

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

ANA PAULA NUNES ZAGO OLIVEIRA

**Caracterização molecular de rainhas *Apis mellifera* L. africanizadas
produtoras de geleia real com o uso de marcadores nucleares e
mitocondriais**

**MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
FEVEREIRO – 2013**

ANA PAULA NUNES ZAGO OLIVEIRA

Caracterização molecular de rainhas *Apis mellifera* L. africanizadas produtoras de geleia real com o uso de marcadores nucleares e mitocondriais

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

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

**MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
FEVEREIRO – 2013**

“Só é digno da liberdade, como da vida, aquele que se empenha em conquistá-la.”
Johann Goethe.

Aos meus pais, Maria de Lourdes Nunes Zago Oliveira e José Maria Zago de Oliveira, que sempre acreditaram nos meus sonhos, não medindo esforços para fazer com que eu chegasse até aqui.

À minha irmã, Carolina Luisa Nunes Zago Oliveira, pela amizade e presença constante em todos os momentos de minha vida.

Ao meu namorado, Diego Vincoletto Garbosa, pela companhia, compreensão e dedicação essenciais na minha vida.

Com todo amor e carinho.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu mestre e guia, que sempre se fez presente em minha vida.

À Universidade Estadual de Maringá (UEM) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (PGM), que me proporcionou a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pelo apoio financeiro concedido.

À minha querida Orientadora, professora doutora Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki, pela paciência, disponibilidade, amizade, pelos ensinamentos e dedicação na conclusão deste mestrado.

Às Coorientadoras, professora doutora Claudete Aparecida Mangolin e professora doutora Adriana Gonela, que, com muita disposição e conhecimento, me orientaram nas atividades laboratoriais e disciplinares.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (PGM), pela contribuição em minha formação.

Aos professores dos Laboratórios de Genética Animal e de Cultura de Tecidos Vegetais e Eletroforese, que sempre estiveram disponíveis para ajudar.

Aos Secretários do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (PGM), Francisco José da Cruz e Maria Valquíria Magro, pela ajuda e trabalho indispensáveis.

Ao professor doutor Vagner de Alencar Arnaut de Toledo, pela amizade, conselhos e presteza em todos os momentos.

À minha família, em especial aos meus tios e primos, que sempre me incentivaram a seguir em frente.

Às amigas que se tornaram minha segunda família, Ana Paula Silva Ton e Rosane Freire, que, por meio da descontração, tornaram esta etapa menos exaustiva.

Às amigas de longa data, Ana Lígia de Lima Moreira e Mayra Scaion Leão Corrêa, pelo grande incentivo, por toda amizade e apoio prestado mesmo com a distância prevalecendo.

Aos amigos que conquistei durante o Curso de Pós-Graduação, principalmente, à Cassiele Uliana Facco, Bruna Manuelli Teles Moreira, Simone

Aparecida dos Santos e Vanessa Neves de Azevedo Fernandes, pelos momentos de alegria e ensinamentos, itens essenciais durante estes dois árduos anos. Cada amigo que conquistei representa uma parte de minhas vitórias.

Enfim, a todos que fazem parte de minha vida, contribuindo de maneira direta e indireta para a realização deste trabalho com palavras de incentivo, ajudando-me a nunca desistir, o meu muito obrigada. Que Deus possa lhes recompensar, tornando possível a realização de seus maiores sonhos.

BIOGRAFIA

ANA PAULA NUNES ZAGO OLIVEIRA, filha de José Maria Zago de Oliveira e de Maria de Lourdes Nunes Zago Oliveira, nasceu em 05 de setembro de 1988, na cidade de Rancharia, estado de São Paulo.

Em dezembro de 2002, concluiu o Ensino Fundamental, na Escola Estadual Antônio de Almeida Prado, na cidade de Iepê, estado de São Paulo.

Concluiu o Ensino Médio, em dezembro de 2005, na Escola Estadual Antônio de Almeida Prado, na cidade de Iepê, estado de São Paulo.

Ingressou no Curso de Ciências Biológicas – Bacharelado, em fevereiro de 2007, na Universidade do Oeste Paulista (Unoeste), na cidade de Presidente Prudente, estado de São Paulo, obtendo o título de Bióloga em dezembro de 2009.

Em março de 2011, ingressou no curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (PGM), da Universidade Estadual de Maringá (UEM), em Maringá, estado do Paraná, Brasil.

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS	IX
LISTA DE FIGURAS	X
RESUMO.....	XI
ABSTRACT.....	XII
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Caracterização das abelhas <i>A. mellifera</i> africanizadas.....	4
2.2. O DNA mitocondrial de <i>A. mellifera</i> africanizada.....	6
2.3. Marcadores moleculares MRJPs e a importância da geleia real para as abelhas <i>A. mellifera</i>	8
2.4. Melhoramento genético de <i>A. mellifera</i> africanizadas.....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1. Material biológico	14
3.2. Isolamento de DNA.....	14
3.3. Amplificação da região MRJP por PCR	15
3.4. Amplificação por PCR de regiões mitocondriais e digestão com endonucleases	16
3.5. Eletroforese em géis de poliacrilamida (PAGE) e coloração com nitrato de prata.....	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
4.1. Avaliação de linhagens por MRJPs	18
4.2. Africanização	21
5. CONCLUSÕES	26
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Regiões do DNA mitocondrial e seus respectivos <i>primers</i> com suas respectivas sequências de nucleotídeos	16
Quadro 2 - Primers e respectivas enzimas de restrição.....	16
Quadro 3 - Genótipos de rainhas de <i>A. mellifera</i> africanizadas de oito colônias produtoras de geleia real e os prováveis zangões que participaram da fecundação.....	19
Quadro 4 - Padrões de ausência e presença de sítios de restrição observados nas diferentes regiões do DNA mitocondrial de <i>A. mellifera</i> da Fazenda Experimental de Iguatemi pertencente a Universidade Estadual de Maringá. (-): Sítio de restrição ausente; (+): Sítio de restrição presente; A: Padrão africano.....	22

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Perfil eletroforético dos locos *mrjps* de abelhas *A. mellifera* africanizadas. (A) Fragmentos amplificados do loco *mrjp3*; (B) Fragmentos amplificados do loco *mrjp5*. M = Marcador de peso molecular de DNA 100 pb (DNA Ladder-Invitrogen). As setas e as letras indicam os alelos identificados para cada loco.....18
- Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose a 1%. NC: Fragmento de DNA amplificado da região COI e região COI-COII e não clivado. M: Marcador molecular com 100 pb. **A:** Fragmento de DNA amplificado da região COI, colunas 1, 2, 3, 4, 5 e 6 - ausência do sítio de restrição *Xba I*. **B:** Fragmento de DNA amplificado da região COI, colunas 1, 2, 3, 4, 5 e 6 - ausência do sítio de restrição *Hinc II*. **C:** Fragmento de DNA amplificado da região COI-COII, colunas 1, 2, 3, 4, 5 e 6 - ausência do sítio de restrição *Xba*.....21
- Figura 3 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 9%. NC: Fragmento de DNA amplificado e não clivado. **M:** Marcadores moleculares com 25, 50 e 100 pb. **A:** Fragmento de DNA amplificado da região 16S, colunas 1e 2 - presença do sítio de restrição *Dra I*. **B:** Fragmento de DNA amplificado da região 16S, colunas 1e 2 - presença do sítio de restrição *Ase I (Vsp I)*. **C:** Fragmento de DNA amplificado da região 16S, colunas 1 e 2 - presença do sítio de restrição *Alu I*. **D:** Fragmento de DNA amplificado da região 16S, colunas 1e 2 - presença do sítio de restrição *Taq I*. **E:** Fragmento de DNA amplificado da região 16S, colunas 1 e 2 - presença do sítio de restrição *Hinc II*. **F:** Fragmento de DNA amplificado da região COI-COII, colunas 1 e 2 - presença do sítio de restrição *Dra I*.....24

RESUMO

OLIVEIRA, Ana Paula Nunes Zago, M.Sc. Universidade Estadual de Maringá, fevereiro de 2012. **Caracterização molecular de rainhas *Apis mellifera* L. africanizadas produtoras de geleia real com o uso de marcadores nucleares e mitocondriais.** Professora orientadora: Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki. Professores conselheiros: Claudete Aparecida Mangolin e Adriana Gonela.

Com a introdução da *Apis mellifera scutellata* no Brasil, em 1956, foram originados poli-híbridos, denominados *Apis mellifera* africanizadas. As abelhas africanizadas se espalharam rapidamente, devido à alta adaptabilidade, comportamento reprodutivo, forrageamento e defensividade. Neste estudo, foi avaliada a variabilidade genética dos locos de marcadores *mrjp3* e *mrjp5*, em abelhas operárias *A. mellifera* de colmeias do programa de melhoramento genético para produção de geleia real. Também foram utilizados marcadores moleculares de DNA mitocondrial, para verificar a origem materna destas operárias e identificar possíveis marcadores. Operárias de oito colmeias produtoras de geleia real pertencentes à FEI/UEM foram coletadas. Após o isolamento do DNA total, foram realizadas análises para os marcadores moleculares MRJPs (proteínas principais da geleia real) de DNA nuclear e marcadores moleculares PCR-RFLP para mtDNA (DNA mitocondrial). Os locos *mrjp3* e *mrjp5* continuam polimórficos, sendo predominante o genótipo *DE* para o loco *mrjp3* e o genótipo *DD* para o loco *mrjp5*. Após sete anos de seleção e análise de parâmetros genéticos, esses alelos estão sendo mantidos nas rainhas, mostrando que possuem papel na produção de geleia real. Foram identificados padrões de restrição com a finalidade de encontrar mitótipos de *A. mellifera* africanas e europeias. A ausência de sítios de restrição com as enzimas *Bgl II* para Citocromo b (Cit b); *Xba I* e *Hinc II* para Citocromo Oxidase I (COI); *Xba I* para Citocromo Oxidase I e II (COI-COII) e *Eco RI* para a subunidade ribossômica maior (16S) indica o padrão africano. O padrão de restrição *Alu I* para 16S foi determinado, por meio de análises comparativas, como sendo europeu. Os mitótipos detectados mostraram que as rainhas selecionadas para a produção de geleia real possuem o padrão africano, porém, sem nenhum mitótipo que pudesse ser utilizado como marcador para a produção de geleia real.

Palavras-chave: Variabilidade genética, DNA mitocondrial, africanização.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Ana Paula Nunes Zago, M.Sc. Universidade Estadual de Maringá, february, 2013. **Molecular characterization of queens *Apis mellifera* L. Africanized producing of royal jelly using nuclear and mitochondrial markers.** Adviser: Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki. Committee Members: Claudete Aparecida Mangolin and Adriana Gonela.

The introduction of *Apis mellifera scutellata* in Brazil in 1956 originated poly-hybrids denominated Africanized honeybees *Apis mellifera*. Africanized honeybees have spread rapidly, due to its high adaptability, breeding behavior, foraging and defensiveness. In this study we evaluated the genetic variability of loci markers *mrjp3* and *mrjp5*, in worker honeybees of *A. mellifera* hives coming from the breeding program for the production of royal jelly. Were also used molecular markers of mitochondrial DNA, to verify the maternal origin of those workers, and also to identify possible markers. Workers of eight hives producers of royal jelly from FEI/UEM were collected. After isolation of total DNA, analysis were performed for molecular markers MRJPs (major proteins of royal jelly) of nuclear DNA and, PCR-RFLP markers for mtDNA (mitochondrial DNA). The loci *mrjp3* and *mrjp5* continue polymorphic, with the predominance of genotype *DE* for the locus *mrjp3* and genotype *DD* for the locus *mrjp5*. In the queens, these alleles are preserved after seven years of analysis of genetic parameters and selection, showing that have a role in the production of royal jelly. Restriction patterns were identified in order to find African and European *A. mellifera* mitotypes. The absence of restriction sites with the enzymes *Bgl II* to Cytochrome b (Cyt b); *Xba I* and *Hinc II* to Cytochrome Oxidase I (COI); *Xba I* to Cytochrome Oxidase I and II (COI-COII) and *Eco RI*, to Large Ribosomal Subunit (16S), indicate the African pattern. The restriction pattern *Alu I* to 16S was determined by comparative analysis, as being European. The detected mitotypes allowed to assume the African pattern of queens producing royal jelly, but no mitotype can be used as a marker for the production of royal jelly.

Key words: Genetic variability, mitochondrial DNA, africanization.

1. INTRODUÇÃO

A apicultura é considerada uma atividade muito antiga, sendo suas origens datadas da pré-história. Desta forma, desde a antiguidade, as abelhas são valorizadas pelos seus produtos e pela maneira como se comportam (Nogueira-Couto e Couto, 2006). Há indicações sugerindo que os egípcios foram os pioneiros na Apicultura, pois consideravam o mel como o medicamento mais popular da época (Nogueira-Couto e Couto, 2006).

As abelhas apresentam uma combinação de características individuais e de cooperação social não encontrada no restante do reino animal. O modo como este inseto consegue se adaptar ao mundo que o rodeia é uma das mais ricas fontes de estudo e de conhecimento dentre todos os organismos (Winston, 2003).

Nogueira-Neto (1972) relatou que as abelhas *Apis mellifera mellifera* foram introduzidas no Brasil pelo Reverendo Antônio Carneiro Aureliano, com a colaboração secundária de Paulo Barbosa e Sebastião Clodovil de Siqueira e Mello, em 1839, proveniente do porto de Portugal, por meio de colmeias européias, na intenção de produzir mel e utilizar a cera branca para produção de artefatos (velas) religiosos. Até esta data, relatos de abelhas nativas sem ferrão são descritos como sendo abelhas indígenas, tais como: mandaçaia (*Melipona quadrifasciata* Lepeletier), tiúba (*Melipona compressipes*), Jataí (*Tetragonica angustula* L.), guarupu (*Melipona bicolor bicolor*), urucu (*Melipona scutellaris* L.), dentre outras (Kerr, 1967).

No Brasil, em 1955, havia uma baixa produtividade de mel das *Apis mellifera*, que não era condizente com o tamanho do país e com suas características tropicais, propícias à exploração da apicultura, chamando a atenção de algumas autoridades brasileiras (Kerr, 1967). Devido ao interesse do Governo em aumentar a produção apícola, em 1956, o Prof. Dr. Warwick Estevam Kerr dirigiu-se à África, trazendo e introduzido as abelhas africanas *A. m. scutellata*, encerrando-se a primeira fase da apicultura brasileira, com a introdução dessa nova abelha (Gonçalves, 2006). A partir deste momento, foi dado início a uma rápida expansão das abelhas *Apis mellifera scutellata* por todo o Brasil, realizando um intercruzamento com as várias subespécies europeias aqui existentes, originando

um descendente poli-híbrido, resultante do cruzamento entre as subespécies europeias presentes no Brasil com a *A. m. scutellata* (Kerr, 1957; Gonçalves, 2006).

A espécie *A. mellifera* tem uma área bastante ampla de distribuição, podendo ser evidenciada pelo isolamento geográfico e adaptações ecológicas (Ruttner, 1978). Desde a sua introdução, a abelha africana se espalhou por quase toda a América Latina e sudoeste dos Estados Unidos (Schneider et al., 2003). A colonização de grande parte do hemisfério ocidental, em menos de 50 anos por uma única subespécie de inseto é uma das mais rápidas e espetaculares invasões biológicas conhecidas (Schneider et al., 2003).

Evidências filogeográficas e morfométricas supõem o agrupamento de subespécies de *A. mellifera* em quatro linhagens evolutivas ou ramos: M (oeste europeu), C (leste europeu), O (Oriente Próximo e Médio) e A (africano) (Ruttner et al., 1978; Ruttner, 1988). Hoje, os descendentes híbridos dessas linhagens podem ser encontrados em muitas áreas do mundo, devido ao transporte e introdução generalizada da população destas abelhas pelos apicultores (Collet et al., 2007). Garnery et al. (1993) sumarizaram os dados obtidos com os marcadores de DNA mitocondrial e mostraram a ocorrência de três ramos evolutivos: M (oeste europeu, *A. m. mellifera*), C (oriente médio para a Itália, subespécies *meda*, *caucásica*, *cecropia*, *carnica* e *ligustica*) e A (espécies africanas, exceto *lamarkii*, e as abelhas de algumas ilhas do Mediterrâneo).

Testes com DNA são importantes para confirmar e compreender os processos responsáveis pela possível propagação das abelhas. Para tal, foi utilizada a técnica de *Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP) que permite analisar polimorfismos presentes no DNA mitocondrial (mtDNA) (Pinto et al., 2003). Segundo Galtier (2009), ao longo das últimas três décadas, o *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) tem sido utilizado para estudos relacionados à diversidade molecular em animais. O conteúdo genético mitocondrial é altamente conservado entre os animais, com poucas duplicações, sem introns, e regiões intergênicas muito curtas, podendo gerar algum sinal sobre a história da população dessas abelhas em curtos prazos.

Por meio de sítios de restrição do mtDNA e pela presença de polimorfismo, Hall e Smith (1991) identificaram três linhagens de subespécies de abelhas, sendo um grupo do leste europeu, um do oeste europeu e um grupo africano. Para tal, um sítio *Xba I* do gene na subunidade Citocromo Oxidase I (COI) foi encontrado

somente em abelhas do grupo do leste europeu e um sitio em *Hinc II* do gene na subunidade COI foi encontrado apenas em abelhas do oeste europeu.

Os objetivos do presente estudo foram: avaliar o processo de seleção de colmeias produtoras de geleia real, utilizando marcadores moleculares MRJPs e marcadores de DNA mitocondrial para verificar a manutenção dos alelos ou dos genótipos das rainhas produtoras (europeias ou africanas) e novos prováveis marcadores para as abelhas de oito colônias do programa de melhoramento de abelhas para produção de geleia real da Universidade Estadual de Maringá.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Caracterização das abelhas *A. mellifera* africanizadas

As abelhas são insetos sociais, pertencentes à ordem Hymenoptera, superfamília Apoidea, sendo esta dividida em oito famílias com 20.000 espécies diferentes, das quais aproximadamente 3.000 podem ser encontradas no Brasil (Nogueira-Couto e Couto, 2006).

Conhecidos há mais de 40 milhões de anos, estes insetos se espalham pela Europa, Ásia e África (Nogueira-Couto e Couto, 2006). No Brasil, a introdução de diferentes subespécies de *A. mellifera* foi atribuída aos jesuítas, imigrantes europeus e pesquisadores, a partir de 1800, com o intuito de produzir mel em larga escala (Nogueira-Couto e Couto, 2006). Em 1845, colonizadores alemães trouxeram a *A. m. mellifera* da Alemanha, introduzindo-a no Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, dando início à apicultura racional brasileira (Nogueira-Neto, 1972). Entre 1870 e 1880, Hannemann e Schenck, Hanewen e Brunnet trouxeram as primeiras *Apis mellifera ligustica* para o Sul do Brasil (Nogueira-Neto, 1972). Ainda segundo Nogueira-Neto (1972), Brunnet recebeu duas colônias de abelhas francesas e duas colônias de abelhas italianas e as introduziu em São Bento das Lages, Bahia. A introdução de novas espécies pode produzir efeitos dramáticos na biologia e na genética das espécies nativas (Pimentel et al., 2000; Simberloff, 2000; Huber et al., 2001). Além disso, também podem ser utilizadas como sistemas para examinar os fatores que influenciam o fluxo gênico e moldam a estrutura genética das populações competidoras (Holway e Suarez, 1999; Clarke et al., 2002; Fewell e Bertram, 2002).

Em 1956, abelhas africanas *A. m. scutellata* foram introduzidas no Brasil. Cerca de um ano depois, 26 enxames com suas respectivas rainhas escaparam e cruzaram com as demais subespécies de abelhas melíferas europeias aqui introduzidas no século XIX: a italiana (*Apis mellifera ligustica*), a alemã (*Apis mellifera mellifera*) e a austríaca (*Apis mellifera carnica*). Com isso surgiram populações polí-híbridas denominadas africanizadas, com predominância de características das abelhas africanas, tais como a grande capacidade de enxamear e a produção (Kerr, 1967).

Com a introgressão dos alelos europeus nas abelhas poli-híbridas, a genética africana e as características comportamentais das abelhas africanizadas permaneceram (Moritz et al., 2005). Porém, a distribuição original dos ramos evolutivos de *A. mellifera* foi progressivamente alterada devido às atividades humanas com estes insetos (Collet, 2009).

Assim que a apicultura foi desenvolvida, foram providenciados locais artificiais de nidificação para estes insetos, o que ocasionou uma concorrência entre as colônias que eram mantidas em ninhos quase que naturais, devido à biologia destas abelhas que apresentam um acasalamento especializado (Moritz et al., 2005).

Rinderer (1987) afirma que a rápida disseminação das abelhas africanizadas e seu simultâneo deslocamento e modificação das abelhas europeias na América do Sul e Central representam um interessante conjunto de problemas biológicos. Os principais deles estão relacionados com dúvidas sobre os mecanismos subjacentes à africanização das populações de abelhas europeias.

Geralmente, explicações da africanização estão enraizadas na biologia reprodutiva. Certamente, a alta taxa de enxameação (Winston, 1980) e o alto índice de populações selvagens (Kerr, 1971) de abelhas africanizadas contribuíram para seu deslocamento.

Até meados de 2003, 26 subespécies autóctones de *A. mellifera* foram identificadas (Sheppard e Mixner, 2003), com distribuição abrangendo uma ampla área biogeográfica constituída por regiões da Europa, África e oeste da Ásia. No entanto, mesmo com a introgressão de alelos europeus, as características africanas de natureza genética e comportamental continuaram preservadas em *A. mellifera* (Schneider et al., 2004).

Nas Américas, as abelhas africanizadas estão restritas às regiões de baixas altitudes e lugares de invernos amenos (Kerr, 1989). Embora ocupem uma grande área da América do Sul, essas abelhas não têm sido capazes de colonizar latitudes meridionais maiores do que 35°, sendo este considerado um limite natural de expansão (Diniz et al., 2003).

Estudos morfométricos e moleculares realizados por Sheppard et al. (1991) em amostras de abelhas da Argentina mostraram que as abelhas não africanizadas vivem além da área entre 30°- 35° SL paralelos. Esta zona de fronteira se encontra um pouco mais ao sul do que o originalmente sugerido por Kerr et al. (1982).

No Brasil, as abelhas *A. mellifera* estão bem adaptadas a áreas urbanas, bordas de florestas e formações vegetativas abertas (Oliveira e Cunha, 2005).

A composição social de uma colmeia de *A. mellifera* se resume em três tipos de indivíduos: uma rainha, operárias em número variável e zangões. A função da rainha é pôr ovos e de manter a ordem social na colmeia. As operárias, por sua vez, executam todo o trabalho necessário de manutenção. Para o cumprimento das atividades, as operárias dispõem de um ferrão funcional, desenvolvimento glandular e diferenciação de idade de acordo com as necessidades da colmeia. Os zangões possuem a função de fecundar a rainha durante o vôo nupcial (Nogueira-Couto e Couto, 2006).

O comportamento da *A. mellifera* é resultante das interações entre o seu potencial genético, seu estado fisiológico, das condições da colmeia e do meio ambiente onde se encontra (Nogueira-Couto, 1989).

Com o início da hibridização (1956) entre abelhas europeias presentes nas Américas e abelhas africanas, muitos estudos têm sido realizados com o intuito de identificar a composição racial dos híbridos descendentes. Esses estudos começaram a ser realizados na segunda metade dos anos de 1980, utilizando como ferramentas moleculares as isoenzimas (Lobo et al., 1989; Del Lama et al., 1990), marcadores de DNA nuclear (Hall, 1990) e de DNA mitocondrial (Hall, 1986; Smith et al., 1989; Hall e Smith, 1991).

2.2. O DNA mitocondrial de *A. mellifera* africanizada

O DNA mitocondrial (mtDNA) animal é uma molécula circular. Em outros grupos, há exceções, pois, segundo Nosek e Tomáška (2002, 2003), já é bem estabelecido que genomas mitocondriais lineares fragmentados evoluíram várias vezes em diversas linhagens eucarióticas por possuírem estruturas especializadas, os terminais telômeros, como o clado Reinhardtinia, um grupo monofilético de algas verdes encontrados na classe chlorophyceae das Chlorophytas (Nakada et al., 2008; Lewis e McCourt, 2004) e em alguns organismos como *Saccharomyces cerevisiae*, *Penicillium sp.*, *Euglena gracilis* (Williamson, 2002). Nos animais, é composto por cerca de 37 genes que codificam 13 proteínas, 22 RNAs e dois RNAsr. Também existe uma região não codificante, a região de controle (ou região rica em "A + T"), responsável pela transcrição e replicação do DNA (Wolstenholme, 1992).

Embora, o conteúdo genômico tenha sido descrito como muito conservado, a ordem em que os genes são organizados na molécula de mtDNA é mais variável do que previsto, em especial para os genes de RNAt (Wolstenholme, 1992; Dowling et al., 1996).

O genoma mitocondrial é herdado matematicamente na maioria dos animais, sem ocorrer recombinação, de maneira que o conjunto de genes é herdado como uma unidade (Avice, 1994). A taxa de mutação é elevada em comparação com cópias únicas de genes nucleares. No entanto, dentro da molécula, existem genes ou regiões com altas e baixas taxas de substituição de bases (Brown, 1983; Vawter e Brown, 1986).

A caracterização do DNA mitocondrial fornece informações úteis, incluindo o tamanho total do genoma, o número de sítios de restrição e as posições relativas dos sítios em um mapa, sendo estas informações capazes de resolver questões filogenéticas e sistemáticas (Avice, 1994; Hillis et al., 1996).

O genoma mitocondrial de *A. mellifera* foi completamente sequenciado há mais de duas décadas (Crozier e Crozier, 1992), sendo o primeiro dentro dos Apidae e o arranjo dos genes principais (em proteínas de codificação e genes de RNAr) foi extremamente conservado quando comparado com a *Drosophila* (Arias et al., 2006).

Ruttner (1988) relata que algumas subespécies europeias de *A. mellifera* foram inicialmente classificadas por meio de estudos com a variabilidade do DNA mitocondrial e de microssatélites.

A variação na molécula de DNA mitocondrial (mtDNA) permite a discriminação entre as linhagens evolutivas de subespécies de abelhas (Crozier et al., 1991; Hall e Smith, 1991). Na análise do mtDNA do gênero *Apis*, ocorreu um aumento significativo na compreensão da filogenia e evolução das espécies e da filogeografia das subespécies (Arias et al., 2006). Porém, em alguns dos estudos moleculares, a identificação das linhagens de abelhas depende do comprimento e do polimorfismo existente no sítio de restrição do genoma mitocondrial (Crozier et al., 1991; Hall e Smith, 1991).

Normalmente, a análise de mtDNA em estudos populacionais começa com a digestão por enzimas de restrição. O número de sítios de restrição detectados e sua relativa posição em um mapa de restrição são utilizados para determinar o haplótipo mitocondrial (Avice, 1994).

De La Rúa et al. (2001) estudaram o polimorfismo do DNA mitocondrial da *A. mellifera* de colônias das Ilhas Baleares a fim de caracterizar as populações daquela localidade. Desta forma, sugeriram que 75% das colônias estudadas pertencem à linhagem Africana. Mais de 25% do mtDNA africano encontrado em populações africanizadas na Argentina é derivado de fontes não relacionadas a *A. m. scutellata* (Sheppard et al., 1999).

Em *A. mellifera* e *Apis cerana*, estudos populacionais têm sido desenvolvidos utilizando o mtDNA e análises de microssatélites, proporcionando um aumento na compreensão sobre a dinâmica de subespécies populacionais, biogeografia, introgressão e evolução (Franck et al., 1998, 2000a, b; Segura, 2000; Sheppard e Smith, 2000; De la Rúa et al., 2001, 2002, 2003; Paar et al., 2004; Sušnik et al., 2004).

Hall e Smith (1991), ao testar o mtDNA em 129 colônias da África e Europa, detectaram duas linhagens europeias de colônias provenientes dos Estado Unidos e México e nas regiões neotropicais observaram que 72 colônias possuíam o mtDNA africano e quatro europeus.

Os polimorfismos existentes no mtDNA podem ser estudados por meio do marcador molecular *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), em que determinadas enzimas clivam o DNA alvo em locais específicos, denominados sítios de restrição, constituídos por quatro a oito pares de bases. As variações detectadas são explicadas pela diferença entre os tamanhos dos fragmentos gerados pelas enzimas de restrição. Esse marcador acompanhado da multiplicação *in vitro* do DNA por meio da *Polymerase Chain Reaction* (PCR) tornou-se uma técnica eficiente para estimar diversidade genética populacional (Pinto et al., 2003).

Apesar de o mtDNA ser uma excelente ferramenta para rastrear ancestrais maternos, não é possível avaliar contribuições paternas para a história e o padrão de fluxo gênico. Contudo, os marcadores moleculares são importantes ferramentas para selecionar rainhas produtoras de geleia real.

2.3. Marcadores moleculares MRJPs e a importância da geleia real para as abelhas *A. mellifera*

Hall (1986), utilizando sondas de diagnóstico de DNA, revelou diferenças características entre abelhas africanizadas e europeias. O uso de oligonucleotídeos

sintéticos em impressões digitais de DNA parece ser ainda mais poderoso para revelar variabilidade genética em populações de abelhas (Moritz e Southwick, 1972).

O desenvolvimento dos marcadores moleculares está diretamente relacionado aos avanços no campo da biologia molecular (Arias et al., 2006).

Os microssatélites são sequências repetidas em tandem com 1–6 bases (Hancock, 1999), amplamente distribuídas ao longo da região da eucromatina (Schlötterer e Wiehe, 1999). Locus de microssatélites são considerados codominantes, seletivamente neutros, altamente polimórficos e demonstram a herança Mendeliana (Moritz e Hillis, 1996). Aliados a estas características, eles têm sido extremamente utilizados em relações de parentesco, mapeamentos genéticos (Chakraborty e Kimmel, 1999), variações intraespecíficas (Moritz e Hillis, 1996), hibridização de espécies, dinâmica de populações e em estudos filogenéticos (Beaumont e Bruford, 1999). Podem também ser utilizados para avaliação do impacto do comportamento reprodutivo, estrutura social e dispersão em populações ameaçadas de extinção (Beaumont e Bruford, 1999). Ao nível de população, o alto polimorfismo dos microssatélites é considerado como sendo consequência de mutações novas, deriva genética e seleção em genes intimamente ligados às respectivas sequências (Schlötterer e Wiehe, 1999).

Dentro da família Apidae, muitos dos trabalhos que utilizaram os marcadores acima foram restritos ao gênero *Apis*. Alguns desses estudos têm abordado questões sobre a dinâmica da população (Estoup et al., 1995), a biogeografia (Franck et al., 1998) e os processos de hibridação e africanização destes insetos (Franck et al., 2001). A maioria dos marcadores microssatélites para Apidae foram descritos em *A. mellifera* (Estoup et al., 1993).

Em abelhas *A. mellifera*, as rainhas acasalam com vários machos (poliandria), sendo a produção de ovos de zangões na colônia basicamente atribuída à rainha (Ratnieks, 1993). Para estudar os conflitos reprodutivos, o comportamento de policiamento e a frequência de acasalamento, vários estudos têm empregado análises de locos de microssatélites (Arias et al., 2006).

A geleia real é uma substância secretada pelas glândulas mandibulares e hipofaríngeas localizadas na cabeça de operárias nutrizas de *A. mellifera*. Essa secreção é promovida pela ingestão de pólen com adição das secreções presentes na vesícula melífera das operárias, contendo principalmente açúcares (Schmitzová et al., 1998; Albert et al., 1999; Nogueira-Couto e Couto, 2006).

Para as abelhas, a geleia real é uma fonte natural de aminoácidos essenciais, lipídios, vitaminas e outros nutrientes (Schmitzová et al., 1998), além de possuir importância no seu processo de desenvolvimento e reprodução. Após o período de três dias, somente larvas designadas pelas operárias a se tornarem rainhas recebem a geleia real como fonte exclusiva de alimentação (Winston, 1992; Drapeau et al., 2006). Logo que é secretada, a geleia real não é armazenada, porém somente durante a criação de rainha ocorre a coleta, período em que as larvas irão se tornar rainhas e serão abundantemente alimentadas com a geleia real (Garcia e Nogueira-Couto, 2005; Nogueira-Couto e Couto, 2006).

A presença das glândulas hipofaríngeas e a produção de geleia real acarretam fatores nutricionais ambientais internos, como a densidade populacional, o desempenho de tarefas na colônia, a presença de cria, fatores externos à colônia, como interações biológicas, forrageamento e fatores genéticos, como a variabilidade que influencia diretamente no desempenho e desenvolvimento das atividades das abelhas (Simpson et al., 1968; Free, 1980; Robinson, 1995; Pernal e Currie, 2000; Deseyn e Billen, 2005; Suwannapong et al., 2007; Wegener et al., 2009; Sereia et al., 2010).

A composição da geleia real varia geograficamente e em resposta às condições climáticas. O teor médio de umidade é de 60-70%; 12-15% de proteína bruta (PB), 10-16% de açúcar, 3-6% de lipídeos e compostos de baixo peso molecular, como sais, vitaminas e aminoácidos livres de 2-3% (Takenaka, 1982; Chen e Chen, 1995). Também estão presentes na geleia real frações de proteínas solúveis em água (46-89%) e frações insolúveis em água (Chen e Chen, 1995; Takenaka e Echigo, 1983).

Garcia e Nogueira-Couto (2005), por meio de diversos estudos, realizaram a comparação da produção de geleia real entre abelhas africanizadas, italianas e descendentes, obtendo resultados que indicaram diferenças entre os períodos de produção e aceitação das larvas transferidas. Contudo, ao estudar a produção de geleia real em abelhas africanizadas e cárnicas, Mouro e Toledo (2004) observaram que as africanizadas, quando selecionadas para a produção de geleia real, mostraram-se mais eficientes.

Em todo o mundo, dentre os produtos das abelhas, a geleia real está relacionada à vida saudável, longevidade e cura de muitas doenças, além de ser

utilizada por mais de 30 anos como alimento ou cosmético (Brown, 1989; Chen e Chen, 1995; Münsted e Georgi, 2003).

Para a produção de geleia real, há poucos trabalhos associados aos marcadores moleculares. Um dos primeiros estudos moleculares com marcadores de DNA para a produção de geleia real foi realizado por Chen et al. (2005). Estes autores, ao analisar um total de 96 alelos produzidos por 10 locos de microssatélites, de acordo com a frequência alélica observada, identificaram sete alelos que podem ser utilizados como marcadores para abelhas produtoras de geleia real.

Proteínas principais da geleia real foram caracterizadas pela clonagem e sequenciamento de DNAs complementares da cabeça de operárias nutrizas *Apis mellifera carnica* (Schmitzová et al., 1998). Essas proteínas contêm oito membros principais: MRJP1, MRJP2, MRJP3, MRJP4, MRJP5 (Ohashi et al., 1997; Schmitzová et al., 1998; Simúth, 2001), MRJP6, MRJP7 e MRJP8 (Albert e Kludiny, 2004; Santos et al., 2005). Albert e Kludiny (2007) descreveram a MRJP9 e relataram que esta proteína possui uma função não-nutricional, sendo considerada ancestral às demais.

Essas proteínas adicionais da geleia real têm sido caracterizadas pela clonagem e sequenciamento do DNA complementar (cDNA) (Kludiny et al., 1994a; Albert et al., 1996; Ohashi et al., 1996, 1997). Foram identificadas quatro proteínas principais da geleia real (MRJPs) que codificam o cDNA (MRJP 1-4) (Kludiny et al., 1994b; Schmitzová et al., 1998), utilizando uma fonte imunológica de expressão da biblioteca de cDNAs, preparada a partir das cabeças de abelhas operárias nutrizas (*A. m. carnica*) de oito dias de idade. Os produtos gênicos desses cDNAs são expressos em níveis muito elevados em cabeças de abelhas nutrizas (Kludiny et al. 1994b). O quinto grupo das MRJPs consistiu de três clones de sequências idênticas que diferiam dos quatro grupos acima mencionados. O longo cDNA deste grupo foi sequenciado e o nucleotídeo e a sequência de aminoácidos provenientes identificaram essa sequência de codificação como um membro adicional da família do gene MRJP. Esse DNA complementar foi nomeado como *mrjp5* (Albert et al., 1996).

As proteínas MRJP3 e MRJP5 apresentam um tamanho de polimorfismo com intervalos de peso molecular entre 60-70 e 77-87 kDa, respectivamente (Schmitzova et al., 1998). O caráter altamente polimórfico do comprimento de

repetição da *mrjp3* e *mrjp5* pode ser usado como loco informativo em estudos genéticos de colônias de abelhas (Beye et al., 1998).

A geleia real produzida comercialmente é realizada pelo estímulo das colônias a produzirem rainhas além das condições do processo de produção natural (enxameagem reprodutiva e substituição de rainhas). Assim, a produção comercial está diretamente relacionada à produção de rainhas (Haydak, 1970). O processo de produção de geleia real necessita de pouco investimento, mas é possível somente com transferência de larvas jovens (menos de 24 horas de idade) dos favos das colmeias para cúpulas acrílicas (Garcia e Nogueira-Couto, 2005; Nogueira-Couto e Couto, 2006). Para isso, é necessário mão-de-obra qualificada, com dedicação maior para a produção de geleia real que comumente é necessária para a produção de outros produtos apícolas como, por exemplo, o mel (Harbo e Rinderer, 2005).

O maior produtor de geleia real é a China, com uma produção anual de cerca de 2000 toneladas, correspondendo a 90% da produção mundial (Li et al., 2003). Gradativas seleções de abelhas *A. mellifera* produtoras de geleia real realizadas desde 1980 explicam esta elevada produção.

As MRJPs são bem caracterizadas em *A. mellifera* (Albert et al., 1996; 1999; Schmitzová et al., 1998; Albert e Kludiny, 2004; Drapeau et al., 2006). O grande número de estudos relacionados com a família MRJP de *A. mellifera* ainda fornece pouca informação sobre o uso desses marcadores moleculares em estudos de genética de populações e como marcadores de seleção associados à produção de geleia real (Baitala et al., 2010; Parpinelli, 2011).

2.4. Melhoramento genético de *A. mellifera* africanizadas

Em qualquer organismo a ser estudado, o melhoramento genético tem como objetivo aumentar as frequências dos genes desejáveis dos locos que apresentam importância econômica, a fim de serem selecionados na população (Bergmann, 2001). Em abelhas, o que se espera é uma produção acima da média, tanto de mel, como de geleia real e própolis, entre outros produtos, a partir da linhagem em que foi feita a seleção.

O melhoramento genético com o intuito de aumentar a produtividade pode ser feito por meio de cruzamentos abertos em áreas sob seleção e por produção de matrizes, por meio da técnica de inseminação instrumental (Soares et al., 1996). Os

mesmos autores indicam que a técnica de inseminação instrumental ajuda a acelerar os programas de melhoramento genético, permitindo o controle exato dos cruzamentos, além de propiciar a formação de matrizes de boa qualidade.

Para Page e Laidlaw (1997), o sucesso no melhoramento genético seletivo necessita de quatro componentes essenciais: 1) seleção do estoque, sendo que as colônias devem ser identificadas com diferenças selecionáveis entre elas que formam o potencial da população parental; 2) manutenção da variabilidade genética; 3) controle dos acasalamentos; e 4) manutenção do estoque durante todo o programa. No caso do Brasil, um quinto componente seria necessário para o sucesso do programa de melhoramento genético: a aplicação do material obtido com os apicultores, por meio de testes com as rainhas avaliadas em relação à produtividade, que neste caso seria a produção de geleia real.

As atividades especializadas na apicultura, como a produção de geleia real, vêm alcançando interesse comercial ao longo dos anos (Queiroz et al., 2001), podendo ser uma excelente opção para os apicultores, especialmente em regiões onde o mel produzido possui pequena aceitação comercial (Nogueira-Couto e Couto, 2006).

A correlação entre características é de grande importância para o melhoramento genético, especialmente se a seleção de uma delas é dificultada devido à baixa herdabilidade, e/ou porque apresenta problemas de mensuração e identificação (Cruz e Regazzy, 1997).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material biológico

Para este estudo, foram utilizadas operárias nutrízes de *A. mellifera* africanizadas provenientes do Apiário Central da Fazenda Experimental de Iguatemi da Universidade Estadual de Maringá (FEI/UEM), pertencentes ao Programa de Melhoramento Genético de abelhas *A. mellifera* Africanizadas para produção de geleia real.

Foram coletadas 20 operárias nutrízes de oito colmeias matrizes fornecedoras de rainhas para as colônias produtoras de geleia real. As abelhas nutrízes foram coletadas dos favos e selecionadas por meio de coloração/idade.

Após a coleta, as abelhas foram sacrificadas, armazenadas em frascos fechados, identificados com a matriz de origem e congeladas a -20°C, até a sua utilização para o isolamento do DNA.

3.2. Isolamento de DNA

O DNA total foi isolado de 10 operárias nutrízes de cada matriz analisada, totalizando 80 indivíduos. O processo de extração foi realizado segundo o protocolo descrito por Bardacki e Skibinski (1994), adaptado para utilizar o tórax de *A. mellifera*. A maceração foi realizada individualmente em 400 µL de tampão de lise composto por Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; EDTA 50 mM, pH 8,0; NaCl 100 mM, SDS à 1%, e 10 µL de proteinase K (5 µg/µL). Em seguida, as amostras foram mantidas por 4 horas a 55°C. O DNA foi purificado com solução de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25: 24: 1) e clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). O Acetato de sódio (3 M) e o etanol absoluto gelado foram utilizados para precipitação do DNA que posteriormente permaneceu incubado a -20°C *overnight*.

O DNA precipitado foi separado por centrifugação a 10.300 xg por 10 min., ressuspenso em tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) e tratado com 3 µL de RNase (10 µg/mL). A quantificação foi avaliada em gel de agarose 0,8% com tampão Tris, Ácido acético, EDTA 0,5 mM, pH 8,0 (TAE 1X) e posteriormente o DNA foi comparado com concentrações conhecidas e graduadas de fago λ. Os geis foram

corados com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e as imagens foram capturadas sob luz ultravioleta pelo sistema L-PIX HE *molecular imaging*.

3.3. Amplificação da região MRJP por PCR

As reações por PCR foram realizadas utilizando primers específicos, sintetizados para amplificar os locos *mrjp3* (Albert et al., 1999b) e *mrjp5* (Albert et al., 1999a): *mrjp3* (forward: ATG TAA TTT TGA AGA ATG AAC TTG; reverse: TGT AGA TGA CTT AAT GAG AAA CAC) e *mrjp5* (forward: AGA CTC TTC AAA CGG TCG TTG C; reverse: CTG TAA TTT CAT ACT TAA AGC CAT).

Em um volume de reação de 20 µL, foi utilizado o tampão Tris-KCl 1X (tris-HCl 20 mM, pH 8,4 e KCl 50 mM), 0,5 µM de cada *primer*, 0,1 mM de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), uma unidade de *Taq* Platinum DNA Polimerase (Invitrogen, Brasil). Para a otimização das amplificações, foram utilizadas concentrações específicas de MgCl₂ e do DNA molde em relação ao primer utilizado.

Para os primers *mrjp3* e *mrjp5*, foram utilizadas as concentrações de 1,4 mmol de MgCl₂ e a concentração do DNA molde empregada para os primers *mrjp3* e *mrjp5* foi de 20 ng/µL.

As reações de amplificação foram realizadas em um termociclador Techne TC-512 e as condições de amplificações para os primers *mrjp3* e *mrjp5* foram baseadas no protocolo descrito por Albert e Schmitz (2002). A amplificação começou com uma desnaturação inicial de 94°C por 2 minutos, seguida de 30 ciclos de 30 s a 54°C e 1 minuto a 72 °C, sendo completada com uma extensão final de 10 minutos a 72°C.

Os produtos das amplificações foram separados em gel de agarose 2% preparado com tampão TBE 0,5 X (54 g Tris; 27,5 g ácido bórico e 20 mL EDTA 0,5 mM, pH 8,0). Para o preparo deste gel, foi utilizado 50% de agarose comum (Invitrogen, Brasil) e 50% de agarose MS-8 (Invitrogen, Brasil). A separação foi realizada a 60 V por 3 horas. Os geis foram corados com banho de brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e as bandas de DNA amplificadas foram visualizadas sob luz ultravioleta. A imagem foi capturada pelo sistema L-PIX HE *molecular imaging*. Para estimar o tamanho dos alelos amplificados foi utilizado o marcador de peso molecular de 100 pares de bases (Invitrogen, Brasil).

3.4. Amplificação por PCR de regiões mitocondriais e digestão com endonucleases

A amplificação por PCR foi realizada, como descrito por Barni et al. (2007), com as regiões do DNA mitocondrial e seus respectivos primers (Quadro 1).

Quadro 1 - Regiões do DNA mitocondrial e seus respectivos *primers* com suas respectivas sequências de nucleotídeos

Região	Sentido	Sequência do <i>primer</i> (5' para 3')
Citocromo b (Cit b)	<i>Foward</i>	TATGTACTACCATGAGGACAAATATC
	<i>Reverse</i>	ATTACACCTCCTAATTTATTAGGAAT
Citocromo Oxidase I (COI)	<i>Foward</i>	TTAAGATCCCCAGGATCATG
	<i>Reverse</i>	TGCAAATACTGCACCTATTG
Subunidade ribossômica maior (16S)	<i>Foward</i>	TTTTGTACCTTTTGTATCAGGGTTG
	<i>Reverse</i>	CTATAGGGTCTTATCGTCCC
Citocromo Oxidase I e II (COI- COII)	<i>Foward</i>	GGCAGAATAAGTGCATTG
	<i>Reverse</i>	CAA TAT CAT TGA TGA CC

Com um volume total de 20µL, as reações de PCR foram realizadas com tampão de 10x, 0,64 mM de cada dNTP, 2,0 mM de MgCl₂, 0,5 µL dos primers *Foward* (*F*) e *Reverse* (*R*) a 0,25 µL.M⁻¹, 0,2 µL de *Taq* Polimerase e 13,16 µL de água esterilizada (miliq). As reações de amplificações foram realizadas em um termociclador *Applied Biosystems* modelo Veriti e submetidas ao seguinte processo para os primers utilizados: desnaturação a 94°C por 3 minutos, amplificação de 35 ciclos de 90°C por 1 minuto, 54°C por 45 segundos, 62°C por 2 minutos e extensão final de 5 minutos a 72°C. Após a amplificação, 3 µL dos produtos de PCR foram submetidos a digestão com as seguintes enzimas de restrição: *Bgl* II para Cit b; *Hinc* II e *Xba* I para COI; *Xba* I e *Dra* I para COI-COII e *Eco* RI, *Alu* I, *Hinc* II, *Taq* I, *Vsp* I, *Dra* I para 16S (Quadro 2).

Quadro 2 - Primers e respectivas enzimas de restrição

Regiões de mtDNA	Enzima de restrição
Cit b	<i>Bgl</i> II
COI	<i>Xba</i> I, <i>Hinc</i> II
16S	<i>Eco</i> RI, <i>Alu</i> I, <i>Hinc</i> II, <i>Taq</i> I, <i>Vsp</i> I, <i>Dra</i> I
COI-COII	<i>Dra</i> I, <i>Xba</i> I

As reações de digestão por endonucleases foram mantidas a 37°C por 4h em banho-maria (exceto para *Taq* I que necessitou de 60°C por 4h). Os fragmentos de restrição foram separados em gel de agarose a 1% e posteriormente corados com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e visualizados sob luz ultravioleta pelo sistema L-PIX HE *molecular imaging*.

3.5. Eletroforese em géis de poliacrilamida (PAGE) e coloração com nitrato de prata

As eletroforeses PAGE foram realizadas com géis de poliacrilamida 9% (T=30,8%; C=2,6%). As corridas eletroforéticas foram realizadas com tampão TBE 10X (108 g de Tris; 55 g de ácido bórico e 40 mL de EDTA, 0,5 M, pH 8,0), a 200V por aproximadamente 3 horas.

Após a corrida, os géis foram corados por impregnação com nitrato de prata e mantidos em solução fixadora e conservante (100 mL de etanol, 5 mL de ácido acético e 995 mL de água esterilizada (miliq)) até a digitalização e secagem.

As análises de restrição das regiões mitocondriais do Citocromo b (Cit b) e COI foram realizadas a fim de obter uma caracterização molecular comparativa das amostras de abelhas. Este foi um controle para o padrão da linhagem africana (ausência do sítio *Bgl* II na região Cit b) e para a diferenciação dentro das subespécies europeias (apenas *A. m. mellifera* possui o sítio *Hinc* II na região COI).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação de linhagens por MRJPs

Os locos *mrjp3* e *mrjp5* continuam polimórficos, mesmo com o processo de seleção de rainhas, que vem sendo mantido pelo Programa de Melhoramento Genético de abelhas *A. mellifera* Africanizadas provenientes do Apiário Central da Fazenda Experimental de Iguatemi da Universidade Estadual de Maringá (FEI/UEM), para produção de geleia real. Nas colmeias matrizes foi encontrado um total de seis alelos para *mrjp3* (A, C, D, E, F e G) e cinco alelos para *mrjp5* (C, D, E, F e G) (Figura 1).

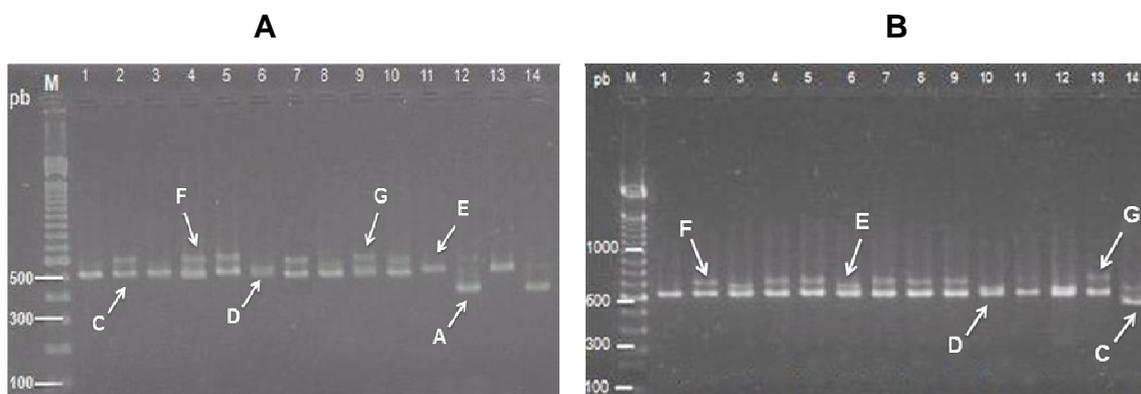


Figura 1 - Perfil eletroforético dos locos *mrjps* de abelhas *A. mellifera* africanizadas. (A) Fragmentos amplificados do loco *mrjp3*; (B) Fragmentos amplificados do loco *mrjp5*. M = Marcador de peso molecular de DNA 100 pb (DNA Ladder-Invitrogen). As setas e as letras indicam os alelos identificados para cada loco.

Nas oito colmeias matrizes analisadas para *mrjp3*, seis apresentaram o alelo E, seguido do alelo D em cinco matrizes. A partir do genótipo das operárias analisadas, foi inferido o genótipo das rainhas. Dessa maneira, foi estimado um total de quatro rainhas com o genótipo DE (Quadro 3). Em uma das colmeias, não foi possível verificar o provável genótipo da rainha para o loco *mrjp3*, provavelmente por estar ocorrendo troca de rainha no período de coleta. Para *mrjp5*, quatro rainhas foram genotipadas como sendo homozigotas (DD), três apresentaram dúvidas se seriam DD ou DE e uma possuía o genótipo DE (Quadro 3).

Nos acasalamentos naturais, as rainhas de *A. mellifera* podem copular com até 17 zangões, possibilitando o aumento da variabilidade genética. Desta forma, foi verificado polimorfismo para os locos *mrjp3* (seis alelos) e *mrjp5* (cinco alelos) entre os zangões que acasalaram com as rainhas (Quadro 3).

Quadro 3 – Genótipos de rainhas de *A. mellifera* africanizadas de oito colônias produtoras de geleia real e os prováveis zangões que participaram da fecundação

Colônia	MRJP3		MRJP5	
	Rainha	Zangão	Rainha	Zangão
Col. 1 (CA8-16)	CD	D; E; F; G	DD	D; E; F; G
Col. 2 (CA8-20)	AE	A; E	DD	D; E; F; G
Col. 3 (PE72-11)	*	*	DD	D; E; F
Col. 4 (CA5-14)	DE	C; D; F; G	DD	E; F;
Col. 5 (VA7-15)	DE	D; E; F;	DD ou DE**	D; E; F
Col. 6 (CA6)	CE	C; E; G	D_ ***	D; E; F
Col. 7 (I64-13)	DE	D; E; F	DE	C; D; E; F
Col. 8 (ME69-05)	DE	D; E	DD ou DE	D; E

*genótipos não estimados devido a possíveis trocas de rainha na colônia; **genótipo incerto; ***genótipo parcialmente estimado.

No processo de melhoramento genético, está ocorrendo seleção com maior frequência dos alelos *D* e *E* para *mrjp3* e do alelo *D* para *mrjp5* em quase todas as rainhas das matrizes selecionadas sem necessitar da inseminação instrumental.

O monitoramento realizado pelo programa de melhoramento deve continuar para que não ocorra aumento de homozigose no genoma das matrizes, que pode prejudicar a colméia, promovendo, por exemplo, expressão de genes deletérios, aumento na suscetibilidade a doenças. Além disso, o aumento de endocruzamentos pode levar à homozigose do loco *csd* (*complementary sex determiner*) que terá como consequência a ocorrência de machos diploides (Beye et al., 2003; Beye, 2004).

Os programas de melhoramento genético têm como objetivo selecionar indivíduos com características de interesse para os apicultores e usá-los como pais da próxima geração, para melhorar e aumentar a eficiência de produção (Rinderer 2008). A seleção é baseada no desempenho da colônia e, assim, as características genéticas de variáveis devem ser estimadas (Calderone e Fondrk 1991). Desta forma, são realizados estudos com a diferença esperada da progênie (DEP), que representa a metade do valor genético do animal e indica a capacidade de

transmissão genética de determinado indivíduo para uma característica em particular. O estudo realizado por Baitala et al. (2010) com matrizes de *A. mellifera* sob seleção para produção de geleia real mostrou que as análises de variância foram significativas ($p < 0,05$) para o *locus mrjp3*. Com a seleção sendo realizada por meio do valor genético apresentado, o valor de R^2 calculado para os alelos significativos do *locus mrjp3* indicou que 36,85% da variação da DEP eram explicados pela variação dos alelos *C*, *D* e *E*. Portanto, esses três alelos exercem um forte efeito na variação do valor genético da produção da geleia real. No processo de seleção de rainhas para produção de geleia, esses resultados têm sido considerados e as rainhas filhas selecionadas e mantidas no programa de melhoramento são genotipadas para o loco *mrp3*. Os resultados apresentados no quadro 3 mostram que esse processo de seleção tem sido eficiente e que os alelos *D* e *E* estão sendo mantidos entre as rainhas produtoras.

No estudo realizado por Ostrovski (2012), foram avaliados os parâmetros genéticos das rainhas produtoras de geleia real, considerando os genótipos para o loco *mrjp3*. Nesse trabalho foi verificado que as rainhas com o genótipo *DE* apresentaram os melhores resultados para os parâmetros avaliados. Para a característica de produção de geleia real total por colônia (g), não houve diferença estatística entre os genótipos analisados, mas o destaque ficou para o genótipo *DE* com 48% de chances em ser classificado como de alto valor genético para esta característica.

Na avaliação da produção de geleia real por cúpula, o genótipo *DE* obteve a melhor classificação, por apresentar 60% de probabilidade em estar acima da média, diferenciando significativamente do genótipo *EF* considerado o pior genótipo para este parâmetro. Para a característica de aceitação de larvas, os valores genéticos dos genótipos *DE* e *CD* foram superiores em relação aos genótipos *CE*, *EF* e *FG* (mas não houve diferença estatística). O valor genético para a produção de geleia real total por colônia foi considerado superior para o genótipo *DE*, não se diferenciando apenas do genótipo *CD*, mas diferenciando-se significativamente dos demais. Na deposição de geleia real por cúpula, o valor genético do genótipo *DE* se destacou como superior, diferenciando significativamente dos genótipos *CD* e *CE*.

Os resultados obtidos por Ostrovski (2012) corroboram o fato de o programa de melhoramento possuir como matrizes quatro rainhas com genótipo *DE* e uma

rainha *CD*. O genótipo *AE* não foi avaliado para parâmetros de produção de geleia real.

O programa de melhoramento genético, desde 2005, vem sendo realizado por meio de fecundação natural e seleção baseada na produção e no marcador MRJP3. Além dos estudos apresentados acima, foram realizadas avaliações de parâmetros genéticos, por Mouro e Toledo (2004), Toledo e Mouro (2005), Faquinello (2010) e Faquinello et al. (2011); avaliação dos marcadores moleculares, por Parpinelli (2011); e o sequenciamento de alelos *mrjps*, por Casagrande-Pozza (2011). Os resultados obtidos em todos os estudos fornecem dados que contribuem para a continuidade do programa de seleção com o intuito de obter rainhas com os melhores genótipos e, assim, aumentar a produção de geleia real.

4.2. Africanização

Os padrões de restrição identificados no presente estudo foram comparados com aqueles descritos por Garnery et al. (1993) e Collet et al. (2007) para identificação de mitótipos de *A. mellifera* africanas e europeias.

Os padrões de restrição após amplificação com primers para as regiões gênicas mostradas no Quadro 4 podem contribuir para a identificação da mistura racial dos genes mitocondriais da abelhas melíferas.

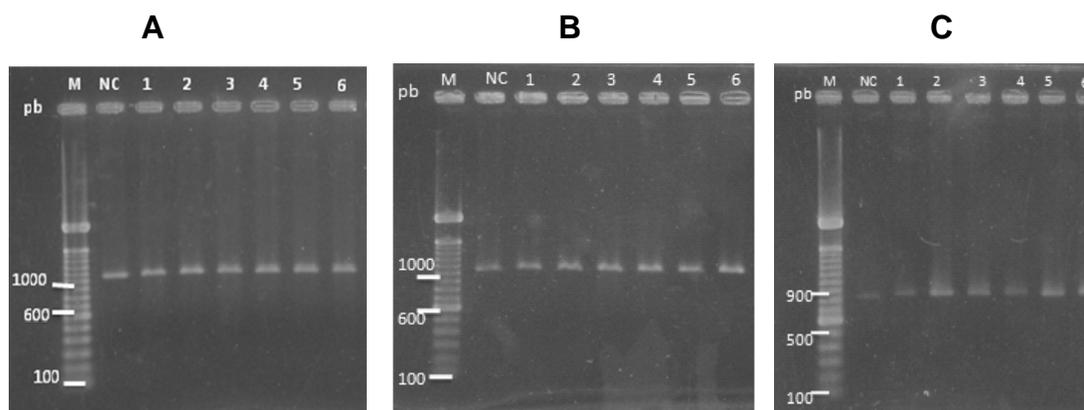


Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose a 1%. NC: Fragmento de DNA amplificado da região COI e região COI-COII e não clivado. M: Marcador molecular com 100 pb. **A:** Fragmento de DNA amplificado da região COI, colunas 1, 2, 3, 4, 5 e 6 - ausência do sítio de restrição *Xba I*. **B:** Fragmento de DNA amplificado da região COI, colunas 1, 2, 3, 4, 5 e 6 - ausência do sítio de restrição *Hinc II*. **C:** Fragmento de DNA amplificado da região COI-COII, colunas 1, 2, 3, 4, 5 e 6 - ausência do sítio de restrição *Xba I*.

No estudo elaborado por Garnery et al. (1993), os autores consideraram que as *A. mellifera* evoluíram de três ramos distintos que divergiram em torno de um milhão de anos atrás. O primeiro ramo (M) corresponde às subespécies do oeste europeu, as *A. m. mellifera*. O segundo (C) se estende do oriente médio para a Itália, englobando as subespécies *meda*, *caucásica*, *cecropia*, *carnica* e *ligustica*. O terceiro ramo (A) inclui todas as subespécies africanas estudadas, exceto a *lamarkii*, bem como as abelhas melíferas de algumas ilhas mediterrâneas, como a Sicília (*Sicula*). Contatos secundários entre os ramos resultam em áreas de introgressão, onde duas categorias de haplótipos de mtDNA coexistem.

Esses mitótipos A, M e C podem ser detectados entre os polihíbridos que compõem as abelhas *A. m.* africanizadas.

Nas abelhas africanizadas produtoras de geleia real analisadas, foi detectada ausência de sítios de restrição com as enzimas *Bgl II* para Cit b; *Xba I* e *Hinc II* para COI (Figura 2); *Xba I* para COI-COII (Figura 2); *Eco RI*, para 16S (Quadro 4). Esses padrões de restrição indicam que as abelhas *A. mellifera* deste estudo apresentam o padrão de DNA mitocondrial africano, ou seja, possuem matrilinearidade africana.

Quadro 4 - Padrões de ausência e presença de sítios de restrição observados nas diferentes regiões do DNA mitocondrial de *A. mellifera* da Fazenda Experimental de Iguatemi pertencente à Universidade Estadual de Maringá. (-): sítio de restrição ausente; (+): sítio de restrição presente; A: padrão africano

Região amplificada	Enzimas de restrição	Matrizes produtoras de geleia real							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Cit b	<i>Bgl II</i> (-)	A	A	A	A	A	A	A	A
CO I	<i>Xba I</i> (-)	A	A	A	A	A	A	A	A
	<i>Hinc II</i> (-)	A	A	A	A	A	A	A	A
COI-COII	<i>Xba I</i> (-)	A	A	A	A	A	A	A	A
	<i>Dra I</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
16S	<i>Eco RI</i> (-)	A	A	A	A	A	A	A	A
	<i>Alu I</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Hinc II</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Taq I</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Ase I (Vsp I)</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Dra I</i>	+	+	+	+	+	+	+	+

A presença de sítios de restrição foi observada com as enzimas *Alu I*, *Hinc II*, *Taq I*, *Ase I* (*Vsp I*) e *Dra I* para 16S (Figura 3) e com a enzima *Dra I* para COI-COII (Figura 3) (Quadro 4).

O padrão de restrição *Alu I* para 16S foi semelhante ao descrito por Collet et al. (2007) para os ramos M e C, ou seja, padrão europeu (Figura 3).

Os haplótipos observados para a 16S/*Taq I* (Figura 3) foi semelhante ao haplótipo A descrito por Collet et al. (2007). Os mitótipos observados para 16S/*Vsp I* parecem híbridos com padrões de restrição intermediários entre os haplótipos A, M e C (Collet et al., 2007). Nesse caso, podem ter ocorrido mutações que alteraram os sítios de restrição para essa enzima.

A enzima de restrição *Dra I* foi empregada para análise de clivagem com os amplificados 16S e COI-COII (Figura 3). Nas duas clivagens foi detectado padrão de restrição africano. Quando comparado com os mitótipos descritos por Garnery et al. (1993) foi verificado que há compatibilidade com o haplótipo A4.

A região intergênica COI-COII exibe pelo menos sete variantes de comprimento que podem ser explicadas pela combinação de três sequências relacionadas Po (67 pb), P (54pb) e Q (192-196 pb) (Garnery et al., 1992, Garnery et al., 1993). Essas sequências originam os seguintes polimorfismos: PoQ, PoQQ, PoQQQ, PQ, PQQ, PQQQ e Q. Esse polimorfismo permite identificar os três ramos evolutivos de *A. mellifera*: Po (A), P (M) e o ramo (C) não possui Po nem P (Garnery et al., 1993).

A análise das sequências disponíveis de COI-COII permitiu a Garnery et al. (1993) concluir que o local de reconhecimento da sequência TTAAA provavelmente tem um valor significativo para o polimorfismo. De acordo com essa proposição e com o padrão de tamanho de fragmento amplificado observado para o mtDNA das abelhas melíferas produtoras de geleia real analisadas, os mitótipos para COI-COII detectados foram PQQ e PoQQ.

Os mitótipos detectados mostraram que as rainhas produtoras de geleia real mantidas pelo programa de melhoramento possuem mitótipo africano. Contudo, não foi identificado nenhum mitótipo que pudesse ser utilizado como marcador para produção de geleia real.

Para De La Rúa et al. (2001), nas análises de restrição após a amplificação por PCR do Citocromo b (Cit b), o padrão de restrição característico da linhagem evolutiva Africana, ou seja, o sítio da *Bgl II* na região Cit b, estava ausente.

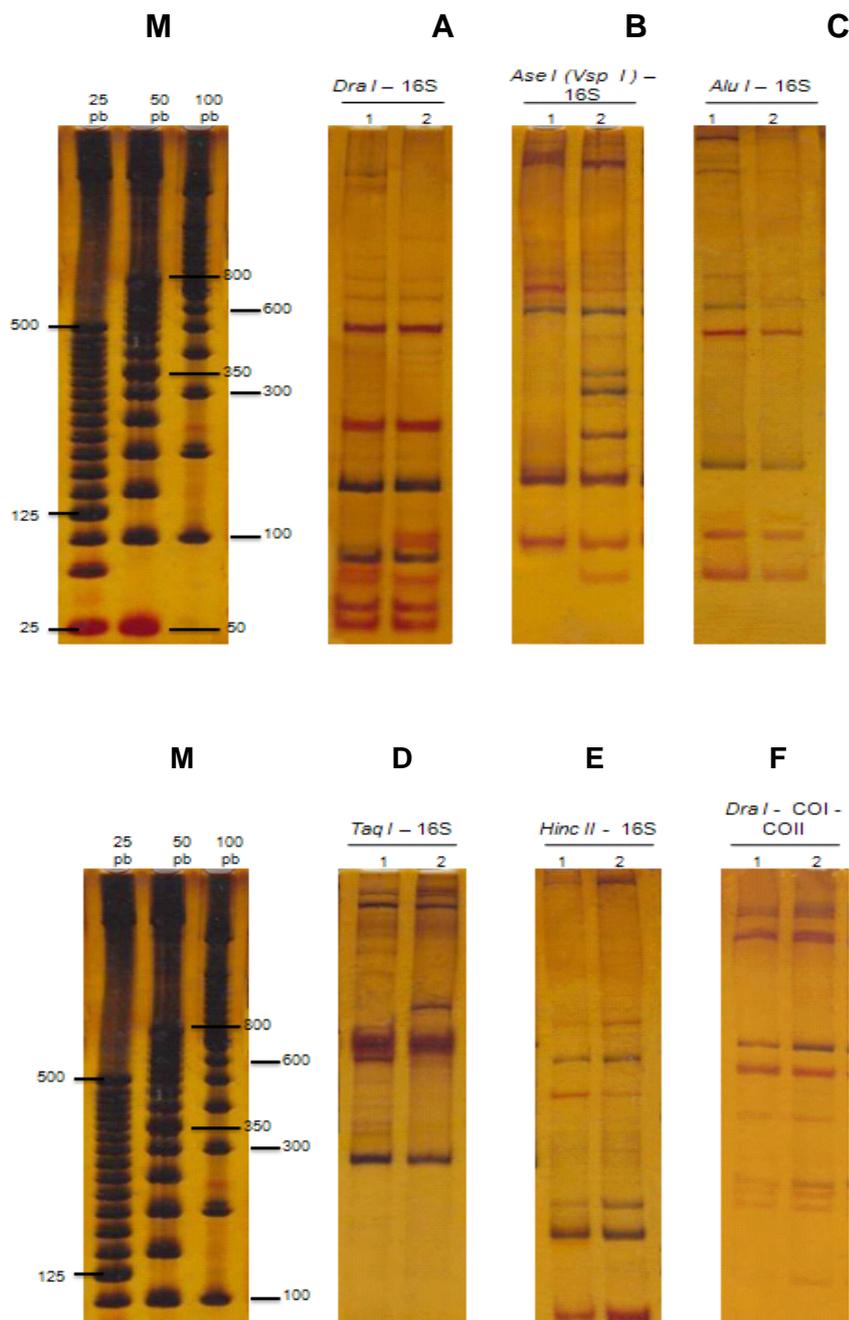


Figura 3 – Eletroforese em gel de poliacrilamida a 9%. NC: Fragmento de DNA amplificado e não clivado. **M**: Marcadores moleculares com 25, 50 e 100 pb. **A**: Fragmento de DNA amplificado da região 16S, colunas 1e 2 - presença do sítio de restrição *Dra I*. **B**: Fragmento de DNA amplificado da região 16S, colunas 1e 2 - presença do sítio de restrição *Ase I (Vsp I)*. **C**: Fragmento de DNA amplificado da região 16S, colunas 1 e 2 - presença do sítio de restrição *Alu I*. **D**: Fragmento de DNA amplificado da região 16S, colunas 1e 2 - presença do sítio de restrição *Taq I*. **E**: Fragmento de DNA amplificado da região 16S, colunas 1 e 2 - presença do sítio de restrição *Hinc II*. **F**: Fragmento de DNA amplificado da região COI-COII, colunas 1 e 2 - presença do sítio de restrição *Dra I*.

Pinto et al. (2003) relataram que estudos desenvolvidos com as colônias do Velho Mundo indicaram, por meio das análises feitas com Citocromo b/ *Bgl II*, a discriminação da linhagem mitocondrial Africana (mitótipo com uma banda) de linhagens mitocondriais da Europa Ocidental, Mediterrâneo Oriental e do Oriente Médio (linhagens de mitótipos com duas bandas) e que nenhum outro mitótipo foi introduzido antes da chegada das abelhas Africanizadas em 1990. Portanto, Citocromo b / *Bgl II* pode ser usado para identificar as abelhas africanizadas matematicamente com um elevado grau de confiabilidade e uma taxa muito baixa de erro estimada (Pinto et al., 2003).

A presença do mtDNA africano foi observada em abelhas melíferas das ilhas Baleares no mar Mediterrâneo (De La Rúa et al., 2001). Ao analisarem o mtDNA de abelhas *A. mellifera* de 23 localidades das Ilhas Majorca, Minorca, Ibiza e Formentera no Mediterrâneo, De La Rúa et al. (2001) mostraram que a maioria das colônias (74,54%) possuem padrão de restrição característico de linhagens Africanas, ou seja, ausência do sítio *Bgl II* na região Cit b e ausência do sítio *Hinc II* e *Xba* na região COI. As demais colônias apresentaram padrão de linhagens de origem da Europa Ocidental. Esses resultados podem considerar a influência dos movimentos migratórios humanos, ocorrentes desde os tempos pré-históricos.

Para Hall e Smith (1991), um sítio de restrição *Hinc II* da subunidade COI é detectado apenas em abelhas pertencentes ao Oeste Europeu. Polimorfismos entre os genes das subunidades COI-COII são encontradas no mtDNA de abelhas Oeste europeias e africanas. De acordo com Collet et al. (2007), o sítio *Hinc II* para COI caracteriza o haplótipo *mellifera*, típico das populações de abelhas da Europa Ocidental.

5. CONCLUSÕES

a) As rainhas matrizes produtoras de geleia real estão mantendo os genótipos *DE* e *DD* para os locos *mrjp3* e *mrjp5*, respectivamente.

b) MRJP3 é um bom marcador molecular para seleção de rainhas para produção de geleia real.

c) O padrão de DNA mitocondrial das rainhas matrizes do programa de melhoramento de abelhas *A. mellifera* para produção de geleia real da UEM é africano.

d) Não foram identificados possíveis marcadores de DNA mitocondrial para contribuir com a seleção das matrizes para o programa de melhoramento de abelhas *A. mellifera* da Universidade Estadual de Maringá.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERT, S.; BHATTACHARYA, D.; KLAUDINY, J.; SCHMITZOVÁ, J.; SIMÚTH, J. The family of major royal jelly proteins and its evolution. **Journal of Molecular Evolution**, 49:290-297, 1999.
- ALBERT, S.; KLAUDINY, J. The MRJP/YELLOW protein family of *Apis mellifera*: Identification of new members in the EST library. **Journal of Insect Physiology**, 50:51–59, 2004.
- ALBERT, S.; KLAUDINY, J. MRJP9, an ancient protein of the honeybee MRJP family with non-nutritional function. **Journal of Apicultural Research**, 46:99-104, 2007.
- ALBERT, S.; SCHMITZ, J. Characterization of major royal jelly protein-like DNA sequences in *Apis dorsata*. **Journal of Apicultural Research**, 41:75-85, 2002.
- ALBERT, S.; KLAUDINY, 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.
- ALBERT, S.; KLAUDINY, J.; SIMÚTH, J. Molecular characterization of MRJP3, highly polymorphic protein of honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 29:427-434, 1999.
- ARIAS, M.C.; BRITO, R.M.; FRANCISCO, F.O.; MORETTO, G.; OLIVEIRA, F.F.; SILVESTRE, D.; SHEPPARD, W.S. Molecular markers as a tool for population and evolutionary studies of stingless bees. **Apidologie**, 37:259-274, 2006.
- AVISE, J.C. **Molecular markers, natural history and evolution**. New York: Chapman and Hall, 1994. 511p.
- 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**, 41:160-168, 2010.

BARDAKCI, F.; SKIBINSKI, D.O. Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification. **Heredity**, 73:117-123, 1994.

BARNI, G.S.; STRAPAZZON, R.; GUERRA, J.C.V.JR.; MORETTO, G. Mitochondrial genome differences between the stingless bees *Melipona rufiventris* and *Melipona mondury* (Apidae: Meliponini). **Genetics And Molecular Research**, 6:8-14, 2007.

BEAMOUNT, M.A.; BRUFORD, M.W. Microsatellites in conservation genetics. In: GOLDSTEIN, D.B.; SCHLÖTTERER, C. (eds.). **Microsatellites evolution and applications**. New York: Oxford University Press, 1999. p. 165-182.

BERGMANN, J.A.G. Avaliação genética. In: PEREIRA, J.C.C. (eds.). **Melhoramento genético aplicado à produção animal**. 3. ed. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2001. p. 502-515.

BEYE, M. The dice of fate: the *csd* gene and how its allelic composition regulates sexual development in the honey bee, *Apis mellifera*. **BioEssays**, 26:1131-1139, 2004.

BEYE, M.; HASSELMANN, M.; FONDRK, M.K.; PAGE, R.E.JR.; OMHOLT, S.W. The gene *csd* is the primary signal for sexual development in the honeybee and encodes an SR-type protein. **Cell**, 114:419-429, 2003.

BEYE, M.; NEUMANN, P.; SCHMITZOVÁ, J.; KLAUDINY, J.; ALBERT, S.; SIMÚTH, J.; FELDER, M.; MORITZ, R.F.A. A simple, non-radioactive DNA fingerprinting method for identification of patriline in honeybee colonies. **Apidologie**, 29:255-263, 1998.

BROWN, R. Hive products: Pollen, propolis and royal jelly. **Bee World**, 70:109-117, 1989.

BROWN, W.M. Evolution of animal mitochondrial DNA. In: NEI, M.; KOEHN R.K. (eds.). **Evolution of genes and proteins**. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 1983. p. 63-88.

CALDERONE, N.W.; FONDRK, M.K. Selection for high and low, colony weight gain in the honey bee, *Apis mellifera*, using selected queens and random males. **Apidologie**, 22:49-60, 1991.

CASAGRANDE-POZZA, A.P.B. **Sequenciamento dos alelos das proteínas principais da geléia real de abelhas *Apis mellifera* africanizadas**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2011. 52p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia).

CHAKRABORTY, R.; KIMMEL, M. Statistics of microsatellite loci: estimation of mutation rate and pattern of population expansion. In: Goldstein D.B.; Schlötterer C. (eds.). **Microsatellites: evolution and applications**. New York: Oxford University Press, 1999. p. 139-150.

CHEN, L.C.; CHEN, S.Y. Changes in protein components and storage stability of royal jelly under various conditions. **Food Chemistry**, 54:195–200, 1995.

CHEN, S.; LI, J.; ZHONG, B.; SU, S. Microsatellite analysis of royal jelly producing traits of Italian honeybee (*Apis mellifera ligustica*). **Acta Genetica Sinica**, 32:1037-1044, 2005.

CLARKE, K.E.; RINDERER, T.E.; FRANCK, P.; QUEZADA-EUÁN, J.G.; OLDROYD, B.P. The africanization of honeybees (*Apis mellifera* L.) of the Yucatan: A study of a massive hybridization event across time. **Evolution**, 56:1462-1474, 2002.

COLLET, T. **Estrutura genética das populações de abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) e suas relações com as raças parentais determinadas por meio da análise de microssatélite**. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 2009. 174p. Tese (Doutorado em Genética e Evolução).

COLLET, T.; ARIAS, M.C.; DEL LAMA, M.A. 16S mtDNA variation in *Apis mellifera* detected by PCR-RFLP. **Apidologie**, 38:47-54, 2007.

CROZIER, R.H.; CROZIER, Y.C. The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera* complete sequence and genome organization. **Genetics**, 133:97-117, 1992.

CROZIER, Y.C.; KOULIANOS, S.; CROZIER, R.H. An improved test for Africanized honey bee mitochondrial DNA. **Experientia**, 47:968-969, 1991.

CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV, 1997. 392p.

DE LA RÚA, P.; GALIÁN, J.; SERRANO, J.; MORITZ, R.F.A. Genetic structure and distinctness of *Apis mellifera* L. populations from the Canary Islands. **Molecular Ecology**, 10:1733-1742, 2001.

DE LA RÚA, P.; GALIÁN, J.; SERRANO, J.; MORITZ, R.F.A. Microsatellite analysis of non-migratory colonies of *Apis mellifera iberica* from south-eastern Spain. **Journal of Zoological Systematics Evolutionary Research**, 40:164-168, 2002.

DE LA RÚA, P.; GALIÁN, J.; SERRANO, J.; MORITZ, R.F.A. Genetic structure of Balearic honeybee populations based on microsatellite polymorphism. **Genetics Selection Evolution**, 35:339-350, 2003.

DEL LAMA, M.A.; LOBO, J.A.; SOARES, A.E.E.; DEL LAMA, S.N. Genetic differentiation estimated by isozymic analysis of Africanized honeybee populations from Brazil and from Central America. **Apidologie**, 21:271-280, 1990.

DESEYN, J.; BILLEN, J. Age-dependent morphology and ultrastructure of the hypopharyngeal gland of *Apis mellifera* workers (Hymenoptera, Apidae). **Apidologie**, 36:49-57, 2005.

DINIZ, N.M.; SOARES, A.E.E.; SHEPPARD, W.S.; DEL LAMA, M.A. Genetic structure of honeybee populations from southern Brazil and Uruguay. **Genetics and Molecular Biology**, 26:47-52, 2003.

DOWLING, T.E.; MORITZ, C.; PALMER, J.D.; RIESEBERG, L.H. Chapter 8: Nucleic acids III: analysis of fragments and restriction sites. In: HILLIS D.M.; MORITZ C.; MABLE B.K. (eds.). **Molecular Systematics**. Massachusetts: Sinauer Associates, 1996. p. 249-320.

DRAPEAU, M.D.; ALBERT, S.; KUCHARSKI, R.; PRUSKO, C.; MALESZKA, R. Evolution of the yellow / major royal jelly protein family and the emergence of social behavior in honey bees. **Genome Research**, 16:1385-1394, 2006.

ESTOUP, A.; GARNERY, L.; SOLIGNAC, M.; CORNUET, J.M. Microsatellite variation in honey bee (*Apis mellifera* L.) populations: hierarchical genetic structure and test of the infinite allele and stepwise mutation models. **Genetics**, 140:679-695, 1995.

ESTOUP, A.; SOLIGNAC, M.; HARRY, H.; CORNUET, J.M. Characterization of (GT)_n and (CT)_n microsatellites in two insect species: *Apis mellifera* and *Bombus terrestris*. **Nucleic Acids Research**, 21:1427-143, 1993.

FAQUINELLO, P. **Heterogeneidade de variâncias e interação genótipo - ambiente na avaliação genética em abelhas *Apis mellifera* africanizadas para produção de geleia real**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2010. 77p. Tese (Doutorado em Zootecnia).

FAQUINELLO, P.; TOLEDO, V.A.A.; MARTINS, E.N.; OLIVEIRA, C.A.L.; SEREIA, M.J.; COSTA-MAIA, F.M.; RUVOLLO-TAKASUSUKI, M.C.C. Parameters for royal jelly production in Africanized honeybees. **Sociobiology**, 57:495-509, 2011.

FEWELL, J.H.; BERTRAM, S.M. Evidence of genetic variation in worker task performance by African and European honey bees. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, 52:318-325, 2002.

FRANCK, P.; GARNERY, L.; LOISEAU, A.; OLDROYD, B.P.; HEPBURN, H.R.; CELEBRANO, G.; SOLIGNAC, M.; CORNUET, J.M. Genetic diversity of the honeybee in Africa: microsatellite and mitochondrial data. **Heredity**, 87:420-430, 2001.

FRANCK, P.; GARNERY, L.; SOLIGNAC, M.; CORNUET, J.M. The origin of west European subspecies of honeybees (*Apis mellifera*) new insights from microsatellite and mitochondrial data. **Evolution**, 52:1119-1134, 1998.

FRANCK, P.; GARNERY, L.; SOLIGNAC, M.; CORNUET, J.M. Molecular confirmation of a fourth lineage in honeybees from the Near East. **Apidologie**, 31:167-180, 2000a.

FRANCK, P.; GARNERY, L.; SOLIGNAC, M.; CORNUET, J.M. Molecular confirmation of a Middle East lineage in *Apis mellifera*. **Apidologie**, 31:167-180, 2000b.

FREE, J.B. **A organização social das abelhas (Apis)**. São Paulo: EDUSP, 1980. 79p.

GALTIER, N.; NABHOLZ, B.; GLÉMIN, S.; HURST, G.D. Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. **Molecular Ecology**, 18:4541-4550, 2009.

GARCIA, R.H.C.; NOGUEIRA-COUTO, R.H. Produção de geléia real por abelhas *Apis mellifera* italianas, africanizadas e descendentes de seus cruzamentos. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, 27:17-22, 2005.

GARNERY, L.; CORNUET, J.M.; SOLIGNAC, M. Evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis. **Molecular Ecology**, 1:145-154, 1992.

GARNERY, L.; SOLIGNAC, M.; CELEBRANO, G.; CORNUET, J.M. A simple test using restricted PCR-amplified mitochondrial DNA to study the genetic structure of *Apis mellifera* L. **Experientia**, 49:1016-1021, 1993.

GONÇALVES, L.S. Desenvolvimento e expansão da apicultura no Brasil com abelhas africanizadas. **Revista SEBRAE**, 3:14-16, 2006.

HALL, H.G. DNA differences found between Africanized and European honeybees. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 83:4874-4877, 1986.

HALL, H.G. Parental analysis of introgressive hybridization between African and European honeybees using nuclear DNA RFLP. **Genetics**, 125:611-621, 1990.

HALL, H.G.; SMITH D.R. Distinguishing African and European honey bee matriline using amplified mitochondrial DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 88:4548-4552, 1991.

HARBO, J.R.; RINDERER, T.E. Breeding and genetics of honeybees. **Agriculture Handbook**, 335:49-57, 2005.

HAYDAK, M.H. Honey bee nutrition. **Annual Review of Entomology**, 15:143-156, 1970.

HANCOCK, J.M. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In: GOLDSTEIN, D.B.; SCHLÖTTERER, C. (eds.). **Microsatellites: Evolution and applications**. New York: Oxford University Press, 1999. p. 1-9.

HILLIS, D.M.; MORITZ, C.; MABLE, B.K. **Molecular Systematics**. 2^a ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 1996. 655p.

HOLWAY, D.A.; SUAREZ, A.V. Animal behavior: an essential component of invasion biology. **Trends in Ecology & Evolution**, 14:328-330, 1999.

HUBER, D.M.; HUGH-JONES, M.E.; RUST, M.K.; SHEFFIELD, S.R.; SIMBERLOFF, D.; TAYLOR, C.R. Invasive pest species: impacts on agricultural production, natural resources, and the environment. **Council for Agricultural Science and Technology**, 20:1-18, 2001.

KLAUDINY, J.; HANES J.; KULIFAJOVÁ, J.; ALBERT, S.; SIMÚTH, J. Molecular cloning of two cDNAs from the head of the nurse honeybee (*Apis mellifera* L.) coding for related proteins of royal jelly. **Journal of Apicultural Research**, 33:105-111, 1994a.

KLAUDINY, J.; KULIFAJOVÁ, J.; CRAILSHEIM, K.; SIMÚTH J. New approach to the study of division of labor in the honeybee colony (*Apis mellifera* L.). **Apidologie**, 25:596-600, 1994b.

KERR, W.E. Introdução de abelhas africanas no Brasil. **Brasil Apicultura**, 3:211-213, 1957.

KERR, W.E. The history of introduction of African bees to Brazil. **South African Bee Journal**, 39:3-5, 1967.

KERR, W.E. Contribuição a ecogenética de algumas espécies de abelhas. **Ciência e Cultura**, 23:89-90, 1971.

KERR, W.E.; DEL RIO S.; BARRIONUEVO M.D. The southern limits of the distribution of the Africanized honeybee in South America. **American Bee Journal**, 122:196-198, 1982.

KERR, W.E. Distribuição da abelha africanizada em seus limites ao sul. **Ciência e Cultura**, 34:499-502, 1989.

LEWIS, L.A.; MCCOURT, M. Green algae and the origin of land plants. **American Journal of Botany**, 91:1535-1556, 2004.

LI, J.K.; CHEN, S.L.; ZHONG, B.X.; SU, S.K. The optimal way of royal jelly production. **American Bee Journal**, 143:221-223, 2003.

LOBO, J.A.; DEL LAMA, M.A.; MESTRINER, M.A. Population differentiation and racial admixture in the Africanized honeybee (*Apis mellifera* L.). **Evolution**, 43:794-802, 1989.

MOURO, G.F.; TOLEDO, V.A.A. Evaluation of *Apis mellifera* Carniolan and Africanized honey bees in royal jelly production. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 47:469-476, 2004.

MORITZ, C.; HILLIS, D.M. Molecular systematics: context and controversies. In: HILLIS, D.M.; MORITZ, C.; MABLE B.K. (eds.). **Molecular Systematics**. Massachusetts: Sinauer Associates, 1996. p. 1-13.

MORITZ, R.F.A.; HARTEL, S.; MEUMANN, P. Global invasions of the western honeybee (*Apis mellifera*) and the consequences for the biodiversity. **Ecoscience**, 12:289-301, 2005.

MORITZ, R.F.A.; SOUTHWICK, E.E. "Bees as superorganisms. An Evolutionary Reality". Berlin: Springer Verlag, 1972. 395p.

MÜNSTED, K.; GEORGI, R.V. Royal jelly – a miraculous product from the bee hive?. **American Bee Journal**, 143:647-650, 2003.

NAKADA, T.; MISAWA, K.; NOZAKI, H. Molecular systematics of Volvocales (Chlorophyceae, Chlorophyta) based on exhaustive 18S rRNA phylogenetic analyses. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 48:281-291, 2008.

NOGUEIRA-COUTO, R.H.N. **Polinização com abelhas africanizadas**. São Paulo: Apicultura & Polinização, 1989. p. 32-33.

NOGUEIRA-COUTO, R.H.N; COUTO, L.A. **Apicultura: manejo e produtos**. Jaboticabal: Funep, 2006. 192p.

NOGUEIRA-NETO, P. Notas sobre a história da apicultura Brasileira. In: CAMARGO, J.M.F. (eds.). **Manual de Apicultura**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1972. p. 17-32.

NOSEK, J.; TOMÁSKA, L. Mitochondrial telomeres: alternative solutions to the end-replication problem. In: KRUPP, G.; PARWARESCH, R. (eds.). **Telomerases telomeres and cancer**. New York: Kluwer/Plenum Publishers, 2002. p. 396–417.

NOSEK, J.; TOMÁSKA, L. Mitochondrial genome diversity: evolution of the molecular architecture and replication strategy. **Current Genetics**, 44:73-84, 2003.

OHASHI, K.; NATORI, S.; KUBO, T. Change in the mode of gene expression of the hypopharyngeal gland cells with an age-dependent role change of the worker honeybee *Apis mellifera* L. **European Journal of Biochemistry**, 249:797-802, 1997

OHASHI, K.; SAWATA, M.; TAKEUCHI, H.; NATORI, S.; KUBO, T. Molecular cloning of cDNA and analysis of expression of the gene for alpha-glucosidase from the hypopharyngeal gland of the honeybee *Apis mellifera* L. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 221:380-385, 1996.

OLIVEIRA, M.L.; CUNHA, J.A. Abelhas africanizadas *Apis mellifera scutellata* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera: Apidae: Apinae) exploram recursos na floresta amazônica?. **Acta amazônica**, 35:389-394, 2005.

OSTROVSKI, K.R. **Valor genético para abelhas africanizadas selecionadas para produção de geleia real com marcadores moleculares**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2012. 56p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia).

PAAR, J.; OLDROYD, B.P.; HUETTINGER, E.; KASTBERGER, G. Genetic structure of an *Apis dorsata* population: the significance of migration and colony aggregation. **Journal of Heredity**, 95:119-126, 2004.

PAGE, R.E.; LAIDLAW, H.H. Honey bee genetics and breeding. In: GRAHAM, J.M. (eds.). **The hive and the honey bee**. Illinois: Dadant & Sons, 1997. p. 235-267.

PARPINELLI, R.S. **Avaliação de marcadores microssatélites MRJPs em colônias de *Apis mellifera* selecionadas para a produção de geleia real**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2011. 54p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia).

PERNAL, S.F.; CURRIE, R.W. Pollen quality of fresh and 1-year-old single pollen diets for worker honey bees (*Apis mellifera* L.). **Apidologie**, 31:387-409, 2000.

PIMENTEL, D.; LACH, L.; ZUNIGA, R.; MORRISON, D. Environmental and economic costs of non-indigenous species in the United States. **Bioscience**, 50:53-65, 2000.

PINTO, M.A.; JOHNSTON, J.S.; RUBINK, W.L.; COULSON, R.N.; PATTON, J.C.; SHEPPARD, W.S. Identification of Africanized honey bee (*Hymenoptera: Apidae*) mitochondrial Dna: validation of a rapid polymerase chain reaction-based assay. **Annals of Entomological Society Of America**, 96:679-684, 2003.

QUEIROZ, M.L.B.; BARBOSA, S.B.P.; AZEVEDO, M. Produção de geleia real e desenvolvimento da larva de abelhas *Apis mellifera*, na região semi-árida de Pernambuco. **Revista Brasileira de Zootecnia** [online], 30:449-453, 2001.

RATNIEKS, F.L.W. Egg-laying, egg-removal, and ovary development by workers in queenright honey bee colonies. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, 32:191-198, 1993.

RINDERER, T.E. Selection. In: RINDERER, T.E. (eds.). **Bee genetics and breeding**. Florida: Academic Press, 2008. p. 305-319.

RINDERER, T.E.; COLLINS, A.M.; HELLMICH, R.L.; DANKA, R.G. Differential drone production by Africanized and European honey bee colonies. **Apidologie**, 18:61-68, 1987.

ROBINSON, G.E. Hormonal and genetic regulation of division of labor in honey bee colonies: You're only as old as you feel. **American Bee Journal**, 135:169-170, 1995.

RUTTNER, F. **Biogeography and taxonomy of honeybees**. Berlin: Springer, 1988. 284p.

RUTTNER, F.; TASSENCOURT, L.; LOUVEAUX, J. Biometrical statistical analysis of the geographic variability of *Apis mellifera* L. **Apidologie**, 9:363-381, 1978.

SANTOS K.S.; SANTOS L.D.; MENDES M.A.; SOUZA B.M.; MALASPINA O.; PALMA M.S. Profiling the proteome complement of the secretion from hypopharyngeal gland of Africanized nurse-honeybees (*Apis mellifera* L.). **Insect Biochemistry Molecular Biology**, 35:85-91, 2005.

SEREIA, J.M.; TOLEDO, V.A.A.; RUVOLO-TAKASUSUKI, M.C.C.; SEKINE, E.S.; FAQUINELLO, P.; COSTA-MAIA, F.M. Viabilidade financeira da produção de geleia real com abelhas africanizadas suplementadas com diferentes nutrientes. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, 32:467-474, 2010.

SCHLÖTTERER, C.E.; WIEHE, T. Microsatellites, a neutral marker to infer selective sweeps. In: GOLDSTEIN, D.B.; SCHLÖTTERER, C. (eds.). **Microsatellites: Evolution and applications**. New York: Oxford University Press, 1999. p. 238-248.

SCHMITZOVÁ, J.; KLAUDINY, J.; ALBERT, S.; SCHRÖDER, W.; SCHRECKENGOST, W.; HANES, J.; JÚDOVÁ, J.; SIMÚTH, J. A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 54:1020-1030, 1998.

SCHNEIDER, S.S.; DEEBY, T.; GILLEY, D.C.; DEGRANDI-HOFFMAN, G. Seasonal nest usurpation of European colonies by African swarms in Arizona, USA. **Insectes Sociaux**, 51:359-364, 2004.

SCHNEIDER, S.S.; LEAMY, L.J.; LEWIS L.A.; DEGRANDI-HOFFMAN, G. The influence of hybridization between African and European honeybees, *Apis mellifera*, on asymmetries in wing size and shape. **Evolution**, 57:2350-2364, 2003.

SEGURA, J.A.L. Highly polymorphic DNA markers in an Africanized honey bee population in Costa Rica. **Genetics and Molecular Biology**, 23:317-322, 2000.

SHEPPARD, W.S.; MEIXNER, M.D. *Apis mellifera pomonella*, a new honey bee subspecies from Central Asia. **Apidologie**, 34:367-375, 2003.

SHEPPARD, W.S.; RINDERER, T.E.; GARNERY, L.; SHIMANUKI, H. Analysis of Africanized honey bee mitochondrial DNA reveals further diversity of origin. **Genetics and Molecular Biology**, 22:73-75, 1999.

SHEPPARD, W.S.; RINDERER, T.E.; MAZZOLI, J.A.; STELZER, J.A.; SHIMANUKI, H. Gene flow between African- and European-derived honey bee populations in Argentina. **Nature**, 349:782-784, 1991.

SHEPPARD, W.S.; SMITH, D.R. Identification of African-derived bees in the Americas: A survey of methods. **Annals of the Entomological Society of America**, 93:159-176, 2000.

SIMBERLOFF, D. Nonindigenous species: a global threat to biodiversity and stability. In: RAVEN, P.; WILLIAM T. (eds.). **Nature and human society: the quest for a sustainable world**. Washington, DC: National Academic Press, 2000. p. 325-334.

SIMPSON, J.; RIEDEL, I.B.M.; WILDING, N. Invertase in the hypopharyngeal glands of the honeybee. **Journal of Apicultural Research**, 7:29-36, 1968.

SIMÚTH, J. Some properties of the main protein of honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly. **Apidologie**, 32:69-80, 2001.

SMITH, R.K., TAYLOR, O.R.; BROWN, W.M. Neotropical africanized honey bees have African mitochondrial DNA. **Nature**, 339:213-215, 1989.

- SÛSNIK, S.; KOZMUS, P.; POKLUKAR, J.; MEGLIÈ, V. Molecular characterization of indigenous *Apis mellifera carnica* in Slovenia. **Apidologie**, 35:623-636, 2004.
- SOARES, A.E.E.; ALMEIDA, R.; BEZERRA-LAURE, M.A. Avanços no melhoramento genético e na inseminação instrumental em *Apis mellifera*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA. Teresina, 1996. **Resumos...** Teresina: CBA, 1996, p. 59-61.
- SUWANNAPONG, G.; SEANBUALUANG, P.; WONGSIRL, S. A histochemical study of the hypopharyngeal glands of the dwarf honey bees *Apis andreniformis* and *Apis florea*. **Journal of Apicultural Research**, 46:260-263, 2007.
- TAKENAKA, T. Chemical composition of royal jelly. **Honeybee Science**, 3:69-74, 1982.
- TAKENAKA, T.; ECHIGO, T. Proteins and peptides in royal jelly. **Nippon Nogeikagaku Kaishi**, 57:1203-1209, 1983.
- TOLEDO, V.A.A.; MOURO, G.F. Produção de geleia real com abelhas africanizadas selecionadas e cárnicas híbridas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 34:2085-2092, 2005.
- VAWTER, L.; BROWN, W.M. Nuclear and mitochondrial DNA comparisons reveal extreme rate variation in the molecular clock. **Science**, 234:194-196, 1986.
- WEGENER, J.; LORENZ, M.W.; BIENEFELD, K. Physiological consequences of prolonged nursing in the honey bee. **Insectes Sociaux**, 56:85-93, 2009.
- WILLIAMSON, D. The curious history of yeast mitochondrial DNA. **Nature Reviews – Genetics**, 3:1-7, 2002.
- WINSTON, M.L. Swarming, after swarming, and reproductive rate of unmanaged honeybee colonies (*Apis mellifera*). **Insectes Sociaux**, 27:391-398, 1980.
- WINSTON, M.L. The biology and management of Africanized honey bees. **Annual Review of Entomology**, 37:173-193, 1992.
- WINSTON, M. L. **A biologia da abelha**. Porto Alegre: Magister, 2003. 276p.

WOLSTENHOLME, D.R. Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. In: WOLSTENHOLME, D.R.; JEON, K.W. (eds.). **Mitochondrial Genomes**. San Diego: Academic Press, 1992. p. 173-216.