



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

ALESSANDRA NOVAGA ALVES

**MARCADORES MICROSSATÉLITES APLICADOS AO  
ESTUDO DA ESTRUTURA SOCIOGENÉTICA DE  
*MISCHOCYTTARUS CASSUNUNGA* VON IHERING, 1903  
(HYMENOPTERA, VESPIDAE, MISCHOCYTTARINI)**

---

Londrina  
2012

**ALESSANDRA NOVAGA ALVES**

**MARCADORES MICROSSATÉLITES APLICADOS AO  
ESTUDO DA ESTRUTURA SOCIOGENÉTICA DE  
*MISCHOCYTTARUS CASSUNUNGA* VON IHERING, 1903  
(HYMENOPTERA, VESPIDAE, MISCHOCYTTARINI)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Helena Sofia

Londrina  
2012

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina.**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

A474m Alves, Alessandra Novaga.  
Marcadores microsatélites aplicados ao estudo da estrutura sociogenética de  
*Mischocyttarus cassununga* von Ihering, 1903 (Hymenoptera, Vespidae,  
Mischocysttarini) / Alessandra Novaga Alves. – Londrina, 2012.  
viii, 93 f. : il.

Orientador: Silvia Helena Sofia.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade  
Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em  
Genética e Biologia Molecular, 2012.

Inclui bibliografia.

1. *Mischocyttarus* – Teses. 2. *Vespa* – Genética molecular – Teses. 3. *Vespa* –  
Comportamento – Teses. 4. Himenoptero – Teses. 5. Marcadores biológicos –  
Teses. I. Sofia, Silvia Helena. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de  
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia  
Molecular. III. Instituto Agrônomo do Paraná. IV. EMBRAPA. V. Título.

CDU 595.798

ALESSANDRA NOVAGA ALVES

**MARCADORES MICROSSATÉLITES APLICADOS AO ESTUDO DA  
ESTRUTURA SOCIOGENÉTICA DE *MISCHOCYTTARUS*  
CASSUNUNGA VON IHERING, 1903 (HYMENOPTERA, VESPIDAE,  
MISCHOCYTTARINI)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Silvia Helena Sofia  
UEL – Londrina - PR

---

Profa. Dra. Solange Cristina Augusto  
UFU – Uberlândia - PR

---

Prof. Dr. Paulo Maurício Ruas  
UEL – Londrina - PR

Londrina, 29 de março de 2012.

"Quase tudo é possível quando se tem dedicação e habilidade. Grandes trabalhos são realizados não pela força, mas pela perseverança."  
*Machado de Assis*

"Não havia ninguém ao seu redor, para lhe dizer que não seria capaz."  
*Albert Einstein*

"Se você quer ser bem sucedido, precisa ter dedicação total, buscar seu último limite e dar o melhor de si."  
*Ayrton Senna*

Aos meus grandes ídolos, meus pais Carlos e Isabel,  
que sempre me apoiaram e batalharam pelos  
meus estudos e projetos!!!

## AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular e ao Departamento de Biologia Geral da Universidade Estadual de Londrina, pela estrutura fornecida para a realização deste trabalho.

À minha orientadora Dra. Silvia Helena Sofia, pelo exemplo de ética e profissionalismo que foi durante todos esses anos, pela orientação, ensinamentos e oportunidades que me proporcionou, pela confiança e por todo carinho e amizade. Lembrando também que foi a responsável por fazer com que eu me apaixonasse pelas abelhas e vespas, meu muito obrigada especial!!!

À professora Dra. Maria Cristina Arias pelo acolhimento no laboratório, pela atenção e por todas as orientações sobre a técnica desenvolvida nesse trabalho;

À Dra. Solange Cristina Augusto e Dr. Paulo Maurício Ruas, banca examinadora, pela disponibilidade em fazer parte da avaliação deste trabalho;

À professora Dra. Fernanda Simões de Almeida, pelos ensinamentos, por toda disponibilidade e ajuda em diversos momentos, por todo carinho, amizade e alegria.

À professora Dra. Leda Maria K. Sodr e pelos ensinamentos, carinho e pelas aulas espetaculares de genética.

Ao Dr. Sidnei Mateus do Departamento de Biologia da FFCLRP, USP/Ribeirão Preto e ao Dr. Orlando Tobias Silveira do Museu Paraense Emílio Goeldi – MPEG/ Belém-PA pela identifica o das espécies estudadas neste trabalho.

À Dra. Claudete de Fátima Ruas e ao Dr. Laurival A. Vilas-Boas por todas as contribui es durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao CNPQ pela bolsa mestrado concedida, a CAPES (Procad 158/2007) e a FAEPE/UEL pelo auxílio financeiro.

Ao IBAMA e ao IAP pela autorização nas coletas das vespas.

À Coordenadora do PPGGBM, Dra Ana Lúcia Dias e à Secretária Sueli Miranda por toda disponibilidade, auxílio e paciência;

Aos técnicos Dário Tormenta e Melissa Costa pelo grande auxílio, sempre muito prestativos.

A todos os professores da Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina que fizeram parte da minha formação profissional.

Aos amigos do LAGEA, Karen, Caconde, Dhiego, Fernanda, Lenice, Wilson, Douglas, Cecília, Henrique e aos amigos “ex-lageanos” Gabi, Bruna e Carol, pelas infinitas contribuições neste trabalho, seja nas conversas, nos conselhos, nas dúvidas e ajuda em diversos momentos no laboratório, nas situações desesperadoras e também nos momentos de descontração depois de um longo dia de trabalho e até mesmo no laboratório e almoços no RU...meu imenso carinho e amizade à todos vocês!!!

Aos meus colegas do mestrado.

A todos do LGEA – USP, em especial Elaine, Flávio, Leandro, Leila, Yuri, Ana e Suzi por me acolher tão bem no laboratório, por toda ajuda e ensinamentos durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais, Carlos e Isabel, pelo amor incondicional, por sempre estarem ao meu lado, apesar da distância entre nós nunca estão ausentes. Nos momentos mais difíceis fizeram o possível e o impossível para me ajudar e nos momentos felizes festejaram juntos comigo. Sem o apoio, incentivo, amor e educação que me deram, não chegaria até aqui jamais....Minha fortaleza, meu alicerce, meu tudo!!!

Aos meus irmãos, Luis Fernando e Carlos Henrique, cunhadas Dani e Gisele e as minhas sobrinhas Ágatha e Ilana, que mesmo distantes foram com certeza essenciais em mais essa conquista da minha vida.

A todos da minha família que sempre estiveram comigo me dando força e palavras de otimismo, acreditando no meu potencial. Em especial a minha Tia Rose e família que me acolheram em sua casa com todo carinho, cuidado e atenção, todas as vezes que viajei a São Paulo para realização deste trabalho.

Às minhas grandes amigas e companheiras de república, Thais Graciano, Natália, Juliana (“erma”) e Thais Gava (mãe), por dividir comigo meu outro lar, pelo companheirismo, força e paciência nos momentos de stress e nervosismo...(hehe) e acima de tudo pela grande amizade;

A todos os meus amigos de Assis, Bahia, São Paulo e aos londrinenses, em especial Vivian, Diana, Juceli, Laura, Carolina, Luana, Ana Paula, Juliana Furlanetti, Thais, Juliana Piveta, Paulinha, Nádia, Flávia, Elê, Renata, Carol, Grasy e Adriana...por toda torcida, incentivo, oração, amizade, companheirismo e compreensão.

À minha família Frutos da Paz, por toda oração e amizade, por me ensinar que “vale a pena viver com Deus”...vocês com certeza fazem parte dessa conquista.

À Deus, meu porto seguro, minha luz e direção, minha fortaleza, e a razão pela qual cheguei até aqui...

**Muito obrigada a todos vocês!!!!**

ALVES, Alessandra Novaga **Marcadores microssatélites aplicados ao estudo da estrutura sociogenética de colônias de *Mischocyttarus cassununga* von Ihering, 1903 (Hymenoptera, Vespidae, Mischocyttarini)**. 2012. 93 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

## RESUMO

*Mischocyttarus cassununga* é uma espécie de vespa da subfamília Polistinae, endêmica do Brasil comumente encontrada em ambientes urbanos e que apresenta comportamento primitivamente eussocial, com fundação de ninho do tipo independente. Nestas vespas as colônias podem ser fundadas por uma única fêmea ou por um pequeno grupo de fêmeas; neste último caso, o grau de parentesco entre as fêmeas é desconhecido. Tais características tornam *M. cassununga* uma espécie interessante para estudos sobre a estrutura sociogenética de colônias de vespas sociais. Considerando a eficiência reconhecida dos marcadores microssatélites nas análises das relações de parentesco intranidal em colônias de insetos sociais, este trabalho teve como objetivos: 1) desenvolver *primers* de microssatélites específicos para *M. cassununga* e 2) realizar a observações do comportamento de cinco colônias de *M. cassununga* e, subsequentemente, analisar as relações de parentesco a partir dos *loci* de microssatélites isolados. Um total de dezoito *loci* polimórficos foi obtido, utilizando 20 indivíduos de colônias distintas. O número de alelos obtidos variou de 3 a 17 alelos por *locus*, totalizando 150 alelos, os quais apresentaram alto conteúdo de informação polimórfica para a maioria dos *loci*. Estes 18 *loci* de microssatélites mostraram alto índice de sucesso na amplificação cruzada para três outras espécies de Polistinae. Oito dos 18 *loci* de microssatélites foram amplificados para acessar o grau de parentesco intranidal dos indivíduos de cada colônia de *M. cassununga*. Os oito locos amplificados revelaram um total de 70 alelos distintos, com uma média de 8,75 alelos por *locus* analisado. As análises genéticas revelaram altos valores de heterozigosidade e presença de alelos nulos para alguns *loci*. Os resultados do parentesco genético obtidos neste estudo revelaram: a) em algumas situações, a presença de mais de uma fêmea poedeira na colônia; e, b) ausência de parentesco entre alguns indivíduos da mesma colônia. Os marcadores microssatélites no presente estudo mostraram-se eficientes tanto para a confirmação de resultados obtidos nas observações comportamentais, quanto nas análises da estrutura sociogenética em colônias de *M. cassununga*. É importante ressaltar que este foi o primeiro estudo sociogenético realizado com esta espécie de vespa Neotropical. Os resultados aqui obtidos abrem novas perspectivas de estudos, especialmente no que se refere a abordagens voltadas a um maior entendimento da evolução do comportamento social entre os Polistinae e também para o maior conhecimento da estrutura sociogenética presente em colônias de *M. cassununga*.

**Palavras-Chave:** Vespas. *Mischocyttarus*. Marcadores microssatélites. Biblioteca genômica enriquecida. Estrutura sociogenética.

ALVES, Alessandra Novaga **Microsatellite markers applied to the study of the sociogenetic structure *Mischocyttarus cassununga* von Ihering, 1903 (Hymenoptera, Vespidae, Mischocyttarini)**. 2012. 93 f. Dissertation (Master's degree in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

## ABSTRACT

*Mischocyttarus cassununga* is a primitively eusocial polistine wasp, endemic to Brazil usually found in urban environments. Colonies of these wasps are founded independently by one female or by association of few females; in this last case, the degree of genetic relatedness between these females is unknown. These characteristics make of *M. cassununga* an interesting species for studies concerning the sociogenetic structure of colonies of social wasps. Considering the recognized efficiency of microsatellite markers in the analysis of genetic relatedness in colonies of social insects, this study aimed to: 1) develop primers of microsatellite for *M. cassununga* and, 2) perform the observations of behavior in five colonies of this species and, subsequently, carry out the microsatellite analyses to assess the genetic relationships among individuals of each of these colonies. A total of eighteen polymorphic loci were obtained across 20 individuals from different colonies. The number of alleles amplified per locus ranged from 3 to 17, totaling 151 alleles detected, which showed high polymorphic information content for most loci. Amplification success and cross-species transferability of these 18 loci, tested for three polistine species, were high. Eight of the 18 microsatellite loci were amplified to assess the degree of intranidal relatedness of individuals in each five colonies of *M. cassununga*. The eight loci revealed a total of 70 alleles, averaging 8.75 alleles per locus. Genetic analysis revealed high values of heterozygosity and the presence of null alleles for some loci, which are probably due to the reduced number of colonies analyzed. The results of genetic relatedness revealed: a) the presence of more than one egg-laying female in the colony, and, b) no genetic relatedness among some members of the colony. In this study, the microsatellite markers were effective for confirmation of results obtained in behavioral observations and in the genetic analysis of sociogenetic structure in colonies of *M. cassununga*. Importantly, this was the first study assessing structure of this Neotropical wasp. Our findings open new perspectives for studies concerning the evolution of social behavior among Polistinae and also for a greater knowledge of the sociogenetic structure in colonies of Our findings open new perspectives for studies concerning the evolution of social behavior among Polistinae and on the sociogenetic structure in colonies of *M. cassununga*.

**Keywords:** Wasps. *Mischocyttarus*. Microsatellite markers. Enriched genomic library. Sociogenetic structure.

## LISTAS DE TABELAS

### TRABALHO 1

<b>Tabela 1</b> – A description of 18 polymorphic microsatellite loci isolated from <i>Myschocyttarus cassununga</i> and results in cross-species amplification tests with other three polistine species. (+) = successful amplification; (-) = no amplification. The sample size (n) for each species is given in the column heading. GenBank accession numbers are JQ672630 to JQ672648 .....	36
---	----

### TRABALHO 2

<b>Tabela 1</b> – Relação do número amostral de cada colônia de <i>M. cassununga</i> analisadas .....	45
<b>Tabela 2</b> – Taxa de heterozigose esperada ( $H_e$ ) e observada ( $H_o$ ) para os oito loci de microssatélites analisados para as cinco colônias de <i>M. cassununga</i> .....	54
<b>Tabela 3</b> – Estimativa do coeficiente de endogamia ( $F_{is}$ ) e análise do BOTTENECK para os três modelos (IAM, TPM e SSM), assumindo o teste de WILCOXON para as cinco colônias estudadas.....	55
<b>Tabela 4</b> – Estimativa da frequência alélica de alelos nulos, presença ou ausência, de todos os loci analisados para as cinco colônias de <i>M. cassununga</i> estudadas.....	55
<b>Tabela 5</b> – Relações de parentesco geradas pelo software COLONY para as cinco colônias de <i>M. cassununga</i> , contendo os pais (hipotéticos para B4, B7, B10 e B13) inferidos a partir da verossimilhança entre genótipos amostrados. A probabilidade obtida para esses resultados foi de 100%.....	58

## LISTA DE FIGURAS

### TRABALHO 1

- Figura 1** – Detalhe de duas colônias de *Mischocyttarus cassununga* no campus da Universidade Estadual de Londrina (CCB), mostrando o peduncúnculo excêntrico em fundação do tipo haplometrose (A) e “pleometrose” (B)..... 17

### TRABALHO 2

- Figura 1** – Localização geográfica dos locais de nidificação das cinco colônias analisadas de *Mischocyttarus cassununga* e a distância entre elas (metros). Imagem do Google Earth ..... 42
- Figura 2** – Colônia de *Mischocyttarus cassununga* no campus da Universidade Estadual de Londrina, Londrina- PR, evidenciando as marcações feitas com tinta acrílica em cada indivíduo da colônia..... 43
- Figura 3** – Colônias de *M. cassununga* fundadas por haplometrose (A, C e D), por pleometrose (B) e tipo de fundação não identificada (E). A = Colônia B4; B = Colônia B7; C = Colônia B10; D = Colônia B11; E = Colônia B13..... 47
- Figura 4** – Representação esquemática das fases de desenvolvimento (T0, T1 e T2) das colônias estudadas, com seus respectivos indivíduos, a relação de dominância observada entre eles e número de imaturos presente na colônia até o momento da coleta..... 52
- Figura 5** – Número de alelos obtidos para os oito loci de microssatélites analisados (Mcas6b, Mcas11b, Mcas14a, Mcas15b, Mcas34b, Mcas42b, Mcas53b e Mcas69b) em *M. cassununga* nas cinco colônias estudadas (B4, B7, B10, B11 e B13) localizadas no campus da Universidade Estadual de Londrina ..... 53

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	15
2.1	VESPIDAE: UMA VISÃO GERAL DA FAMÍLIA E UM ENFOQUE A MISCHOCYTTARUS CASSUNUNGA VON IHERING, 1903 .....	15
2.2	HAPLODIPLOIDIA EM HIMENÓPTEROS, SISTEMA DE DETERMINAÇÃO SEXUAL E SELEÇÃO DE PARENTESCO GENÉTICO .....	19
2.3	ESTUDOS GENÉTICOS ENVOLVENDO VESPAS POLISTINAE .....	21
2.4	MARCADORES MICROSSATÉLITES .....	22
2.5	MARCADORES MICROSSATÉLITES EM VESPIDAE .....	24
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	26
3.1	OBJETIVOS GERAIS .....	26
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	26
<b>4</b>	<b>TRABALHOS</b> .....	27
4.1	TRABALHO 1: ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LOCI DE MICROSSATÉLITES DE MISCHOCYTTARUS CASSUNUNGA VON IHERING, 1903 (HYMENOPTERA: VESPIDAE: MISCHOCYTTARINI).....	27
4.2	TRABALHO 2: MARCADORES MICROSSATÉLITES APLICADOS AO ESTUDO DO COMPORTAMENTO SOCIAL DE COLÔNIAS DE MISCHOCYTTARUS CASSUNUNGA VON IHERING, 1903 (HYMENOPTERA, VESPIDAE, MISCHOCYTTARINI) .....	37
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	59
	<b>ANEXOS</b> .....	68
	<b>CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	74
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	75
	<b>APÊNDICE</b> .....	85

## 1 INTRODUÇÃO

As vespas da família Vespidae são insetos que apresentam níveis variados de organização social, exibindo comportamentos desde o tipo solitário até o social, característica que torna este grupo de vespas organismos interessantes para estudos relacionados à evolução do comportamento social em vespas e outros himenópteros (CARPENTER, 1991; REEVE, 1991). Dentre os Vespidae, Polistinae é uma subfamília de vespas sociais que reúne 21 gêneros e 900 espécies distribuídas em três tribos distintas, dentre as quais Myschocyttarini, representada apenas pelo gênero *Mischocyttarus* (RICHARDS, 1978; CARPENTER, 2004; GOMES; NOLL, 2009). Com 240 espécies, este gênero é o maior em número de espécies dentre os Vespidae sociais. *Mischocyttarus* é um gênero com distribuição essencialmente Neotropical, com apenas umas poucas espécies com ocorrência na América do Norte (RICHARDS, 1978; CARPENTER, 1993; CARPENTER; MARQUES, 2001; SILVEIRA, 2008).

Nos últimos anos alguns trabalhos têm estudado a organização social de determinadas espécies de *Mischocyttarus* - a exemplo de *Mischocyttarus labiatus*, *M. mexicanus*, *M. cerberus* e *M. cassununga* - um gênero que exhibe comportamento como primitivamente eussocial (LITTE, 1981; GIANNOTTI, 1998; MURAKAMI, 2007; GUIMARÃES, 2008; KEPFER, 2011). Em colônias de *Mischocyttarus*, a substituição da rainha pode ser feita por uma de suas companheiras de ninho, aparentada à rainha, ou ainda por meio de usurpação, feita por uma fêmea de outro ninho, não aparentada à rainha (STRASSMANN; QUELLER; SOLÍS, 1995). Em *Mischocyttarus cassununga* e outras espécies deste gênero as fêmeas podem fundar seus ninhos solitariamente ou em grupos de poucas fêmeas (GIANNOTTI, 1998; MURAKAMI, 2007; DA SILVA, 2008; GUIMARÃES, 2008). Guimarães (2008) observou que a fundação de colônias por pleometrose (mais de uma fêmea) foi o tipo predominante para *M. cassununga*, enquanto que haplometrose (fundação por uma única fêmea) foi a condição observada por Murakami (2007), assim como para a vespa *M. ceberus styx* (GIANNOTTI, 1998).

Embora o comportamento intranidal de fêmeas de colônias de *Mischocyttarus* e outros Polistinae tenha sido objeto de vários estudos

comportamentais realizados na tentativa de melhor compreender diferentes aspectos da organização social destas vespas, ainda são escassos os estudos com uma abordagem sociogenética envolvendo *Mischocyttarus*. Tal abordagem permite uma melhor caracterização do parentesco genético entre os membros da colônia, essencial para o entendimento da organização social e da evolução do comportamento social neste grupo de vespas e outros himenópteros.

Atualmente existe uma gama de marcadores moleculares que podem ser utilizados para este fim. Dentre estes, os marcadores microssatélites têm sido utilizados e se mostrado informativos em vários estudos com himenópteros (EVANS, 1995; PAXTON *et al.*, 1996; BEYE *et al.*, 1997; HASTINGS *et al.*, 1998; FOSTER *et al.*, 1999; FOSTER; RATNIEKS 2000; KATADA, 2007). Contudo, para que tais marcadores se mostrem eficientes e informativos se faz necessário, preferencialmente, a utilização de *primers* específicos, desenvolvidos para a espécie a ser estudada.

No caso de *M. cassununga* ainda não existem *primers* de microssatélites desenvolvidos para esta espécie de vespa, nem tampouco para outra espécie deste gênero. Diante disto, os objetivos do presente estudo foram: em uma primeira etapa, desenvolver a partir de bibliotecas enriquecidas de microssatélites, *primers* específicos para *Mischocyttarus cassununga* e, posteriormente, empregar tais *primers* na identificação das relações de parentesco genético entre indivíduos de uma mesma colônia de *M. cassununga*. Os resultados obtidos neste trabalho podem vir a contribuir para estudos mais detalhados do comportamento sociogenético desta espécie de Polistinae, bem como para estudos sobre a diversidade genética de populações de *M. cassununga*, com vistas à conservação desta espécie.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 VESPIDAE: UMA VISÃO GERAL DA FAMÍLIA E UM ENFOQUE A *MISCHOCYTTARUS CASSUNUNGA* VON IHERING, 1903

As vespas são insetos pertencentes à ordem Hymenoptera (CARPENTER; MARQUES, 2001). Dentro desta ordem, a divisão Aculeata reúne certamente os himenópteros mais conhecidos - formigas, abelhas e vespas - os quais têm como característica principal, a modificação do ovipositor, que ao invés de servir para a deposição de ovos, é utilizado como um órgão para inocular veneno. Neste grupo de insetos, os ovos são depositados por uma abertura na base do ferrão, ao invés de passarem através do canal formado pelo ovipositor (GRIMALDI; ENGEL, 2005; HUNT, 2007). Segundo Brothers (1999) os Aculeata são divididos em três grandes superfamílias, Chrysidoidea, Apoidea e Vespoidea. Nesta última superfamília, além de outros grupos de vespas e as formigas (Formicidae), estão reunidas, na família Vespidae, todas as vespas sociais. Os Vespidae formam um grupo de especial interesse para o estudo da evolução do comportamento social (CARPENTER, 1991; REEVE, 1991; GASPAR; LÓPEZ-URIBE; DEL LAMA, 2007), uma vez que reúne espécies exibindo desde comportamento solitário até altamente social (RICHARDS, 1978; CARPENTER, 1991; REEVE, 1991). No caso dos insetos sociais, define-se por comportamento eussocial, quando as colônias apresentam divisão de trabalho reprodutivo entre as fêmeas (ex. operárias e rainha, formando a casta estéril e casta reprodutora, respectivamente), cuidado cooperativo com os indivíduos da colônia e com a cria e sobreposição de gerações (WILSON, 1971; CARPENTER, 1991).

A família Vespidae é dividida em seis subfamílias: Euparagiinae, Masarinae e Eumeninae, que compreendem as espécies de comportamento solitário e, Stenogastrinae, Vespinae e Polistinae, com diferentes graus de comportamento social (CARPENTER; MARQUES, 2001; AREVÁLO *et al.*, 2004; CARPENTER, 2004).

A subfamília Polistinae possui uma ampla distribuição geográfica, com representantes distribuídos por todo o mundo, somando atualmente 21 gêneros, e uma predominância de espécies na região Neotropical, principalmente no

Brasil (CARPENTER, 2004). São descritas 304 espécies brasileiras de Polistinae e destas aproximadamente 106 são endêmicas, com ocorrência em quase toda a extensão do território brasileiro (distribuídas desde a Floresta Amazônica ao Pantanal e Mata Atlântica). Na verdade, em relação aos Polistinae, a fauna brasileira é considerada a mais rica do mundo (CARPENTER; MARQUES, 2001).

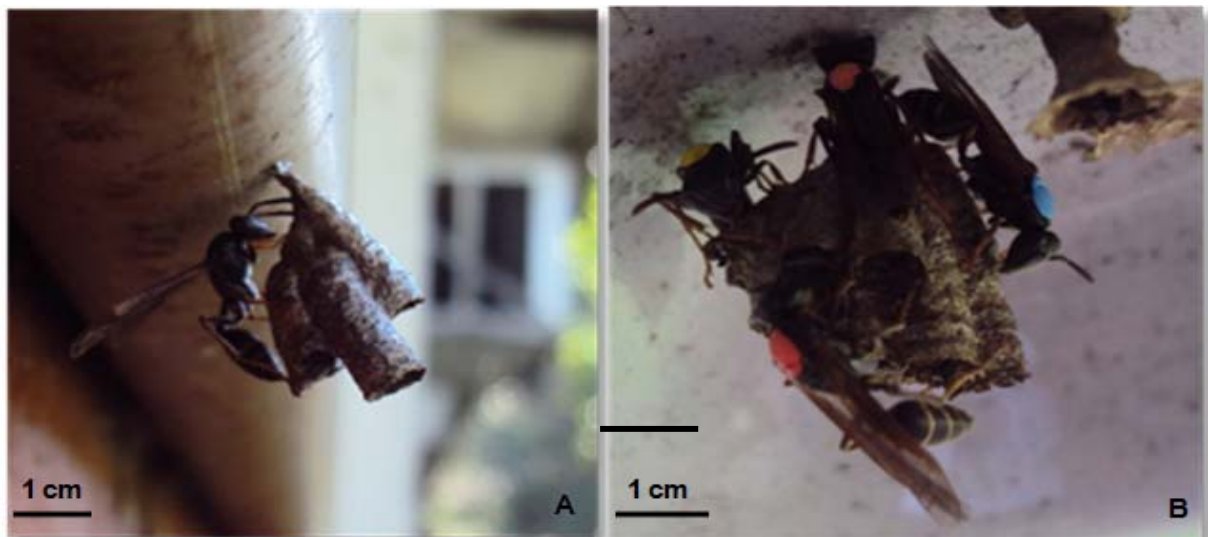
As espécies brasileiras de Polistinae pertencem a três tribos: Polistini, Mischocyttarini e Epiponini, que incluem os gêneros *Polistes*, *Mischocyttarus* e 19 gêneros de Epiponini, respectivamente (CARPENTER, 2004). A tribo Mischocyttarini está exclusivamente distribuída nos países do Novo Mundo, no qual o único gênero representante (*Mischocyttarus*) compreende um dos maiores e mais importantes grupos de vespas sociais, em termos de complexidade biológica e número de espécies (GADAGKAR, 1991; CARPENTER; MARQUES, 2001). O gênero *Mischocyttarus* é representado por mais de 240 espécies, distribuídas desde o Canadá até a Argentina, abrangendo todo o Brasil; inclui 117 espécies brasileiras, das quais, 76 são endêmicas (CARPENTER; MARQUES, 2001).

Dentre os Polistinae, além de *Polistes*, *Mischocyttarus* tem atraído de forma expressiva a atenção de vários pesquisadores interessados em elucidar diferentes aspectos relacionados à evolução do comportamento social nos himenópteros (LITTE, 1981; GADAGKAR, 1991; QUELLER; STRASSMANN; HUGHES, 1992; STRASSMANN; QUELLER; SOLÍS, 1995; GIANNOTTI, 1998; GIANNOTTI, 1999; MURAKAMI *et al.*, 2009; MURAKAMI; SHIMA, 2010). Aparentemente, neste grupo de vespas, existe uma única fêmea dominante na colônia, que é aquela que monopoliza a função da postura dos ovos (LITTE, 1981; QUELLER; STRASSMANN; HUGHES, 1992; NODA; SILVA; GIANNOTTI, 2001).

Dentre as espécies que compõem o gênero *Mischocyttarus*, *Mischocyttarus cassununga* é uma vespa primitivamente eussocial que apresenta ninho constituído por um único favo descoberto, preso ao substrato por um pedúnculo excêntrico (Figura 1). Em relação ao comportamento de nidificação, é uma espécie que apresenta fundação do tipo independente (CARPENTER; MARQUES, 2001; PINTO *et al.*, 2004). Este tipo de fundação pode ser iniciado apenas por uma fêmea inseminada que funda o ninho solitariamente (Haplometrose) ou pela associação de duas ou mais fêmeas férteis (Pleometrose), as quais geralmente são aparentadas (WEST-EBERHARD, 1969; REEVE, 1991). Embora a

inseminação não tenha sido levada em questão, o termo pleometrose deve ser usado somente para colônias que contêm duas ou mais fêmeas, cujos ovários apresentam ovos desenvolvidos (MURAKAMI, 2007). As fêmeas reprodutoras da subfamília Polistinae, iniciam a construção do ninho, ovipositam e alimentam as larvas; após a emergência da primeira prole, a fêmea fundadora, usualmente, restringe-se a produção de ovos e as demais funções são desempenhadas pelas fêmeas filhas.

**Figura 1** –Detalhe de duas colônias de *Mischocyttarus cassununga* no campus da Universidade Estadual de Londrina (CCB), mostrando o peduncúnculo excêntrico em fundação do tipo haplometrose (A) e “pleometrose” (B).



**Fonte:** Carpenter e Marques (2001).

Vespas primitivamente eussociais podem fundar seus ninhos solitariamente ou agregar-se a ninhos já estabelecidos, no qual colaboram com a fundadora. Além disto, estas vespas podem apossar-se de pequenos ninhos que estejam sem liderança por enfraquecimento da colônia ou com baixa atividade defensiva das fundadoras (PINTO *et al.*, 2004).

A interação de fêmeas na fundação de uma colônia é visto como uma estratégia de otimização intranidal, em que pressões ecológicas como o ataque de predadores e usurpadores, e pressões sociais como aumento dos níveis de sobrevivência, estão todos associados, conferindo diversas vantagens ecológicas e comportamentais, como o aumento de proteção da colônia (WEST-EBERHARD, 1969; GIANNOTTI, 1997; REEVE, 1991; OLIVEIRA; CASTRO; PREZOTO, 2005).

Sabe-se que colônias que apresentam fundação do tipo independente sofrem maiores efeitos de predação e parasitismo do que espécies que fundam colônias por enxameagem, devido ao menor número de indivíduos protegendo a colônia, principalmente quando as fêmeas saem para forragear em busca de recursos (CLOUSE, 2001; CARPENTER; MARQUES, 2001), além de apresentar ninho com um único favo descoberto, sem um envelope protetor (RICHARDS, 1978; JEANNE, 1972; JEANNE, 1991; CARPENTER; MARQUES, 2001).

As vespas sociais de regiões tropicais, geralmente são ativas durante todo o ano, podendo fundar seus ninhos em qualquer período e assim não obedecem a um ciclo definido de fundação e abandono das colônias, ao contrário das vespas sociais de regiões temperadas (JEANNE, 1991; GUIMARÃES, 2008), no qual o sucesso de nidificação é influenciado pela sazonalidade. Alguns estudos (JEANNE, 1972; GIANNOTTI, 1998; PENNA *et al.*, 2007) relatam que em geral espécies do gênero *Mischocyttarus*, incluindo *M. cassununga*, apresentam um assincronismo sazonal, podendo ocorrer fundações em qualquer período do ano. No entanto, Gobbi e Simões (1988; *apud* Guimarães, 2008) apesar de terem verificado assincronia sazonal em *M. cassununga*, observaram uma correlação positiva entre o número de colônias fundadas/abandonadas e a precipitação/temperatura, ocorridas em cada mês, sugerindo então que essa espécie é provavelmente sensível a oscilações climáticas.

Assim como outros insetos sociais, as vespas podem armazenar substâncias líquidas (néctar) e sólidas (partes dos corpos de presa) no interior das células de suas colônias (PREZOTO *et al.*, 2005) para alimentação de adultos e larvas. As vespas adultas se alimentam de líquidos do corpo das presas, néctar, mel, exudatos de insetos, sucos de frutas maduras e outros produtos açucarados, conteúdos celulares e água, e as larvas muito novas são alimentadas por um curto período pelos mesmos alimentos dos adultos e em seguida, por uma dieta proteica, composta basicamente por pequenos animais, principalmente insetos, capturados e macerados pelos adultos (CARPENTER; MARQUES, 2001)

Em ambiente natural os ninhos são muito bem camuflados pela forma e coloração presentes em diversas espécies de plantas, troncos ou cavidades naturais (JEANNE, 1991; GIANNOTTI, 1999), no qual são construídos com fibra vegetal, retirada das árvores pelas vespas por raspagem da casca com suas

mandíbulas (GIANNOTTI, 1999). Existe uma grande incidência de nidificações de vespas sociais em áreas antrópicas, principalmente em edificações humanas, onde permanecem ativas por muitos anos, sendo consideradas espécies com um alto grau de sinantropia (JEANNE, 1972). A construção dos ninhos nestes locais proporciona grandes vantagens às vespas sociais, no qual confere uma maior chance de sucesso, uma vez que nos ambientes antrópicos, a pressão contra inimigos naturais são minimizadas, assim como uma maior oferta de locais adequados para a fundação das colônias, devido a uma maior segurança às intempéries climáticas (JEANNE, 1975; LIMA *et al.*, 2000). Vespas do gênero *Mischocyttarus* têm preferências por nidificarem em construções humanas (JEANNE, 1972; LIMA *et al.* 2000), o que torna esses insetos bons modelos para o estudo de comportamento destes grupos de vespas sociais em ambientes antrópicos.

## 2.2 HAPLODIPLOIDIA EM HIMENÓPTEROS, SISTEMA DE DETERMINAÇÃO SEXUAL E SELEÇÃO DE PARENTESCO GENÉTICO

Dentre os insetos Hymenoptera, ordem na qual estão inseridas as formigas, abelhas e vespas, o modo de reprodução mais comum é a arrenotoquia (COOK, 1993; COOK; CROZIER, 1995). Neste modo de reprodução, os machos nascem de ovos não fertilizados (partenogênese), recebendo desta forma um conjunto simples (haplóide) de cromossomos maternos, enquanto as fêmeas têm sua origem a partir de ovos fertilizados, sendo assim organismos diplóides ( $2n$ ) que carregam cromossomos de origem paterna e materna (COOK, 1993; UNRUH; MESSING, 1993). Em alguns casos, machos diplóides também podem ser produzidos, mas estes são usualmente estéreis ou apresentam um baixo valor adaptativo, podendo inclusive, como descrito para a abelha *Apis mellifera*, serem eliminados pelas operárias antes de sua emergência (COOK, 1993; UNRUH; MESSING, 1993).

Estudos mostram que na maioria dos himenópteros não ocorre os conhecidos mecanismos de determinação sexual diplodiplóide, o qual se baseia, por exemplo, nas diferenças de conjuntos cromossômicos, tal como a presença/ausência do cromossomo Y, que resulta na determinação do sexo masculino em mamíferos (COOK; CROZIER, 1995). Deste modo, um modelo

amplamente aceito e difundido para explicar tal determinação sexual se baseia nos estudos realizados por Whiting nas décadas de 1930-1940. De acordo com este modelo, o sexo é determinado por apenas um único loco, o loco Si-CSD (do inglês *single-locus complementary sex determination*), porém com muitos alelos. Se, em um indivíduo diplóide, este loco estiver em homozigose ocorrerá o nascimento de um macho diplóide, caso contrário, nascerá uma fêmea (ZAYED; PACKER, 2005). Este modelo CSD-loco único multialélico foi primeiro descrito para a vespa parasita *Bracon hebetor*. Nesta espécie, heterozigotos  $A^iA^j$  são fêmeas, enquanto os genótipos  $A^iA^i$  e  $A^jA^j$  são machos diplóides (COOK, 1993).

O sistema haplodiplóide dos himenópteros tem sido apontado como um dos fatores principais envolvendo a organização social nestes insetos, conforme teoria de Hamilton (WILSON, 1971). Hamilton em 1964 publicou dois trabalhos que procuravam explicar, sob a luz da seleção natural, o comportamento eussocial nas diferentes espécies animais (HAMILTON, 1964a; HAMILTON, 1964b). Sob esta perspectiva, ambas as pesquisas introduziram uma nova e importante ideia no contexto da evolução: a seleção de parentesco. De acordo com Hamilton, a capacidade reprodutiva está intimamente relacionada com o grau de parentesco do indivíduo com os indivíduos reprodutivamente ativos (geneticamente relacionados) da colônia (RIBEIRO, 2009).

Hamilton relata ainda que comportamentos altruísticos poderiam ser justificados quando existe um alto grau de parentesco entre os membros de uma colônia, no qual pode ser mais vantajoso, do ponto de vista da transmissão de genes para gerações futuras, que se tenha maior cuidado com as irmãs do que com os próprios filhos. Em sociedades partenogênicas, como é o caso dos insetos sociais, este raciocínio ganha força, afinal, as irmãs compartilham, em média, 75% dos genes umas com as outras, enquanto que mães e filhas compartilham apenas 50% dos genes (HAMILTON, 1964a; HAMILTON, 1964b; RIBEIRO 2009).

Wilson, em 1971, estipula três critérios, que classificam espécies sociais: 1) indivíduos da mesma espécie ajudam de forma cooperativa na criação da prole; 2) há uma divisão de tarefas reprodutivas em uma sociedade em que um grupo de indivíduos é infértil e colabora com a criação dos filhos dos indivíduos férteis, além de desempenharem outras funções de manutenção; e 3) a existência de uma sobreposição de pelo menos duas gerações, de forma que os filhos possam

ajudar seus pais. Sob a perspectiva de Wilson, os animais eussociais são apenas aqueles que exibem os três critérios por ele estipulados (WILSON, 1971; RIBEIRO, 2009). Em vespas e abelhas, o comportamento eussocial está presente para algumas espécies, enquanto que para diversas outras espécies diferentes níveis de organização social podem ser evidenciados (WILSON, 1971).

### 2.3 ESTUDOS GENÉTICOS ENVOLVENDO VESPAS POLISTINAE

Nas últimas décadas estudos genéticos moleculares têm sido desenvolvidos com diferentes espécies de vespas, incluindo diversos estudos com espécies da subfamília Polistinae (QUELLER; STRASSMANN; HUGHES, 1992; HUGHES; QUELLER, 1993; STRASSMANN; QUELLER; SOLIS, 1995; EZENWA *et al.*, 1998; FIELD *et al.*, 1998; QUELLER *et al.*, 2000; STRASSMANN, 2001; AREVÁLO *et al.*, 2004; JOHNSON; STARKS, 2004; KUDÔ, 2005; LIEBERT *et al.*, 2006; PICKET; CARPENTER; WHELLER, 2006; GASPAR; LÓPEZ-URIBE; DEL LAMA, 2007; SEPPÄ *et al.*, 2007; ZANETTE; FIELD, 2008; HENSHAW; TOTH; YOUNG, 2011). As abordagens destes estudos incluem análises da estrutura de populações, filogenia e evolução, estrutura sociogenética, efeitos da fissão de colônias no parentesco de vespas, determinação do sistema de acasalamento, entre outros fatores que auxiliam na interpretação do entendimento da biologia deste grupo de Vespidae.

Como destacado anteriormente, um dos aspectos essenciais no entendimento da evolução da organização social em insetos himenópteros, diz respeito, sem dúvida alguma, ao grau de parentesco genético entre os membros de uma colônia (GASPAR; LÓPEZ-URIBE; DEL LAMA, 2007). De acordo com Gaspar, López-Uribe e Dela Lama (2007), o grau de parentesco genético entre os indivíduos da colônia associados com os níveis de poliginia (mais de uma fêmea realizando postura na colônia) e poliandria (mais de um macho copulando com uma única fêmea) indicam a estrutura sociogenética de uma colônia. Segundo estes autores, o conhecimento da estrutura sociogenética de colônias de insetos primitivamente eussociais ajuda a entender a evolução da socialidade nos insetos.

Embora a presença de mais de uma fêmea reprodutora (poliginia) tenha sido descrita para *Mischocyttarus*, análises genéticas baseadas em

marcadores isoenzimáticos apontaram pouca evidência para poliginia nestas vespas, revelando um elevado grau de parentesco entre os membros de uma colônia (QUELLER; STRASSMANN; HUGES, 1992). Estes autores também evidenciaram ausência de endogamia e de diferenciação em subpopulações, sugerindo acasalamento ao acaso para as espécies estudadas.

Há evidências, pelo menos para *Polistes*, que as associações entre fêmeas durante a fase de fundação do ninho ocorrem preferencialmente entre fêmeas aparentadas (WEST-EBERHARD, 1969). Contudo, em relação a este fato, a literatura atual carece de estudos genéticos que comprovem se o mesmo ocorre para *Mischocyttarus* e outros gêneros de Polistinae.

#### 2.4 MARCADORES MICROSSATÉLITES

Os marcadores microssatélites são pequenas sequências repetidas em tandem e que estão distribuídas amplamente pelo genoma apresentando altos níveis de polimorfismo alélico, localizadas tanto na região não codificante quanto codificante do DNA (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; STRASSMANN *et al.*, 1997). São conhecidos também como repetições curtas em *tandem* (STRs) ou sequências simples repetidas (SSRs), que variam de 1 a 6 pares de bases (HUGHES; QUELLER, 1993; PARKER *et al.*, 1998; AVISE, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2006). Os microssatélites são classificados em quatro grupos: 1) perfeitos (GAGAGAGAGAGAGAGAGA); 2) imperfeitos (TCTCTCTCTGTCTC); 3) interrompidos (ACACACATTTACACAC) e 4) compostos (ACACACACACTCTCTCTC). Tais marcadores são amplificados via PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) utilizando-se um par de *primers* específicos (de 20 a 30 pb), que são complementares a sequências únicas de regiões conservadas do genoma, que nesse caso flanqueiam um microssatélite. Segmentos amplificados a partir destes sítios quase que invariavelmente apresentam um polimorfismo extensivo, resultante da presença de diferentes números de elementos simples repetidos (*motifs*). Assim, cada “bloco” de microssatélites, independentemente do *motif* (por exemplo, CA, TG, ATG ou CTAG), constitui um loco genético altamente variável, multialélico e de grande conteúdo informativo (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Entretanto, para usufruir o grande potencial desses marcadores, é necessário um melhor entendimento de como os microssatélites evoluem dentro e entre as espécies (FITZSIMMONS *et al.*, 1995). Apesar do mecanismo de evolução dos microssatélites ainda não estar totalmente elucidado, eles têm sido amplamente empregados devido à sua alta variabilidade, o que os tornam marcadores genéticos informativos (QUELLER *et al.*, 1993; ZHU, 2000).

A taxa de mutação dos microssatélites é muito variável e depende de vários fatores. Um deles, e geralmente o mais frequente, é o número de repetições, pois se sabe que quanto maior for esse número, mais polimórficos serão os microssatélites (WEBER, 1990). Erros durante a recombinação, *crossing-over* desigual e deslizamento da polimerase na replicação ou no reparo do DNA também podem explicar esta alta taxa de mutação (ZHU, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Dentre as características dos microssatélites que os tornam úteis nos vários tipos de estudos, destacam-se: constituem caracteres mendelianos, codominantes (ou seja, é possível distinguir indivíduos homocigotos e heterocigotos), geralmente são seletivamente neutros, pois não sofrem o efeito da seleção e são altamente polimórficos (AVISE, 2004). Deste modo, atualmente, a utilização dos microssatélites tem sido bastante difundida na análise de polimorfismos genéticos (MATIOLI; PASSOS-BUENO, 2001).

Os microssatélites são amplamente utilizados em estudos de parentesco, apresentam algumas vantagens sobre as outras técnicas neste tipo de estudos entre os indivíduos de uma população, pois tais marcadores moleculares fornecem informações sobre *loci* únicos, o que permite estimativas de frequências alélicas e também, por apresentarem altos níveis de diversidade gênica e conseqüentemente altos níveis de polimorfismo (PARKER *et al.*, 1998)

Segundo Avise (2004) estudos que envolvem parentesco surgem em praticamente todas as discussões sobre espécies sociais, em que morfologias e comportamentos peculiares poderiam ter evoluído sob a influência de seleção de parentes (*kin selection*) ou *fitness* (valor de aptidão de um indivíduo que envolve o seu sucesso reprodutivo e seus parentes). Neste caso, para que dois indivíduos retirados ao acaso de uma colônia sejam irmãos verdadeiros completos (filhos de um mesmo casal) estes devem: a) exibir no máximo três alelos por loco no caso de espécies haplodiploides como os Hymenoptera; b) exibir alelos em frequências

consistentes com a transmissão vinda somente de dois parentais; c) partilhar algum alelo que foi observado no estudo da população; d) exibir com frequência excesso de indivíduos heterozigotos com relação às frequências genotípicas esperadas na geração; exibir valores de parentesco genotípico próximo a 0,5 (0,75 no caso dos Hymenoptera); f) alta variação de frequências alélicas entre as gerações (AVISE, 2004).

Os microssatélites têm se mostrado uma ferramenta extremamente vantajosa também para o mapeamento do genoma de muitos organismos. Não obstante suas análises se estendem por diferentes áreas como estudos filogenéticos, forenses, de paternidade, genética de populações, conservação e manejo dos recursos biológicos (JARNE; LAGODA, 1996).

## 2.5 MARCADORES MICROSSATÉLITES EM VESPIDAE

Os Hymenoptera sociais, que apresentam níveis variáveis de organização social, como é o caso das vespas da família Vespidae, constituem modelos importantes para o estudo da evolução do comportamento. Como já mencionado um dos aspectos essenciais no entendimento da organização social destes insetos, diz respeito, sem dúvida alguma, ao grau de parentesco genético entre os membros de uma colônia (GASPAR; LÓPEZ-URIBE; DEL LAMA, 2007).

A associação existente entre as vespas de uma colônia é um componente essencial na determinação do conflito de oviposição entre as rainhas e as operárias. Acredita-se, que a frequência de acasalamento das rainhas, é a chave para o estudo do comportamento reprodutivo (FOSTER *et al.*, 1999; FOSTER; RATNIEKS 2000).

Por meio da análise de microssatélites é possível reconstruir genealogias e estimar relações de parentesco (STRASSMANN, 1997). Além disto, é possível também gerar informações sobre eventos não observados (morte da rainha, a usurpação do ninho ou dominância reprodutiva de uma geração passada) e caracterização da estrutura genética das colônias, como, por exemplo, frequência de acasalamentos, número de rainhas, coeficiente de endogamia, entre outros (QUELLER *et al.*, 1993; FIELD *et al.*, 1998; HUGHES, 1998). Contudo, uma limitação aos estudos genéticos baseados em marcadores microssatélites,

envolvendo vespas e outros organismos, relaciona-se à falta de construção de *primers* de *loci* de microssatélites para as espécies a serem estudadas.

No caso de vespas da família Vespidae, nas últimas duas décadas, alguns trabalhos da literatura descreveram *primers* de microssatélites para algumas das muitas espécies deste grupo diverso de vespas. Por exemplo, Thoren *et al.* (1995) descreveram alguns locos de microssatélites para a vespa social *Vespula rufa*, para avaliar a estrutura reprodutiva e entender como a sociedade reprodutiva é mantida nesta espécie, encontrando um alto nível de polimorfismo destes marcadores na espécie estudada. Em um estudo mais recente foram caracterizados dezenove locos de microssatélites para *Vespula vulgaris*, os quais foram testados também para outras sete espécies de três gêneros de Vespidae (DALY *et al.*, 2002). Estes autores sugeriram a aplicação dos *primers* descritos em investigações ecológicas moleculares com outras espécies de vespas sociais (Vespidae). Ainda, outras espécies de Vespidae que tiveram *loci* de microssatélites isolados e *primers* específicos descritos incluem: *Parachartergus colobopterus* (CHOULDHARY *et al.*, 1993), *Polistes bellicosus* e *P. annularis* (STRASSMANN *et al.*, 1997), *Polistes dominulus* (HENSHAW, 2000), *Eustenogaster fraterna* (ZHU *et al.*, 2000), *Polistes tabidus* (HENSHAW *et al.*, 2001), *Vespula vulgaris* (DALY *et al.*, 2002), *Polistes rothneyi* (TAKAHASHI; YAMASAKI, 2007). Até o presente, contudo, ainda não se tinha na literatura informações sobre *loci* de microssatélites para espécies do gênero *Mischocyttarus*, apesar de ser este um gênero extremamente importante para o estudo da evolução do comportamento social.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVOS GERAIS

Considerando a falta de estudos genéticos com vespas da espécie *Mischocyttarus cassununga* e a necessidade de se conhecer a relação de parentesco intranidal dos indivíduos em colônias desta espécie, na tentativa premente de esclarecer dúvidas relacionadas à estrutura sociogenética desta vespa Polistinae, o presente trabalho teve como objetivos descrever marcadores microssatélites e testar a aplicação destes no estudo das relações genéticas de diferentes colônias de *M. cassununga*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver bibliotecas enriquecidas de microssatélites para *Mischocyttarus cassununga*;
- Selecionar *primers* para regiões flanqueadoras de microssatélites, para sua amplificação por PCR;
- Padronizar os protocolos de amplificação dos locos de microssatélites;
- Otimizar a amplificação dos *primers* em outras espécies da subfamília Polistinae;
- Testar os *primers* desenvolvidos em avaliações das relações de parentesco e estrutura sociogenética de colônias de *M. cassununga*.

## **4 TRABALHOS**

### **4.1 TRABALHO 1**

#### **ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *LOC*/ DE MICROSSATÉLITES DE *MISCHOCYTTARUS CASSUNUNGA* VON IHERING, 1903 (HYMENOPTERA: VESPIDAE: MISCHOCYTTARINI)**

**Alessandra Novaga Alves, Silvia Helena Sofia**

Este trabalho foi submetido à revista **Insectes Sociaux**

**ISOLATION AND CHARACTERISATION OF MICROSATELLITE LOCI OF  
*MISCHOCYTTARUS CASSUNUNGA* (VESPIDAE, POLISTINAE,  
MISCHOCYTTARINI)**

**Alessandra Novaga Alves<sup>1</sup>, Silvia Helena Sofia<sup>1\*</sup>**

**Abstract**

*Mischocyttarus cassununga* (von Ihering, 1903), a primitively eusocial Brazilian wasp, commonly found in urban environments, is an interesting model for studies on Hymenoptera social behaviour evolution. In this study a microsatellite-enriched genomic library was constructed and primers for 18 microsatellite loci are presented. For the analysis, 20 unrelated females were screened and all loci obtained were polymorphic. The number of alleles per locus varied from 3 to 17 ( $\bar{X} = 8.3$ ), totalizing 151 alleles. Levels of observed ( $H_o$ ) and expected ( $H_e$ ) heterozygosities ranged from 0.150 to 0.950 and 0.261 to 0.920, respectively. The polymorphic information content (PIC) ranged from 0.238 to 0.915, averaging 0.680. All loci were in Hardy-Weinberg equilibrium and linkage disequilibrium was not detected after sequential Bonferroni correction ( $P > 0.05$ ). These polymorphic markers will allow further studies on sociogenetic structure, extensive population genetic analysis and diversity of *M. cassununga* and other Mischocyttarini species.

**Keywords:** Wasps. Hymenoptera. Polistinae. *Mischocyttarus*. Molecular markers. Primitively eussocial wasps.

**Introduction**

*Mischocyttarus cassununga* is a Neotropical and primitively eusocial polistine wasp, found exclusively in Brazil (Richards, 1978). As several other species of the subfamily Polistinae, *M. cassununga* represents an interesting model for studies of social behaviour evolution and cooperation in insect societies.

Colonies of *Mischocyttarus* are founded independently by one female (haplometrosis) or by an association of a few females (pleometrosis), which are apparently related to each other (West-Eberhard, 1969; Gadagkar, 1991). These two colony foundation types have been reported for *M. cassununga* (Murakami, 2007;

---

<sup>1</sup> Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Rod. Celso Garcia Cid, km 380, Londrina, PR, 86051-980, Brazil.\*Corresponding author:email: shsofia@uel.br.phone: +55 43 33714417; fax: +55 43 33714207

Guimarães, 2008). The facultative females association for the colony foundation raises several questions concerning genetic relatedness among individuals, and social organisation in the colonies. In social insects, estimates of relatedness among nestmates, levels of polyandry and polygyny are very important to understand the sociogenetic structure (Gaspar et al., 2007). Also, according to these authors, the elucidation of genetic structure of primitively eusocial species will certainly contribute to a better understanding of the evolution of social behaviour in insects.

In colonies of *M. cassununga* castes are morphologically undifferentiated and reproductive division of work is established by dominance and submission interactions, through agonistic behaviour among females (Prezoto et al., 2004; Costa Filho et al., 2011). Although in this wasp the presence of a single dominant female per colony is a typical condition (Richards, 1978), more than one inseminated female per colony during all stages of the colony cycle have been observed (Murakami et al., 2009).

In these last two decades, microsatellite genetic markers have greatly improved our knowledge and ability to characterise the reproductive strategies performed by social wasps (Henshaw, 2000). Also, these markers have proved very informative in determining the genetic relatedness of different hymenopteran social species (Paxton et al., 1996; Beye et al., 1997; Henshaw et al., 2000; Kudô et al., 2005, Katada et al., 2007). In this sense, these markers are considered reliable tools for sociogenetic studies (Henshaw et al., 2011; Augusto et al., 2012).

In the current study we report on primers for amplifying eighteen polymorphic microsatellite loci for the primitively eusocial wasp *M. cassununga*. The results obtained will allow the development of genetic studies regarding the sociogenetic structure of *M. cassununga*, as well as population genetic approaches for this Neotropical wasp species.

DNA was isolated from the insect legs and thorax using a standard phenol/chloroform protocol. A microsatellite-enriched genomic library was constructed according to the method of Billotte et al. (1999) with some modifications proposed by Brito et al. (2009). Genomic DNA (5 µg) was digested with 50 U of *Rsa* I and then linked to 10 µM of Rsa21 (5'CTCTTGCTTACGCGTGGACTA3') and Rsa25 (5'TAGTCCACGCGTAAGCAAGAGCACA3') adaptors. Fragments were selected by

(AGA)<sub>5</sub> and (GA)<sub>8</sub> probes, then cloned into pGem®-T (Promega) vector. Such recombinant plasmids were used to transform *E. coli* DH10-β lineage. A total of 144 recombinant clones were selected and sequenced using Big Dye Terminator™ kit (v. 3.1 – Applied Biosystems). The sequences were solved on ABI 3100 and ABI 3730 automated sequencer. Sequences were analyzed using BioEdit v.7.0 software (Hall, 1999) and, primer design was performed by Primer 3 software (Rozen and Skaletsky, 2000). The forward primers selected received an additional sequence 5'-TGTAACGACGGCCAGT-3' to the 5' end (Schuelke 2000). The AutoDimer software (Vallone and Butler, 2004) was used to test potential presence of hairpin structures and primer-dimer problems. The individual genotyping was performed on ABI 3730 automated sequencer.

Loci polymorphism was tested using 20 unrelated females of *M. cassununga* collected from different nests distributed in the campus of Universidade Estadual de Londrina - UEL (23°15'S, 51°10'W), Londrina, Paraná state, southern Brazil. Also, one individual of the following polistine species *Mischocyttarus cerberus styx* Richards, 1940, *Mischocyttarus drewseni* de Saussure, 1857, and *Polistes versicolor* (Olivier, 1791) was collected at UEL campus and used to test transferability of microsatellite primers designed for *M. cassununga*. Total DNA was extracted from the thorax and legs of each individual, following the protocol of Freiria et al. (2012) with some modifications. PCR reactions were performed according to the protocol described by Francisco et al. (2011), with some modifications. The amplifications were performed at an initial denaturation step of 94 °C for 4 min, followed by 35 cycles of 94 °C for 40 s, 54 °C or 60 °C for 1 min, 72 °C for 1 min, and a final extension of 72 °C for 10 min. The PCR products were submitted to electrophoresis in an automated sequencer (Applied Biosystems 3730 Genetic Analyzer) and GeneScan 500 ROX (Applied Biosystems) was used as the standard molecular weight.

The individuals were genotyped through GeneMarker 1.85 software (SoftGenetics, State College, PA) followed by manual checking. Tests for Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) and linkage disequilibrium among pairs of loci were calculated by GENEPOP 4.0.10 (Raymond and Rousset, 1995; Rousset, 2008); subsequently, *P* values were adjusted by the sequential Bonferroni correction (Rice, 1989). The software GenAIEx v.6.41 (Peakall and Smouse, 2006) was used to

estimate the observed ( $H_o$ ) and expected ( $H_e$ ) heterozygosities and average number of alleles per locus. Estimates of the polymorphic information content (PIC) and potential null alleles were obtained through Cervus v.3.0 (Marshall et al., 1998) and MicroChecker v.2.2.3 (van Oosterhout et al., 2004) software, respectively.

Out of 144 sequenced clones, 33 showed microsatellite repeats that deserved primers designing. However, after testing several amplification conditions, only 19 loci amplified successfully, being 18 polymorphic (Table 1). The number of alleles per locus varied from 3 to 17, averaging 8.33. Observed ( $H_o$ ) and expected ( $H_e$ ) heterozygosities ranged from 0.150 to 0.950 and 0.261 to 0.920, respectively. The polymorphic information content (PIC) ranged from 0.238 to 0.915, averaging 0.680 (Table 1). According to Botstein et al. (1980) estimates of PIC above 0.5 are considered highly informative, between 0.25 and 0.50 are reasonably informative and, below 0.25 are only slightly informative. Based on this, in the current study, since 14 loci showed PIC values equal or superior to 0.652 they were considered as highly informative; three loci (Mcas5b, Mcas83b and Mcas90b) were reasonably informative and one locus (Mcas90b) was slightly informative. After adjusting to sequential Bonferroni correction no loci showed significant deviation from HWE, as well as no linkage disequilibrium was found between all pairs of loci analyzed ( $P > 0.05$ ). The occurrence of null alleles was found for two loci, Mcas5b and Mcas55b, a result that is likely due to the very low allele frequency (0.025) detected for both. The PCR products from cross-species amplification tests produced fragments of expected sizes (not shown) for all three polistine species analysed (*M. cerberus styx*, *M. drewseni* and *Polistes versicolor*). However, non-PCR product for locus Mcas42b was observed for *P. versicolor* (Table 1). As previously reported for other wasps species (Henshaw, 2000; Zhu et al., 2000; Daly et al., 2002), the success in cross-species amplification performed by Mcas primers, reaffirm the extensive conservative character of microsatellite flanking region in related species (Zardoya et al., 1996). Although taken with care, considering that more tests involving a higher number of individuals of these species are recommended, our findings suggest the potential use of these primers to assess heterologous loci of other Polistinae wasps, especially the Mischocyttarini species.

In spite of *M. cassununga* being a wasp species commonly found in urban environments (Prezoto et al., 2004; Guimarães, 2008), until now there has no

genetic approach dealing with the sociogenetic structure and reproductive strategies of this polistine species. A limiting factor can be attributed to the absence of publications bringing forward specific information regarding microsatellite loci for *Mischocyttarus* species. In this sense, the microsatellite loci described herein will contribute to future sociogenetic studies involving *M. cassununga*, a recognised primitively eusocial wasp. Certainly, information about the sociogenetic structure of colonies coupled with behavioural studies, already performed for *M. cassununga* (Prezoto et al., 2004; Murakami et al., 2009; Murakami and Shima, 2010), will help to elucidate existing doubts regarding its social organisation. In addition, the microsatellite loci here reported will contribute to the development of population genetic studies involving *M. cassununga* as well as other *Mischocyttarus* species.

### **Acknowledgments**

This research was financially supported by CAPES/PROCAD (158/2007) and by the Universidade Estadual de Londrina (FAEPE no. 01/2011). We gratefully acknowledge Dr Sidnei Mateus (USP/Ribeirão Preto) and Dr Orlando T. Silveira (Museu Paraense Emílio Goeldi) for their valuable help in identification of the wasps. Thanks are also due to IBAMA/SISBIO for permission to collect wasps. A.N. Alves received a fellowship from CNPq.

## REFERENCES

- Augusto S.C., Gonçalves P.H.P., Francisco F.O., Santiago L.R., Franoso E.A., Suzuki K.M., Sofia S.H., Simões Z.L.P and Arias M.C. 2012. Microsatellite loci for the carpenter bee *Xylocopa frontalis* (Apidae, Xylocopini). *Conserv. Genet. Resour* **4**: 315-317
- Beye M., Neumann P., Chapuisat M. and Pamilo P. 1998. Nestmate recognition and the genetic relatedness of nests in the ant *Formica pratensis*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **43**: 67-72
- Billotte N., Lagoda P.J.R., Risterucci A.M. and Baurens F.C. 1999. Microsatellite enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits* **54**: 277–288
- Botstein D., White L.R., Skolnick M. and Davis R.W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Human Genet.* **32**: 314-331
- Brito R.M., Francisco F.O., Domingues-Yamada A.M.T., Gonçalves P.H.P., Pioker F.C., Soares A.E.E. and Arias M.C. 2009. Characterization of microsatellite loci of *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Conserv. Genet. Resour.* **1**: 183–187
- Costa Filho V.C., Shima S.N., Desuó I.C. and Murakami A.S.N. 2011. The effects of the social hierarchy destabilization on the foraging activity of eusocial wasp *Mischocyttarus cerberus styx* Richards, 1940 (Hymenoptera: Vespidae: Polistinae). *Psyche* doi: 10.1155/2011/501381
- Daly D., Archer M.E., Watts P.C., Speed M.P., Hughes M.R., Barker F.S., Jones J., Odgaard K. and Kemp S.J. 2002. Polymorphic microsatellite loci for eusocial wasps (Hymenoptera: Vespidae). *Mol. Ecol. Notes* **2**: 273–275
- Francisco F.O., Brito R.M., Santiago L.R., Gonçalves P.H.P., Pioker F.C., Domingues-Yamada A.M.T. and Arias M.C. 2011. Isolation and characterization of 15 microsatellite loci in the stingless bee *Plebeia remota* (Apidae: Meliponini). *Conserv. Genet. Resour.* **3**: 417–419
- Freiria G.A, Ruim J.B., Souza R.F. and Sofia S.H. 2012. Population structure and genetic diversity of the orchid bee *Eufriesea violacea* (Hymenoptera, Apidae, Euglossini) from Atlantic Forest remnants in southern and southeastern Brazil. *Apidologie* doi: 10.1007/s13592-011-0104-y
- Gadagkar R. 1991. *Belonogaster*, *Mischocyttarus*, *Parapolybia* and independent-founding *Ropalidia*. In: *The Social Biology of Wasps* (Ross K.G. and Matthews R.W., Eds.). Cornell University Press, Ithaca, pp 149-190
- Gaspar J.C.W., López-Uribe M.M. and Del Lama M.A. 2007. Allozyme variation and sociogenetic structure of *Polistes satan* Bequaert 1940 colonies (Hymenoptera, Vespidae). *Genet. Mol. Biol.* **30**: 470-474

- Guimarães D.L. 2008. *Biologia e ecologia comportamental da vespa social Mischocyttarus cassununga (Von Ihering, 1903) (Hymenoptera, Vespidae) em ambiente antrópico*. Master dissertation, Universidade Federal de Juiz de Fora
- Hall T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41: 95-98
- Henshaw M.T. 2000. Microsatellite loci for the social wasp *Polistes dominulus* and their application in other polistine wasps. *Mol. Ecol.* 9: 2155–2234
- Henshaw M.T., Strassmann J.A. and Queller D.C. 2000. The independent origin of a queen number bottleneck that promotes cooperation in the African swarm-founding wasp, *Polybioides tabidus*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 48: 478-483
- Henshaw M.T. Toth A.L., Young T.J. 2011. Development of new microsatellite loci for the genus *Polistes* from publicly available expressed sequence tag sequences. *Insectes Soc.* 58: 581–585
- Katada S., Suzuki T. and Tsuchida K. 2007. Application of microsatellite primers for the social wasp *Polistes* to another social wasp genus, *Parapolybia*, to estimate genetic relationships among nestmates. *Entomol. Sci.* 10: 1-5
- Kudô K., Tsujita S., Tsuchida K., Goi W., Yamane S., Mateus S., Itô, Miyano S. and Zucchi R. 2005. Stable relatedness structure of the large-colony swarm-founding wasp *Polybia paulista*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 58: 27–35
- Marshall T.C., Slate J. and Kruuk L.E.B., Pemberton J.M. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol. Ecol.* 7: 639-655
- Murakami A.S.N. 2007. *Diferenciação etológica e morfofisiológica das castas de Mischocyttarus (Monocyttarus) cassununga von Ihering, 1903 (Hymenoptera, Vespidae, Mischocyttarini), com especial referência as fêmeas hierarquicamente*
- Murakami A.S.N., Shima S.N. and Desuó I.C. 2009. More than one inseminated female in colonies of the independent-founding wasp *Mischocyttarus cassununga* von Ihering (Hymenoptera, Vespidae). *Rev. Bras. Entomol.* 53: 653-662
- Murakami A.S.N. and Shima S.N. 2010. Regulation of social hierarchy over time in colonies of the primitive eusocial wasp *Mischocyttarus (Monocyttarus) cassununga*. von Ihering, 1903 (Hymenoptera, Vespidae). *J. Kansas Entomol. Soc.* 83: 163-171
- Paxton R.J., Thorgn P.A., Tengo J., Estoup A. and Pamilo P. 1996. Mating structure and nestmate relatedness in a communal bee, *Andrena jacobi* (Hymenoptera, Andrenidae), using microsatellites. *Mol. Ecol.* 5: 511-519

- Peakall R. and Smouse P.E. 2006. GENEALX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes* **6**: 288-295
- Prezoto F., Vilela A.P.P., Lima M.A.P., D'ávila S., Sinzato D.M.S., Andrade F.R., Santos-Prezoto H.H. and Giannotti E. 2004. Dominance hierarchy in different stages of development in colonies of the primitively eusocial wasp *Mischocyttarus cassununga* (Hymenoptera, Vespidae). *Sociobiology* **44**: 379-390
- Raymond M., Rousset F. 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for 237 exact tests and ecumenicism. *J. Heredity* **86**: 248-249
- Rice W.R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* **43**: 223-225
- Richards O.W. 1978. *The Social Wasps of the Americas, Excluding the Vespinae*. London, British Museum, London
- Rousset F. 2008. GENEPOP'007: a complete re-implementation the GENEPOP software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Resour.* **8**: 103-106
- Rozen S. and Skaletsky H.J. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology* (Krawetz S. and Misener S., Eds.). Humana Press, Totowa, pp 365-386
- Schuelke M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nat. Biotechnol.* **18**: 233-234
- Vallone M.V. and Butler J.M. 2004. AutoDimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structures. *BioTechniques* **37**: 226-231
- van Oosterhout C., Hutchinson W.F., Wills D.P.M. and Shipley P.F. 2004. Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes* **4**: 535-538
- West-Eberhard M.J. 1969. The social biology of polistine wasps. *Misc. Publ. Univ. Mich. Mus. Zool.* **140**: 1-101
- Zardoya R., Vollmer D.M., Craddock C., Streelman J.T., Karl S. and Meyer A. 1996. Evolutionary conservation of microsatellite flanking regions and their use in resolving the phylogeny of cichlid fishes (Pisces: Perciformes). *Proc. Royal Soc. B - Biol. Sci.* **263**: 1589-1598
- Zhu Y., Landi M., Queller D.C., Turillazzi S. and Strassmann J.E. 2000. Polymorphic microsatellite loci for primitively eusocial Stenogastrine wasps. *Mol. Ecol.* **9**: 2155-223

**Table 1** – A description of 18 polymorphic microsatellite loci isolated from *Myschocyttarus cassununga* and results in cross-species amplification tests with other three polistine species. (+) = successful amplification; (-) = no amplification. The sample size (*n*) for each species is given in the column heading. GenBank accession numbers are JQ672630 to JQ672648

Locus	Sequence repeat	Primer sequences (5'→3')	T <sub>a</sub> (°C)	<i>k</i>	Allele size range (bp)	H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub>	PIC	<i>Mischocyttarus cserberus stox</i> (n=1)	<i>Mischocyttarus drewseni</i> (n=1)	<i>Polistes versicolor</i> (n=1)
Mcas5b	(AG) <sub>3</sub>	F: GAGATTAATGGGAGCTTACAC G R: CTTGTCGATTGGCTCGCTTA	60	3	172 - 176	0.15	0.52*	0.41	+	+	+
Mcas6b	(AG) <sub>3</sub> AA(AG) <sub>10</sub> AAAGGG(AG) <sub>4</sub>	F: TTGAGTCACGCTCTCTCTCG R: GTCGAACCTCGTGCATGTC	60	11	199 - 227	0.75	0.83	0.81	+	+	+
Mcas11b	(AG) <sub>3</sub> TAAA(AG) <sub>7</sub> TG(AG) <sub>4</sub> TG(AG)	F: TGTTCGTGCTTATTGAAACG R: CATCTTAGCGACAAGGGAAA	60	2	159 - 181	0.84	0.78	0.75	+	+	+
Mcas14a	(GA) <sub>10</sub>	F: GCAAGCCTTAAAGAAAAGATGGA R: ATCGGAACGCGTTGAAGCATA	60	6	168 - 184	0.6	0.69	0.65	+	+	+
Mcas15b	(GA) <sub>3</sub>	F: CGTTCAGACGAGAAACACACA R: CTTCCACAATTCTCAAAGGA	60	11	189 - 215	0.95	0.87	0.85	+	+	+
Mcas34b	(TC) <sub>6</sub> TT(TC) <sub>10</sub>	F: GGGCAGATTGAGGCTTAGAG R: TGCGTTCGCCTGACTATATG	60	8	179 - 201	0.75	0.81	0.79	+	+	-
Mcas42b	(GA) <sub>2</sub> GC(GA) <sub>3</sub> TTGAAA(GA) <sub>3</sub>	F: TGGAGATTCACAATTACCGAAG R: CTTGAGGTGGTTTCTTCA	60	6	226 - 236	0.55	0.69	0.65	+	+	+
Mcas51b	(TC) <sub>4</sub> TT(TC) <sub>6</sub> TG(TC) <sub>10</sub> TG (TC) <sub>7</sub>	F: TCCTCCAACGACACGATACA R: TAGGAGTCGTTGCGGAAATC	60	12	160 - 214	0.70	0.83	0.81	+	+	+
Mcas53b	(TC) <sub>13</sub>	F: GAGAATTC GAC GTGCAACA R: CCTACGAATCTTTCCAAGTTTTT	60	17	241 - 287	0.95	0.92*	0.91	+	+	+
Mcas55b	(TC) <sub>14</sub>	F: CGATTGACCGAACCGTAAAG R: GCCCTGGTGATACCGACTAA	60	8	228 - 244	0.60	0.79*	0.76	+	+	+
Mcas56b	(GT) <sub>14</sub>	F: TGGTGCATGAAAAGAAT R: GCAAGTCTCACGACC GTTCT	60	10	176 - 194	0.85	0.82*	0.80	+	+	+
Mcas69b	(TAG)CAG(TAG)AG(TAG) <sub>10</sub> (TCG) <sub>2</sub>	F: TCTTCTCTTGCTCTGTATGTTCTG R: CTAGGCACTCGATGAC GTTG	60	2	149 - 202	0.90	0.74	0.72	+	+	+
Mcas83b	(CT) <sub>10</sub> TT(CT) <sub>3</sub>	F: TTGAACGAGAGAACGGATCG R: GAGCCGGCAGATGATACAAT	54	2	193 - 201	0.65	0.51	0.45	+	+	+
Mcas88b	(TC) <sub>15</sub>	F: CACTCAATCAAGGATCATAGCC R: GCAGCGATTACCACGAAGAG	60	10	228 - 256	0.95	0.83	0.81	+	+	+
Mcas90b	(TAA) <sub>3</sub>	F: GACAGTGCACAGATTC AAAC G R: AATATCGCTGAGGGTTTTGC	60	3	187 - 193	0.30	0.26	0.24	+	+	+
Mcas95b	(TC) <sub>17</sub> TA(TC) <sub>3</sub>	F: CTCACTCTCAGAGGAGGAAG R: TGTGTTATGTATATGTTAGAAAAGAG	54	2	191 - 211	0.45	0.46	0.44	+	+	+
Mcas103b	(TC) <sub>3</sub> (TCCC) <sub>4</sub> (TC) <sub>3</sub> TT(TC) <sub>14</sub>	F: AGACGACGATAAGTGACAGTGAA R: TAACCGAGACGGCGAATTAC	60	10	203 a 227	0.85	0.80	0.77	+	+	+
Mcas108b	(TA) <sub>5</sub> (GA) <sub>9</sub>	F: CGTCATTAAC TAAGACACATTAAG R: ACATTTAAGTGGCAGACGA	60	2	263 - 275	0.70	0.74	0.70	+	+	+

Flanking primers, T<sub>a</sub> = optimal annealing temperatures, *k* = number of alleles, allele size range (bp), H<sub>o</sub> = observed heterozygosity, H<sub>e</sub> = expected heterozygosity estimated from 20 unrelated females, PIC = polymorphic information content, GenBank accession numbers. \*Indicates significant HWE departure (*P* < 0.05).

## 4.2 TRABALHO 2

**MARCADORES MICROSSATÉLITES APLICADOS AO ESTUDO DO  
COMPORTAMENTO SOCIAL DE COLÔNIAS DA VESPA *MISCHOCYTTARUS*  
*CASSUNUNGA* VON IHERING, 1903 (HYMENOPTERA, VESPIDAE,  
MISCHOCYTTARINI)<sup>1</sup>**

Este trabalho será submetido à revista **Genetica**

**Alessandra Novaga Alves, Silvia Helena Sofia**

**MARCADORES MICROSSATÉLITES APLICADOS AO ESTUDO DO  
COMPORTAMENTO SOCIAL DE COLÔNIAS DE *MISCHOCYTTARUS  
CASSUNUNGA* VON IHERING, 1903 (HYMENOPTERA, VESPIDAE,  
MISCHOCYTTARINI)**

**Alessandra Novaga Alves<sup>1</sup>, Silvia Helena Sofia<sup>1</sup>**

**Resumo**

Neste trabalho foram realizadas observações do comportamento intranidal de cinco colônias da vespa *Mischocyttarus cassununga* von Ihering, com o objetivo de obter informações que pudessem subsidiar a caracterização do parentesco genético dos indivíduos adultos e prole da colônia. Tais observações permitiram identificar um predomínio de fundações por haplometrose (60%), a presença de fêmeas *M. cassununga* usurpadoras coexistindo em algumas colônias e uma possível alternância de dominância entre fêmeas dominantes. Nas análises genéticas, oito *loci* de microsatélites de os todos os indivíduos (fêmeas e imaturos) das cinco colônias foram amplificados e, em seguida genotipados, em sequenciador automático. O número de alelos encontrados variou de dois a seis alelos por *locus*, totalizando 70 alelos obtidos; com a presença de alelos exclusivos para algumas colônias. As estimativas genéticas revelaram altos valores de heterozigose e presença de alelos nulos para alguns *loci*. As análises do parentesco genético obtidos neste estudo revelaram a presença de indivíduos não-aparentados em uma mesma colônia, indicando: a) a presença de mais de uma fêmea poedeira na colônia; e, b) nos casos de invasão de fêmeas externas à colônia, que tais fêmeas não eram irmãs ou aparentadas com os indivíduos da colônia invadida. Este foi o primeiro estudo sociogenético realizado com *M. cassununga* e os resultados aqui obtidos abrem novas perspectivas de estudos, especialmente no que se refere a abordagens voltadas a um maior entendimento da evolução do comportamento social entre os Polistinae.

**Palavras-chaves:** Vespidae – Polistinae - *Mischocyttarus cassununga* – Microsatélites – Relação de parentesco – Sociogenética.

---

<sup>1</sup> Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, 6001, Londrina, PR, 86051-980, Brasil. email: shsofia@uel.br

## 1 INTRODUÇÃO

As vespas da família Vespidae são insetos que apresentam níveis variados de organização social, exibindo comportamentos desde o tipo solitário até altamente social, característica que torna este grupo de vespas interessantes para estudos relacionados à evolução do comportamento social (Carpenter, 1991; Reeve, 1991; Gaspar et al., 2007). Dentro de Vespidae, Polistinae é uma subfamília que reúne 21 gêneros distribuídos em três tribos distintas, dentre estas Mischocyttarini é representada apenas pelo gênero *Mischocyttarus* (Carpenter, 2004; Gomes e Noll, 2009).

*Mischocyttarus* de Saussure, 1853 apresenta uma distribuição essencialmente Neotropical, ocorrendo em sua maior diversidade na América do Sul (Richards, 1978; Carpenter e Marques, 2001; Silveira, 2008). Apesar de reunir cerca de 250 espécies, constituindo o gênero mais diverso em número de espécies dentre os vespídeos sociais (Silveira, 2008), ainda são poucos os estudos envolvendo *Mischocyttarus* (Murakami et al., 2009). Dentro deste gênero, *Mischocyttarus cassununga* é uma das mais de 75 espécies que são endêmicas do Brasil (Carpenter e Marques, 2001).

Assim como as outras espécies do gênero (Wilson, 1971; Litte, 1981; Giannotti, 1999), *M. cassununga* apresenta comportamento primitivamente eussocial (Prezoto et al., 2004), que tem como uma de suas características a fundação independente da colônia (Gadagkar, 1991). Em *Mischocyttarus* a fundação da colônia pode acontecer com uma fêmea fundando sozinha o ninho (haplometrose) ou em associação com outras poucas fêmeas (pleometrose) (Litte, 1981; Gadagkar, 1991), que geralmente são consideradas aparentadas entre si (West-Eberhard, 1969; Jeanne, 1972; Gadagkar, 1991). Ambas as condições já foram observadas para *M. cassununga* (Murakami, 2007; Guimarães, 2008).

No caso de *M. cassununga* embora apenas uma fêmea dominante reprodutora pareça ser a condição usual (Richards, 1978), foi demonstrado que colônias desta espécie apresentam mais de uma fêmea inseminada, as quais seriam potencialmente capazes de realizar postura de ovos viáveis durante todas as fases da colônia (Murakami, 2007; Murakami et al., 2009). Sobre este fato não se sabe ainda ao certo se tais fêmeas realizam oofagia com produção de sua própria prole e qual o grau de parentesco entre tais fêmeas, particularmente nos casos de fundação

por pleometrose. Estes dois aspectos estão inerentemente relacionados aos modelos de desvio reprodutivo em vespas e outros himenópteros sociais, e consequentemente ao estudo da evolução do comportamento social nestes insetos (Liebert e Starks, 2006; Augusto e Garófalo, 2009), merecendo ser foco de maiores estudos. Nestes casos, análises genéticas podem subsidiar o esclarecimento de tais questões biológicas, como já demonstrado em estudos envolvendo outras espécies de vespas primitivamente eussociais (Liebert e Starks, 2006; Seppä et al., 2008).

No presente trabalho, marcadores microssatélites foram empregados para as análises do parentesco genético de indivíduos de cinco colônias de *M. cassununga*, que tiveram previamente alguns aspectos do compartimento intranidal avaliados. Tais marcadores têm sido utilizados com sucesso na determinação das relações de parentesco em diferentes espécies himenópteros sociais (Hastings et al., 1998; Foster et al., 1999; Foster e Ratnieks, 2000; Katada, 2007). Os resultados aqui obtidos mostram que os oito *loci* amplificados permitiram discriminar eficientemente o grau de parentesco entre os indivíduos de uma colônia e forneceram informações que indicam a ocorrência de oligogenia em algumas colônias estudadas de *M. cassununga*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 OBSERVAÇÃO COMPORTAMENTAL *IN SITU*

O estudo foi realizado no *campus* da Universidade Estadual de Londrina, localizado no município de Londrina (23°15'S, 51°10'W), estado do Paraná região sul do Brasil. Para a coleta das informações foram analisadas cuidadosamente as edificações presentes, pois é conhecido que vespas do gênero *Mischocyttarus* têm preferência por nidificarem em locais de construção humana (Jeanne, 1972; Lima et al., 2000).

Merece destaque o fato de que no presente trabalho a observação do comportamento intranidal de *M. cassununga* esteve restrita à identificação de alguns dos comportamentos entre os indivíduos das colônias observadas, visando apenas obter informações que pudessem subsidiar a caracterização do parentesco genético dos indivíduos adultos e prole da colônia. Assim, não foi objetivo deste

estudo a descrição detalhada do comportamento dessa espécie de vespa, uma vez que estes dados já constam da literatura (Prezoto et al. 2004; Murakami 2007; Guimarães, 2008). Para tanto, nas colônias de *M. cassununga* estudadas neste trabalho, foram realizadas observações que permitissem principalmente a identificação: a) do número de fêmeas fundadoras (quando possível) em cada colônia; b) de fêmeas dominantes e subordinadas; c) da estabilidade da posição social de cada indivíduo presente; d) de indivíduos inerentes e externos à 1ª colônia; e) das interações entre os indivíduos da colônia (ex. comportamentos agonísticos); f) comportamento de postura; g) fêmeas forrageadoras.

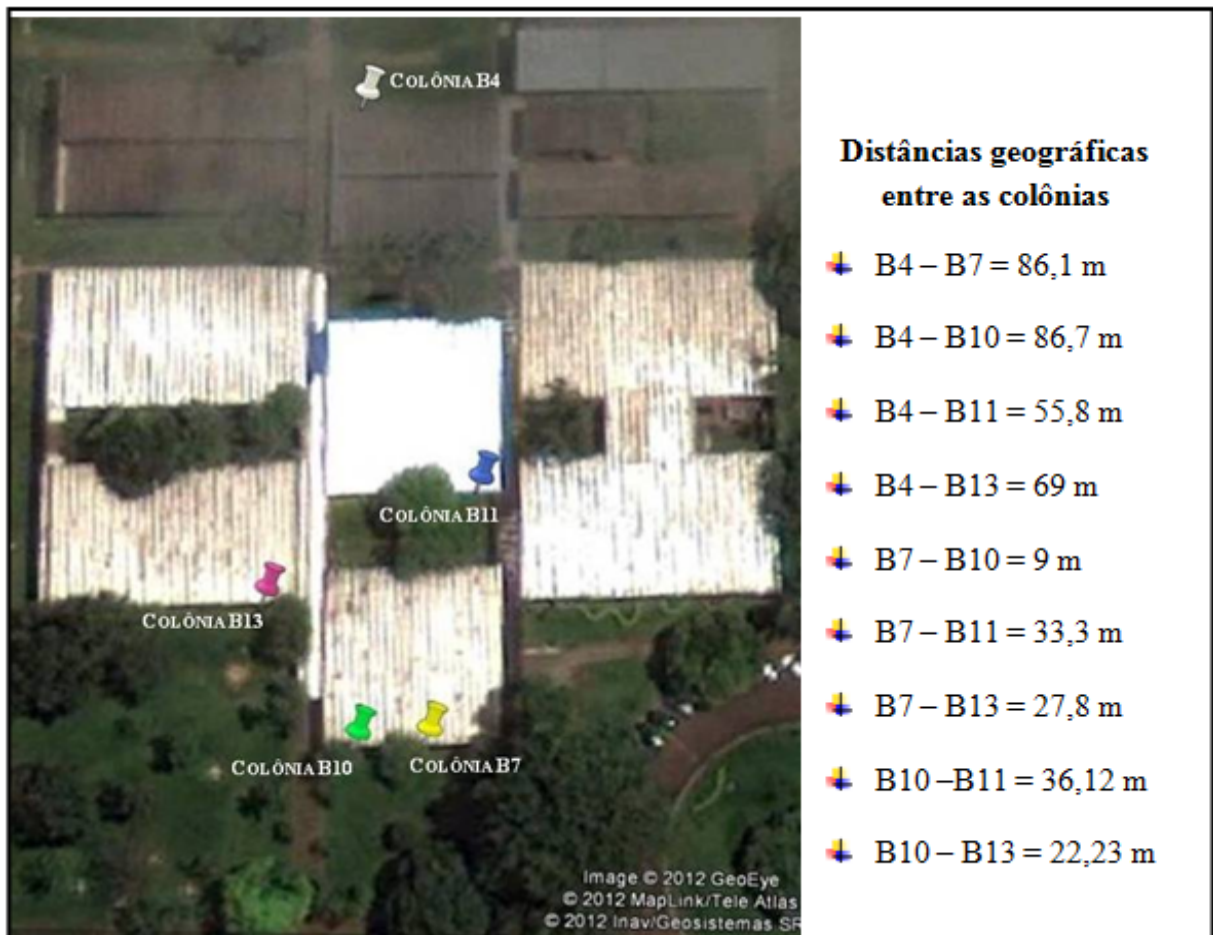
Depois de mapeadas e identificadas, foram selecionadas 13 colônias de *Mischocyttarus cassununga*. Destas, oito não apresentaram desenvolvimento satisfatório com os objetivos do trabalho e foram excluídas do estudo. Portanto, foram analisadas as cinco colônias restantes: **B4** (23°19'29,97"S e 51°11'49,63"W), **B7** (23°19'32,78"S e 51°11'49,48"W), **B10** (23°19'32,77"S e 51°11'49,80"W), **B11** (23°19'31,72"S e 51°11'49,19"W) e **B13** (23°19'32,14"S e 51°11'50,18"W) (Figura 1).

Vale destacar aqui que registros na literatura indicam que o ciclo biológico de uma colônia de *M. cassununga*, o qual envolve diferentes etapas [(I) fundação, (II) pré-emergência, (III) pós-emergência, (IV) declínio e (V) abandono] (Murakami, 2007), pode ser muito variável em termos de longevidade, podendo se estender por cerca de apenas um mês até um ano, ou um pouco mais do que isto (Gobbi e Simões, 1988 *apud* Prezoto et al., 2004; Penna et al., 2007). Além disto, colônias desta espécie podem apresentar uma grande variação no número de células, com registros indicando desde quatro até 172 células ( $\bar{X} = 40,1$ ) por colônia (Gobbi e Simões, 1988 *apud* Prezoto et al., 2004).

As observações foram realizadas nos meses de setembro/2011 a dezembro/2011. Cada colônia foi observada, individualmente, por meio de visitas periódicas em dias intercalados, preferencialmente entre às 11h00 e 16h00, período no qual os indivíduos apresentavam maior atividade na colônia. O tempo de cada observação variou de 20 a 60 horas/colônia. Esta variação foi determinada de acordo com a dinâmica da colônia, pois algumas ao longo do estudo mostraram um maior potencial informativo e por isso uma maior atenção e conseqüentemente maior número de horas de observação foi dedicada às mesmas. Por exemplo, colônias com mais indivíduos trabalhando, com mais de uma fêmea fundadora e

comportamentos agonísticos entre estas, acabaram demandando maior tempo de observação.

**Figura 1** – Localização geográfica dos locais de nidificação das cinco colônias analisadas de *Mischocyttarus cassununga* e a distância entre elas (metros). Imagem do Google Earth.



Para a identificação dos indivíduos presentes na colônia e diferenciação visual entre eles, os mesmos foram previamente marcados no tórax com tinta acrílica de rápida secagem (Figura 2). A coleta dos dados foi realizada por meio de observações diretas, a olho nu.

**Figura 2** – Colônia de *Mischocyttarus cassununga* no campus da Universidade Estadual de Londrina, Londrina- PR, evidenciando as marcações feitas com tinta acrílica em cada indivíduo da colônia. Foto: A. N. Alves.



A descrição dos comportamentos observados foi baseada nos trabalhos de Prezoto et al. (2004), Murakami (2007) e Guimarães (2008), com pequenas modificações. A escala de hierarquia social em cada uma das colônias foi estabelecida com base na frequência de comportamentos de dominância e subordinação demonstrados por cada fêmea presente na colônia. É conhecido que o estabelecimento da hierarquia da colônia ocorre geralmente por comportamentos agonísticos entre as fêmeas, sendo que a mais agressiva ocupa a posição de dominante e as agredidas passam a realizar comportamentos de subordinadas, independente da fase do ciclo biológico (Murakami, 2007). Vale destacar também que *M. cassununga* apresenta geralmente poucos indivíduos em suas colônias (Gobbi e Simões, 1988 *apud* Prezoto et al., 2004). Uma vez determinada à hierarquia social, manteve-se o acompanhamento de tais relações entre os indivíduos, com o objetivo de verificar a estabilidade da hierarquia da colônia e as possíveis causas de substituição da fêmea dominante (ex. predação, disputa ou abandono), caso este fato viesse a ocorrer.

Durante o período das observações, notou-se o abandono permanente de alguns indivíduos das suas respectivas colônias, por motivos desconhecidos. Devido a este fato, foi determinada que metade de uma antena de cada indivíduo da colônia fosse seccionada e armazenada, para a garantia do material genético a ser utilizado nas análises moleculares posteriores. Tal procedimento não evidenciou diferenças na atividade e manutenção das colônias, como já relatado em um estudo com uma espécie de abelha (Oi, 2010).

Ao final das observações, os indivíduos das cinco colônias foram capturados com armadilha contendo solução anestésica (éter), incluindo imaturos (larvas e pupas) e adultos. Após a coleta, a sexagem dos adultos foi confirmada em estereomicroscópio, evidenciando somente a presença de fêmeas. Posteriormente, todos os indivíduos coletados foram estocados em *freezer* a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento da extração de DNA.

## 2.2 EXTRAÇÃO DO DNA

O DNA das amostras foi obtido por meio de dois protocolos distintos:

*A. Larvas e pupas:* no caso das larvas, primeiramente foi retirado o aparelho digestivo, com auxílio de uma pinça de ponta fina, e do restante do material foi extraído o DNA genômico; no caso das pupas, o DNA foi extraído de todo o material. Tanto o material das larvas quanto das pupas, foi dilacerado em tampão de extração com auxílio de uma tesoura e seguiram-se as etapas de digestão e purificação do DNA conforme descrito por Freiria (2012).

*B. Adultos:* foi seccionada metade da antena direita de cada adulto e o DNA genômico foi obtido por extração Chelex® 100, de acordo com protocolo descrito por Walsh et al. (1991), com algumas modificações sugeridas por Oi (2010).

A quantificação das amostras foi realizada em fluorímetro DyNA Quant 200 (Hoefer). O DNA das amostras foi diluído em uma concentração de  $10\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  para as larvas e pupas, já para a extração Chelex®100 manteve recomendações sugeridas por Oi (2010).

### 2.3 PARENTESCO INTRANIDAL: MARCADORES MICROSSATÉLITES

O tamanho amostral de cada colônia analisada foi conforme descrição na Tabela 1. Para as análises foram testados oito *primers* de microssatélites: Mcas6b, Mcas11b, Mcas14a, Mcas15b, Mcas34b, Mcas42b, Mcas53b e Mcas69b. A padronização dos primers foi realizada por análise de fragmentos em sequenciador automático Applied Biosystems (3730 Genetic Analyzer). Para tal técnica, os *primers forward* foram modificados recebendo na extremidade 5' uma sequência adicional (5'-TGTA AACGACGGCCAGT-3'). Esta sequência também foi sintetizada de forma independente com três fluoróforos (6-FAM, HEX e NED), a ser usado como um terceiro *primer*, de acordo com metodologia descrita por Schuelke (2000). Essa metodologia elimina a necessidade da marcação dos *primers forward* em todos os *loci*.

**Tabela 1** – Relação do número amostral de cada colônia de *M. cassununga* analisadas.

Indivíduos	Colônias				
	B4	B7	B10	B11	B13
Imaturos	2	5	1	7	22
Fêmeas adultas	3	8	6	2	9
<b>Total</b>	<b>5</b>	<b>13</b>	<b>7</b>	<b>9</b>	<b>31</b>

As reações de PCR foram realizadas de acordo com protocolo descrito por Francisco et al. (2011). As amplificações foram submetidas a 94°C por 4 minutos, seguida por 35 ciclos de: [94°C por 40 segundos, 60°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto] e uma extensão final de 72°C por 10 minutos. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese automática no sequenciador Applied Biosystems (3730 Genetic Analyzer) e o marcador GeneScan 500 ROX (Applied Biosystems) foi usado como padrão de peso molecular.

## 2.4 ANÁLISE DOS DADOS

Os dados de genotipagem gerados pelo sequenciador automático foram visualizados e analisados através do programa GENEMARKER v.1.85 (*demo version*) (SoftGenetics, State College, PA). Para o cálculo das taxas de heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) e observada ( $H_o$ ), frequência alélica, bem como a média dessas taxas e o número de alelos por *locus*, foi utilizado o GENALEX v.6.41 (Peakall e Smouse, 2006). Para as estimativas de  $F_{IS}$  (coeficiente de endogamia) foi utilizado o software  $F_{STAT}$  versão 2.9.3.2 (Goudet, 2002). Um teste de ocorrência de *Bottleneck* (efeito gargalo de garrafa / efeito fundador) foi realizado utilizando-se o programa computacional BOTTENECK (Cornuet e Luikart, 1996) considerando o cálculo de WILCOXON com 1000 interações, que apresenta um alto poder estatístico e pode ser utilizado com menos de 20 *loci*. Foi assumido o modelo mutacional bifásico (TPM), com a opção de 30% para o modelo IAM e 70% para o SMM. O software MICROCHECKER v.2.2.3. (van Oosterhout et al., 2004) também foi utilizado para detecção de possíveis alelos nulos, segundo a equação 1 de Brookfield (1996).

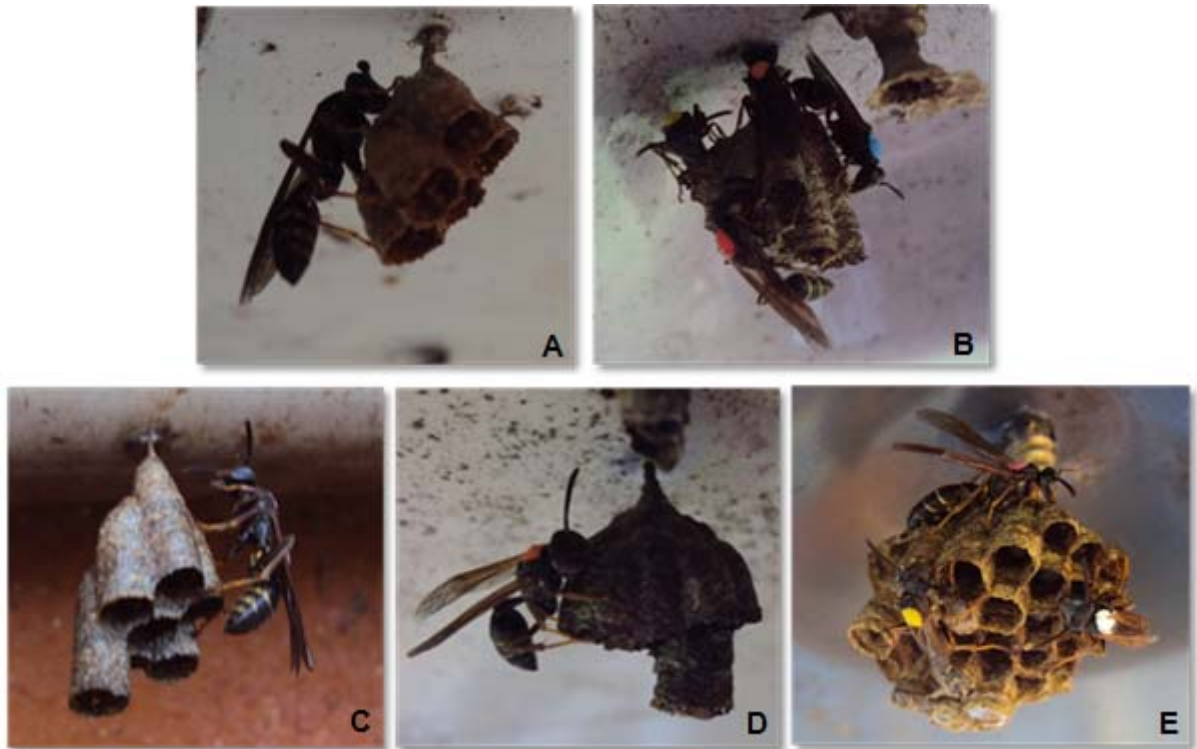
Cada ninho foi individualmente analisado pelo software COLONY 2.0 (Wang, 2008) e o método de análise adotado foi o de verossimilhança total (*full-likelihood*), uma vez que é considerado mais acurado (Wang, 2004; Wang e Santure, 2009). Os parâmetros adotados foram que o sistema de acasalamento é monogâmico, sem endocruzamento e os graus de parentesco não são previamente conhecidos. Tais pressupostos se baseiam em estudos que relatam para *Mischocyttarus mexicanus* e outros Polistinae que: a) as fêmeas acasalam com um único macho (Strassmann et al., 1995); b) machos de *Mischocyttarus* e outros Polistinae nunca foram vistos acasalar no próprio ninho (Gadakgar, 1991); c) ausência de endocruzamento detectada para alguns *Mischocittarini* (Queller et al., 1992). O software empregado assume três sub-amostras: a prole, os candidatos a pais e as candidatas a mães, sendo que os dois últimos podem ser determinados com valor "0", não sendo inferidos os genótipos do pai nem mãe. Ele faz uma estimativa completa podendo inferir o parentesco e as relações entre todos os indivíduos, atribuindo a maternidade/paternidade, presença de irmãos verdadeiros, meio-irmãos ou não irmãos e o número de fêmeas responsáveis pela cria (Jones e Wang, 2010).

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 OBSERVAÇÃO COMPORTAMENTAL *IN SITU*

Das cinco colônias analisadas, três apresentaram nidificações fundadas por haplometrose (B4, B10 e B11), uma por pleometrose (B7) e, em uma delas (B13) não foi possível determinar o tipo de fundação, pois a colônia já estava num estágio maior de desenvolvimento (Figura 3).

**Figura 3** – Colônias de *M. cassununga* fundadas por haplometrose (A, C e D), por pleometrose (B) e tipo de fundação não identificada (E). A = Colônia B4; B = Colônia B7; C = Colônia B10; D = Colônia B11; E = Colônia B13. Foto: A. N. Alves



Abaixo são descritos os principais resultados comportamentais obtidos nas observações de cada colônia de *M. cassununga* no *campus* da UEL e a representação esquemática de tais resultados também se encontram na figura 4.

### 3.1.2 Colônia B4

As observações iniciais realizadas na colônia B4 permitiram identificar que, esta colônia foi fundada por apenas uma fêmea (1) caracterizando, portanto, fundação por haplometrose. Neste caso, esta fêmea foi considerada como a fêmea dominante da colônia, já que durante vários dias de observação somente ela estava presente no ninho, desempenhando todas as funções intranidais (por exemplo, repouso em cima da colônia, cuidado com a cria, alimentação e forrageio.). Alguns dias após houve o nascimento de duas filhas (1 e 2), porém percebeu-se que a partir deste mesmo dia a fêmea dominante desapareceu do ninho, por motivo desconhecido. Foi observado, após este ocorrido, o aparecimento de uma fêmea adulta não identificada até então na colônia e que não poderia ser descendente, pois as células operculadas anteriormente continuavam fechadas; desta forma este indivíduo foi considerado como externo a colônia (usurpadora). Após o aparecimento desta, as fêmeas 1 e 2 desapareceram e mais duas filhas nasceram (3 e 4). As três fêmeas (usurpadora, 3 e 4) coexistiram na colônia até o final das observações. Durante este período, o comportamento de dominância prevalecia para a fêmea *br*, contudo, não foi observada postura por esta fêmea nas células da colônia. Havia ainda duas células com imaturos presentes (larvas), que não emergiram até o momento em que foi realizado o procedimento de coleta da colônia (Figura 4). As observações desta colônia foram feitas no período de 11 de novembro a 10 de dezembro de 2010, totalizando 32 horas.

### 3.1.3 Colônia B7

Nesta colônia, como foi constatada a presença de quatro fêmeas (1, 2, 3 e 4) na fase inicial de fundação (Figura 3.B), o tipo de fundação foi classificado como sendo por pleometrose, na qual as fêmeas fundadoras dividem as tarefas intranidais, prevalecendo comportamentos de dominância nas fêmeas de maior posição hierárquica (Jeanne 1972). Neste caso, desde o início do estudo, observou-se que *am* mantinha em maior frequência as tarefas realizadas pela fêmea dominante, como por exemplo, permanência praticamente constante e em posição de repouso no alto da colônia. As outras fêmeas (1, 2 e 3) realizavam em maior frequência também as demais tarefas, como forrageio, inspeção das células e

alimentação. Entretanto, houve alternância de tais comportamentos em alguns momentos entre as fêmeas, porém a predominância foi como descrito.

Ao longo do estudo foi presenciado um comportamento diferenciado na colônia, que até então não havia ocorrido: a fêmea 1 realizou larvifagia em uma célula e posteriormente postura nesta mesma célula. Durante este ocorrido a fêmea 4 (dominante) estava ausente da colônia, porém no momento em que ela retornou, a mesma se mostrou em estado de alerta, em posição de defesa, mas não foi visualizado comportamento agonístico entre elas. A partir desta ocorrência, as fêmeas 1 e 4 coexistiram na colônia por um curto período, porém com comportamentos alternados [1 (dominante) e 4 (subordinada)]; alguns dias após, a fêmea 4 não esteve mais presente no ninho e o comportamento de dominância manteve-se com a fêmea 1. Apesar de ter ocorrido postura por 1, não foi observado desenvolvimento do imaturo. Este comportamento aparentemente levou há uma alternância de dominância na colônia, onde mudanças nas tarefas intranidais foram visualizadas. Vale ressaltar que em observações anteriores a este fato, a fêmea 1 já apresentava alguns comportamentos de fêmea dominante e concomitante 4 (antiga fêmea dominante) não permanecendo o tempo todo como observado no início da fundação.

Durante o período de observação desta colônia (26 de outubro a 16 de dezembro de 2010, totalizando 60 horas) foi observado também: a) nascimento de oito indivíduos; b) presença de uma fêmea não identificada (usurpadora) alguns dias após iniciado o estudo, que passou a coexistir na colônia até o encerramento das observações; c) o desaparecimento por motivos desconhecidos de alguns indivíduos da colônia [2 e 3 (fêmeas fundadoras), 4 e 8 (prole da colônia)]. Havia ainda cinco células com imaturos presentes (quatro larvas e uma pupa), que não emergiram até o momento em que foi realizado o procedimento de coleta da colônia (Figura 4).

#### 3.1.4 Colônia B10

Esta colônia assim como B4, foi fundada por apenas uma fêmea (1), caracterizando, assim, fundação por haplometrose. Neste caso, esta fêmea foi considerada como a dominante da colônia, já que durante vários dias de observação somente ela estava presente na colônia, desempenhando todas as funções

intranidais (repouso em cima da colônia, cuidado com a cria, alimentação e forrageio). Alguns dias após, houve o aparecimento de uma nova fêmea não identificada (usurpadora) e depois desse ocorrido a fêmea fundadora desapareceu. No decorrer das observações nasceram cinco filhas da fêmea 1, que mantiveram sempre comportamentos de subordinadas. Foi observado que a fêmea usurpadora apresentou com maior frequência o comportamento de fêmea dominante, porém, houve momentos em que esta apresentou comportamentos similares ao das filhas da fêmea fundadora, como por exemplo, atividade forrageadora. Quando isto ocorria a filha 2 permanecia cuidando do ninho. Havia ainda um imaturo presente (larva), que não emergiu até o momento em que foi realizado o procedimento de coleta da colônia (Figura 4). As observações desta colônia foram feitas no período de 25 de outubro a 10 de dezembro de 2010, totalizando 53 horas.

#### 3.1.5 Colônia B11

Também fundada por uma única fêmea (1), ou seja, por haplometrose, a colônia B11 foi observada durante o período de 25 de outubro a 15 de dezembro de 2010, totalizando 60 horas. A fêmea fundadora comportou-se como dominante da colônia, mostrando-se presente na colônia durante todos os dias de observação e realizando todas as funções intranidais (repouso em cima da colônia, cuidado com a cria, alimentação e forrageio). Durante as observações ocorreu apenas a emergência de uma filha, que manteve sempre o comportamento de subordinada. Também durante todo o tempo de observação desta colônia somente mãe e filha coexistiram, prevalecendo comportamento de dominante e subordinada, respectivamente. Além disto, foi detectada a presença de sete células com imaturos (quatro larvas e três pupas) que não emergiram até o momento em que foi realizado o procedimento de coleta da colônia (Figura 4).

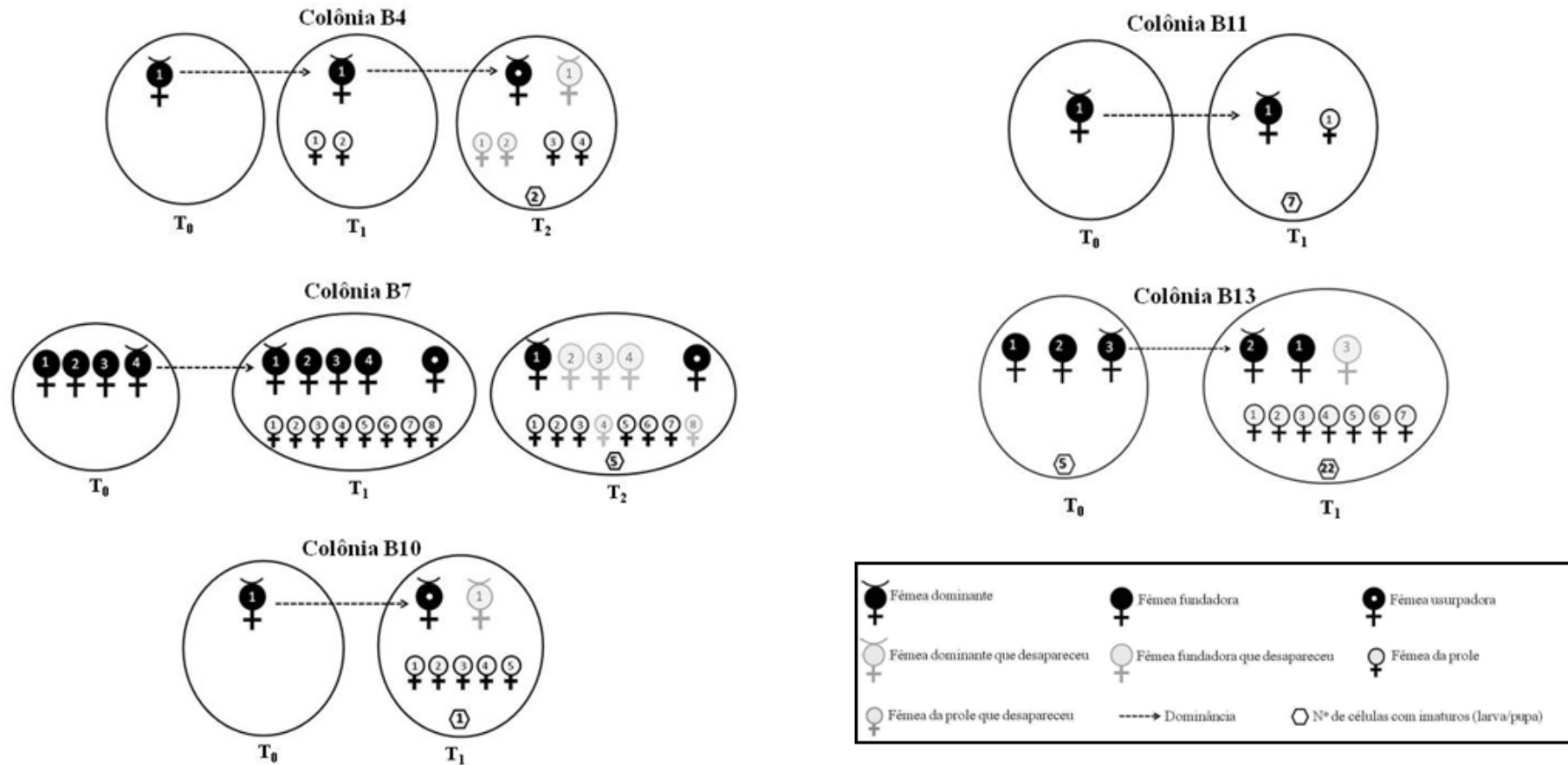
#### 3.1.6 Colônia B13

Ao contrário das outras colônias que foram observadas desde o início de sua fundação, na colônia B13 as observações foram bem menos frequentes e iniciadas quando está já se encontrava em um estágio maior de desenvolvimento, não sendo possível caracterizar o tipo de fundação. A inclusão

desta colônia nas análises teve como objetivo, fazer uma comparação com as demais colônias em estágio inicial de desenvolvimento, para tentar verificar se ao longo do desenvolvimento da colônia, uma possível alternância de dominância da mãe com suas filhas ou ainda, e a frequência deste evento. O período das observações foi de 15 de outubro a 10 de dezembro de 2011, porém a periodicidade das observações nesta colônia foi menor, totalizando cerca de 20 horas.

A colônia já possuía três fêmeas (1, 2 e 3), cerca de 30 células, das quais 5 estavam com larvas em desenvolvimento e poucas novas sem imaturos. Durante as observações foi possível visualizar comportamentos de dominância na fêmea 3, a qual inclusive realizou postura. Porém ao logo do desenvolvimento da colônia ela desapareceu e a fêmea 2 passou a apresentar comportamento de fêmea dominante. Foi observada a emergência de sete fêmeas descendentes que mantiveram o comportamento de subordinadas. Foi registrada também a presença de alguns imaturos, totalizando 12 larvas e 10 pupas, os quais não emergiram até o momento em que foi realizado o procedimento de coleta da colônia. (Figura 4).

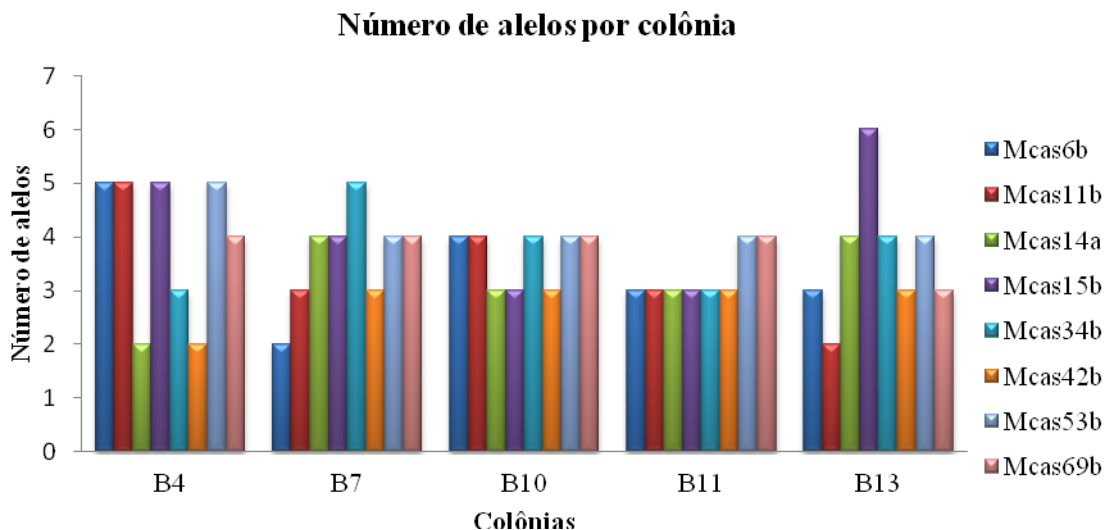
**Figura 4** – Representação esquemática das fases de desenvolvimento ( $T_0$ ,  $T_1$  e  $T_2$ ) das colônias estudadas com seus respectivos indivíduos, a relação de dominância observada entre eles e o número de imaturos presente na colônia até o momento da coleta



### 3. 2 PARENTESCO INTRANIDAL: MARCADORES MICROSSATÉLITES

Todos os oito *loci* (Mcas6b, Mcas11b, Mcas14a, Mcas15b, Mcas34b, Mcas42b, Mcas53b e Mcas69b) de microssatélites analisados para as cinco colônias se mostraram polimórficos, com uma variação de 5 a 13 alelos por *loci*, totalizando 70 alelos identificados. O número de alelos encontrado para cada *locus* por colônia foi menos expressivo (dois a seis) (Figura 5), com presença de alelos exclusivos como, por exemplo, o alelo 1 do *locus* Mcas6b (Anexo A). Tal ocorrência evidenciou variações nas frequências alélicas nas diferentes colônias (Anexo A).

**Figura 5** –Número de alelos obtidos para os oito *loci* de microssatélites analisados (Mcas6b, Mcas11b, Mcas14a, Mcas15b, Mcas34b, Mcas42b, Mcas53b e Mcas69b) em *M. cassununga* nas cinco colônias estudadas (B4, B7, B10, B11 e B13) localizadas no *campus* da Universidade Estadual de Londrina.



As taxas de heterozigose encontradas nas cinco colônias analisadas se encontram na Tabela 2. Pode-se observar uma grande variação nos valores, com predominância de valores mais altos de  $H_o$  em relação a  $H_e$  ( $H_{o\text{média}T} = 0,738$  e  $H_{e\text{média}T} = 0,574$ ) (Tabela 2). Ressaltando ainda que para a colônia B13 com 31 indivíduos analisados, mostrou um maior equilíbrio entre as frequências obtidas ( $H_{o\text{média}} = 0,484$  e  $H_{e\text{média}} = 0,543$ ).

**Tabela 2** – Taxa de heterozigose esperada (*He*) e observada (*Ho*) para os oito *loci* de microssatélites analisados para as cinco colônias de *M. cassununga*.

<i>Loci</i>		Colônias					<i>H</i> <sub>médiaT</sub>
		B4 n=5	B7 n=13	B10 n=7	B11 n=9	B13 n=31	
<b>Mcas6b</b>	<i>Ho</i>	1,000	0,462	1,000	1,000	0,310	0,754
	<i>He</i>	0,720	0,473	0,684	0,623	0,539	0,608
<b>Mcas11b</b>	<i>Ho</i>	1,000	0,846	0,571	0,889	0,581	0,777
	<i>He</i>	0,720	0,518	0,531	0,549	0,475	0,558
<b>Mcas14a</b>	<i>Ho</i>	0,600	0,923	0,857	0,889	0,226	0,699
	<i>He</i>	0,420	0,654	0,571	0,623	0,508	0,555
<b>Mcas15b</b>	<i>Ho</i>	1,000	0,923	0,571	1,000	0,710	0,841
	<i>He</i>	0,740	0,683	0,439	0,549	0,691	0,621
<b>Mcas34b</b>	<i>Ho</i>	0,400	0,923	1,000	1,000	0,452	0,755
	<i>He</i>	0,340	0,692	0,684	0,642	0,489	0,569
<b>Mcas42b</b>	<i>Ho</i>	0,200	0,615	0,143	0,444	0,400	0,361
	<i>He</i>	0,180	0,556	0,255	0,494	0,487	0,394
<b>Mcas53b</b>	<i>Ho</i>	1,000	0,833	1,000	0,889	0,806	0,906
	<i>He</i>	0,740	0,563	0,622	0,698	0,680	0,661
<b>Mcas69b</b>	<i>Ho</i>	1,000	0,923	0,857	0,889	0,387	0,811
	<i>He</i>	0,660	0,683	0,663	0,660	0,476	0,629
	<b><i>Ho</i><sub>média</sub></b>	0,775	0,806	0,750	0,875	0,484	0,738
	<b><i>He</i><sub>média</sub></b>	0,565	0,603	0,541	0,597	0,553	0,572

*H*<sub>médiaT</sub> = média da heterozigose total; n= número de amostras de *M. cassununga* analisadas

Para as cinco colônias estudadas foram encontrados valores negativos ou próximo de zero para estimativa de  $F_{IS}$  (coeficiente de endogamia na população), variando de -0,398 (colônia B11) a 0,125 (colônia B13) (Tabela 3), indicando ausência de endogamia. As análises obtidas pelo programa computacional BOTTLENECK, demonstraram valores significativos ( $P \leq 0,05$ ) para todos os *loci* das cinco colônias analisadas, nos três modelos mutacionais do teste de WILCOXON, evidenciando um excesso de heterozigotos que caracteriza eventos de gargalo de garrafa ou efeito fundador (Tabela 3). As análises no programa MICROCHECKER indicaram a presença de alelos nulos para os *loci* Mcas6b e Mcas42b, com valores significativos de frequência alélica (0,1571 e 0,1302 respectivamente) encontrada em ambos os *loci* (Tabela 4).

**Tabela 3** – Estimativa do coeficiente de endogamia ( $F_{is}$ ) e análise do BOTTENECK para os três modelos (IAM, TPM e SSM), assumindo o teste de WILCOXON para as cinco colônias estudadas.

Colônia	$k$	Bottleneck			$F_{is}$
		IAM <sup>a</sup> (P)	TPM <sup>b</sup> (P)	SSM <sup>c</sup> (P)	
B4	5	0,478*	0,438*	0,444*	-0,272
B7	13	0,220*	0,279*	0,328*	-0,301
B10	7	0,280*	0,289*	0,310*	-0,279
B11	9	0,198*	0,253*	0,313*	-0,398
B13	31	0,272*	0,303*	0,264*	0,125

$k$  = número de indivíduos; <sup>a</sup> *Modelo de Alelos Infinitos*; <sup>b</sup> *Modelo Mutacional Bifásico*; <sup>c</sup> *Modelo de Mutação Passo a passo*; \*Valores significativos ( $P \leq 0,05$ ) indicando excesso de heterozigotos.

**Tabela 4** – Estimativa da frequência alélica de alelos nulos, presença ou ausência, de todos os *loci* analisados para as cinco colônias de *M. cassununga* estudadas.

Locus	Presença de alelo nulo	Frequência
Mcas6b	sim	0,1571*
Mcas11b	não	0,0368
Mcas14a	não	0,0499
Mcas15b	não	0,0123
Mcas34b	não	0,0356
Mcas42b	sim	0,1302*
Mcas53b	não	-0,0698
Mcas69b	não	0,0479

\* Valores significativos EHW ( $P > 0,05$ ) indicando presença de alelos nulos.

A partir da matriz binária da distribuição e compartilhamento dos alelos de microssatélites, foi possível inferir as possíveis relações de parentesco entre os indivíduos (Tabela 5) das colônias, usando o software COLONY. Com base

nestes dados, o software inferiu os possíveis genitores e as relações de irmandade entre a prole de cada colônia (Tabela 5).

Quanto à colônia B4 os resultados confirmam as observações comportamentais, revelando que a colônia apresenta uma única mãe (#1) e um único pai (\*1), em que todos os quatro indivíduos da prole (01 a 04) são irmãos verdadeiros. Além disto, o indivíduo 05, considerado como externo a colônia nas análises de comportamento, realmente não mostrou relação de parentesco com os outros indivíduos, sendo considerado pelo software como não-irmão (amostra 5 - Anexo B), ou seja, filho de pai e mãe distintos (conforme Tabela 5).

Na colônia B7 somente 10 indivíduos (01, 03, 04, 05, 06, 08, 09, 10, 12 e 013) foram inferidos como irmãos de mesmos pais (#1/\*1), sendo também inferida para esta colônia a presença de mais dois genitores (Tabela 5). Neste caso, o terceiro casal de pais deduzido pelo software, são pais do indivíduo 11 (Anexo B), que foi considerado como fêmea externa (usurpadora) nas observações comportamentais. Este indivíduo realmente não mostrou nenhum parentesco com a colônia confirmando, portanto, a coexistência de indivíduos entre as colônias. Além disto, parece ter ocorrido a presença de mais de uma fêmea poedeira na colônia, pois dois indivíduos (02 e 07) da prole são irmãos de genitores diferentes do restante da colônia (Tabela 5). O indivíduo 02 analisado era um imaturo (larva), que apresentou 100% de homozigose para os oito *loci* analisados, permitindo afirmar que se trata de um imaturo macho (hemizigoto) (Anexo B).

Na colônia B10, a presença de apenas uma mãe (#1) na prole também foi inferida pelo software (Tabela 5), conforme visto também nas observações da colônia, em que uma única fêmea dominante inicialmente foi vista em atividade. De acordo com os dados gerados pelo COLONY pode-se confirmar também o não parentesco do indivíduo 02 (Tabela 5), o qual mostrou pais distintos dos demais; resultado este em conformidade com as observações comportamentais, que indicaram que este indivíduo era externo à colônia.

Como esperado para a colônia B11, a fêmea dominante realmente é a mãe da prole desta colônia, sendo, então, todos filhos de mesmo pai e mãe (#1/F2), com exceção apenas do indivíduo 02; para este indivíduo o software fez a inferência de que o mesmo seria filho de um segundo casal

(Tabela 5). Este fato pode ser explicado pela presença de alelos distintos neste indivíduo, em dois dos oito *loci* analisados (Anexo B).

As análises geradas pelo software para a colônia B13 inferiram a presença de oito casais de genitores, havendo presença de irmãos verdadeiros dentro de cada grupo de casal (Tabela 5), com exceção do indivíduo 014 que não mostrou nenhum parentesco com a colônia, provindo de pai e mãe distintos. Esta não relação de parentesco pode ser explicada pela presença de alguns alelos exclusivos neste indivíduo quando comparado aos demais (Anexo B). Nesta colônia assim como na colônia B7, foi amostrado um total de quatro imaturos com 100% de homozigose para os oito *loci* analisados, permitindo afirmar portanto, que se trata de imaturos machos (hemizigotos) (Anexo B).

Os possíveis genótipos inferidos pelo software para cada *locus* de cada genitor por colônia analisada se encontram relacionados no Anexo C.

**Tabela 5** – Relações de parentesco geradas pelo software COLONY para as cinco colônias de *M. cassununga*, contendo os pais (hipotéticos para B4, B7, B10 e B13) inferidos a partir da verossimilhança entre genótipos amostrados. A probabilidade obtida para esses resultados foi de 100%.

Colônia	$\Delta$	Pai	Mãe	Colônia	$\Delta$	Pai	Mãe
B4	01 ( I )	*1	#1	B13	01 ( I )	*1	#1
B4	02 ( I )	*1	#1	B13	02 ( I )	*1	#1
B4	03 ( F )	*1	#1	B13	03 ( I )	*1	#1
B4	04 ( F )	*1	#1	B13	11 ( I )	*1	#1
B4	05 ( F <sub>U</sub> )	*2	#2	B13	024 ( F )	*1	#1
B7	01 ( I )	*1	#1	B13	028 ( F )	*1	#1
B7	03 ( I )	*1	#1	B13	029 ( F )	*1	#1
B7	04 ( I )	*1	#1	B13	030 ( F )	*1	#1
B7	05 ( I )	*1	#1	B13	04 ( I )	*2	#2
B7	06 ( F )	*1	#1	B13	016 ( I )	*2	#2
B7	08 ( F )	*1	#1	B13	018 ( I )	*2	#2
B7	09 ( F )	*1	#1	B13	05 ( I )	*3	#3
B7	010 ( F )	*1	#1	B13	08 ( I )	*3	#3
B7	012 ( F )	*1	#1	B13	06 ( I )	*4	#4
B7	013 ( F )	*1	#1	B13	07 ( I )	*4	#4
B7	02 ( I )	*2	#2	B13	012 ( I )	*4	#4
B7	07 ( F )	*2	#2	B13	017 ( I )	*4	#4
B7	011 ( F <sub>U</sub> )	*3	#3	B13	021 ( I )	*4	#4
B10	01 ( I )	*1	#1	B13	022 ( F )	*4	#4
B10	03 ( F <sub>U</sub> )	*1	#1	B13	025 ( F )	*4	#4
B10	04 ( F )	*1	#1	B13	027 ( F )	*4	#4
B10	05 ( F )	*1	#1	B13	031 ( F )	*4	#4
B10	06 ( F )	*1	#1	B13	09 ( I )	*5	#5
B10	07 ( F )	*1	#1	B13	010 ( I )	*5	#5
B10	02 ( F )	*2	#2	B13	020 ( I )	*5	#5
B11	01 ( I )	*1	F2	B13	013 ( I )	*6	#6
B11	03 ( I )	*1	F2	B13	019 ( I )	*6	#6
B11	04 ( I )	*1	F2	B13	014 ( I )	*7	#7
B11	05 ( I )	*1	F2	B13	015 ( I )	*8	#8
B11	06 ( I )	*1	F2	B13	023 ( F )	*8	#8
B11	07 ( I )	*1	F2	B13	026 ( F )	*8	#8
B11	08 ( F )	*1	F2				
B11	02 ( I )	*2	#1				
B11	09 ( F <sub>M</sub> )	*3	#2				

$\Delta$  Indivíduos da colônia; I = Imaturo; F = Fêmea; F<sub>U</sub> = Usurpadora; F<sub>M</sub> = Mãe

## 5 DISCUSSÃO

Os marcadores microssatélites desenvolvidos para *M. cassununga* e aplicados neste estudo se mostraram muito eficientes e informativos, confirmando os dados obtidos nas observações intranidais, bem como, revelaram informações até então desconhecidas, como a determinação do sexo dos imaturos para esta espécie de vespa.

Os microssatélites são marcadores moleculares caracterizados por apresentarem elevado grau de polimorfismo (Awise, 2004). No caso de vespas do gênero *Polistes*, subfamília Polistinae, um estudo envolvendo seis *loci* de microssatélites e análise de 58 ninhos de *Polistes aurifer* revelou um expressivo polimorfismo alélico (7 a 26 alelos por *locus*), mesmo tendo os autores empregado *primers* heterólogos, desenvolvidos para outras espécies de *Polistes* (Liebert et al., 2005). No presente trabalho, um menor polimorfismo alélico foi observado (5 a 13) para os oito *loci* de microssatélites analisados, ressaltando que um baixo número de alelos por colônia (dois a seis) foi detectado. Esta variação se deve a presença de alelos exclusivos nas cinco colônias analisadas, que provavelmente são consequência do número amostral reduzido de indivíduos em algumas colônias analisadas. Tal suposição se apoia no fato de que um maior polimorfismo alélico foi obtido para todos estes *loci* no estudo relacionado ao isolamento e caracterização destes *loci* (dados ainda não publicados). Vale destacar ainda que das cinco colônias analisadas, três tiveram fundação por haplometrose, ou seja, uma única fêmea fundadora e, portanto, única fêmea fazendo postura de ovos na fase reconhecida como pré-emergência, relacionada ao início da colônia (West-Eberhard, 1969; Gadagkar, 1991). Nestes casos, espera-se, pelo menos para a primeira prole uma elevada semelhança genética dos indivíduos, uma vez que estes são filhos da mesma mãe e mesmo pai, pois acasalamentos com um único macho têm sido observado em vários Polistinae (Gadagkar, 1991). Ao se levar em consideração ainda a haplodiploidia destes insetos (Cook, 1993), o baixo número de alelos por *locus* seria mesmo o esperado.

Pôde-se constatar também ausência de endogamia nesta população estudada (cinco colônias analisadas), de acordo com as estimativas de  $F_{IS}$  (coeficiente de endogamia na população) encontradas para as cinco colônias analisadas, o qual mostrou valores negativos ou próximos de zero. Estudos relatam

que para *Mischocyttarus mexicanus* e outros Polistinae, as fêmeas acasalam com um único macho (Strassmann et al., 1995), os machos nunca foram vistos acasalando no próprio ninho (Gadakgar, 1991) e a ausência de endocruzamento já foi detectada para alguns Mischocittarini (Queller et al., 1992). Richard (1978) descreve que a espécie de estudo *M. cassununga* é caracterizada por apenas uma fêmea reprodutiva na colônia, no entanto já é sabido da ocorrência de mais de uma fêmea inseminada durante seus ciclos e que, provavelmente, a fêmea de maior posição hierárquica é a fêmea reprodutiva da colônia (Murakami et al., 2009). Este comportamento reprodutivo que ocorre na espécie pode explicar o excesso de heterozigotos e a ocorrência de alelos raros em baixa frequência, que caracteriza eventos de gargalo de garrafa ou efeito fundador (Hartl e Clark, 2010; Hundertmark e Daele, 2010). Ou seja, neste caso, a biologia da espécie apoia a hipótese de efeito fundador, com a presença de poucos alelos na fundação da colônia, já que esta é fundada por apenas uma ou poucas fêmeas.

Os resultados apresentados neste estudo revelam também dados interessantes entre as fêmeas das colônias de *M. cassununga*, que mesmo quando as colônias foram fundadas por apenas uma fêmea, como na colônia B4 e B10, assim como em fundação por associação (pleometrose – colônia B7), comprovou-se a presença de uma fêmea não aparentada na colônia. No caso de *Polistes dominulus*, outra espécie de Polistinae, um estudo mostrou que a maioria das colônias estudadas (80%) apresentava coexistência de fêmeas fundadoras não aparentadas na colônia (Zanette e Field, 2008). Dapporto et al. (2004), realizando um estudo também com *Polistes dominulus*, afirmam que indivíduos de uma mesma população possuem alguns componentes químicos particulares na composição cuticular, componentes estes que estão envolvidos no reconhecimento entre os indivíduos de uma mesma população. Tais autores sugerem ainda, que a origem geográfica das colônias deve ser sempre considerada quando se trata de análise comportamental. Isso pode explicar o fato das colônias deste estudo ter uma grande incidência de fêmeas não aparentadas coexistindo nas colônias, pois as cinco colônias estudadas são oriundas de uma mesma população e geograficamente próximas, distantes somente alguns metros umas das outras.

A elevada incidência de usurpadoras encontradas nestas colônias é considerada - do ponto de vista genético - de grande importância, pois fêmeas não aparentadas com a colônia contribuem com novos alelos, garantindo assim a

variabilidade genética e, por conseguinte a manutenção da colônia (Frankham et al., 2008). De acordo com esses mesmos autores populações parcialmente isoladas ou subpopulações, podem divergir ao longo do tempo como um resultado de deriva e seleção, no entanto migrações e intercruzamentos subsequentes restauram rapidamente a diversidade genética, pois os efeitos são diretamente sobre as frequências alélicas.

Guimarães (2008) estudando colônias de *M. cassununga* evidenciou que o número de fundações por pleometrose foi significativamente maior (67,57%) e 84% destas tiveram sucesso, sugerindo que a associação de fêmeas é a estratégia de nidificação predominante na espécie. No entanto, Murakami e Shima (2010) ressaltam que a fundação de colônias por haplometrose parece ser mais comum em *M. cassununga*. No presente trabalho, as observações comportamentais que revelaram a fundação por haplometrose para três colônias foi corroborada pelas análises de microssatélites, que mostraram uma única mãe para a prole nas colônias de fundação por haplometrose, com exceção apenas das fêmeas usurpadoras que coexistiram nas colônias, originadas de mães distintas e desconhecidas. Segundo alguns estudos, as usurpações intraespecíficas são comuns em Polistinae (Makino e Sayama, 1991; Gamboa et al., 1992; Queller et al., 2000; Clouse, 1995, 2001; Zanette e Field, 2008), havendo inclusive relato na literatura da coexistência interespecífica de duas espécies de *Mischocyttarus* em uma mesma colônia (Pinto et al., 2004); neste estudo, os autores argumentam que fêmeas de *Mischocyttarus* com fundação solitária são mais suscetíveis à usurpação do que em grupo.

Ainda em relação às observações comportamentais, no caso da colônia B7 - na qual foi constatada a presença de quatro fêmeas na fase inicial de fundação - revelou uma aparente alternância no comportamento de dominância entre duas fêmeas fundadoras (1 e 4), em estudos comportamentais com outras espécies de vespas também revelam que fêmeas dominantes podem ser substituídas por fêmeas co-fundadoras da colônia. Por exemplo, em *M. mexicanus* (Litte, 1977 *apud* Giannotti e Machado, 1997) a fêmea substituta da rainha (co-fundadora ou irmãs) começa a por ovos uma semana antes do desaparecimento da rainha, assemelhando-se muito ao comportamento apresentado a fêmea 1 da colônia B7 deste estudo. Também em *Polistes versicolor* foi observado que a fêmea mais velha da colônia foi a fêmea que provavelmente substituiu a 'rainha' ou fêmea

dominante, embora co-fundadoras ou usurpadoras já tenham sido observadas se tornarem fêmeas dominantes poedeiras da colônia (Giannotti e Machado, 1997).

Uma forte tendência à alternância de dominância também pode ter ocorrido na colônia B13 de *M. cassununga* estudada. Sabe-se que embora seja mais comum que a hierarquia se mantenha estável, uma vez que é estabelecida na fase inicial de fundação da colônia é possível que ocorra certa flexibilidade na dominância entre as fêmeas hierarquicamente superiores da colônia, aquelas que ocupam posições logo abaixo da fêmea funcional (Murakami, 2007). Esse tipo de comportamento pode ser explicado pela competição social e reprodutiva que aumenta com a idade das fêmeas adultas, podendo levar a uma possível substituição da fêmea dominante (Giannotti, 1997), alternando a hierarquia social da colônia.

Embora não tenha sido possível descrever o número de fundadoras presentes na fase inicial da colônia B13 (fase pré-emergente), as análises dos marcadores microssatélites revelaram a presença que alguns indivíduos da prole eram filhos de mães diferentes. Já é sabido que esta espécie pode apresentar mais de uma fêmea inseminada na colônia com ovário bem desenvolvido e capaz de realizar a postura de ovos viáveis (Murakami et al., 2009). Deste modo, pode-se afirmar, que os marcadores microssatélites confirmaram que a oligoginia (poucas fêmeas poedeiras na colônia) realmente ocorre para algumas colônias de *M. cassununga*. Murakami et al. (2009) argumentam que a razão principal de existir mais de uma fêmea poedeira em *Mischocyttarus cassununga* está relacionada ao risco de fracasso da colônia durante o ciclo biológico, funcionando como uma estratégia para aumentar o sucesso na natureza.

A ocorrência de oligoginia presente nestas colônias parece estar relacionada ao modelo de desvio reprodutivo “cabo de guerra”, no qual a reprodução pode ser compartilhada entre membros de um mesmo grupo (Reeve e Keller, 2001; Liebert e Starks, 2006), como neste estudo entre as fêmeas de uma mesma colônia. O desvio reprodutivo pode ser resultado de limitações ecológicas, aumentando a probabilidade de uma fêmea subordinada realizar a postura de ovos e eventualmente herdar a dominância (Summer et al, 2002), o que contribui com o sucesso da colônia.

De um modo geral, os dados obtidos no presente trabalho permitem inferir, a partir das análises genéticas da prole das colônias estudadas, a

confirmação de monogamia em *M. cassununga*, em que a fêmea acasala somente com um macho; a oligoginia para algumas colônias (B7 e B13); em colônias maiores, presença de irmãos e não-irmãos na mesma colônia. De acordo com Gaspar et al. (2007) as relações de parentesco entre os indivíduos da colônia estão associados com os níveis de poligenia. Ainda de acordo com estes autores, estes três aspectos ressaltam a importância do conhecimento da estrutura sociogenética de colônias primitivamente eussociais para se entender a evolução do comportamento social.

É importante ressaltar que este foi o primeiro estudo sociogenético realizado com *M. cassununga*, na tentativa de se obter algumas informações sobre as relações que se estabelecem entre indivíduos de uma colônia. Os resultados aqui obtidos abrem novas perspectivas de estudos envolvendo *M. cassununga*, especialmente no que se refere a abordagens voltadas ao um maior entendimento da evolução do comportamento social entre os Polistinae e também para o maior conhecimento da estrutura sociogenética presente em colônias destas vespas primitivamente eussociais. A identificação do número de fêmeas poedeiras ou reprodutoras, grau de parentesco entre fêmeas que realizam fundação por pleometrose, ou mesmo nos casos em que a usurpação do ninho ocorre por fêmeas alheias a este, são apenas alguns dos muitos aspectos a serem mais bem compreendidos no estudo de *M. cassununga*, aspectos estes que certamente irão contribuir na elucidação de perguntas ainda sem respostas.

## **Agradecimentos**

Este trabalho foi financiado pela Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por meio Programa Nacional de Cooperação Acadêmica (PROCAD 158/2007) e Universidade Estadual de Londrina, por meio do Fundo de Apoio ao Ensino, à Pesquisa e à Extensão (FAEPE). Os autores agradecem ao IBAMA/SISBIO e ao IAP pela autorização das coletas e aos pesquisadores Dr. Sidnei Mateus e Dr. Orlando Tobias Silveira pela identificação das espécies estudadas. Alessandra Novaga Alves recebeu bolsa de estudo do CNPq.

## REFERÊNCIAS

- Augusto SC, Garófalo CA (2009) Bionomics and sociological aspects of *Euglossa fimbriata* (Apidae, Euglossini). *Genet Mol Res* 2: 525-538
- Avise JC (2004) *Molecular markers, natural history and evolution* (2<sup>nd</sup>ed) Sunderland, MA, Sinauer Associates, Inc. 684p.
- Brito RM, Arias MC (2010) Genetic structure of *Partamona helleri* (Apidae, Meliponini) from Neotropical Atlantic rainforest. *Insect Soc* 57: 413–419
- Carpenter JM (1991) Phylogenetic relationships and the origin of social behavior in the Vespidae. In: Ross KG, Matthews RW (eds). *The Social biology of wasps*. Ithaca, Cornell University, pp 7-32
- Carpenter JM, Marques OM (2001) Contribuição ao estudo dos vespídeos do Brasil. *Série Publicações Digitais, Universidade Federal da Bahia*, 2: 147p
- Clouse RM (1995) Nest usurpation and intercolonial cannibalism in *Mischocyttarus mexicanus* (Hymenoptera: Vespidae). *J Kansas Entomol Soc* 68: 67-73
- Clouse R (2001) Some effects of group size on the output of beginning nests of *Mischocyttarus mexicanus* (Hymenoptera: Vespidae). *Fla Entomol* 3: 418-420
- Cook J.M. (1993) Sex determination in the Hymenoptera: a review of models and evidence. *Heredity*, 71: 421-435
- Cornuet JM, Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144: 2001-201.
- Dapporto L, Theodora P, Spacchini C, Pieraccini G, Turillazzi S (2004) Rank and epicuticular hydrocarbons in different populations of the paper wasp *Polistes dominulus* (Christ) (Hymenoptera Vespidae). *Insec Soc* 52: 279–286
- Foster KR, Seppä P, Ratnieks FLW, Thorén PA (1999) Low paternity in the hornet *Vespa crabro* indicates that multiple mating by queens is derived in vespine wasps. *Behav Ecol Sociobiol* 46: 252–257
- Foster KR, Ratnieks FLW (2000) Paternity, reproduction and conflict in vespine wasps: a model system for testing kin selection predictions. *Behav Ecol Sociobiol* 50: 1–8
- Francisco FO, Brito RM, Santiago LR, Gonçalves PHP, Pioker FC, Domingues-Yamada A MT, Arias MC (2011) Isolation and characterization of 15 microsatellite loci in the stingless bee *Plebeia remota* (Apidae: Meliponini). *Conserv Genet Resour* 3:417–419
- Frankham R, Ballau, JD, Briscoe DA (2008) *Fundamentos de Genética da Conservação* (1.ed). Ribeirão Preto, São Paulo. 280p

- Freiria GA, Ruim JB, Souza RF, Sofia SH (2012) Population structure and genetic diversity of the orchid bee *Eufriesea violacea* (Hymenoptera, Apidae, Euglossini) from Atlantic Forest remnants in southern and southeastern Brazil. *Apidologie* doi: 10.1007/s13592-011-0104-y
- Gadagkar R (1991) *Belonogaster*, *Mischocyttarus*, *Parapolybia* and independent-founding *Ropalidia*. In: Ross KG, Matthews RW (ed) *The social biology of wasps*, Ithaca, New York, pp. 149-190
- Gamboa GJ, Wacker TL, Duffy KG, Dobson, SW, Fishwind TG (1992) Defense against intraspecific usurpation by paper wasp cofoundresses (*Polistes fuscatus*, Hymenoptera: Vespidae). *Can J Zool* 70: 2369-2372
- Giannotti E, Machado VLL (1997) Queen replacement in post-emergent colonies of the social wasp, *Polistes lanio* (Hymenoptera, Vespidae). *Rev Bras Entomol* 41: 9-11
- Gianotti E (1999) Arquitetura de ninhos de *Mischocyttarus cerberus styx* Richards, 1940 (Hymenoptera, Vespidae). *Rev Bras Zool* 1: 7–18
- GOUDET J (2002) FSTAT: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2). Lausanne: University of Lausanne, Department of Ecology & Evolution
- Guimarães DL (2008) *Biologia e ecologia comportamental da vespa social Mischocyttarus cassununga* (von Ihering, 1903) (Hymenoptera, Apidae) em ambiente antrópico. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista.
- Hartl DL, Clark AG (2010) *Princípios de genética de populações*. Artmed, Porto Alegre
- Hastings MD, Queller DC, Eischen F, Strassmann JE (1997) Kin selection, relatedness, and worker control of reproduction in a large-colony epiponine wasp, *Brachygastra mellifica*. *Behav Ecol* 9: 573-581
- Hundertmark KJ, Van Daele I (2010) Founder effect and bottleneck signatures in an introduced, insular population of elk. *Conserv Genetics*, 11: 139-148
- Jeanne RL (1972) Social biology of the Neotropical wasp *Mischocyttarus drewseni*. *Bull Mus Comp Zool*, 144: 63-150
- Jones O, Wang J (2009) COLONY: a program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. *Mol Ecol Res* 10: 551–555
- Katada S, Suzuki T, Tsuchida K (2007) Application of microsatellite primers for the social wasp *Polistes* to another social wasp genus, *Parapolybia*, to estimate genetic relationships among nestmates. *Entomol Sci* 10: 10-15
- Liebert AE, Nonacs P, Wayne RK (2005) Solitary nesting and reproductive success in the paper wasp *Polistes aurifer*. *Behav Ecol Sociobiol*, 57: 445–456.

- Liebert AE, Gamboa GL, Stamp NE, Curtis TR, Monnet KM, Turillazzi S, Starks PT (2006) Genetics, behavior and ecology of a paper wasp invasion: *Polistes dominulus* in North America. *Ann Zool Fenn* 43: 595-624
- Lima MAP, Lima, JR, Prezoto, F (2000) Levantamento dos gêneros, flutuação das colônias e hábitos de nidificação de vespas sociais (Hymenoptera, Vespidae) no Campus da UFJF, Juiz de Fora, MG. *Rev Bras Zooc* 2: 69-80
- Litte M (1981) Social biology of the Polistine wasp *Mischocyttarus labiatus*: survival in a Colombian rain forest. *Smithson Contrib Zool* 327: 1-27
- Makino S, Sayama K (1991) Comparison of intraspecific usurpation between two haplometrotic paper wasp species (Hymenoptera: Vespidae: Polistes). *J Ethol* 9: 121-128
- Murakami ASN (2007) Diferenciação etológica e morfofisiológica das castas de *Mischocyttarus (Monocyttarus) cassununga* von Ihering, 1903 (Hymenoptera, Vespidae, Mischocyttarini), com especial referência as fêmeas hierarquicamente superiores. Dissertação, Universidade Estadual Paulista
- Murakami ASN, Shima SN, Desuó IC (2009) More than one inseminated female in colonies of the independent-founding wasp *Mischocyttarus cassununga* von Ihering (Hymenoptera, Vespidae). *Rev Bras Entomol* 53: 653-662
- Murakami ASN, Shima SN (2010) Regulation of social hierarchy over time in colonies of the primitive eusocial Wasp *Mischocyttarus (Monocyttarus) cassununga* von Ihering, 1903 (Hymenoptera, Vespidae). *J Kans Entomol Soc* 83: 163-171
- Oi CA (2010) Estrutura sociogenética de ninhos de Euglossini (Hymenoptera: Apidae) e estrutura genética das populações urbanas de *Euglossa cordata* do estado de São Paulo. Dissertação, Universidade Federal de São Carlos
- Peakall R, Smouse PE (2006) GENEALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Notes* 6: 288-295
- Penna MAH, Gobbi N, Giacomini HC, Prezoto F, Gonçalves FMF (2007) Comparative productivity of *Mischocyttarus cerberus* styx (Richards, 1940) and *Mischocyttarus cassununga* Saussure (Von Ihering, 1903) in an anthropic environment as evaluation for differences in ecological strategies. *Rev Bras Zooc* 9: 205-212
- Pinto NPO, Gobbi N, Noll FB, Penna MAH, Nazareth SL (2004) Coexistência interespecífica em *Mischocyttarus* Saussure (Hymenoptera: Vespidae, Mischocyttarini) durante a fase inicial de desenvolvimento de um ninho. *Rev Etol* 6: 95-100
- Prezoto F, Vilela APP, Lima MAP, D'Avila S, M. Sinzato S, Andrade FR, Santos-Prezoto HH, Giannotti E (2004) Dominance hierarchy in different stages of development in colonies of the primitively eusocial wasp *Mischocyttarus cassununga* (Hymenoptera, Vespidae). *Sociobiology* 44: 379-390

- Queller DC, Strassmann JE, Hughes CR (1992) Genetic relatedness and population structure and primitively eusocial wasps in the genus *Mischocyttarus* (Hymenoptera: Vespidae). *J Hym Res* 1: 81-89
- Queller DC, Zacchi F, Cervo R, Turillazzi S, Henshaw MT, Santorelli LA, Strassmann JE (2000) Unrelated helpers in a social insect. *Nature* 405: 784-787
- Reeve HK *Polistes* (1991) In: Ross KG, Matthews RW (eds). *The Social biology of wasps*. Ithaca, Cornell University, pp 99-148
- Reeve HK, Keller I (2001) Tests of reproductive - Skew models in social insects. *Annu Rev Entomol*, 46:347–85
- Richards OW (1978) *The social wasps of America excluding the Vespinae*. British Museum (Natural History), London
- Schuelke M (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nat Biotechnol* 18: 233-234
- Seppä P, Fernandez-Escudero I, Gyllenstrand N, Pamilo P (2008) Colony fission affects kinship in a social insect. *Behav Ecol Sociobiol* 62: 589–597
- Silveira OT (2008) Phylogeny of wasps of the genus *Mischocyttarus* de Saussure (Hymenoptera, Vespidae, Polistinae). *Rev Bras Entomol* 52: 510-549
- Strassmann JE, Queller DC, Solís CR (1995) Genetic relatedness and population structure in the social wasp, *Mischocyttarus mexicanus* (Hymenoptera: Vespidae). *Ins. Soc* 42: 379-383
- Sumner S, Casiraghi S, Foster W, Field J (2002) High reproductive skew in tropical hover wasps. *Proc R Soc Lond B* 269: 179–186
- van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley PF (2004) Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes* 4: 535–538
- Walsh PS, Metzger, DA, Higuchi R (1991) Chelex® 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques* 10: 506-513
- Wang J (2004) Sibship reconstruction from genetic data with typing errors. *Genetics* 166: 1963-1979
- Wang J, Santure AW (2009) Parentage and sibship inference from multi-locus genotype data under polygamy. *Genetics* 181: 1579-1594
- West-Eberhard MJ (1969) *The social biology of polistine wasps*. *Misc Publ Univ Mich Mus Zool* 140: 1-101
- Zanette LRS, Field J (2008) Genetic relatedness in early associations of *Polistes dominulus*: from related to unrelated helpers. *Mol Ecol* 17: 2590–2597

## **ANEXOS**

ANEXO A – Alelos e suas frequências obtidos para as cinco colônias de *M. cassununga* estudadas (B4, B7, B10, B11 e B13) para os oito *loci* analisados. pb = tamanho estimado dos alelos em pares de bases

<i>Loci</i>	Alelo	pb	Colônias				
			B4	B7	B10	B11	B13
Mcas6b	1	197	0,000	0,000	0,000	0,000	0,603
Mcas6b	2	199	0,100	0,615	0,214	0,444	0,000
Mcas6b	3	201	0,000	0,000	0,000	0,000	0,293
Mcas6b	4	203	0,100	0,385	0,000	0,000	0,000
Mcas6b	5	205	0,000	0,000	0,000	0,000	0,103
Mcas6b	6	207	0,400	0,000	0,286	0,167	0,000
Mcas6b	7	209	0,300	0,000	0,000	0,389	0,000
Mcas6b	8	211	0,100	0,000	0,000	0,000	0,000
Mcas6b	9	213	0,000	0,000	0,429	0,000	0,000
Mcas6b	10	215	0,000	0,000	0,071	0,000	0,000
Mcas11b	1	157	0,400	0,577	0,071	0,056	0,000
Mcas11b	2	163	0,100	0,000	0,000	0,500	0,387
Mcas11b	3	167	0,300	0,000	0,214	0,444	0,000
Mcas11b	4	171	0,000	0,038	0,071	0,000	0,000
Mcas11b	5	173	0,100	0,000	0,643	0,000	0,613
Mcas11b	6	177	0,000	0,385	0,000	0,000	0,000
Mcas11b	7	193	0,100	0,000	0,000	0,000	0,000
Mcas14a	1	158	0,000	0,038	0,000	0,000	0,000
Mcas14a	2	166	0,000	0,308	0,000	0,000	0,000
Mcas14a	3	168	0,300	0,000	0,143	0,000	0,032
Mcas14a	4	170	0,700	0,462	0,571	0,222	0,629
Mcas14a	5	172	0,000	0,192	0,000	0,500	0,306
Mcas14a	6	174	0,000	0,000	0,000	0,278	0,000
Mcas14a	7	176	0,000	0,000	0,286	0,000	0,032
Mcas15b	1	192	0,000	0,038	0,000	0,500	0,000
Mcas15b	2	200	0,200	0,000	0,000	0,444	0,016
Mcas15b	3	202	0,400	0,000	0,000	0,000	0,258
Mcas15b	4	204	0,000	0,385	0,714	0,000	0,371
Mcas15b	5	206	0,100	0,000	0,000	0,056	0,000
Mcas15b	6	208	0,200	0,269	0,071	0,000	0,016
Mcas15b	7	210	0,000	0,000	0,000	0,000	0,323
Mcas15b	8	212	0,100	0,308	0,214	0,000	0,016
Mcas34b	1	179	0,000	0,000	0,000	0,000	0,032
Mcas34b	2	181	0,800	0,038	0,429	0,333	0,645
Mcas34b	3	183	0,100	0,192	0,286	0,000	0,000
Mcas34b	4	185	0,000	0,000	0,214	0,000	0,000

<i>Loci</i>	Alelo	pb	Colônias				
			B4	B7	B10	B11	B13
Mcas34b	5	187	0,000	0,000	0,000	0,222	0,306
Mcas34b	6	191	0,000	0,385	0,071	0,000	0,000
Mcas34b	7	195	0,000	0,000	0,000	0,000	0,016
Mcas34b	8	197	0,100	0,038	0,000	0,444	0,000
Mcas34b	9	209	0,000	0,346	0,000	0,000	0,000
Mcas42b	1	224	0,000	0,538	0,071	0,000	0,000
Mcas42b	2	226	0,000	0,000	0,000	0,000	0,033
Mcas42b	3	228	0,900	0,385	0,857	0,222	0,633
Mcas42b	4	232	0,100	0,077	0,071	0,667	0,333
Mcas42b	5	234	0,000	0,000	0,000	0,111	0,000
Mcas53b	1	237	0,100	0,000	0,000	0,000	0,000
Mcas53b	2	241	0,200	0,000	0,000	0,333	0,032
Mcas53b	3	243	0,000	0,000	0,071	0,000	0,000
Mcas53b	4	253	0,400	0,042	0,000	0,000	0,000
Mcas53b	5	255	0,000	0,000	0,071	0,000	0,000
Mcas53b	6	257	0,200	0,000	0,000	0,000	0,000
Mcas53b	7	261	0,000	0,542	0,429	0,389	0,339
Mcas53b	8	263	0,000	0,000	0,000	0,000	0,258
Mcas53b	9	265	0,100	0,000	0,000	0,111	0,000
Mcas53b	10	273	0,000	0,000	0,000	0,167	0,000
Mcas53b	11	275	0,000	0,000	0,429	0,000	0,000
Mcas53b	12	277	0,000	0,375	0,000	0,000	0,371
Mcas53b	13	281	0,000	0,042	0,000	0,000	0,000
Mcas69b	1	151	0,400	0,038	0,000	0,000	0,000
Mcas69b	2	157	0,100	0,000	0,000	0,000	0,000
Mcas69b	3	166	0,000	0,000	0,000	0,056	0,048
Mcas69b	4	169	0,400	0,385	0,071	0,333	0,661
Mcas69b	5	172	0,000	0,000	0,357	0,000	0,000
Mcas69b	6	175	0,000	0,000	0,143	0,000	0,000
Mcas69b	7	178	0,000	0,308	0,000	0,444	0,000
Mcas69b	8	181	0,100	0,000	0,000	0,000	0,290
Mcas69b	9	184	0,000	0,269	0,000	0,000	0,000
Mcas69b	10	187	0,000	0,000	0,429	0,000	0,000
Mcas69b	11	196	0,000	0,000	0,000	0,167	0,000

ANEXO B – Alelos encontrados na amostragem das cinco colônias de *Mischocyttarus cassununga* (B4, B7, B10, B11 e B13) para os oito *loci* de microssatélites analisado. Os valores dos alelos estão representados em pares de bases (pb) e as amostras em negrito correspondem aos machos (100% de homozigose). I = Imaturo; F = Fêmea; F<sub>u</sub> = Usurpadora; F<sub>M</sub> = Mãe

Colônia / Indivíduo	Loci							
	Mcas6b	Mcas11b	Mcas14a	Mcas15b	Mcas34b	Mcas42b	Mcas53b	Mcas69b
B4 1 ( I )	6 7	1 2	4 4	3 6	2 2	3 3	2 4	1 4
B4 2 ( I )	4 6	1 3	4 4	3 6	2 2	3 3	4 6	1 8
B4 3 ( F )	2 7	1 3	3 4	2 3	2 2	3 3	4 6	1 4
B4 4 ( F )	6 7	1 3	3 4	2 3	2 3	3 3	2 4	1 4
B4 5 ( F <sub>u</sub> )	6 8	5 7	3 4	5 8	2 8	3 4	1 9	2 4
B7 1 ( I )	2 4	1 6	2 4	4 6	3 6	1 1	7 12	4 7
B7 2 ( I )	4 4	<b>1 1</b>	<b>2 2</b>	<b>8 8</b>	<b>9 9</b>	<b>3 3</b>	<b>7 7</b>	4 4
B7 3 ( I )	2 4	1 6	2 4	4 6	6 9	1 3	7 12	7 9
B7 4 ( I )	2 2	1 6	2 4	4 8	3 6	1 3	0 0	4 9
B7 5 ( I )	2 4	1 6	4 5	4 8	3 6	1 1	7 12	7 9
B7 6 ( F )	2 4	1 6	4 5	4 6	6 9	1 3	7 7	4 9
B7 7 ( F )	4 4	1 1	4 5	6 8	3 9	1 3	7 12	4 7
B7 8 ( F )	2 4	1 6	2 4	4 6	6 9	1 3	7 12	7 9
B7 9 ( F )	2 2	1 6	2 4	4 8	6 9	1 3	7 12	7 9
B7 10 ( F )	2 2	1 6	4 5	4 8	6 9	1 3	7 12	4 9
B7 11 ( F )	2 2	1 4	1 4	1 6	2 8	4 4	4 13	1 4
B7 12 ( F )	2 4	1 6	2 4	4 6	6 9	1 3	7 12	4 7
B7 13 ( F <sub>u</sub> )	2 2	1 6	4 5	4 8	3 6	1 1	7 12	4 7
B10 1 ( I )	2 9	5 5	3 4	4 4	2 3	3 3	7 11	5 10
B10 2 ( F )	6 10	1 4	4 4	4 6	4 6	1 4	3 5	6 6
B10 3 ( F <sub>u</sub> )	6 9	3 5	4 7	4 4	2 4	3 3	7 11	5 10
B10 4 ( F )	6 9	3 5	4 7	4 8	2 3	3 3	7 11	4 10
B10 5 ( F )	2 9	5 5	4 7	4 8	2 4	3 3	7 11	5 10
B10 6 ( F )	6 9	5 5	3 4	4 8	2 3	3 3	7 11	5 10
B10 7 ( F )	2 9	3 5	4 7	4 4	2 3	3 3	7 11	5 10
B11 1 ( I )	2 6	2 3	5 6	1 2	2 8	4 4	2 7	4 7
B11 2 ( I )	2 7	2 3	5 6	1 2	2 8	5 5	9 9	7 11
B11 3 ( I )	2 7	2 3	5 6	1 2	2 8	4 4	2 7	3 7
B11 4 ( I )	2 7	2 3	5 6	1 2	2 8	4 4	7 10	4 7
B11 5 ( I )	2 6	2 3	4 5	1 2	5 8	3 4	7 10	7 11
B11 6 ( I )	2 7	2 3	4 5	1 2	5 8	3 4	2 7	4 7
B11 7 ( I )	2 7	1 3	5 5	1 2	5 8	3 4	2 7	4 7

Colônia / Indivíduo	Loci							
	Mcas6b	Mcas11b	Mcas14a	Mcas15b	Mcas34b	Mcas42b	Mcas53b	Mcas69b
B11 8 ( F )	2 7	2 3	4 5	1 2	2 8	4 4	2 7	7 11
B11 9 ( F <sub>M</sub> )	6 7	2 2	4 6	1 5	2 5	3 4	2 10	4 4
B13 1 ( I )	1 1	2 5	4 5	3 7	2 2	3 3	7 12	4 4
B13 2 ( I )	1 1	2 5	4 4	3 7	2 2	3 3	7 12	4 4
B13 3 ( I )	1 1	2 5	4 4	4 7	2 2	3 3	7 12	4 4
B13 4 ( I )	3 3	2 5	5 5	4 4	2 2	3 3	7 7	4 8
B13 5 ( I )	3 3	2 2	4 4	4 4	2 2	3 3	8 8	8 8
B13 6 ( I )	1 1	2 5	4 5	3 7	2 5	3 4	8 12	4 8
B13 7 ( I )	1 3	2 5	4 5	4 7	2 5	3 4	7 12	4 4
B13 8 ( I )	3 3	2 2	4 4	4 4	2 2	3 3	8 8	4 4
B13 9 ( I )	5 5	5 5	5 5	4 4	5 5	4 4	8 8	8 8
B13 10 ( I )	5 5	2 2	5 5	3 3	5 5	4 4	2 8	8 8
B13 11 ( I )	1 3	5 5	4 4	3 7	2 2	3 3	7 12	4 4
B13 12 ( I )	1 1	5 5	4 5	4 7	2 5	3 4	7 12	4 4
B13 13 ( I )	1 3	2 5	4 4	4 7	2 5	3 4	8 12	3 8
B13 14 ( I )	0 0	2 5	7 7	2 6	1 1	2 2	2 7	4 8
B13 15 ( I )	1 1	5 5	4 4	3 7	2 2	3 3	8 12	4 8
B13 16 ( I )	3 3	5 5	5 5	3 3	2 2	3 3	7 7	4 4
B13 17 ( I )	1 1	5 5	4 4	3 7	2 5	3 4	7 12	4 4
B13 18 ( I )	0 0	2 5	5 5	3 3	2 7	0 0	8 12	4 4
B13 19 ( I )	1 1	2 5	4 5	4 4	2 5	4 4	7 12	3 3
B13 20 ( I )	5 5	5 5	5 5	4 4	5 5	4 4	7 7	4 4
B13 21 ( I )	1 3	2 5	4 4	3 7	2 5	3 4	7 12	4 4
B13 22 ( I )	1 3	2 5	4 4	4 7	2 5	3 4	8 12	4 8
B13 23 ( F )	1 1	2 5	3 3	3 7	2 5	3 4	8 12	4 8
B13 24 ( F )	1 3	5 5	4 4	4 7	2 2	3 3	7 12	4 4
B13 25 ( F )	1 1	5 5	4 5	3 7	2 5	3 4	8 12	4 8
B13 26 ( F )	1 1	2 5	4 4	4 8	2 5	3 4	8 12	4 8
B13 27 ( F )	1 3	2 5	4 4	4 7	2 5	3 4	7 12	4 8
B13 28 ( F )	1 1	2 5	4 4	4 7	2 2	3 3	7 12	4 8
B13 29 ( F )	1 3	2 5	4 4	4 7	2 2	3 3	7 12	4 4
B13 30 ( F )	1 1	5 5	4 5	4 7	2 2	3 3	7 12	4 4
B13 31 ( F )	1 3	2 5	4 4	3 7	2 5	3 4	8 12	4 8

ANEXO C – Estimativa dos possíveis genótipos e suas probabilidades (Prob.), inferidos pelo software COLONY, para cada *locus* de cada genitor por colônia analisada.

Colônia B 4								
<i>Loci</i>	Mãe	Genótipo		Prob.	Pai	Genótipo		Prob.
Mcas6b	#2	6	8	0.250	*2	6	ou 8	0.250
Mcas6b	#1	2	6	0.499	*1	2	ou 6	0.499
Mcas11b	#2	1	5	0.187	*2	1	ou 5	0.187
Mcas11b	#1	2	3	0.452	*1	2	ou 3	0.452
Mcas14a	#2	3	4	0.500	*2	3	ou 4	0.500
Mcas14a	#1	3	4	0.565	*1	3	ou 4	0.565
Mcas15b	#2	3	5	0.187	*2	3	ou 5	0.187
Mcas15b	#1	2	6	0.453	*1	2	ou 6	0.453
Mcas34b	#2	2	8	0.437	*2	2	ou 8	0.437
Mcas34b	#1	2	3	0.509	*1	2	ou 3	0.509
Mcas42b	#2	3	4	0.500	*2	3	ou 4	0.500
Mcas42b	#1	3	3	0.982	*1	3	ou 3	0.982
Mcas53b	#2	1	4	0.187	*2	1	ou 4	0.187
Mcas53b	#1	2	6	0.453	*1	2	ou 6	0.453
Mcas69b	#2	2	4	0.281	*2	2	ou 4	0.281
Mcas69b	#1	4	8	0.452	*1	4	ou 8	0.452

Colônia B7								
<i>Loci</i>	Mãe	Genótipo		Prob.	Pai	Genótipo		Prob.
Mcas6b	#3	2	2	0.643	*3	2	ou 2	0.643
Mcas6b	#1	2	4	0.517	*1	2	ou 4	0.517
Mcas6b	#2	4	4	0.526	*2	4	ou 4	0.526
Mcas11b	#3	1	4	0.309	*3	1	ou 4	0.309
Mcas11b	#1	1	1	0.498	*1	1	ou 1	0.498
Mcas11b	#2	1	1	0.727	*2	1	ou 1	0.727
Mcas14a	#3	1	4	0.262	*3	1	ou 4	0.262
Mcas14a	#1	2	5	0.499	*1	2	ou 5	0.499
Mcas14a	#2	2	4	0.500	*2	2	ou 4	0.500
Mcas15b	#3	4	6	0.191	*3	4	ou 6	0.191
Mcas15b	#1	6	8	0.499	*1	6	ou 8	0.499
Mcas15b	#2	6	8	0.611	*2	6	ou 8	0.611
Mcas34b	#3	2	6	0.190	*3	2	ou 6	0.190
Mcas34b	#1	3	9	0.499	*1	3	ou 9	0.499
Mcas34b	#2	3	9	0.561	*2	3	ou 9	0.561
Mcas42b	#3	1	4	0.524	*3	1	ou 4	0.524
Mcas42b	#1	1	3	0.542	*1	1	ou 3	0.542
Mcas42b	#2	1	3	0.690	*2	1	ou 3	0.690
Mcas53b	#3	7	13	0.262	*3	7	ou #	0.262
Mcas53b	#1	7	12	0.629	*1	7	ou #	0.629
Mcas53b	#2	7	12	0.623	*2	7	ou #	0.623
Mcas69b	#3	1	4	0.214	*3	1	ou 4	0.214
Mcas69b	#1	4	7	0.362	*1	4	ou 7	0.362
Mcas69b	#2	4	7	0.612	*2	4	ou 7	0.612

CONT. ANEXO C – Estimativa dos possíveis genótipos e suas probabilidades (Prob.), inferidos pelo software COLONY, para cada *locus* de cada genitor por colônia analisada.

Colônia B10								
<i>Loci</i>	Mãe	Genótipo		Prob.	Pai	Genótipo		Prob.
Mcas6b	#2	6	9	0.212	*2	6	ou 9	0.212
Mcas6b	#1	2	6	0.485	*1	2	ou 6	0.485
Mcas11b	#2	4	5	0.308	*2	4	ou 5	0.308
Mcas11b	#1	3	5	0.522	*1	3	ou 5	0.522
Mcas14a	#2	4	4	0.577	*2	4	ou 4	0.577
Mcas14a	#1	3	7	0.485	*1	3	ou 7	0.485
Mcas15b	#2	4	6	0.384	*2	4	ou 6	0.384
Mcas15b	#1	4	8	0.520	*1	4	ou 8	0.520
Mcas34b	#2	2	4	0.212	*2	2	ou 4	0.212
Mcas34b	#1	3	4	0.485	*1	3	ou 4	0.485
Mcas42b	#2	1	3	0.423	*2	1	ou 3	0.423
Mcas42b	#1	3	3	0.994	*1	3	ou 3	0.994
Mcas53b	#2	3	7	0.212	*2	3	ou 7	0.212
Mcas53b	#1	7	7	0.467	*1	7	ou 7	0.467
Mcas69b	#2	6	10	0.423	*2	6	ou 10	0.423
Mcas69b	#1	4	5	0.483	*1	4	ou 5	0.483

Colônia B11								
<i>Loci</i>	Mãe	Genótipo		Prob.	Pai	Genótipo		Prob.
Mcas6b	F2	6	7	1.000	*2	2	ou 7	0.425
Mcas6b	#1	2	7	0.425	*1	2	ou 2	0.981
Mcas11b	F2	2	2	0.998	*2	2	ou 3	0.475
Mcas11b	#1	2	3	0.475	*1	3	ou 3	0.980
Mcas14a	F2	4	6	0.985	*2	5	ou 6	0.375
Mcas14a	#1	5	6	0.375	*1	5	ou 5	0.970
Mcas15b	F2	1	5	0.938	*2	1	ou 2	0.475
Mcas15b	#1	1	2	0.475	*1	2	ou 2	0.980
Mcas34b	F2	2	5	1.000	*2	2	ou 8	0.400
Mcas34b	#1	2	8	0.400	*1	8	ou 8	0.981
Mcas42b	F2	3	4	1.000	*2	4	ou 5	0.700
Mcas42b	#1	4	5	0.700	*1	4	ou 4	0.963
Mcas53b	F2	2	10	1.000	*2	7	ou 9	0.400
Mcas53b	#1	7	9	0.400	*1	7	ou 7	0.977
Mcas69b	F2	4	11	0.959	*2	7	ou 11	0.325
Mcas69b	#1	7	11	0.325	*1	7	ou 7	0.941

CONT. ANEXO C – Estimativa dos possíveis genótipos e suas probabilidades (Prob.), inferidos pelo software COLONY, para cada *locus* de cada genitor por colônia analisada.

Colônia B13								
<i>Loci</i>	Mãe	Genótipo		Prob.	Pai	Genótipo		Prob.
Mcas6b	#7	1	1	0.416	*7	1	ou 1	0.416
Mcas6b	#5	1	5	0.521	*5	1	ou 5	0.521
Mcas6b	#3	1	3	0.505	*3	1	ou 3	0.505
Mcas6b	#1	1	3	0.507	*1	1	ou 3	0.507
Mcas6b	#2	1	3	0.505	*2	1	ou 3	0.505
Mcas6b	#4	1	3	0.513	*4	1	ou 3	0.513
Mcas6b	#6	1	3	0.584	*6	1	ou 3	0.584
Mcas6b	#8	1	1	0.879	*8	1	ou 1	0.879
Mcas11b	#7	2	5	0.500	*7	2	ou 5	0.500
Mcas11b	#5	2	5	0.999	*5	2	ou 5	0.999
Mcas11b	#3	2	2	0.545	*3	2	ou 2	0.545
Mcas11b	#1	2	5	0.535	*1	2	ou 5	0.535
Mcas11b	#2	2	5	0.615	*2	2	ou 5	0.615
Mcas11b	#4	2	5	0.535	*4	2	ou 5	0.535
Mcas11b	#6	2	5	0.405	*6	2	ou 5	0.405
Mcas11b	#8	2	5	0.615	*8	2	ou 5	0.615
Mcas14a	#7	4	7	0.662	*7	4	ou 7	0.662
Mcas14a	#5	5	5	0.587	*5	5	ou 5	0.587
Mcas14a	#3	4	4	0.797	*3	4	ou 4	0.797
Mcas14a	#1	4	5	0.503	*1	4	ou 5	0.503
Mcas14a	#2	5	5	0.587	*2	5	ou 5	0.587
Mcas14a	#4	4	5	0.506	*4	4	ou 5	0.506
Mcas14a	#6	4	5	0.579	*6	4	ou 5	0.579
Mcas14a	#8	3	4	0.998	*8	3	ou 4	0.998
Mcas15b	#7	4	6	0.181	*7	4	ou 6	0.181
Mcas15b	#5	3	4	1.000	*5	3	ou 4	1.000
Mcas15b	#3	4	4	0.532	*3	4	ou 4	0.532
Mcas15b	#1	3	4	0.496	*1	3	ou 4	0.496
Mcas15b	#2	3	4	1.000	*2	3	ou 4	1.000
Mcas15b	#4	3	4	0.498	*4	3	ou 4	0.498
Mcas15b	#6	4	7	0.628	*6	4	ou 7	0.628
Mcas15b	#8	3	4	0.250	*8	3	ou 4	0.250

Colônia B13								
<i>Loci</i>	Mãe	Genótipo		Prob.	Pai	Genótipo		Prob.
Mcas34b	#7	1	2	0.662	*7	1	ou 2	0.662
Mcas34b	#5	5	5	0.632	*5	5	ou 5	0.632
Mcas34b	#3	2	2	0.797	*3	2	ou 2	0.797
Mcas34b	#1	2	2	0.996	*1	2	ou 2	0.996
Mcas34b	#2	2	7	0.498	*2	2	ou 7	0.498
Mcas34b	#4	2	2	0.497	*4	2	ou 2	0.497
Mcas34b	#6	2	5	0.400	*6	2	ou 5	0.400
Mcas34b	#8	2	5	0.591	*8	2	ou 5	0.591
Mcas42b	#7	2	3	0.653	*7	2	ou 3	0.653
Mcas42b	#5	4	4	0.654	*5	4	ou 4	0.654
Mcas42b	#3	3	3	0.791	*3	3	ou 3	0.791
Mcas42b	#1	3	3	0.996	*1	3	ou 3	0.996
Mcas42b	#2	3	3	0.791	*2	3	ou 3	0.791
Mcas42b	#4	3	3	0.497	*4	3	ou 3	0.497
Mcas42b	#6	3	4	0.747	*6	3	ou 4	0.747
Mcas42b	#8	3	4	0.598	*8	3	ou 4	0.598
Mcas53b	#7	7	12	0.200	*7	7	ou 12	0.200
Mcas53b	#5	7	8	0.925	*5	7	ou 8	0.925
Mcas53b	#3	8	8	0.400	*3	8	ou 8	0.400
Mcas53b	#1	12	12	0.491	*1	12	ou 12	0.491
Mcas53b	#2	7	12	0.500	*2	7	ou 12	0.500
Mcas53b	#4	7	8	0.498	*4	7	ou 8	0.498
Mcas53b	#6	7	8	0.389	*6	7	ou 8	0.389
Mcas53b	#8	12	12	0.337	*8	12	ou 12	0.337
Mcas69b	#7	4	8	0.481	*7	4	ou 8	0.481
Mcas69b	#5	4	8	1.000	*5	4	ou 8	1.000
Mcas69b	#3	4	8	1.000	*3	4	ou 8	1.000
Mcas69b	#1	4	4	0.505	*1	4	ou 4	0.505
Mcas69b	#2	4	8	0.550	*2	4	ou 8	0.550
Mcas69b	#4	4	8	0.514	*4	4	ou 8	0.514
Mcas69b	#6	3	8	0.643	*6	3	ou 8	0.643
Mcas69b	#8	4	4	0.401	*8	4	ou 4	0.401

## CONCLUSÕES GERAIS

- A metodologia empregada para isolar os *loci* de microssatélites em *Mischocyttarus cassununga*, utilizando bibliotecas enriquecidas se mostrou eficiente, permitindo desenvolver 18 pares de *primers* polimórficos.
- A constatação de altos valores de informação polimórfica para a grande maioria dos *loci* indica o elevado potencial destes marcadores para estudos genéticos com *Mischocyttarus cassununga*.
- Os *loci* isolados amplificaram com sucesso para outras espécies de Polistinae, confirmando o caráter conservativo das sequências flanqueadoras de microssatélites em espécies próximas, evidenciando a potencialidade de *loci* heterólogos para estudos com outras espécies da mesma subfamília (Polistinae).
- Uma análise associada entre o comportamento intranidal dos indivíduos das colônias *M. cassununga* estudadas e a caracterização genética destes indivíduos se mostrou informativa em relação à elucidação de aspectos relevantes para o conhecimento da estrutura sociogenética das colônias estudadas. Os dois tipos de análises se mostraram complementar e essencial para entender as relações de parentesco entre os indivíduos da colônia, bem como para interpretar alguns dos resultados obtidos separadamente por cada uma das análises (comportamental e genética).
- Estudos mais abrangentes, que disponham de um maior número amostral de colônias e períodos mais prolongados de observação, devem ser realizados para que se possa ter uma confirmação concreta da organização sociogenética desta espécie de vespa.
- Os marcadores microssatélites desenvolvidos se mostraram eficientes para estudos de relação de parentesco em *M. cassununga*, sendo possível inferir: a) as possíveis mães, assim como os pais de cada indivíduo da prole; b) irmandade da prole, detectando possíveis não-irmãos presentes;
- As análises genéticas também permitiram confirmar: a) a usurpação intraespecífica de colônias de *M. cassununga* por fêmeas não-aparentadas e a coexistências destas nas colônias; b) uma forte tendência a alternância de dominância entre fêmeas da colônia; c) a sexagem dos imaturos (larvas e pupas) e, d) oligoginia em algumas colônias desta espécie de vespa.

## REFERÊNCIAS

- ARÉVALO, 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. **BMC Evolutionary Biology**, v.4, p.1-16. 2004.
- AUGUSTO, S. C.; GARÓFALO, C. A. Bionomics and sociological aspects of *Euglossa fimbriata* (Apidae, Euglossini). **Genetics and Molecular Research**, v.2, p.525-538. 2009.
- AUGUSTO, S. C.; GONÇALVES, P. H. P.; FRANCISCO, F. O.; SANTIAGO, L. R.; FRANÇOSO, E. A.; SUZUKI, K. M.; SOFIA, S. H.; SIMÕES, Z. L. P; ARIAS M. C. Microsatellite loci for the carpenter bee *Xylocopa frontalis* (Apidae, Xylocopini). **Conservation Genetics Resources**, doi: 10.1007/s12686-011-9536-y. 2012.
- AVISE, J. C. **Molecular markers, Natural History and Evolution**. 2<sup>a</sup>ed. Sunderland, MA, Sinauer Associates, Inc. 2004. 684p.
- BEYE, M.; NEUMANN, P.; CHAPUISAT, M.; PAMILO, P. Nestmate recognition and the genetic relatedness of nests in the ant *Formica pratensis*. **Behavior Ecology Sociobiology**, v.43, p.67-72. 1998.
- BILLOTTE N.; LAGODA, P. J. R.; RISTERUCCI, A. M.; BAURENS, F. C. Microsatellite enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. **Fruits**, v.54, p.277–288. 1999.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, L. R.; SKOLNICK, M., DAVIS, R. W. Construction of a genetic linkage Map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, v.32, p.314-331, 1980.
- BRITO, R. M.; FRANCISCO F. O., DOMINGUES-YAMADA A. M. T., GONÇALVES P. H. P., PIOKER vF. C., SOARES A. E. E. AND ARIAS M. C. Characterization of microsatellite loci of *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). **Conservation Genetics Resources**, v.1, p.183-187. 2009.
- BROTHERS, D. J. Phylogeny and evolution of wasps, ants and bees (Hymenoptera, Chrysidoidea, Vespoidea and Apoidea). **Zoologica Scripta**, v.28, p. 233-249. 1999.
- CARPENTER, J. M. Phylogenetic relationships and the origin of social behavior in the Vespidae, pp.7-32. In: ROSS, K.G.; MATTHEWS, R.W. (eds). **The Social biology of wasps**. Ithaca, Cornell University. 1991. 678p.
- CARPENTER, J. M. Biogeographic patterns in the Vespidae (Hymenoptera): two views of Africa and South America, pp. 139-155. In: GOLDBLATT, P. (ed.), **Biological relationships between Africa and South America**. New Halen, Yale University, 1993.
- CARPENTER, J. M.; MARQUES, O. M. Contribuição ao estudo dos vespídeos do Brasil. **Série Publicações Digitais**, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal da Bahia, v.2, 147p, 2001.

- CARPENTER, J. M. Synonymy of the genus *Marimbonda* Richards, 1978, with *Leipomeles Mobius*, 1856 (Hymenoptera: Vespidae: Polistinae), and a new key to the genera of paper wasps of the New World. **American Museum of Natural History**, v.51, p.2-16. 2004.
- CHOULDHARY, M.; STRASSMANN, J. E.; SOLIS, C. R.; QUELLER, D. C. Microsatellite variation in insect social. **Biochemical Genetics**, v.31, p.87-96. 1993.
- CLOUSE, R. M. Nest usurpation and intercolonial cannibalism in *Mischocyttarus mexicanus* (Hymenoptera: Vespidae). **Journal of Kansas Entomological Society**, v.68, p.67-73. 1995.
- CLOUSE, R. Some effects of group size on the output of beginning nests of *Mischocyttarus mexicanus* (Hymenoptera: Vespidae). **Florida Entomologist**, v.3, p.418-420. 2001.
- COOK, J. M. Sex determination in the Hymenoptera: a review of models and evidence. **Heredity**, v.71, p.421-435. 1993.
- COOK, J. M.; CROZIER, R. H. Sex determination and population biology of the Hymenoptera. **Trends in Ecology and Evolution**, v.10, p. 281-286. 1995.
- CORNUET, J. M.; LUIKART, G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics**, v.144, p.2001-2014. 1996.
- COSTA FILHO, V. C.; SHIMA, S. N.; DESUÓ, I. C.; MURAKAMI, A. S. N. The effects of the social hierarchy destabilization on the foraging activity of eusocial wasp *Mischocyttarus cerberus styx* Richards, 1940 (Hymenoptera: Vespidae: Polistinae). **Psyche**, doi: 10.1155/2011/501381. 2011.
- DALY, D.; ARCHER, M. E.; WATTS, P. C.; SPEED, M. P.; HUGHES, M. R.; BARKER, F. S.; JONES, J.; ODGAARD, K.; KEMP, S. J. Polymorphic microsatellite loci for eusocial wasps (Hymenoptera: Vespidae). **Molecular Ecology Notes**, v.2, p.273-275. 2002.
- DAPPORTO, L.; THEODORA, P.; SPACCHINI, C.; PIERACCINI, G.; TURILLAZZI, S. Rank and epicuticular hydrocarbons in different populations of the paper wasp *Polistes dominulus* (Christ) (Hymenoptera Vespidae). **Insectes Sociaux**, v.52, p.279-286. 2004.
- DA SILVA, I. M. **Diferenciação etológica e morfofisiológica das castas de *Mischocyttarus cerberus styx* Richards, 1940 (Hymenoptera, Vespidae, Mischocyttarini), com especial referência à dinâmica do estabelecimento da hierarquia social**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, São Paulo. 2008. 93p.
- EZENWA, V. O.; PETERS, J. M.; ZHU, Y.; ARÉVALO, E.; HASTINGS, M. D.; SEPPÄ, P.; PEDERSEN, J. S.; ZACCHI, F.; QUELLER, D.; STRASSMANN, J. E. Conservation of trinucleotide microsatellite loci in Polistinae wasps. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.10, p.166-177. 1998.

EVANS, J. D. Relatedness threshold for the production of female sexuals in colonies of a polygynous ant, *Myrmica tahoensis*, as revealed by microsatellite DNA analysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.92, p.6514-6517. 1995.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**, 3.ed. Brasília: Ed. EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p.

FIELD, J.; SOLIS, C. R.; QUELLER, D. C.; STRASSMANN, J. E. Social and genetic structure of paper wasp cofoundress associations: tests of reproductive skew models. **The American Naturalist**, v. 6, p. 545–563. 1998.

FITZSIMMONS, N. N.; MORITZ, C.; MOOR, S. S. Conservation and dynamics of microsatellite loci over 300 million years of marine turtle evolution. **Molecular Biology Evolution**, v.3, p.432-440. 1995.

FOSTER, K. R.; SEPPÄ, P.; RATNIEKS, F. L. W.; THORÉN, P. A. Low paternity in the hornet *Vespa crabro* indicates that multiple mating by queens is derived in vespine wasps. **Behavior Ecology Sociobiology**, v. 46, p. 252–257. 1999.

FOSTER, K. R.; RATNIEKS, F. L. W. Paternity, reproduction and conflict in vespine wasps: a model system for testing kin selection predictions. **Behavior Ecology Sociobiology**, v. 50, p. 1–8. 2000.

FRANCISCO, F. O.; BRITO, R. M.; SANTIAGO, L. R.; GONÇALVES, P. H. P.; PIOKER, F. C.; DOMINGUES-YAMADA, A. M. T. ; ARIAS, M. C. Isolation and characterization of 15 microsatellite loci in the stingless bee *Plebeia remota* (Apidae: Meliponini). **Conservation Genetic Resource**, v.3, p. 417–419. 2011.

FRANKHAM, R; BALOU, J. D; BRISCOE, D. A. **Fundamentos de Genética da Conservação** (1.ed). Ribeirão Preto, São Paulo. 2008. 280p

FREIRIA, G. A; RUIM, J. B.; SOUZA, R. F; SOFIA S. H. Population structure and genetic diversity of the orchid bee *Eufriesea violacea* (Hymenoptera, Apidae, Euglossini) from Atlantic Forest remnants in southern and southeastern Brazil. **Apidologie** doi: 10.1007/s13592-011-0104-y. 2011.

GADAGKAR, R. *Belonogaster*, *Mischocyttarus*, *Parapolybia* and independent-founding *Ropalidia*. In: ROSS, K. G.; MATTEWS, R.W. (eds.), p. 149-190. **The social biology of wasps**. Ithaca, New York, Cornell University Press, 1991. 678 p.

GAMBOA, G. J.; WACKER, T. L.; DUFFY, K. G.; DOBSON, S. W.; FISHWIND, T. G. Defense against intraspecific usurpation by paper wasp cofoundresses (*Polistes fuscatus*, Hymenoptera: Vespidae). **Canadian Journal of Zoology**. v.70, p.2369-2372. 1992.

GASPAR, J. C. W.; LÓPEZ-URIBE, M. M.; DEL LAMA, M. A. Allozyme variation and sociogenetic structure of *Polistes satan* Bequaert 1940 colonies (Hymenoptera, Vespidae). **Genetics and Molecular Biology**, v.30, p.470-474. 2007.

- GIANNOTTI, E. Biology of the wasp *Polistes (Epicnemius) cinerascens* Saussure (Hymenoptera: Vespidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.26, p.61-67. 1997.
- GIANNOTTI, E.; MACHADO, V. L. L. Queen replacement in post-emergent colonies of the social wasp, *Polistes lanio* (Hymenoptera, Vespidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v.41, p.9-11. 1997.
- GIANNOTTI, E. The colony cycle of the social wasp, *Mischocyttarus cerberus styx* Richards, 1940 (Hymenoptera, Vespidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v.41, p.217-224. 1998.
- GIANNOTTI, E. Arquitetura de ninhos de *Mischocyttarus cerberus styx* Richards, 1940 (Hymenoptera, Vespidae). **Revista Brasileira de Zociências**, v.1, p.7–18. 1999.
- GOMES, B; NOLL, F. B. Diversity of social wasps (Hymenoptera, Vespidae, Polistinae) in three fragments of semideciduous seasonal forest in the northwest of São Paulo State, Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v.53, p.428–431. 2009.
- GOUDET, J. FSTAT: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2). **Lausanne: University of Lausanne, Department of Ecology & Evolution**. 2002.
- GRIMALDI, D.; ENGEL, M. S. Hymenoptera: ants, bees, and other wasps. In: **Evolution of the insects**, p. 407-467. New York, NY, Cambridge University Press. 2005. 770p.
- GUIMARÃES, D. L. **Biologia e ecologia comportamental da vespa social *Mischocyttarus cassununga* (Von Ihering, 1903) (Hymenoptera, Apidae) em ambiente antrópico**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Rio Claro, São Paulo. 2008. 99p.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v.41, p.95-98. 1999.
- HAMILTON, W. D. The genetical evolution of social behavior I. **Journal of Theoretical Biology**, v.7, p.1-16. 1964a.
- HAMILTON, W. D. The genetical evolution of social behavior II. **Journal of Theoretical Biology**, v.7, p.17-52. 1964b.
- HARTL, D. L.; CLARK, A. G **Princípios de genética de populações**. Artmed, Porto Alegre. 2010. 659p
- HASTINGS, M. D.; QUELLER, D. C.; EISCHEN, F.; STRASSMANN, J. E. Kin selection, relatedness, and worker control of reproduction in a large-colony epiponine wasp, *Brachygastra mellifica*. **Behavioral Ecology**, v.9, p.573-581. 1997.
- HENSHAW, M. T. Microsatellite loci for the social wasp *Polistes dominulus* and their application in other polistine wasps. **Molecular Ecology**, v.9, p.2155–2234. 2000.

- HENSHAW M. T., STRASSMANN J. A. AND QUELLER D. C. The independent origin of a queen number bottleneck that promotes cooperation in the African swarm-founding wasp, *Polybioides tabidus*. **Behaviour Ecology Sociobiology**, v.48, p.478-483. 2000.
- HENSHAW, M. T.; STRASSMANN, J. E.; QUELLER, D. C. Swarm-founding in the polistine wasps: the importance of finding many microsatellite loci in studies of adaptation. **Molecular Ecology**, v.10, p.185–191. 2001.
- HENSHAW, M. T.; TOTH, A. L.; YOUNG, T. J. Development of new microsatellite loci for the genus *Polistes* from publicly available expressed sequence tag sequences. **Insectes Sociaux**, v.58, p.581–585. 2011.
- HUGHES, C. R.; QUELLER, D. C. Detection of highly polymorphic microsatellite loci in a species with little allozyme polymorphism. **Molecular Ecology**, v.2, p.131-137. 1993.
- HUGHES, C. R. Integrating molecular techniques with field methods in studies of social behavior: a revolution results. **Ecology**, v.79, p. 383–399. 1998.
- HUNT, J. H. **The evolution of social wasps**. University Express, New York, NY. 2007. 259p.
- HUNDERTMARK, K. J.; VAN DAELE, L. Founder effect and bottleneck signatures in an introduced, insular population of elk. **Conservation Genetics**, v.11, p.139-148. 2010.
- JARNE, P.; LAGODA, P. J. L. Microsatellites, from molecules to populations and back. **Trends Ecology Evolution**, v.11, p.424–429. 1996.
- JEANNE, R. L. Social biology of the Neotropical wasp *Mischocyttarus drewseni*. **Bulletin of Museum Comparative Zoology**, v.144, p.63-150. 1972.
- JEANNE, R. L. The adaptiveness of social wasp nest architecture. **Quarterly Review of Biology**, v.50, p.267-287. 1975.
- JEANNE, R. L. The Swarm-founding Polistinae. In: K.G. ROSS; R.W. MATTEWS (eds.), p. 191-231. **The social biology of wasps**. Ithaca, New York, Cornell University Press. 1991. 678p.
- JONES, O.; WANG, J. COLONY: a program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. **Molecular Ecology Resources**, v.10, p.551–555. 2009.
- JOHNSON, R. N.; STARKS, P. T. A Surprising Level of Genetic Diversity in an Invasive Wasp: *Polistes dominulus* in the Northeastern United States. **Annals of the Entomological Society of America**, v.97, p.732-737. 2004.
- KATADA, S.; SUZUKI, T.; TSUCHIDA, K. Application of microsatellite primers for the social wasp *Polistes* to another social wasp genus, *Parapolybia*, to estimate genetic relationships among nestmates. **Entomological Science**, v.10, p.10-15. 2007.

KEPFER, F. M. **Context-Dependent Behavior, reproduction and brain structure in newly-established colonies of the primitively eusocial wasp, *Mischocyttarus mexicanus***. Tese de doutorado. University of Miami, Coral Gables, Florida, 2011. 108p.

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

LIEBERT, A. E.; NONACS, P.; WAYNE, R. K. Solitary nesting and reproductive success in the paper wasp *Polistes aurifer*. **Behaviour Ecology Sociobiology**, v.57, p.445–456, 2005.

LIEBERT, A. E.; GAMBOA, G. L.; STAMP, N. E.; CURTIS, T. R.; MONNET, K. M.; TURILLAZZI, S.; STARKS, P. T. Genetics, behavior and ecology of a paper wasp invasion: *Polistes dominulus* in North America. **Annales Zoologici Fennici**, v.43, p.595-624. 2006.

LIMA, M. A. P.; LIMA, J. R.; PREZOTO, F. Levantamento dos gêneros, flutuação das colônias e hábitos de nidificação de vespas sociais (Hymenoptera, Vespidae) no Campus da UFJF, Juiz de Fora, MG). **Revista Brasileira de Zoociências**, v.2, p.69–80. 2000.

LITTE, M. Social biology of the Polistine wasp *Mischocyttarus labiatus*: survival in a Colombian rain forest. **Smithsonian Contributions to Zoology**, n. 327, p. 1-27. 1981.

MAKINO, S.; SAYAMA, K. Comparison of intraspecific usurpation between two haplometrotic paper wasp species (Hymenoptera: Vespidae: Polistes). **Journal of Ethology**, v.9, p.121-128.1991

MARSHALL, T. C.; SLATE, J.; KRUK, L. E. B.; PEMBERTON, J. M. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology**, v.7, p.639 - 655. 1998.

MATIOLI, S. R.; PASSOS-BUENO, M. R. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucléicos. In: MATIOLI, S. R. (ed). **Biologia Molecular e Evolução**, Ribeirão Preto: Holos, cap. 15, p. 153-161. 2001.

MURAKAMI, A. S. N. **Diferenciação etológica e morfofisiológica das castas de *Mischocyttarus (Monocyttarus) cassununga* Von Ihering, 1903 (Hymenoptera, Vespidae, Mischocyttarini), com especial referência as fêmeas hierarquicamente superiores**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista, UNESP, Rio Claro, São Paulo. 2007. 213p.

MURAKAMI, A. S. N.; SHIMA, S. N.; DESUÓ, I. C. More than one inseminated female in colonies of the independent-founding wasp *Mischocyttarus cassununga* von Ihering (Hymenoptera, Vespidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 53, p. 653–662. 2009.

- MURAKAMI, A. S. N.; SHIMA, S. N. Regulation of social hierarchy over time in colonies of the primitive eusocial wasp *Mischocyttarus (Monocyttarus) cassununga*. von Ihering, 1903 (Hymenoptera, Vespidae). **Journal of the Kansas Entomological Society**, v.83, p.163-171. 2010.
- NODA, S. C. M.; SILVA, E. R.; GIANOTTI, E. Dominance hierarchy in different stages of development in colonies of the primitively eusocial wasp *Mischocyttarus cerberus styx* (Hymenoptera, Vespidae). **Sociobiology**, v.38, p.603-614. 2001.
- OLIVEIRA, S. A.; CASTRO, M. M.; PREZOTO, F. Foundation pattern, productivity and colony success of the paper wasp, *Polistes versicolor*. **Journal of Insect Science**, v.10, p.1-10. 2005.
- OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; VENCOVSKY, R.; VIEIRA, M. L. C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellite. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, p.294-307. 2006.
- Oi, C.A. **Estrutura sociogenética de ninhos de Euglossini (Hymenoptera: Apidae) e estrutura genética das populações urbanas de *Euglossa cordata* do estado de São Paulo**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de São Carlos, UFScar, São Carlos, São Paulo. 2010. 139p.
- PARKER, P. G.; SNOW, A. A.; SCHUG, M. D.; BOOTON, G. C.; FUERST, P. A. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. **Ecology**, v.79, p.361-382. 1998.
- PAXTON, R. J.; THORGN, P. A.; TENGO, J.; ESTOUP, A.; PAMILO, P. Mating structure and nestmate relatedness in a communal bee, *Alzdrena jacobii* (Hymenoptera, Andrenidae), using microsatellites. **Molecular Ecology**, v.5, p.511-519, 1996.
- PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GENEALX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, v.6, p.288-295. 2006.
- PENNA, M. A. H.; GOBBI, N.; GIACOMINI, H. C.; PREZOTO, F.; GONÇALVES, F. M. F. Comparative productivity of *Mischocyttarus cerberus styx* (Richards, 1940) and *Mischocyttarus cassununga* Saussure (Von Ihering, 1903) in an anthropic environment as evaluation for differences in ecological strategies. **Revista Brasileira de Zoociências**, v.9, p.205-212. 2007.
- PICKET, K. M.; CARPENTES, J. M.; WHEELER, W. Systematics of *Polistes* (Hymenoptera: Vespidae) with a phylogenetic consideration of Hamilton's haplodiploidy hypothesis. **Annales Zoologici Fennici**, v.43, p.390-406. 2006.
- PINTO, N. P. O.; GOBBI, N.; NOLL, F. B.; PENNA, M. A. H.; NAZARETH, S. L. Coexistência interespecífica em *Mischocyttarus* Saussure (Hymenoptera: Vespidae, Mischocyttarini) durante a fase inicial de desenvolvimento de um ninho. **Revista de Etologia**, v.6, p.95-100. 2004.
- PREZOTO, P.; VILELA, A. P. P.; LIMA, M. A. P.; D'ÁVILA, S.; SINZATO, D. M. S.; ANDRADE, F. R.; SANTOS-PREZOTO, H. H.; GIANNOTTI, E. Dominance hierarchy

in different stages of development in colonies of the primitively eusocial wasp *Mischocyttarus cassununga* (Hymenoptera, Vespidae). **Sociobiology**, v.44, p.370-390. 2004.

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

QUELLER, D. C; STRASSMANN, J. E.; HUGHES, C. R. Genetic relatedness and population structure in primitively eusocial wasps in the genus *Mischocyttarus* (Hymenoptera: Vespidae). **Journal of Hymenoptera Research**, v.1, p.81-89. 1992.

QUELLER, D. C; STRASSMANN, J. E.; HUGHES, C. R. Microsatellites and kinship. Trends in Ecology and Evolution. **Trends in Ecology & Evolution**,. v. 8, p. 285-288. 1993.

QUELLER, D. C; ZACCHI, F.; CERVO, R.; TURILLAZZI, S.; HENSHAW, M. T.; SANTORELLI, L. A.; STRASSMANN, J. E. Unrelated helpers in a social insect. **Nature**, v.405, p.784-787. 2000.

RAYMOND, M.; ROUSSET F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, v.86, p.248-249. 1995.

REEVE, H. K. *Polistes* In: ROSS, K. G.; MATTEWS, R. W. (eds.), p. 99-148. **The social biology of wasps**, Cornell University Press. 1991. 678p.

REEVE, H. K.; KELLER, L. Tests of reproductive - Skew models in social insects. **Annual Review of Entomology**, v.46, p.347-85. 2001.

RIBEIRO, P. L. Insetos eussociais e o desafio para a idéia de seleção natural. **Revista da Biologia**, v.3, p.6-8. 2009.

RICE, W. R. Analyzing tables of statistical tests. **Evolution**, v.43, p.223-225. 1989.

RICHARDS, O. W. **The social wasps of the Americas, excluding the Vespinae**. London, London British Museum. 1978. 357p.

ROUSSET, F. GENEPOP'007: a complete re-implementation the GENEPOP software for Windows and Linux. **Molecular Ecology Resources**, v. 8, p.103-106. 2008.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. J. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. **Humana Press**, Totowa, NJ, p.365-38. 2000.

SAMBROOK, J. F.; FRITSCH, E. F.; MANIATS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2<sup>nd</sup> edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA. 1989. 1659p.

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotechnology**, v.18, p.223-234. 2000.

- SEPPÄ, P.; FERNADEZ-ESCUADERO, I.; GYLLENSTRAND, N.; PAMILO, P. Colony fission affects kinship in a social insect. **Behaviour Ecology Sociobiology**, v.62, p.589–597. 2008.
- SILVEIRA, O. T. Phylogeny of wasps of the genus *Mischocyttarus* de Saussure (Hymenoptera, Vespidae, Polistinae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v.52, p.510-549. 2008.
- STRASSMANN, J. E.; QUELLER, D. C.; SOLIS, C. R. Genetic relatedness and population structure in social wasps, *Mischocyttarus mexicanus* (Hymenoptera: Vespidae). **Insects Sociaux**, v.42, p.379-383. 1995.
- STRASSMANN, J. E.; PETERS, J. M.; BAREFIELD, K; SOLIS, C. R.; HUGHES, C. R.; QUELLER, D. C. Trinucleotide Microsatellite locos and increased heterozygosity in cross-species applications in the social wasp, *Polistes*. *Biochemical Genetics*, v.35, p.273-279. 1997.
- STRASSMANN, J. The rarity of multiple mating by females in the social Hymenoptera. *Insectes Sociaux*, v.48, p.1–13. 2001.
- SUMNER, S.; CASIRAGHI, S.; FOSTER, W.; FIELD, J. High reproductive skew in tropical hover wasps. **Proceedings of the Royal Society of London B**, v.269, 179-186. 2002
- TAKAHASHI, N. C.; PERUQUETTI, R. C.; DEL LAMA, M. A.; CAMPOS, L. A. O. A reanalysis of diploid male frequencies in euglossine bees (Hymenoptera: Vespidae). **Evolution**, v.55, p.1897-1899. 2001.
- THORÉN, P. A.; PAXTON, R. J.; ESTOUP, A. Unusually high frequency of (CT)<sub>n</sub> and (GT)<sub>n</sub> microsatellite loci in a yellowjacket wasp, *Vespula rufa* (L.) (Hymenoptera: Vespidae). **Insect Molecular Biology**, v.4, p.141–148. 1995.
- UNRUH, T.R.; MESSING, R. H. Intraspecific biodiversity in Hymenoptera: Implications for conservation and biological control, pp. 27-52. In: LASALLE, J.; GAULD, I. D. (eds.). **Hymenoptera and biodiversity**, Wallingford: C-A-B International, 1993.
- VALLONE, M. V.; BUTLER, J. M. AutoDimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structures. **BioTechniques**, v.37, p.226-231. 2004.
- VAN OOSTERHOUT, C.; HUTCHINSON, W. F.; WILLS, D. P. M; SHIPLEY, P. F. Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v.4, p.535–538. 2004.
- WALSH, P. S.; METZGER, D. A.; HIGUCHI, R. Chelex® 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. **BioTechniques**, v.10, p.506-513. 1991.
- WANG, J. Sibship reconstruction from genetic data with typing errors. **Genetics**, v.166, p.1963-1979. 2004.

- WANG, J.; SANTURE, A. W. Parentage and sibship inference from multi-locus genotype data under polygamy. **Genetics**, v.181, p.1579-1594. 2009.
- WEBER, J. L. Informativeness of human (dC-dA)<sub>n</sub> (dG-dT)<sub>n</sub> polymorphisms. **Genomics**, v.7, p.524-530. 1990.
- WEST-EBERHARD, M. J. The social biology of polistine wasps. **Miscellaneous Publications Museum of Zoology**, University of Michigan, v. 140, p. 1-101. 1969.
- WILSON, E.O. **The insect societies**. Cambridge, Harvard University Press. 1971. 548p.
- ZANETTE, L. R. S; FIELD, J. Genetic relatedness in early associations of *Polistes dominulus*: from related to unrelated helpers. **Molecular Ecology**, v.17, p.2590–2597. 2008.
- ZARDOYA, R.; VOLLMER, D. M.; CRADDOCK, C.; STREELMAN, J. T.; KARL; S., MEYER, A. Evolutionary conservation of microsatellite flanking regions and their use in resolving the phylogeny of cichlid fishes (Pisces: Perciformes). **Proceedings of the Royal Society, B**, v.22, p.263:1589-1598. 1996.
- ZAYED, A.; PACKER, L. Complementary sex determination substantially increases extinction proneness of haplodiploid populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.102, p.10742-10746. 2005.
- ZHU, Y.; LANDI, M.; QUELLER, D. C.; TURILLAZZI, S.; STRASSMANN, J. E. Polymorphic microsatellite loci for primitively eusocial Stenogastrine wasps. **Molecular Ecology**, v.9, p.2155–2234. 2000.

## APÊNDICE

## APÊNDICE

### CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA ENRIQUECIDA EM MICROSSATÉLITES PARA *MISCHOCYTTARUS CASSUNUNGA*

A construção da biblioteca foi desenvolvida em colaboração com a professora Dra. Claudete de Fátima Ruas no Laboratório de Marcadores Moleculares e Citogenética de Plantas da Universidade Estadual de Londrina e também com a professora Dra. Maria Cristina Arias no Laboratório de Genética e Evolução de Abelhas da Universidade de São Paulo, utilizando-se o protocolo descrito por Billote *et al.* (1999) com algumas modificações.

#### 1 EXTRAÇÃO E DIGESTÃO DO DNA COM ENZIMA DE RESTRIÇÃO

A extração do DNA foi realizada de acordo com Suzuki (2010), com algumas modificações. Foi macerado o tórax e pernas de uma fêmea de *M. cassununga* em tampão SDS, seguido de extrações sucessivas com fenol, clorofórmio e álcool isoamílico. O DNA foi precipitado com etanol e ressuspenso em 50 µL de TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) e armazenado a -20°C. A quantificação das amostras foi realizada em fluorímetro DyNA Quant 200 (Hoefer). O DNA das amostras foi primeiramente diluído na concentração 1:10 para posterior realização das leituras no equipamento.

Para a digestão do DNA genômico obtido nas extrações foi utilizada a enzima *Rsa I* para gerar fragmentos de tamanhos adequados (200pb a 900pb). Desta forma em um tubo de microcentrifuga foram adicionados 62,5 µL de água Milli-Q, 10 µL de tampão específico da enzima, 2,5 µL de enzima (20U/µL) e 25µL de DNA na concentração de 50ng/µL, perfazendo um total de 100µL de reação. Incubou-se a reação *overnight* a 37°C. Para verificar a efetivação da reação, os fragmentos gerados foram separados em gel de agarose 0,8%, corados com GelRed™ (Biotium), para a visualização em transluminador U.V.

## 2 LIGAÇÃO DOS ADAPTADORES

Posteriormente, para garantir que todos os fragmentos digeridos tenham uma terminação comum e conhecida, foram feitas ligações de adaptadores (*Rsa21* 5'-TCTTGCTTACGCGTGGACTA-3'; *Rsa25* 5'-TAGTCCACGCGTAAGCAAGA-3'). Estes adaptadores possuem extremidade complementar com o sítio de corte de *RsaI*, no qual foram ligados por complementaridade e finalizado pela ação da T4 DNA ligase. Portanto uma alíquota de 6 µL do produto de digestão com *RsaI* foi adicionada a 34 µL de água Milli-Q, 5 µL de tampão 2X (específico da enzima), 2 µL de cada um dos adaptadores (10µM cada), 1 µL de enzima T4 DNA ligase (1U/µL) em um volume final de 50 µL. Em seguida, este material foi incubado por duas horas a 20°C no termociclador.

## 3 PRÉ – AMPLIFICAÇÃO

Após a ligação dos adaptadores seguiu-se a amplificação dos fragmentos para o enriquecimento da amostra. Segue o protocolo de amplificação: 27 µL de água Milli-Q, 5 µL de tampão 10X, 3 µL de MgCl<sub>2</sub> (50Mm), 5 µL de Dntp (2,5 Mm), 2 µL de *primer* *Rsa21* (10µM), 3 µL de *Taq* DNA polimerase (5U/µL) e 5 µL da ligação dos adaptadores, totalizando 50 µL de reação . Posteriormente essa reação foi submetida a uma temperatura de 95°C por 1 minuto e 25 ciclos de: 94°C por 40 segundos, 60°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos; e ao final do ciclo uma extensão final de 72°C por 5 minutos.

Em seguida uma alíquota do produto de amplificação foi submetido a uma eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com GelRed™ (Biotium), visualizado em transluminador U.V. e fotografado com câmera digital

## 4 PURIFICAÇÃO DO DNA

Posteriormente os produtos da PCR foram purificados com a exonuclease (EXOSap IT® - Prodimol), visando à eliminação de possíveis interferentes ou excessos de reagentes da reação, para preparar o DNA para a posterior seleção dos fragmentos contendo os microssatélites. Para isso foi

adicionado 3,0  $\mu\text{L}$  de EXOSap ao produto de amplificação, que foi submetido a 37°C por 15 minutos e 80°C por mais 15 minutos.

## 5 SELEÇÃO DOS FRAGMENTOS CONTENDO OS MICROSSATÉLITES

Após a purificação os fragmentos contendo microssatélites foram selecionados utilizando as *beads* envolvidas por streptavidina. Nesse procedimento os fragmentos de DNA de interesse (400 a 1000 pb) são desnaturados e hibridados com oligonucleotídeos biotinizados (Figura 3). Os fragmentos que contêm as sequências microssatélites complementares à sequência repetitiva dos oligonucleotídeos se complexam às *beads*, pois a biotina presente na extremidade do oligonucleotídeo se complexam às *beads*, pois a biotina presente na extremidade do oligonucleotídeo tem afinidade pela streptavidina que envolve a *bead* e através da utilização de um ímã que prende as *beads* à parede do tubo, os fragmentos que contém microssatélites são selecionados.

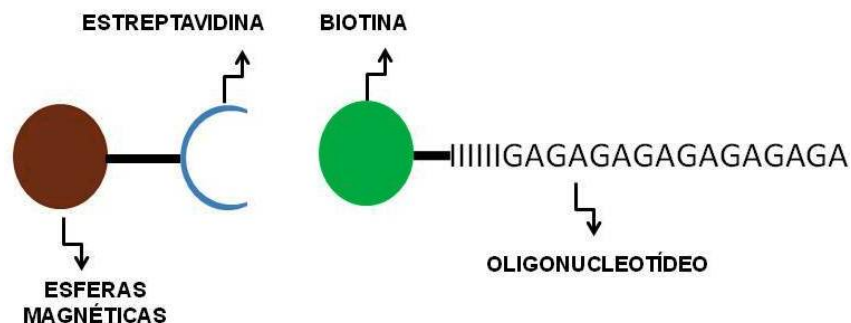


Imagem ilustrativa das *beads* (esferas magnéticas) envolvidas por streptavidina e o oligonucleotídeo biotilado.

### 5.1 PREPARO DAS ESFERAS MAGNÉTICAS (BEADS) COM STREPTAVIDINA

Para a seleção dos fragmentos contendo regiões de microssatélites, 600  $\mu\text{L}$  de *beads* (*Streptavidin magnesphere – Paramagnetic particles – Promega*) foram ressuspensas por agitação seguida de exposição a uma coluna magnética por 30 segundos. Aspirou-se o sobrenadante. Adicionou-se 300  $\mu\text{L}$  de SSC 0,5X e ressuspendeu-se por agitação, magnetizou-se por 30 segundos e descartou-se o sobrenadante. Esse processo de lavagem foi repetido por mais três vezes e ao final ressuspendido em 100  $\mu\text{L}$  de SSC 0,5X.

## 5.2 PREPARO DO DNA PURIFICADO

Adicionou-se 457  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q a 43  $\mu\text{L}$  de DNA purificado. Incubou-se por 15 minutos a  $95^{\circ}\text{C}$  para a desnaturação. Adicionou-se 13  $\mu\text{L}$  de SSC 20X e 3  $\mu\text{L}$  de cada oligonucleotídeo biotinilado [(AGA)<sub>5</sub> e (AG)<sub>8</sub>, ambos a 50  $\mu\text{M}$ . Incubou-se à temperatura ambiente por 20 minutos agitando-se o tubo a cada 2 minutos para que as sondas se hibridassem a regiões complementares. Adicionou-se a esta solução os 100  $\mu\text{L}$  de *beads* previamente lavadas. Agitou-se levemente por 10 minutos à temperatura ambiente. Nesse passo, as *beads* contendo estreptavidina se ligaram à biotina das sondas. Magnetizou-se por 30 segundos, aspirou-se o sobrenadante e ressuspendeu em 300  $\mu\text{L}$  de SSC 0,1X. Esta etapa foi repetida três vezes e ao final ressuspendeu em 100  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q e magnetizou-se por mais 30 segundos. Reservou-se então o sobrenadante (contendo os fragmentos com repetições) em um novo tubo de microcentrífuga e procedeu-se mais uma lavagem das *beads* com 150  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q para garantir que todos os fragmentos selecionados fossem recuperados. Posteriormente juntaram-se os dois sobrenadantes (100  $\mu\text{L}$  + 150  $\mu\text{L}$ ).

## 6 AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS SELECIONADOS

Posteriormente à seleção dos fragmentos de interesse foi feita a verificação da efetividade da seleção através da amplificação por PCR. As reações foram realizadas em volume final de 100  $\mu\text{L}$  contendo, 49,5  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q, 10  $\mu\text{L}$  de tampão 10X, 6  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (25Mm), 10  $\mu\text{L}$  de Dntp (2,0Mm), 4  $\mu\text{L}$  de *primer Rsa21* (10  $\mu\text{M}$ ), 0,5  $\mu\text{L}$  de *Taq* Polimerase Platinum (5U/  $\mu\text{L}$ ) e 20  $\mu\text{L}$  dos fragmentos selecionados. Essa reação foi submetida a uma temperatura de  $95^{\circ}\text{C}$  por 1 minuto e 25 ciclos de: [ $94^{\circ}\text{C}$  por 40 segundos,  $60^{\circ}\text{C}$  por um minuto e  $72^{\circ}\text{C}$  por 2 minutos], com uma extensão ao final do ciclo de  $72^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos.

Para verificar a efetividade da reação, o produto de amplificação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com GelRed™ (Biotium) e visualizados em transluminador U.V.

## 7 LIGAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE DNA AO VETOR PGEM-T EASY

O produto de amplificação obtido na etapa anterior foi ligado a um vetor de clonagem Pgem-T Easy (*Kit Pgem®-T Easy Vector Systems* – Promega). Dessa forma foi aliqotado 6 µL do produto de amplificação dos fragmentos selecionados, no qual foi adicionado 2 µL de água Milli-Q, 10 µL de tampão 2X, 1 µL do vetor de clonagem (50 ng/µL), 1 µL de enzima T4 DNA ligase (3U/µL), em um volume final de 20 µL. Em seguida, este material foi incubado *overnight* a 4°C.

## 8 TRANSFORMAÇÃO EM XL1-BLUE E CLONAGEM

Primeiramente células competentes de *Escherichia coli* (linhagem DH10-β) foram preparadas de acordo com Sambrook *et al.* (1989). Posteriormente foram transformadas com os plasmídeos recombinantes (etapa de ligação) de acordo com o seguinte protocolo: 100 µL de células competentes foram incubadas em 8 µL de plasmídeos recombinantes por 15 minutos no gelo, em seguida a 37°C por 5 minutos e por mais 15 minutos no gelo; 250 µL de meio LB foram adicionados e seguiu-se uma incubação a 37°C sob agitação por uma hora. Após a incubação, as células foram plaqueadas em meio LB-ágar com ampicilina (0,15 mg/MI) e X-Gal (0,10 mg/MI) e incubadas *overnight* a 37°C.

Após a incubação das placas, foram selecionadas aquelas colônias que apresentaram coloração branca, que são justamente as colônias que apresentam o inserto no plasmídeo. Estas foram transferidas em microtubos (0,2 MI) contendo 10 µL de solução TE 0,5X. Em seguida, foram mantidas a uma temperatura elevada (99°C por 5 minutos) para a extração do DNA bacteriano, que posteriormente foram usadas para a amplificação por PCR.

Posteriormente foi feita amplificação dos fragmentos clonados e conseqüentemente o isolamento destes do plasmidial, por meio do anelamento dos *primers* na região *upstream* e *downstream* aos adaptadores presentes nas extremidades 5' e 3', respectivamente. As reações foram realizadas em volume final de 20 µL contendo, 12,8 µL de água Milli-Q, 2 µL de tampão 10X, 1,5Mm de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 µM de Dntp, 0,4 µM de cada *primer* M13 (F: 5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3'; R: 5'-TTTCACACAGGAAACAGCTATG-3'), 1,5 U de *Taq* Polimerase Invitrogen e 1,5 µL do DNA. Essa reação foi submetida a uma temperatura de 94°C por 5 minutos e

35 ciclos de: [94°C por 1 minuto, 42°C por 1 minuto e 20 segundos e 64°C por 2 minutos], com uma extensão ao final de 64°C por 10 minutos.

Em seguida uma alíquota de 3 µL de cada amostra foi submetida à eletroforese em gel de agarose 0,8%, corados com GelRed™ (Biotium) e visualizados em transluminador UV. Foram considerados clones positivos os que apresentaram insertos.

## 9 PURIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO

Após a amplificação, os clones positivos foram purificados também com a exonuclease (EXOSap IT®), adicionando 0,5 µL de EXOSap ao produto de amplificação, que foi submetido a 37°C por 15 minutos e 80°C por mais 15 minutos. Em seguida o DNA dos clones foram utilizados para fazer a reação de sequenciamento, com o conjunto de reagentes do Kit“ *Big Dye Terminator<sup>T</sup>*” (vs. 3.1 – Applied Biosystems).

Após a purificação, as amostras foram submetidas ao sequenciamento (Departamento de Química do IQ-USP, em sequenciador automático modelo ABI-PRISM 3100; e MACROGEN – Advancing through Genomics, em sequenciador automático modelo ABI-PRISM 3730).

## 10 EDIÇÃO DAS SEQUÊNCIAS E DESENHO DOS PRIMERS

A visualização das sequências geradas foi realizada através do software Bioedit v. 7.0 (HALL, 1999) e a busca por regiões repetitivas do tipo microssatélites foi feita manualmente.

As sequências foram selecionadas com base na qualidade da região que flanqueiam os microssatélites. Para o desenho dos *primers* utilizou-se o software eletrônico Primer3 (ROZEN; SKALETSKY, 2000) e em seguida verificou-se a possibilidade de *hairpins* e dímeros nos *primers* desenhados, pelo software Autodimer (VALLONE; BUTLER, 2004).

Os *primers* foram sintetizados (Macrogen – Coréia), diluídos para uma concentração estoque de 200 µM em Tris 10Mm Ph 7,5 e armazenados a -20°C.

## 11 PADRONIZAÇÃO DAS REAÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO DOS PRIMERS DESENVOLVIDOS

Posteriormente à confecção dos *primers*, foram feitos testes para a otimização das condições de amplificação de todos os locos adquiridos, através basicamente de alterações na temperatura de anelamento dos *primers*. Foram amostrados 20 indivíduos (fêmeas) não aparentados de *M. cassununga*, uma fêmea de *Mischocyttarus* sp e uma fêmea de *Polistes versicolor*.

A padronização dos *primers* foi realizada por análise de fragmentos em sequenciador automático. Para tal técnica, os *primers forward* foram modificados na sua extremidade 5', na qual foi adicionada uma sequência "Tag" (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3'). Nessa sequência se liga o *primer* M13(21) (SHELKE, 2000) marcado com fluoróforos 6-FAM (azul), NED (amarelo) ou HEX (verde). Essa metodologia elimina a necessidade da marcação dos *primers forward* em todos os locos.

As reações de otimização foram realizadas de acordo com protocolo a seguir: 2,35 µL de água Milli-Q; 0,5 µL de tampão 10X (Invitrogen), 0,5 µL de dNTPs (2 Mm); 0,2 µL de MgCl<sub>2</sub> (50Mm); 0,125 µL de um *mix* composto do *primer forward Tag* (0,5 µM) + *primer reverse* (5 µM); 0,125 µL do *primer* M13(-21) (5 µM) marcado com fluorocromo; 1 µL do DNA molde; 0,1 µL de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen – 5U/µL) e 0,1 µL de glicerol 50%. Cada reação foi inicialmente submetida a 94°C por 4 minutos, seguida por 35 ciclos de: [94°C por 40 segundos, 48°C / 54°C / 60°C por 50 segundos e 72°C por 1 minutos] e uma extensão final de 72°C por 10 minutos. Como descrito, foram realizados inicialmente três testes de temperaturas de anelamento dos *primers*, para que se chegasse a uma temperatura ótima para cada loco.

Os produtos de PCR foram diluídos na proporção de 1:10 em H<sub>2</sub>O e 2 µL dessa diluição foram acrescentados a 0,15 µL do marcador de peso molecular GeneScan ROX 500 (Applied Biosystems) e 7,85 µL de Formamida Hi-Di (Applied Biosystems). As análises foram realizadas em um sequenciador automático, modelo ABI-PRISM 3100 (Perkin Elmer) do Centro de Estudos do Genoma humano do IB-USP.

## 12 ANÁLISES DOS DADOS

Os dados de genotipagem gerados pelo sequenciador automático foram visualizados e analisados através do programa GeneMarker v.1.85 (*demo version*) (SoftGenetics, State College, PA). Para o cálculo das taxas de heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) e observada ( $H_o$ ), bem como a média dessas taxas e o número de alelos por *locus*, foi utilizado o GenAIEx v.6.41 (PEAKALL; SMOUSE, 2006). Os cálculos do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e desequilíbrio de ligação foram realizados usando o programa GenePop v.1.2 (RAYMOND; ROUSSET, 1995) e subsequentemente os valores de P foram ajustados pela correção sequencial de Bonferroni (RICE, 1989). O software Cervus v.3.0 (MARSHALL *et al.*, 1998) para o cálculo do conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) e o software MicroChecker v.2.2.3. (VAN OOSTERHOUT *et al.*, 2004) foi utilizado para detecção de possíveis alelos nulos.