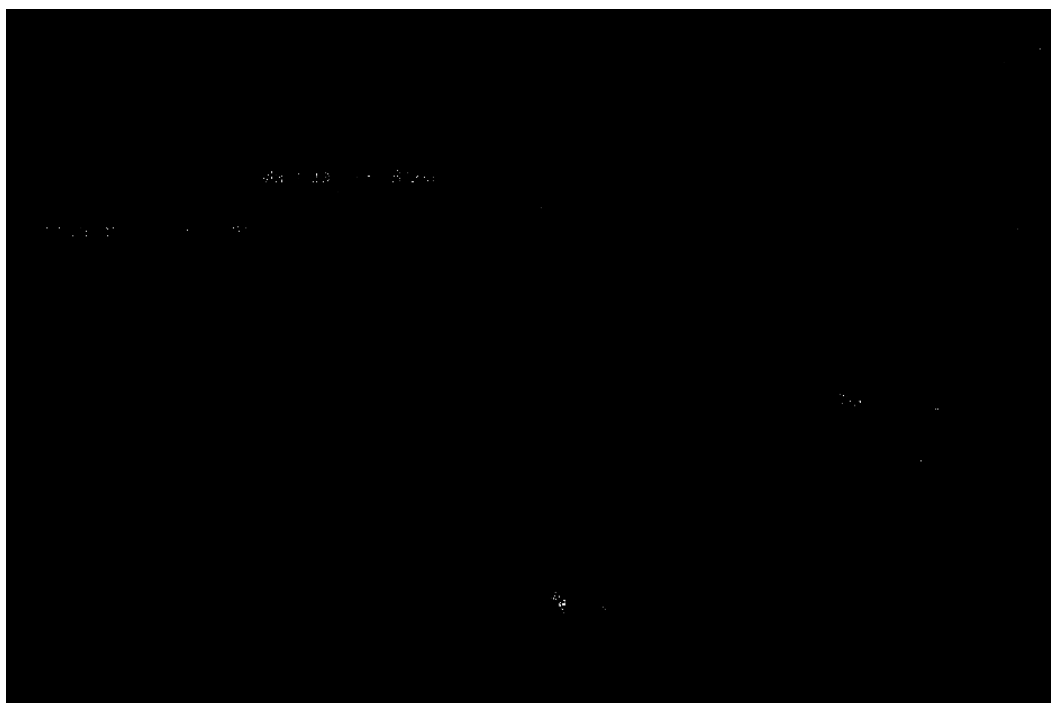


Figura 1 - Mapa do Estado do Paraná, mostrando a distância entre as localidades onde foram realizadas as coletas. Fonte: Google Earth (2011).

Para confirmar a classificação das vespas, amostras de todos os ninhos coletados foram separadas e acondicionadas em solução de álcool à 70% e enviadas para o Prof. Dr. Edilberto Giannotti (Unesp – Rio Claro-SP). Todos os demais indivíduos foram estocados em freezer a -20°C.

O Quadro 1 apresenta a identificação dos ninhos, as cidades de origem e a localização do ponto exato de coleta.

Quadro 1 - Pontos de coleta dos ninhos de *Polybia paulista*

ID População	ID ninho	Município de coleta	Coordenadas geográficas
Pop 1	Ninho 1	Maringá – PR	S 23° 24' 15.35" W 51° 55' 45.06"
	Ninho 2	Maringá – PR	S 23° 25' 45.25" W 51° 54' 51.16"
	Ninho 3	Maringá – PR	S 23° 22' 39.21" W 51° 56' 22.82"
	Ninho 4	Maringá – PR	S 23° 22' 39.34" W 51° 56' 24.29"
Pop 2	Ninho 5	Umuarama – PR	S 23° 47' 53.97" W 53° 12' 19.96"
	Ninho 6	Umuarama – PR	S 23° 45' 29.00" W 53° 17' 36.56"
	Ninho 7	Umuarama – PR	S 23° 47' 22.78" W 53° 21' 35.84"
	Ninho 8	Umuarama – PR	S 23° 45' 53.00" W 53° 18' 10.00"
	Ninho 9	Umuarama – PR	S 23° 45' 55.25" W 53° 18' 04.95"
	Ninho 10	Maria Helena – PR	S 23° 37' 05.29" W 53° 12' 22.28"

2.2. Métodos

2.2.1. Preparação das amostras

Para as análises eletroforéticas das isoenzimas, tanto em géis de amido como em géis de poliacrilamida, foram utilizadas vinte vespas adultas inteiras de cada ninho coletado. No total foram analisados 200 indivíduos.

As amostras foram mantidas resfriadas em banho de gelo durante todo o processo de extração das proteínas. As vespas adultas foram homogeneizadas individualmente em tubos de propileno com 120 µL de solução contendo β-

mercaptoetanol a 0,1% mais glicerol a 10%. Em seguida as amostras foram maceradas com auxílio de um bastão de vidro e centrifugadas em centrífuga refrigerada a 4°C por 10 minutos a 12000xg.

O sobrenadante resultante da centrifugação foi utilizado para o estudo das isoenzimas em géis de poliacrilamida e amido.

2.2.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida das esterases

A corrida eletroforética foi realizada em gel de poliacrilamida 9% (PAGE - Polyacrylamide Gel Electrophoresis) por cinco horas a 200 V em tampão Tris-Glicina 0,1M pH 8,3. Nessa análise foram aplicadas no gel 20 µL do sobrenadante obtido a partir da centrifugação das amostras.

A coloração das esterases foi realizada incubando o gel por 30 minutos em 50 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 6,2. Em seguida as bandas de esterase foram evidenciadas com uma solução contendo 0,06g de Fast Blue RR Salt, 50 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 6,2, 5 mL de N-propanol e os substratos α -naftil acetato (0,03g) e β -naftil acetato (0,02g) dissolvidos em 1 mL de acetona. O gel foi mantido nessa solução até a completa visualização das bandas.

Após a revelação das esterases os géis foram mantidos em temperatura ambiente, durante 24 horas em 100 mL de uma solução fixadora contendo ácido acético a 75% e glicerol a 10% dissolvidos em 1000 mL de água destilada.

Posteriormente, os géis foram embebidos em gelatina 5% acondicionados entre duas folhas esticadas de papel celofane e colocados para secagem num período de 24-48 horas.

2.2.3. Eletroforese em gel de amido

Os géis de amido foram preparados com amido de milho (Penetrose 30®, Corn Products of Brazil) a uma concentração de 17%. O sistema empregado foi Tris-Citrato (TC), pH 7,0 (Shaw e Prasad, 1970). Após atingirem a temperatura ambiente, os géis permaneceram sob refrigeração por aproximadamente 12 horas.

O sobrenadante foi aplicado no gel com pequenas tiras de papel-filtro (5 mm x 11 mm) Whatman 3 MM® embebidas com as amostras. Em seguida, foi submetido à eletroforese horizontal contínua, sob refrigeração, durante oito horas, com corrente

de 200 V determinada pela fonte elétrica. Após a corrida eletroforética, o gel foi cortado horizontalmente em três partes, que em seguida foram incubadas com colorações específicas, necessárias para a revelação das bandas de atividade enzimática de cada sistema, preparadas segundo protocolo de Murphy et al. (1996).

Foram analisados quatro sistemas enzimáticos em gel de amido e um em gel de poliacrilamida, que estão representados no Quadro 2.

A Fosfoglucomutase (PGM) catalisa a interconversão de glicose 1-fosfatase e glicose 6-fosfatase e assim tem um papel importante na glicólise e na gluconeogênese. A coloração para esta enzima foi preparada com 25 ml de tampão Tris/HCl 0,1M pH 8,0, 0,02 g de Glicose 1-fosfato, 20 µL de Glucose-6-fosfato desidrogenase diluída, 200 µL de MgCl₂, 1 ml de NADP (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato), 750 µL de MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) e 750 µL de PMS (N-Methyl Dibenzopyrazine Methyl Sulfate Salt).

Quadro 2 – Nome e número de Comissão de Enzima (nº E.C.) das enzimas analisadas

Enzima (abreviação)	nº E.C.
Fosfoglucomutase (PGM)	2.7.5.1
Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (G3PDH)	1.1.1.8
Isocitrato desidrogenase (IDH)	1.1.1.42
Esterase (EST)	3.1.1.1
Malato desidrogenase (MDH)	1.1.1.37

A gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (G3PDH) catalisa a desidrogenação do gliceraldeído 3-fosfato durante a glicólise conforme a seguinte reação: gliceraldeído-3-P + NAD⁺ → H₃PO₄ + 3-P-gliceroil-P + NADH + H⁺. A coloração foi preparada com 25 mL de tampão Tris/HCl 0,1M pH 8,0, 0,2 g α-glicerofosfato, 100µL de ácido pirúvico, 2 mL de NAD⁺, 750 µL de MTT e 750 µL de PMS.

A isocitrato desidrogenase (IDH) é uma óxidorredutase que catalisa: isocitrato + NADP⁺ → 2-oxoglutarato+CO₂+NADPH+H⁺. A coloração foi preparada com 25 mL de tampão Tris/HCl 0,1M pH 8,0, 200 µL de MgCl₂, 2 mL de NADP, 100 µL de ácido pirúvico, 0,06 g de ácido isocítrico, 750 µL de MTT e 750 µL de PMS (0,5%).

A malato desidrogenase (MDH) catalisa a reação $\text{malato} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{oxaloacetato}^+$, é oxidorreductase dependente de NAD^+ . A coloração foi preparada com 25 mL de tampão Tris/HCl 0,1M pH 8,0, adicionando 0,3g de ácido L-málico e 100 μL de ácido pirúvico, e a seguir, ajustando o pH para 8,0 com solução concentrada de NaOH. Após foram adicionados 1 ml de NAD, 750 μL de MTT e 750 μL de PMS.

Cada parte cortada do gel foi incubada com uma solução de coloração em estufa a 38°C até a completa evidenciação das bandas. Em seguida os géis foram fixados em 10mL de solução fixadora (5 Metanol: 5 água destilada: 1 ácido acético glacial).

2.2.4. Análise de dados

A nomenclatura utilizada para as isoenzimas foi proposta pela International Union of Biochemistry and Molecular Biology (1992). A interpretação genética dos zimogramas foi baseada na estrutura quaternária das enzimas segundo Ward et al. (1992). Os dados foram analisados no programa Popgene 3.1 (Yeh et al., 1999). A variabilidade genética foi estimada pelo cálculo da heterozigosidade (H_e e H_o) de acordo com Nei (1978). A partir dos cálculos das frequências alélicas, foi possível calcular a identidade (I) e a distância genética (D) de Nei (1978).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise das isoenzimas foram identificados 14 locos, dos quais cinco se mostraram polimórficos (35,71%). Apesar do pequeno número de locos analisados, o polimorfismo observado corrobora com outros trabalhos realizados em himenópteros sociais por meio de isoenzimas. Costa et al. (2005), observaram um polimorfismo total de 58% em 35 colônias *Melipona rufiventris* de 12 localidades diferentes de Minas Gerais. Stuchi et al. (2008), analisaram duas populações de *Tetragonisca angustula*, utilizando os sistemas isoenzimáticos fosfatase ácida, esterase e anidrase carbônica, observando um polimorfismo de 60% na população coletada em Ivatuba (PR) e 40% na população coletada em Dracena (SP). Cantagalli et al. (2010) analisando *Atta capiguara* (Hymenoptera: Formicidae) com os mesmos três sistemas isoenzimáticos que Stuchi et al. (2008) identificaram dez locos, dos quais quatro foram polimórficos, o que perfaz um total de 40%.

A origem do comportamento social destes insetos ainda gera muitas dúvidas e discussões. Em geral, os Epiponini apresentam poliginia e complexa diferenciação de castas (Carpenter, 1993). Para Hamilton (1972), o aumento do número de rainhas diminui o ganho via cooperação da colônia.

West-Eberhard (1978) estudando *Metapolybia aztecoides*, explica que em Epiponini, geralmente em colônias maduras, formadas por muitos indivíduos, rainhas e operárias enxameiam e iniciam uma nova colônia, estabelecida por uma fase poligínica. A medida que a colônia se desenvolve, algumas rainhas morrem ou passam a se comportar como operárias, reduzindo o número de rainhas a poucas fêmeas férteis. Como pode ocorrer a presença de intermediárias, quando a colônia entrar na fase de produção de machos, ou seja, estiver novamente em grande número de indivíduos, o ciclo pode se repetir. O autor chamou tal ciclo de oligogínico.

Para Queller et al. (1993) a oligoginia cíclica em vespas *Polybia occidentalis* interferem no parentesco genético das populações destas vespas sociais, podendo aumentar sua variabilidade genética, desde que haja um intenso fluxo gênico entre as populações relacionadas no ambiente. Já para Strassmann et al. (1998), a produção de rainhas-filhas ocorre sempre em colônias maduras, ou seja,

oligogínicas, o que resulta na produção de rainhas que são sempre altamente aparentadas, o que confirma a teoria da *Kin-selection* proposta por Hamilton.

Vários trabalhos utilizando marcadores moleculares foram realizados em outras espécies de Hymenoptera sociais, e os resultados tem revelado um elevado parentesco entre as operárias de uma mesma colônia, fator resultante principalmente devido á haplodiploidia (Strassmann et al., 1991; Queller et al., 1993; Strassmann et al., 1997; Solis et al., 1998)

Foram detectadas dez regiões de esterase (Figura 2), apenas as EST-9 e EST-10 apresentaram-se polimórficas, sendo todas as outras consideradas monomórficas. As vespas do ninho coletado em Maria Helena, a EST-9 não apresentou polimorfismo.

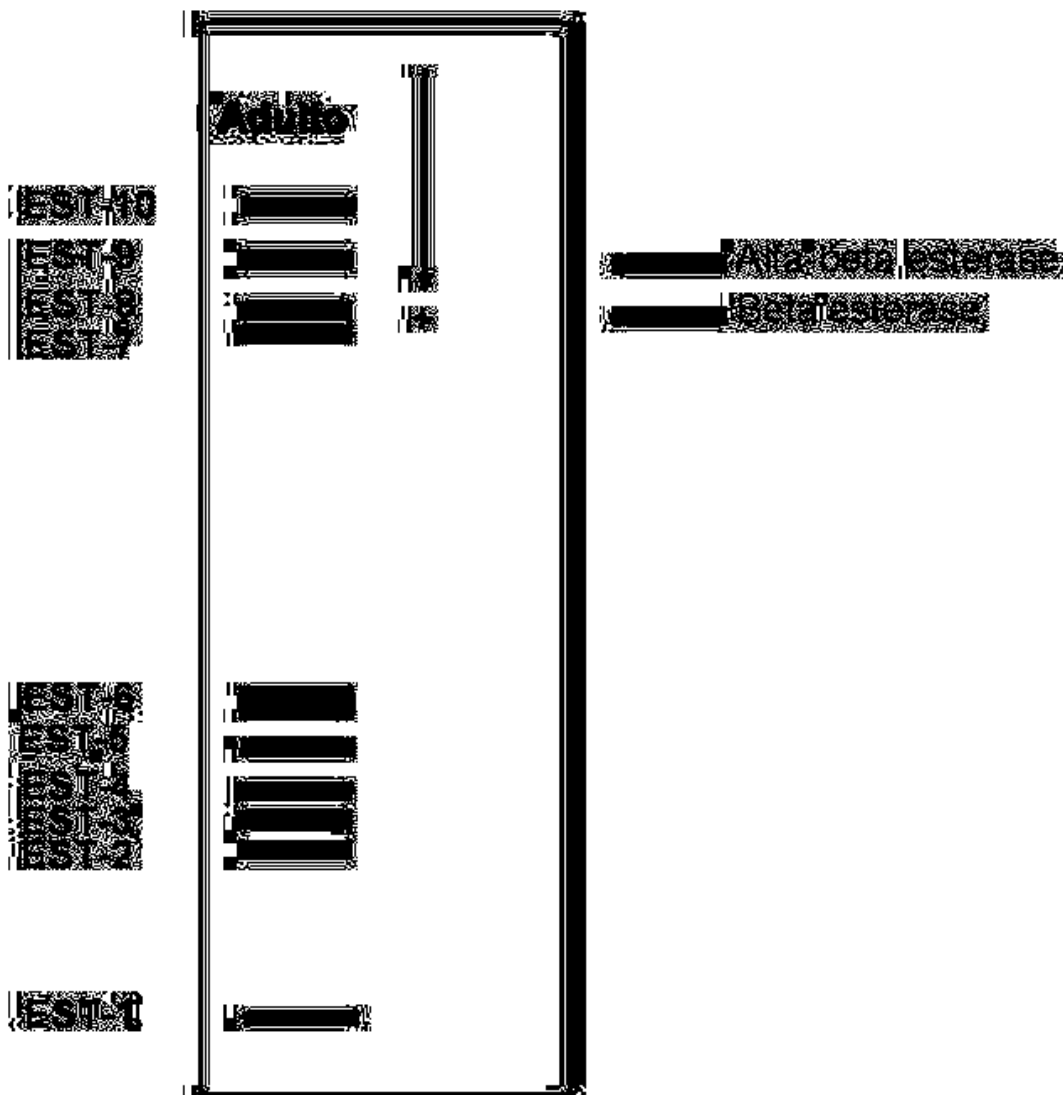


Figura 2 – Zimograma do perfil eletroforético das esterases de *P. paulista*.

Conforme se pode observar no Quadro 3, variações nas frequências alélicas entre as populações de *P. paulista* aqui analisadas evidenciaram uma diferenciação entre as populações. O alelo *Est-9^A* da população de Maringá apresentou frequência de 57,5% e o alelo *Est-9^B* 42,5%, enquanto na população de Umuarama o alelo mais frequente o *Est-9^A* teve frequência de 67,05% e *Est-9^B* (32,95%). Para a EST-10, o alelo *Est-10^A* apresentou a maior frequência observada na população de Maringá 80,82%.

Para a espécie *Polybia paulista*, a EST-10 foi classificada como uma colinesterase do tipo II, forma de esterase que segundo Beckel et al. (2006) atua na detoxificação de xenobióticos presentes no meio. O polimorfismo desse loco e a frequência observada do alelo *Est-10^A* pode estar associada com a presença de inseticidas no ambiente, mesmo sendo em área urbana como Maringá, já que a cidade é constantemente pulverizada com inseticidas para controle da dengue.

Quadro 3 – Frequências alélicas das três populações de *P. paulista*

Locos polimórficos	Alelos	População Maringá	População Umuarama	Total
<i>Est-9</i>	<i>A</i>	0,5750	0,6705	0,5585
	<i>B</i>	0,4250	0,3295	0,4415
<i>Est-10</i>	<i>A</i>	0,8082	0,6761	0,7253
	<i>B</i>	0,1918	0,3239	0,2747
<i>Idh</i>	<i>A</i>	0,6937	0,7245	0,6995
	<i>B</i>	0,3063	0,2755	0,3005
<i>G3pdh</i>	<i>A</i>	0,2938	0,5909	0,4318
	<i>B</i>	0,7063	0,4091	0,5682
<i>Pgm</i>	<i>A</i>	0,3231	0,4293	0,3880
	<i>B</i>	0,6231	0,5404	0,5765
	<i>C</i>	0,0538	0,0253	0,0328
	<i>D</i>	-	0,0051	0,0027

Para a isoenzima Isocitrato desidrogenase também foram observados dois alelos, denominados de acordo com o padrão de migração em *Idh-1^A* (menos anódica) e *Idh-1^B* (mais anódica) conforme mostra a Figura 3. Para esta isoenzima, em nenhuma das duas populações houve a ocorrência de indivíduo homocigoto para o alelo *Idh-1^B*.

Para a isoenzima malato desidrogenase (MDH) foram observadas duas regiões de atividade, sendo denominadas de acordo com sua mobilidade; a que apresentou mobilidade catódica foi denominada MDH-C (MDH-Catódica) e aquela que apresentou mobilidade anódica, MDH-A (MDH-Anódica). Porém, não foi possível realizar uma interpretação adequada das bandas da MDH-C, pois estas não apresentavam boa resolução no gel. A MDH-A não apresentou polimorfismo nas populações analisadas, sendo considerada monomórfica.

Para a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (G3PDH) foram observados dois alelos, sendo denominados *G3pdh-1^A* o que apresentou menor migração anódica e *G3pdh-1^B*, que apresentou maior migração anódica (Figura 3). Esta isoenzima apresentou polimorfismo em todas as populações analisadas. A enzima Fosfoglucomutase foi, dentre as isoenzimas analisadas a que apresentou maior número de alelos. Foram identificados quatro alelos para esta isoenzima, sendo denominados de acordo com a mobilidade em *Pgm-1^A* para o menos anódico, a *Pgm-1^D* para o mais anódico. O alelo *Pgm-1^A* foi observado em todas as populações na forma homozigótica, bem como em heterozigose com os alelos *Pgm-1^B* e *Pgm-1^C* na população de Maringá e com os alelos *Pgm-1^B* e *Pgm-1^D* na população de Umuarama.

No sistema isoenzimático PGM foi possível identificar um alelo exclusivo na população de Umuarama, o alelo *Pgm-1^D*, porém com uma frequência muito baixa (0,51%) (Quadro 3). Esse alelo pode ser considerado um alelo diagnóstico para identificação da população de Umuarama. O alelo *Pgm-1^C* observado nas populações de Maringá e Umuarama também foram observados em baixa frequência (5,38% e 2,53%, respectivamente).

O Quadro 4 mostra a heterozigosidade observada e esperada para as populações analisadas de *P. paulista*. Observa-se uma heterozigosidade média alta quando comparada com análises feitas em outros insetos sociais. A população de Maringá apresentou proximidade entre os valores de heterozigosidade observada (0,1303) e esperada (0,1575). A população de Umuarama também apresentou heterozigosidade alta, porém houve diferença maior entre os valores de heterozigosidade observada (0,1016) e esperada (0,1642). A Heterozigosidade média observada para as duas populações foi 0,1165 e a esperada 0,1661. Os valores observados de heterozigosidade foram inferiores aos de heterozigosidade esperada indicando que houve falta de heterozigotos nos ninhos analisados.

Tais resultados são bem superiores quando comparados com outras espécies de insetos sociais. Pamilo et al. (1978) analisaram várias espécies de formigas encontrando uma heteroziguidade média de 0,05, valor inferior aos obtidos no presente estudo. Também analisando formigas, Cantagalli et al. (2010) obtiveram uma heteroziguidade média de 0,0296.

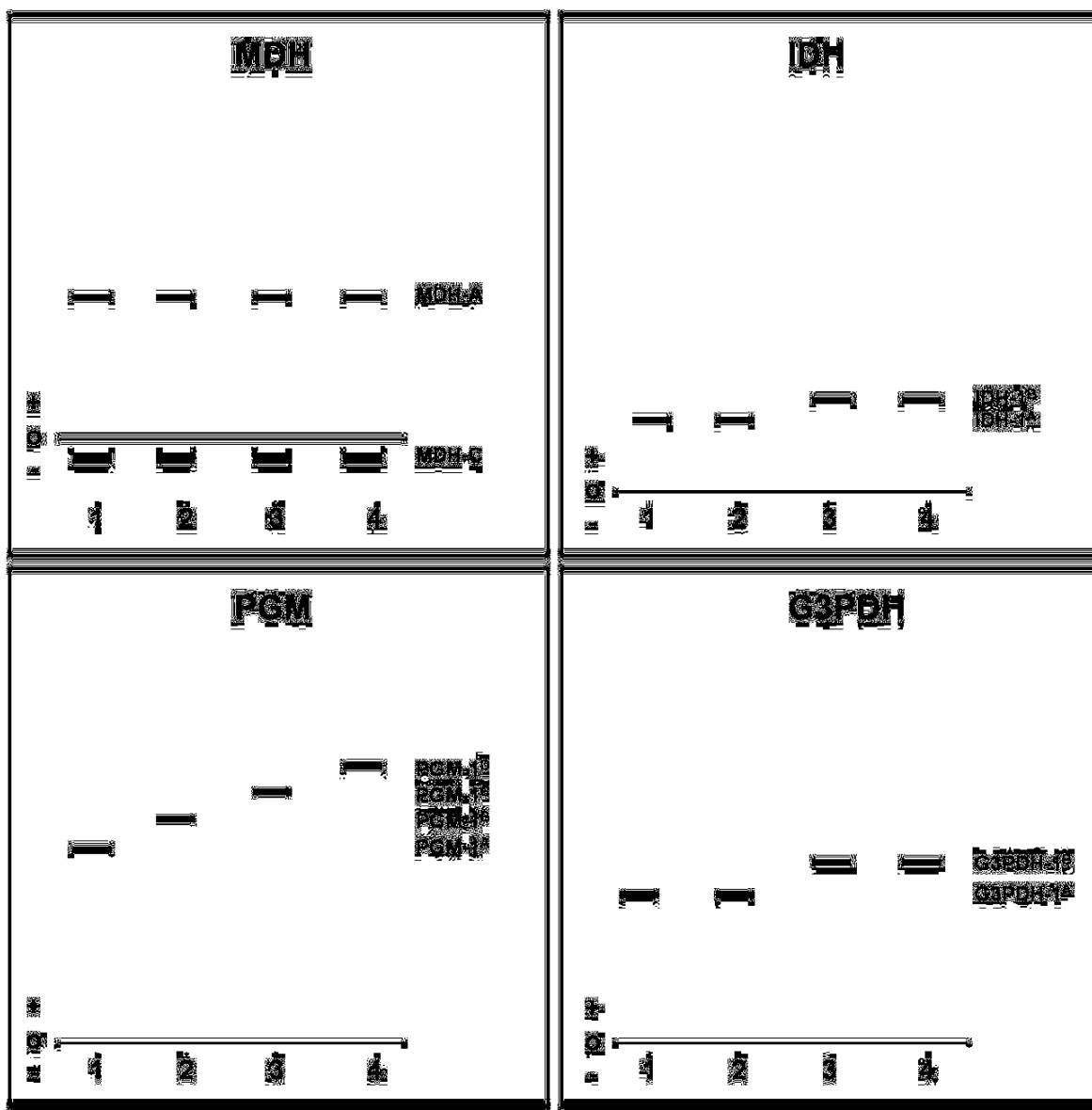


Figura 3 – Zimograma do perfil eletroforético em gel de amido dos sistemas enzimáticos malato desidrogenase (MDH), isocitrato desidrogenase (IDH), fosfoglucomutase (PGM) e gliceraldeído-2-fosfato desidrogenase (G3PDH) de *P. paulista*.

Ruiz (2006) chegou a valores próximos a estes avaliando populações de *Tetragonisca angustula*, cujos valores médios de heteroziguidade observada foram

de 0,0141 para a população de Ivatuba-PR, e de 0,1063 para população de Altônia-PR, sendo este último próximo do valor de heterozigosidade observada para a população de Umuarama.

Quadro 4 – Heterozigosidade observada (Het. Obs.) e Heterozigosidade esperada (Het. Esp.) para os locos analisados que apresentaram polimorfismo nas populações de Maringá, Umuarama e Maria Helena de *Polybia paulista*

Locos	Maringá-PR			Umuarama-PR			Total		
	Tamanho da amostra	Het. Obs.	Het. Esp.	Tamanho da amostra	Het. Obs.	Het. Esp.	Tamanho da amostra	Het. Obs.	Het. Esp.
<i>G3pdh</i>	80	0,5455	0,3987	120	0,3939	0,4859	200	0,4697	0,4919
<i>Pgm</i>	80	0,2262	0,5029	120	0,2626	0,5257	200	0,2459	0,5174
<i>Idh</i>	80	0,6500	0,4410	120	0,5510	0,4013	200	0,6010	0,4215
<i>Est-9</i>	80	0,2600	0,4993	120	0,0455	0,4444	200	0,1596	0,4945
<i>Est-10</i>	80	0,1429	0,3629	120	0,1690	0,4411	200	0,1543	0,3997
Média		0,1303	0,1575	120	0,1016	0,1642		0,1165	0,1661
Desvio		0,2186	0,2219		0,1784	0,2301		0,1964	0,2330

A explicação para a diferença nestes valores de heterozigosidade observada pode residir principalmente no fato destes himenópteros sociais apresentarem colônias poligínicas, diferentemente das formigas e abelhas jataí que apresentam apenas uma rainha (O'Donnell, 1998; Gelin et al., 2008), devido ao fato de que os maiores valores de heterozigosidade foram evidenciados em ninhos que se apresentavam em fase de formação, portanto, poligínica.

A diversidade genética foi estimada pelo índice de Shannon (I), que considerando todos os indivíduos analisados apresentou valor médio de 0,2416 enquanto que para cada população, os valores detectados foram próximos; 0,2321 para a população de Maringá e 0,2389 para a população de Umuarama, conforme apresentado no quadro 5.

O Índice de Shannon (I) tem se mostrado um importante indicador de diversidade genética. Rousseau et al. (2011) analisaram formigas e cupins encontrados no solo amazônico em sistemas de agricultura tradicional utilizando este índice, entre outros, e considerando-o como o mais explicativo para a biodiversidade destes grupos neste ecossistema. Alves (2006) utilizou o Índice de Shannon para avaliar a diversidade genética em três populações de abelha jataí empregando o marcador molecular PCR-RAPD, estimando valores que variaram

entre 0,3043 a 0,3730. Tais valores são superiores aos observados no presente estudo, permitindo sugerir que nas populações analisadas de *P. paulista* há menor diversidade que nessas espécies de insetos sociais.

Quadro 5 – Estimativa da diversidade genética das populações de *Polybia paulista* obtidas pelo Índice de Shannon (I), considerando os lócus polimórficos

Locos	Maringá-PR		Umuarama-PR		Total	
	Tamanho da amostra	Índice de Shannon (I)	Tamanho da amostra	Índice de Shannon (I)	Tamanho da amostra	Índice de Shannon (I)
<i>G3pdh</i>	80	0,5860	120	0,6765	200	0,6838
<i>Pgm</i>	80	0,7960	120	0,8152	200	0,8130
<i>Idh</i>	80	0,6306	120	0,5887	200	0,6113
<i>Est-9</i>	80	0,6899	120	0,6339	200	0,6863
<i>Est-10</i>	80	0,5467	120	0,6298	200	0,5879
Média	80	0,2321	120	0,2389	200	0,2416
Desvio	80	0,3276		0,3361		0,3399

A proximidade dos valores do Índice de Shannon observados entre as duas populações pode ser decorrente do processo evolutivo, da socialidade e de fatores ambientais, pois, há grande distância geográfica entre os dois locais de coleta.

O índice de fixação (F_{IS}), o grau de diferenciação (F_{ST}) e o fluxo gênico (Nm) foram observados na análise multipopulacional, ou seja, considerando todas as populações, conforme mostra o Quadro 6. O índice de fixação (F_{IS}) estimado para as populações mostrou que há um excesso de homozigotos devido ao fato do valor ser positivo (0,2747). Observou-se que para alguns sistemas isoenzimáticos o valor do F_{IS} foi negativo e alto, indicando que há excesso de heterozigotos para estes locos, fato que confirma os valores altos de heterozigosidade observada (Quadro 4).

Os valores de F_{IS} permitem sugerir que há excesso de homozigotos nas populações, provavelmente devido ao fato das colônias serem maduras, estarem formando novas rainhas, que são altamente aparentadas com as operárias e machos preexistentes na colônia, predispondo a endogamia, o que pode ser prejudicial para a evolução destes insetos, favorecendo a expressão de genes deletérios (Strassmann et al., 1992; Queller et al., 1993; Platt et al., 2004).

As populações analisadas apresentaram um valor de F_{ST} de 0,0352 mostrando que as populações analisadas não estão diferenciadas, podendo ser consideradas uma única população (Wright, 1984).

Quadro 6 – Índice de fixação (F_{IS}), índice de fixação para a população total (F_{IT}) e o grau de diferenciação (F_{ST}) das vespas *Polybia paulista*

Locos	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}
<i>G3pdh</i>	-0,0673	0,0428	0,1032
<i>Pgm</i>	0,5221	0,5255	0,0071
<i>Idh</i>	-0,4333	-0,4291	0,0029
<i>Est-9</i>	0,6746	0,6893	0,0451
<i>Est-10</i>	0,6096	0,6133	0,0095
Média	0.2747	0,3002	0,0352

Os valores estimados de identidade e distância genética de Nei (1978) foram respectivamente 0,9862 e 0,0139, corroborando o fato de que essas populações possuem grande proximidade genética.

Segundo Strassmann et al. (1998), a presença de múltiplas rainhas na fundação das colônias é fator determinante para que ocorra um alto grau de diferenciação, assim, colônias que apresentam oligoginia podem apresentar pouca diferenciação, além de que a presença de machos filhos destas rainhas contribuem para uma diminuição do grau de diferenciação das populações. Dessa maneira, os resultados obtidos no presente estudo indicam que as colônias analisadas provavelmente estavam em oligoginia, pois as populações analisadas não estão diferenciadas mostrando de forma indireta que nos ninhos coletados haviam poucas fêmeas fazendo postura e que os machos filhos poderiam estar reduzindo a diferenciação das populações em estudo.

A região noroeste do Paraná era composta de floresta estacional semidecidual e foi desmatada e urbanizada nos últimos 60 anos. A ocorrência de *P. paulista* nas duas localidades e os valores F_{ST} obtidos indicam que esse período de tempo não foi suficiente para isolar e promover diferenciação entre as populações que as subdividissem. Contudo os altos valores de F_{IS} indicam que deve estar ocorrendo endogamia em cada uma das populações, que em longo prazo poderá promover redução da variabilidade genética dessa espécie.

Tal fato poderá ser prejudicial no seu papel como polinizadora e como predadora de outras espécies de insetos que tem potencial para se tornarem pragas de culturas da região.

4. CONCLUSÕES

A utilização da técnica de eletroforese de isoenzimas se mostrou eficiente no estudo das populações naturais de *P. paulista*, obtendo índices de polimorfismo e de diversidade genética que corroboram com achados em outras espécies de insetos sociais.

Os locos isoenzimáticos que foram identificados como polimórficos apresentaram, em média, alta heterozigosidade, indicando que há poliginia nos ninhos em formação.

A análise de estruturação das duas populações mostrou que não há diferenciação entre as *P. paulista* de Maringá e de Umuarama, portanto o tempo decorrido desde o início da derrubada da floresta existente na região ainda não foi suficiente para isolar e proporcionar a subdivisão das populações dessas vespas.

As colônias provavelmente estão entrando na fase de oligoginia cíclica, e por isso estaria ocorrendo um aumento de homozigotos nas duas populações.

5. CONCLUSÕES GERAIS

Em extratos de larvas, pupas e fêmeas adultas de *P. paulista* foi observado um aumento no número de esterases.

Nos extratos de fêmeas adultas foram identificadas carboxilesterases e colinesterase (II) (EST-10) que poderão ser utilizadas em estudos futuros para serem empregadas no biomonitoramento da presença de resíduos de inseticidas no ambiente.

O estudo do perfil eletroforético das esterases permitiu identificar parasitismo de *P. paulista* por formigas Dolichoderinae, pois nos extratos de fêmeas adultas as três esterases desse parasita podem ser facilmente identificadas.

A análise da genética de populações de *P. paulista* de Maringá e Umuarama mostrou que os ninhos analisados eram oligogínicos, provavelmente ocorrendo endogamia entre as fêmeas e os machos presentes na região.

As duas populações em estudo não estão diferenciadas, que provavelmente ainda há fluxo gênico entre elas mesmo com o deflorestamento e a urbanização da região noroeste do Paraná.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, D.J. **Uso do marcador molecular RAPD para estudos de polimorfismo em populações de *Tetragonisca angustula* L. (Apidae: Meliponinae)**. Maringá-PR: Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2006. 45p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento).
- AUGUSTIN, E.; LOECK, A.E.; STORCH, G.; GRÜTZMACHER, D.D.; AFONSO, A.P.S.; GUSMÃO, L.G. Identificação de formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex* (Hymenoptera: Formicidae) através de isoenzimas. **Revista Brasileira de Agrociências**, 5:217-220, 1999.
- BARROS, M.G. Sistemas reprodutivos e polinização em espécies simpátricas de *Erythroxyllum* P. Br. (Erythroxyllaceae) do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, 21:159-166, 1998.
- BECKEL, H.S.; LORINI, I.; LAZZARI, S.M.N. Efeito do sinergista butóxido de piperonila na resistência de *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Coleoptera, Silvanidae) a deltametrina e fenitrotion. **Revista Brasileira de Entomologia**, 50:110-114, 2006.
- BOURKE, A.F.G. Colony size, social complexity and reproductive conflict in social insects. **Journal of Evolutionary Biology**, 12(2):245-257, 1999.
- CANTAGALLI, L.B.; MANGOLIN, C.A.; RUVOLLO-TAKASUSUKI, M.C.C. Isoenzymatic Polymorphism in the Leaf-Cutting Ant *Atta capiguara* Gonçalves (Hymenoptera: Formicidae). **Neotropical Entomology**, 39(1):46-49, 2010.
- CARPENTER, J.M. Biogeographic patterns in the Vespidae (Hymenoptera): Two views of Africa and South America. *In*: GOLDBLATT, P. (editor). **Biological relationships between Africa and South America**. New Haven, Yale University Press, 139-155, 1993.
- COSTA, R.G.; TAVARES, M.G.; DIAS, L.A.S.; CAMPOS, L.A.O. Isoenzyme variation in *Melipona rufiventris* (Hymenoptera: Apidae, Meliponina) in Minas Gerais State, Brazil. **Biochemical Genetics**, 43:49-58, 2005.
- GELIN, L.F.F.; CRUZ, J.D.; NOLL, F.B.; GIANNOTTI, E.; SANTOS, G.M.M.; BICHARA-FILHO, C.C. Morphological Caste Studies In The Neotropical Swarm-Founding Polistine Wasp *Angiopolybia pallens* (Lepeletier) (Hymenoptera: Vespidae). **Neotropical Entomology**, 37(6):691-701, 2008.
- GOBBI, N.; MACHADO, V.L.L. Material capturado e utilizado na alimentação de *Polybia (Trichothorax) ignobilis* (Haliday, 1836) (Hymenoptera, Vespidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, 15:117-124, 1986.
- INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY. **Nomenclature Committee, Enzyme Nomenclature 1992**. San Diego: Academic Press, 1992.

MACHADO, V.L.L. Análise populacional de colônias de *Polybia (Myrapetra) paulista* (Ihering, 1896) (Hymenoptera, Vespidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, 2:187-201, 1984.

MACHADO, V.L.L., GOBBI, N., ALVES JUNIOR, V.V. Material capturado e utilizado na alimentação de *Polybia sericea*. **Revista Brasileira de Zoociências**, 5:261-266, 1988.

MURPHY, R.W.; SITES, J.W.; BUTH, D.G.; HAUFLE, C.H. Proteins: Isozyme. Electrophoresis. In: HILLIS, D. M.; MORITZ, C.; MABLE, B. M. (eds). **Molecular Systematics**. Massachusetts: Sinauer Associates, 51-120, 1996.

NEI, M. Genetic distance between populations. **The American Naturalist**, 106:283-291, 1972.

NEI, M. Estimation of average of heterozygosity and genetic distance from small number of individuals. **Genetics**, 89:583-590, 1978.

NOLL, F.B.; WENZEL, J.W. Castes in the swarming wasps: "queenless" societies in highly social insects. **Biological Journal of Linnean Society**, 93:509-522, 2008.

O'DONNELL, S. Dominance and polyethism in the eusocial wasp *Mischocyttarus mastigophorus* (Hymenoptera: Vespidae). **Behavioral Ecology and Sociobiology**, 43:327-331, 1998.

PAMILO, P.; ROSENGREN, R.; VEPSÄLÄINEN, K.; VARVIO-AHO, S.L.; PISARSKI, B. Population genetics of *Formica* ants. I. Patterns of enzymes gene variation. **Hereditas**, 89:233-248, 1978.

PLATT, T.G.; QUELLER, D.C.; STRASSMANN, J.E. Aggression and worker control of caste fate in a multiple-queen wasp, *Parachartergus colobopterus*. **Animal Behaviour**, 67:1-10. 2004.

PREZOTO, F.; LIMA, M.A.P.; MACHADO, V.L.L. Survey of preys captured and used by *Polybia platycephala* (Richards) (Hymenoptera: Vespidae, Epiponini). **Neotropical Entomology**, 34(5):849-851, 2005.

QUELLER, D.C.; NEGRÓN-STOMAYOR, J.A.; HUGHES, C.R.; STRASSMANN, J. E. Queen number and genetic relatedness in a neotropical wasp, *Polybia occidentalis*. **Behavioral Ecology**, 4:7-13, 1993.

ROUSSEAU, G.X.; SILVA, P.R.S.; CARVALHO, C.J.R. **Comunidades de minhocas, formigas e outros grupos da macrofauna do solo em sistemas de agricultura tradicional e sem fogo na Amazônia Oriental**. Disponível em: http://www.iamazonica.org.br/conteudo/eventos/biodiversidadeSolo/pdf/resumos/Painel3_GuillaumeX.pdf. Acesso em: 16/06/2011.

RUIZ, J.B. **Análise genética de populações em *Tetragonisca angustula* na região noroeste do Paraná por meio de isoenzimas**. Maringá: Universidade

Estadual de Maringá, 2006. 59p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento).

SANTOS, G.M.M.; BICHARA-FILHO, C.C.; RESENDE, J.J.; CRUZ, J.D.; MARQUES, O.M. Diversity and community structure of social wasps (Hymenoptera, Vespidae) in three ecosystems in Itaparica Island, Bahia State, Brazil. **Neotropical Entomology**, 36:180-185, 2007

SHAW, C.R.; PRASAD, R. Starch gel electrophoresis of enzymes - a compilation of recipes. **Biochemical Genetics**, 4:297-320, 1970.

SOLIS, C.R.; HUGHES, C.R.; KLINGER, C.J.; STRASSMANN, J.E.; QUELLER, D.C. Lack of queen discrimination during wasp colony fission. **Behavioral Ecology**, 9:172-176, 1998.

SOUZA, M.M.; PREZOTO, F. Diversity of Social Wasps (Hymenoptera, Vespidae) in Semideciduous Forest and Cerrado (Savanna) Regions in Brazil. **Sociobiology**, 47(1):135-147, 2006.

STRASSMANN, J.E.; QUELLER, D.C.; SOLIS, C.R.; HUGHES, C.R. Relatedness and queen number in the Neotropical wasp, *Parachartergus colobopterus*. **Animal Behavior**, 42:461-470, 1991.

STRASSMANN, J.E.; GASTREICH, K.R.; QUELLER, D.C.; HUGHES, C.R. Demographic and genetic evidence for cyclical changes in queen number in a Neotropical wasp, *Polybia emaciata*. **The American Naturalist**, 140:363-372, 1992.

STRASSMANN, J.E.; SOLIS, C.R.; HUGHES, C.R.; GOODNIGHT, K.F.; QUELLER, D.C. Colony life cycle history and demography of swarn founding social wasp. **Behavioral Ecology & Sociobiology**, 40:71-77, 1997.

STRASSMANN, J.E.; GOODNIGHT, K.F.; KLINGLER, C.J.; QUELLER, D.C. The genetic structure of swarms and the timing of their production in the queen cycles of neotropical wasps. **Molecular Ecology**, 7:709-718, 1998.

STUCHI, A.L.P.B.; RUVOLO-TAKASUSUKI, M.C.C.; TOLEDO, V.A.A. Análise da genética de populações de abelhas Jataí (*Tetragonisca angustula* Latreille) por meio de isoenzimas. **Magistra**, 20(1):68-77, 2008.

YEH, F.C.; YANG, R.; BOYLE, T. **Popgene version 1.31**. Microsoft Window - Based Freeware for Population Genetic Analysis. University of Albert and Center for International Forestry Research. 1999.

WALKER, B.H. Biodiversity and ecological redundancy. **Conservation biology**, 6(1):18-23, 1992

WARD, R.D.; SKIBINSKI, D.O.F.; WOODWARK, M. Protein heterozygosity, protein structure, and taxonomic differentiation. **Evolutionary Biology**, 26:73-159, 1992.

WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of populations, variability within and among natural populations.** Chicago: The University of Chicago Press, LTD. 1984. 580p.