

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

AVALIAÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES
MRJPS EM COLÔNIAS DE *Apis mellifera* AFRICANIZADAS
SELECIONADAS PARA A PRODUÇÃO DE GELEIA REAL

Autor: Rejane Stubs Parpinelli
Orientador: Prof. Dr. Vagner de Alencar Arnaut de Toledo

MARINGÁ
Estado do Paraná
Março - 2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

AVALIAÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES
MRJPS EM COLÔNIAS DE *Apis mellifera* AFRICANIZADAS
SELECIONADAS PARA A PRODUÇÃO DE GELEIA REAL

Autor: Rejane Stubs Parpinelli

Orientador: Prof. Dr. Vagner de Alencar Arnaut de Toledo

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Cláudia Colla Ruvolo-Takasusuki

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá - Área de concentração Produção Animal.

MARINGÁ
Estado do Paraná
Março - 2011

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

P257a Parpinelli, Rejane Stubs, 1985-
Avaliação de marcadores microssatélites MRJPS em colônias de *Apis mellifera* africanizadas selecionadas para a produção de geleia real / Rejane Stubs Parpinelli. – Maringá, PR, 2011.
41 f. : il.

Dissertação (mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Maringá, Dep. de Zootecnia, 2011.
Orientador: Prof. Dr. Wagner de Alencar Arnaut de Toledo.
Coorientador: Profa. Dra. Maria Cláudia Colla Ruvolo-Takasusuki.

1. Apicultura - Geleia real - 2. Melhoramento genético. 3. Apicultura - Extração de DNA. I. Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Zootecnia. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia.

CDD 22. ed. 638.130
NBR/CIP 12899 AACR/2

“Se errar no tango continue dançando”

Al Pacino

À

minha avó Malvina Zanatta Stubs, pelo amor, carinho,
dedicação, ensino, conselhos, e todo o apoio necessário.

Ao

meu avô Carlos Stubs (*in memoriam*), pelo amor, educação e carinho
dedicados a minha criação.

Ao

meu pai Jair Parpinelli, pelo incentivo e compreensão.

À

minha mãe Doralice Stubs Parpinelli (*in memoriam*),
exemplo de vida, dedicação, amor e alegria.

Aos

meus irmãos Rafael Stubs Parpinelli, Roberta Stubs Parpinelli
e Carolina Pellegrim, pelo estímulo.

À

amiga e Doutora Odinete Murari, pelo
grande apoio, motivação e confiança.

À

querida Natalina Fátima Bortolon Parpinelli, pelo carinho.

Aos

meus queridos amigos Jéssica Natália Zironi da Silva, Rosane Ezequiel
Ferreira, Ronaldo Schneider Stubs, pelo grande apoio e paciência nos
momentos mais difíceis.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela dádiva da vida.

À Universidade Estadual de Maringá.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudo concedida durante parte do curso.

Ao Prof. Dr. Vagner de Alencar Arnaut de Toledo, pela dedicada orientação, ensinamentos, estímulos e amizade.

À Prof^ª. Dr^ª Maria Claudia Colla Ruvolo-Takasusuki, pela orientação, paciência e dedicação.

À Prof^ª. Dr^ª. Claudete Aparecida Mangolin, pela ajuda, ensinamentos e amizade.

À Fazenda Experimental de Iguatemi e ao Laboratório de Biologia Celular e Genética, que forneceram estrutura física e pessoal para que este trabalho fosse realizado.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, por todos os ensinamentos passados.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Celular e Genética (DBC), que tanto colaboraram para a realização deste trabalho.

À Arielen Patrícia Balista Casagrande, grande amiga e companheira que pude contar em todos os momentos.

À Kátia Regina Ostrovski amiga irmã muito especial e querida, um presente de Deus, por todas as orações e companheirismo.

Aos colegas do mestrado e graduação, pela amizade, apoio e demonstração de companheirismo, em especial à Juliana Sala pela ajuda e apoio nas análises laboratoriais.

Aos técnicos de laboratório Sergio Luiz Calvi e Leila Andréia Frota, pelo auxílio no manejo dos equipamentos laboratoriais.

Ao Denílson dos Santos Vicentin e Rose Mary Pepinelli, secretários do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, pelo apoio moral.

E, a tantos outros que contribuíram de forma direta ou indireta na realização deste trabalho, o meu agradecimento.

BIOGRAFIA

REJANE STUBS PARPINELLI, filha de Jair Parpinelli e Doralice Stubs Parpinelli, nasceu em Marialva, Paraná, no dia 24 de junho de 1985.

Participou do programa de monitoria na disciplina de Sericicultura no curso de Zootecnia.

Em janeiro de 2009, concluiu o curso de Zootecnia pela Universidade Estadual de Maringá.

Em março de 2009, iniciou no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, em nível de Mestrado, área de concentração Produção Animal, na Universidade Estadual de Maringá, realizando estudos na área de Produção animal – Apicultura.

No dia 31 de março de 2011, submeteu-se à banca para defesa da dissertação.

ÍNDICE

	Página
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. O processo de africanização e a dispersão da <i>Apis mellifera</i> africanizada	03
1.2. Composição e importância da geleia real	07
1.3. Produção comercial da geleia real	10
1.4. Do genoma à Família das proteínas principais da geleia real (MRJPs)	12
2. REFERÊNCIAS	15
I. AVALIAÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES MRJPS EM COLÔNIAS DE <i>Apis mellifera</i> AFRICANIZADAS SELECIONADAS PARA A PRODUÇÃO DE GELEIA REAL	
Resumo	23
Abstract	24
Introdução	25
Material e Métodos	27
Resultados	29
Discussão	30
Referências	32

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela I. Condições da PCR para a amplificação dos lócus das MRJPs de abelhas <i>A. mellifera</i> africanizadas.	35
Tabela II. Lócus das MRJPs de <i>A. mellifera</i> africanizadas produtoras de geleia real analisados mostrando o tamanho dos alelos em pares de bases (pb) e as frequências alélicas (f) obtidas para as sete colônias avaliadas.	36
Tabela III. Teste do qui-quadrado (χ^2) para verificar o equilíbrio de Hardy-Weinberg dos lócus analisados por colônia de <i>A. mellifera</i> africanizadas. GL= graus de liberdade; P = probabilidade.	37
Tabela IV. Valores de heterozigosidade observada (Ho) e esperada (He) por lócus das colônias de abelhas <i>A. mellifera</i> africanizadas analisadas.	38
Tabela V. Índice de fixação (Fis) para os lócus das MRJPs de <i>A. mellifera</i> africanizadas produtoras de geleia real analisadas.	39
Tabela VI. Genótipos das sete rainhas de <i>A. mellifera</i> africanizadas produtoras de geleia real analisadas e dos prováveis zangões que participaram da fecundação.	40

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Mapa da migração de abelhas africanizadas: de São Paulo, Brasil, para os Estados Unidos, realizada em menos de 35 anos (linhas vermelhas indicam os pontos mais distantes de detecção nos anos indicados). Os insetos chegaram ao extremo sul do Texas, em 15 de outubro de 1990, e foram vistos no Arizona em 1993.	06
 AVALIAÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES MRJPS EM COLÔNIAS DE <i>Apis mellifera</i> AFRICANIZADAS SELECIONADAS PARA A PRODUÇÃO DE GELEIA REAL	
Figura 1. Perfil eletroferético dos loci das MRJPs de abelhas <i>Apis mellifera</i> africanizadas. (A) Fragmentos amplificados para o locus <i>Mrjp3</i> ; (B) Fragmentos amplificados para o loco <i>Mrjp5</i> ; (C) Fragmentos amplificados para o locus <i>Mrjp8</i> . M= Marcador de peso molecular de DNA (DNA Ladder-Invitrogen). As setas e as letras indicam os alelos identificados para cada locus.	41

RESUMO

Avaliação de marcadores microssatélites MRJPs em colônias de *Apis mellifera* africanizadas selecionadas para a produção de geleia real

No presente estudo, foi avaliado a variabilidade genética dos locos *Mrjp3*, *Mrjp5* e *Mrjp8* de *A. mellifera* africanizadas, selecionadas para produção de geleia real e a fixação destes alelos durante o processo de reprodução selecionada. As nutrizes foram coletadas de sete colônias matrizes que estão sendo selecionadas desde 2006, para a produção de geleia real. O DNA genômico foi extraído de 20 operárias nutrizes, de cada matriz analisada foi quantificado e amplificado, totalizando 140 indivíduos. Os três locos analisados foram polimórficos e produziram um total de 16 alelos, e o número de alelos efetivos para o locus *Mrjp3*, foi de 3,81; sendo identificados também quatro novos alelos para o locus *Mrjp5*. A heterozigosidade média observada foi de 0,4905 indicando um elevado grau de variabilidade genética para os locos analisados. Os elevados valores de Fis para os locos *Mrjp3*, *Mrjp5* e *Mrjp8* (0,4096; 0,1102 e 0,2847, respectivamente) indicam excesso de homozigotos. Os valores de heterozigosidade e de Fis mostram que a variabilidade genética das rainhas está diminuindo para os locos analisados, havendo excesso de homozigotos, mas o elevado número de zangões não genotipados que fecundam as rainhas dificulta a produção de genótipos homozigotos para o locus *Mrjp3*. Será necessário realizar acasalamentos pelo método de inseminação instrumental de rainhas com zangões genotipados, para aumentar a eficiência do programa de melhoramento de abelhas *A. mellifera* africanizadas.

Palavras-chave: extração, DNA, variabilidade, alelos.

ABSTRACT

Evaluation of microsatellite markers MRJPs in colonies of Africanized *Apis mellifera* selected for the production of royal jelly

In this study, the genetic variability of loci *Mrjp3*, *Mrjp5* and *Mrjp8* in Africanized *A. mellifera* selected for royal jelly production and the alleles fixation during the process of selective breeding were evaluated. The nurse worker bees were collected from seven matrix colonies that have been selected since 2006 for royal jelly production. Genomic DNA was extracted from 20 nursing honeybees from each analyzed matrix and was quantified and amplified, totaling 140 individuals. The three analyzed loci were polymorphic and produced a total of 16 alleles, and the effective number of alleles for the locus *Mrjp3* was 3.81; also, four new alleles were identified for the locus *Mrjp5*. The average observed heterozygosity was 0.4905 indicating a high degree of genetic variability of the loci analyzed. The high values of F_{IS} for *Mrjp3*, *Mrjp5* and *Mrjp8* (0.4096; 0.1102; 0.2847, respectively) indicate an excess of homozygotes. The values of heterozygosity and F_{IS} show that the genetic variability of the queens decreased for the loci analyzed, with an excess of homozygotes, but the large number of drones not genotyped that fertilize the queens jeopardize the production of homozygous genotypes for the locus *Mrjp3*. It will be necessary to conduct matings of queens using instrumental insemination with known genotype drones to increase the efficiency of Africanized *A. mellifera* bees improvement programs.

Key words: extraction; DNA; variability; alleles

1. INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade as abelhas têm sido valorizadas pelos seus produtos e observadas pelo seu comportamento, gerando grande admiração. Os primeiros registros de abelhas foram encontrados em pinturas de cavernas e manuscritos de livros científicos. Estes insetos pertencem a ordem Hymenoptera, superfamília Apoidea, dividida em oito famílias com cerca de 20.000 espécies, das quais aproximadamente 3.000 podem ser encontradas no Brasil (Nogueira-Couto e Couto, 2006). Estudos realizados por Toledo et al. (2003) mostraram que das seis famílias de abelhas que ocorrem no Brasil, foram encontradas cinco delas na região de Maringá (Andrenidae, Anthophoridae, Apidae, Halictidae e Megachilidae).

A abelha *Apis mellifera* L. (1758) é considerada o inseto mais estudado no mundo, por possuir relevante função ecológica em todo o ecossistema, sendo que em ambientes naturais, desempenha papel importante na manutenção das comunidades de plantas e animais. Por serem eficientes polinizadoras de diversas espécies de angiospermas, que por sua vez, são responsáveis pela produção de alimentos utilizados por aves e mamíferos (Jansen, 1980; Free, 1993), garantem a sobrevivência de boa parte da humanidade, sendo que, em torno de 15% (McGregor, 1976) e 15-35% (Greenleaf e Kremen, 2006) dessa dieta depende efetivamente das atividades das abelhas, e a *Apis mellifera* tem se tornado fundamental na condução de muitas culturas agrícolas como a soja (Chiari et al., 2005; 2008), e de acordo com estudos realizados por Greenleaf e Kremen (2006) e Chambó et al. (2009), sua interação comportamental com abelhas nativas aumenta sua eficiência de polinização em híbrido de girassol (*Helianthus annuus*). Sendo assim, com a realização e o sucesso da polinização cruzada, as abelhas auxiliam no aumento da produção de frutos e sementes de diversos vegetais de interesse agroflorestal, além de proporcionar a exploração comercial de seus produtos, sendo eles

o mel, geleia real, pólen, cera e a própolis, o que evidencia a potencialidade das abelhas e a interdependência existente entre seres humanos e esses insetos.

Os produtos apícolas, principalmente o mel e geleia real têm sido utilizados pelo homem desde a antiguidade, como complemento alimentar.

A geleia real é composta a partir da mistura de secreções das glândulas hipofaríngeas e mandibulares, localizadas na cabeça das operárias de *A. mellifera*. Sua secreção é promovida pela ingestão do pólen com adição de soluções regurgitadas do papo das operárias nutrizas, no período entre o quinto e o 15º dia de vida, contendo principalmente açúcares (Haydak, 1970; Rembold et al., 1974; Knecht e Kaatz, 1990; Chen e Chen, 1995; Schmitzová et al., 1998; Albert et al., 1999; Nogueira-Couto e Couto, 2006). É um produto apícola reconhecido mundialmente por sua complexa composição, contendo elementos minerais, proteínas, aminoácidos, esteroides, fenóis, carboidratos, vitaminas, lipídios, além de outras substâncias desconhecidas (Garcia-Amoedo e Almeida-Muradian, 2007).

A geleia real possui de 9 a 15% do seu peso total em proteínas e, nos últimos anos, vários estudos têm identificado e caracterizado essas proteínas. Dentre estas, destacam-se as hidrossolúveis, como as proteínas principais da geleia real (*Major Royal Jelly Proteins* – MRJPs).

Estas proteínas representam 82% do total das proteínas hidrossolúveis e cerca de 90% do total de proteínas da geleia real (Schmitzová et al., 1998), consistindo de cinco membros principais: MRJP1, MRJP2, MRJP3, MRJP4 e MRJP5 (Ohashi et al., 1997; Schmitzová et al., 1998; Simúth, 2001), com massa molecular relativa de 49 a 87kDa (Scarselli et al., 2005). Segundo Albert e Klaudiny (2004) e Santos et al. (2005) existem também outras três MRJPs (MRJP6, MRJP7 e MRJP8) em bibliotecas de cDNA de cérebro de *A. mellifera* e na secreção da glândula hipofaríngeal. Segundo Klaudiny et al. (1994), Schmitzová et al. (1998), Albert et al. (1999) e Drapeau et al. (2006), nove locos de *Mrjps* (*Mrjps1* – *Mrjps 9*) e um polipeptídeo incompleto (*mrjp-ψ*) foram identificados, e posteriormente Albert e Klaudiny (2007) relataram uma função não-nutricional para a MRJP9, consistindo de uma proteína ancestral às demais, bem como um possível fator imunossintetizante encontrado no veneno das abelhas.

O maior produtor e exportador de geleia real é a China, responsável por aproximadamente 60% da produção mundial, seguida pela Coreia, Taiwan e Japão (Rosmilah et al., 2008). Esta elevada produção é decorrente de gradativas seleções de *A. mellifera* produtoras de geleia real e do manejo efetuado. Segundo Harbo e Rinderer

(2005), a seleção de abelhas com genótipos superiores envolve o uso de técnicas de substituição de rainhas melhoradas, inseminação instrumental e seleção assistida por marcadores moleculares. Contudo, na literatura há poucos dados disponíveis associando marcadores moleculares à produção de geleia real.

A análise de 10 loci microssatélites entre abelhas *A. mellifera* italianas nativas, chinesa-italiana e selecionadas para produção de geleia real foi realizado por Chen et al. (2005). Nesse estudo, foram analisados sete alelos de seis loci relacionados com a produção de geleia real entre abelhas italianas nativas, chinesa-italianas e altamente produtoras de geleia real. Esses autores observaram uma variação de frequência de sete alelos de seis loci (159 pb do A29; 100 pb e 104 pb do A24; 110 pb do A7; 126 pb do A43; 221 pb do A14 e 221 pb do A113) entre as abelhas italianas nativas, chinesa-italianas e altamente produtoras de geleia real. Esses resultados foram confirmados com testes “pairwise”, indicando que esses alelos têm potencial para serem utilizados como marcadores moleculares para produção de geleia real. Utilizando marcadores microssatélites para os loci *Mrjp3*, *Mrjp5* e *Mrjp 8* em abelhas *A. mellifera* africanizadas produtoras de geleia real, Baitala et al. (2010) mostraram que os alelos C, D e E do locus *Mrjp3* estão associados com a produção de geleia real.

1.1. O processo de africanização e a dispersão da *Apis mellifera* africanizada

Com o processo da expansão territorial europeia e a colonização das novas terras descobertas, as abelhas que antigamente ocupavam apenas o Velho Mundo foram introduzidas em locais onde não se tinham registros de existência. Os primeiros ninhos de *A. mellifera* encontrados nas Américas datam do século XVII, no ano de 1621 (Crane, 1990). Citado por Nogueira Neto (1972), quem introduziu a *A. mellifera* no Brasil foi o Padre Antonio Carneiro Aureliano com a colaboração secundária de Paulo Barbosa e Sebastião Clodovil de Siqueira e Mello em março de 1839, proveniente do Porto de Portugal. Até esta data não há relatos de abelhas com ferrão no Brasil, apenas as nativas sem ferrão, ou abelhas indígenas, tais como: mandaçaia (*Melipona quadrifasciata* Lepeletier), tiúba (*Melipona compressipes*), jataí (*Tetragonisca angustula* L.), guarupu (*Melipona bicolor bicolor*), urucu (*Melipona scutellaris* L.), dentre outras (Kerr, 1967).

Em 1845, os colonizadores alemães trouxeram consigo *A. m. mellifera* da Alemanha, introduzindo-as no Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, dando início

à apicultura racional brasileira. Entre 1870 e 1880, Hannemann e Schenck, Hanewin e Brunnet trouxeram as primeiras *A. m. ligustica* para o Sul do Brasil.

Estas abelhas foram introduzidas no Brasil, para ser utilizada a cera branca na confecção de velas para fins religiosos, visto que a cera produzida pelas abelhas nativas, sem ferrão, possui cor marrom, por ser uma mistura de cera e resina, entre outros produtos (Francoy, 2007).

Sendo assim, destacam-se as quatro principais subespécies europeias introduzidas em terras brasileiras: a alemã *A. m. mellifera*, a italiana *A. m. ligustica*, a eslovena *A. m. carnica* e a russa *A. m. caucasica* (Oliveira e Cunha, 2005).

Em meados de 1950, a produção apícola nacional era muito baixa (cerca de 4 a 6 mil toneladas/ano), a maioria dos equipamentos apícolas era importada (centrífugas, tanques, decantadores, estampadoras de cera, desoperculadoras etc.) e o associativismo era praticamente inexistente (De Paula, 2008).

Em 1955, havia um enorme descontentamento com a baixa produtividade de mel das *A. mellifera* no Brasil, que não era condizente com o tamanho do país e com suas características tropicais, propícias à exploração da apicultura. Tal situação chamou a atenção de algumas autoridades brasileiras (Kerr, 1967). Na ocasião, a Argentina apresentava grande destaque internacional, sendo considerada como um dos cinco maiores produtores mundiais de mel, ao passo que o Brasil não figurava nem entre os primeiros vinte países produtores de mel. Assim, por causa do interesse do Governo brasileiro em mudar a situação da apicultura brasileira, o Prof. Dr. Warwick Estevam Kerr dirigiu-se à África, trazendo e introduzido em 1956, as abelhas africanas *A. m. scutellata* (anteriormente conhecidas como *A. m. adansonii*, nome científico usado até aproximadamente 1975, quando o Prof. F. Ruttner propôs a mudança para *A. m. scutellata*), encerrando-se, com a introdução dessa nova abelha, a primeira fase da apicultura brasileira (Gonçalves, 2006).

De todas as rainhas que foram trazidas para o Brasil, 48 sobreviveram, sendo que destas, 26 eram consideradas as mais produtivas (Kerr, 1957; Rinderer et al., 1993). Destas, 35 colônias foram transportadas para uma floresta de Eucalipto no Horto de Camacã, nas proximidades de Rio Claro-SP, para realização de testes e cada uma das colônias teve sua entrada protegida por uma tela excludente de rainhas (Kerr, 1957). Posteriormente, um apicultor visitante retirou as telas excludentes de rainha e quando se tomou conhecimento dos fatos, enxames de 26 colônias haviam abandonado o local, estabelecendo-se como colônias selvagens (Kerr, 1967). Iniciou-se então uma rápida

expansão das abelhas *A. m. scutellata* por todo o Brasil realizando um inter cruzamento com as várias subespécies europeias aqui existentes originando um descendente poli-híbrido, denominado abelha africanizada, tendo predominância das características das abelhas africanas (Kerr, 1957; Gonçalves, 2006).

Embora esses híbridos tenham características próprias, eles se assemelham muito com a subespécie africana (De Jong, 1996). Entre algumas das características predominantemente africanas se destacam a alta capacidade de defesa e adaptação a novos ambientes, elevada capacidade de reprodução com ciclo de vida mais curto, que permite um aumento populacional e consequente aumento de produção (Gonçalves, 1985).

No Brasil, a abelha africanizada apresentou desempenho superior às abelhas europeias presentes no continente. Além da alta capacidade de produção, essa nova abelha apresentou importantes características como rápida adaptação, desenvolvimento populacional, rusticidade, resistência à doenças, prolificidade, eficiência na polinização e maior capacidade de identificação de fonte de alimento (Gonçalves, 1974; Benson, 1985). Por causa destas novas formas de adaptação e expansão, a abelha africanizada rapidamente se espalhou pelas Américas (Fig. 1), colonizando inicialmente o Brasil, seguindo por quase toda a América do Sul, exceto as regiões abaixo do paralelo 35° na Argentina, onde o limite foi provavelmente imposto pelas baixas temperaturas de inverno encontradas nesta região (Kerr e Vencovsky, 1982; Sheppard et al., 1999). Ao Oeste, sua expansão foi limitada pela presença da Cordilheira dos Andes, que impediu a passagem dos enxames em razão das baixas temperaturas. Graça às Cordilheiras, o Chile é o único país da América do Sul que não apresenta abelhas africanizadas em seu território até os dias de hoje (Del Lama et al., 2004). A América Central foi rapidamente colonizada, mesmo com as tentativas frustradas de se criar barreiras que impedissem o avanço dos enxames na região do Panamá (Boreham e Roubik, 1987). Atualmente, ocupam grande parte ou totalidade dos Estados do Texas, Califórnia, Arizona, Novo México e Nevada, no Sul dos Estados Unidos (Alice Pinto et al., 2007).



Figura 1: Mapa da migração de abelhas africanizadas: de São Paulo, Brasil, para os Estados Unidos, realizada em menos de 35 anos (linhas vermelhas indicam os pontos mais distantes de detecção nos anos indicados). Os insetos chegaram ao extremo sul do Texas, em 15 de outubro de 1990, e foram vistos no Arizona em 1993 fonte: Rinderer et al., 1993.

Durante muitos anos foram destacadas as características negativas destas abelhas, provocando o abandono ou redução drástica da atividade pelos apicultores, que muito pouco ou quase nada sabiam sobre seus hábitos, morfologia e comportamento, resultando na falta de técnicas de manejo adequados. Esta visão negativa diminuiu dando destaque para a produtividade dessas abelhas (Gonçalves, 1979; Garcia e Nogueira-Couto, 2005).

O surgimento das abelhas africanizadas no Brasil e as suas consequências na vida dos apicultores, comerciantes e pesquisadores causaram uma grande modificação

no cenário apícola brasileiro, sendo considerado como marco divisório na história da apicultura brasileira (Nogueira-Couto e Couto, 2006).

Após essas mudanças a apicultura está em ampla expansão, tendo destaque como a atividade do agronegócio de maior desenvolvimento, permitindo que o Brasil seja conhecido como produtor e exportador dos produtos apícolas (Faquinello, 2010).

Portanto, o crescimento exacerbado da apicultura nacional despertou o interesse comercial para atividades especializadas como a produção de geleia real, que possui um bom preço de mercado e possibilidade de produção ao longo do ano (Queiroz et al., 2001), incentivando cada vez mais a prática de manejo das abelhas *A. mellifera* africanizadas pelos apicultores objetivando o consumo de seus subprodutos bem como a valorização no mercado nacional e internacional.

1.2. Composição e importância da geleia real

A geleia real é um produto das secreções das glândulas hipofaríngeas e mandibulares, localizadas na cabeça das abelhas operárias (Haydak, 1970), e um dos mais valorizados produtos apícolas, sendo produzida por operárias de 5 a 15 dias de idade, denominadas nutrízes.

Para as abelhas, a geleia real tem três aplicações: alimentação das larvas de operárias de até 90 horas após eclosão; alimentação da rainha durante toda sua vida (Wang, 1965); e alimentação durante toda a fase larval de zangões (Haydak, 1970).

As glândulas hipofaríngeas possuem completo desenvolvimento entre o 5º e o 15º dia de vida das operárias, e secretam proteínas essenciais (Rembold et al., 1974; Takenaka e Kaatz, 1987; Brown, 1989; Garcia et al., 1989; Schmitzová et al., 1998).

A quantidade e atividade de síntese de proteínas dessas glândulas variam de acordo com a idade da operária, possuindo maior período ativo entre o 10º ao 14º dias (Takenaka e Kaatz, 1987; Crailsheim e Stolberg, 1989; Huang e Otis, 1989; Knecht e Kaatz, 1990; Naiem et al., 1999). Após esse período sua mobilidade e volume decrescem rapidamente passando a secretar enzimas como a invertase, período este em que as abelhas tornam-se campeiras (Huang e Otis, 1989).

As secreções que compõem a geleia real possuem características distintas, sendo que, a glândula mandibular secreta um componente branco leitoso e a glândula hipofaríngea produz uma secreção de coloração clara e rica em proteínas (Haydak, 1970; Beetsma, 1979). De modo geral, a geleia real pode ser descrita como um creme

branco-amarelado de aspecto leitoso, fortemente ácido, altamente nitrogenado e com odor e sabor característicos (Chen e Chen, 1995; Melliou e Chinou, 2005; Liu et al., 2008). Possui ainda, densidade de aproximadamente $1,1 \text{ g/cm}^3$ (Lercker et al., 1992) e é parcialmente solúvel em água, sua viscosidade varia de acordo com a idade e também conteúdo de água.

A flexibilidade das glândulas hipofaríngeas, bem como a produção de geleia real mostra que fatores nutricionais ambientais internos como densidade populacional, presença de cria, desempenho de tarefas na colônia, e fatores externos à colônia como forrageamento, interações biológicas e fatores genéticos como a variabilidade influenciam diretamente no desempenho e desenvolvimento de suas atividades (Simpson et al., 1968; Free, 1980; Silva de Moraes e Cruz-Landim, 1984; Robinson, 1995; Pernal e Currie, 2000; Deseyn e Billen, 2005; Suwannapong et al., 2007; Wegener et al., 2009; Sereia et al., 2010), bem como variáveis climáticas como temperatura, umidade relativa e pressão de vapor (Garcia e Nogueira-Couto, 2005; Toledo et al., 2010).

Estudos realizados por Garcia e Nogueira-Couto (2005) compararam a produção de geleia real entre abelhas africanizadas, italianas e descendentes, associada a fatores ambientais. Os resultados indicaram diferenças entre o período de produção e aceitação das larvas transferidas, sendo o melhor período de produção entre fevereiro e março em Jaboticabal, Estado de São Paulo. Contudo, Mouro e Toledo (2004), estudando a produção de geleia real em abelhas africanizadas e cárnicas, observaram que as africanizadas, quando selecionadas para a produção de geleia real, mostraram-se mais eficientes.

Na constituição química da geleia real são encontrados vários compostos como água (50-65%), proteínas (12-18%), carboidratos (15%), lipídios (3-6%, principalmente o 10-hidroxi-2-decenoico), sais minerais (1,5%, como o ferro e cálcio) e vitaminas (principalmente tiamina, niacina, e riboflavina) (Schmitzová et al., 1998; Albert et al., 1999; Schönleben et al., 2007; Viuda-Martos et al., 2008). DeGroot (1953) estudou as exigências de aminoácidos das abelhas. Ele verificou que as abelhas exigem para sua nutrição os mesmos dez aminoácidos que são essenciais para os mamíferos, em níveis que vão de 1,0 a 4,5% de proteína digerível, sendo 3,0% arginina, 2,5% fenilalanina, 1,5% histidina, 4,0% isoleucina, 4,5% leucina, 3,0% lisina, 1,5% metionina, 3,0% treonina, 1,0% triptofano e 4,0% valina.

O triptofano é um aminoácido essencial precursor bioquímico de substâncias fisiologicamente importantes, como a serotonina, a melatonina e a niacina. Zhang et al. (2009), determinaram o conteúdo de triptofano livre e total de amostras de pólen e geleia real, não observando triptofano na forma livre na geleia real, e a quantidade total foi de 1,74 mg/g, níveis menores do que os do pólen, cujo teor total atingiu 2,69 mg/g. Outros aminoácidos foram quantificados por Liming et al. (2009), que encontraram uma média de aminoácidos livres na geleia real fresca de 9,21 mg/g, com a prolina em maior concentração (5,19 mg/g). Quanto ao conteúdo total de aminoácidos na geleia real, a média observada foi de 111,27 mg/g.

Quanto aos componentes lipídicos da geleia real, estudos têm demonstrado predominância de ácidos graxos livres contendo de 8-12 carbonos que são normalmente dicarboxílicos ou hidroxílicos, e de particular interesse é o ácido (E)-10-hidroxi-2-decenóico (10-HDA), que é um ácido graxo específico da geleia real (Krell, 1996). A sua concentração pode ser considerada como um indicador de qualidade ou frescor de geleia real adicionada em produtos. Além do Brasil, apenas quatro países: Austrália, Coreia, Japão e Tailândia especificam a presença deste ácido como pré-requisito de autenticidade da própria geleia real ou da sua adição em produtos (Koshio e Almeida-Muradian, 2003).

Em todo o mundo, dentre os produtos das abelhas, a geleia real está relacionada com longevidade, vida saudável e cura de muitas doenças, sendo utilizada como alimento ou cosmético por mais de 30 anos (Brown, 1989; Chen e Chen, 1995; Münsted e Georgi, 2003). Muitos estudos têm sido realizados, não só em função de seu papel na alimentação das abelhas, mas também por várias propriedades nutritivas. Estudos terapêuticos têm mostrado atuação da geleia real como: antioxidante, antifúngico, antifadiga, inibidor de células cancerígenas, arteriosclerose, redutor do colesterol, da anemia, ativação das funções cerebrais, regeneração dos tecidos e efeitos contra importantes bactérias: *Escherichia coli*, *Salmonella sp*, *Proteus sp*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* (Yatsunami e Echigo, 1985, Kamakura et al., 2001). Além disso, apresenta efeito no aumento da resistência do organismo, combatendo o cansaço físico e mental, fertilidade, entre outros (Münsted e Georgi, 2003).

A geleia real pode ser obtida com relativa facilidade e sua produção pode ser estendida o ano todo, sendo uma excelente opção para os apicultores nos períodos ente floradas e em regiões canavieiras onde o mel produzido possui características organolépticas com pouca aceitação comercial (Garcia et al., 2000; Queiroz et al., 2001;

Nogueira-Couto e Couto, 2006). Apesar do Brasil apresentar condições favoráveis à produção apícola, os produtores ainda possuem níveis variados de tecnologia e experiência prática (Levy et al., 1993), sendo que a profissionalização dos apicultores para a aplicação de técnicas adequadas às abelhas africanizadas levará ao crescimento e à expansão da apicultura brasileira tornando-a competitiva para esta atividade (Sereia et al., 2010), gerando apoio e incentivo para a produção comercial do produto.

1.3. Produção comercial da geleia real

A produção comercial de geleia real possui um elevado custo tanto para as abelhas como para o produtor, porque este produto não é estocado pelas operárias em sua colmeia e sua produção depende efetivamente da alimentação larval. Com isso, em seu habitat natural, a geleia real é produzida pelas operárias nutrizas em maior quantidade quando ocorre a substituição de rainhas ou quando as colônias se preparam para a realização da exameagem reprodutiva, visando à produção de novas rainhas (Haydak, 1970; Garcia et al., 1989; Garcia e Nogueira-Couto, 2005; Nogueira-Couto e Couto, 2006).

Portanto, a produção de geleia real é realizada por estímulos das colônias destinadas ao processo de produção de rainhas, além das condições em que ocorrem naturalmente. Inicialmente, o processo para a obtenção de geleia real necessita de mão de obra especializada, sendo necessário dedicar mais tempo a sua produção do que normalmente é necessário para a produção de outros produtos apícolas como, o mel (Harbo e Rinderer, 2005).

Para a produção comercial, o processo é feito em colônias especiais, denominadas de recria e de mini recria, e em laboratório é realizada a transferência de larvas jovens (menos de 24 horas de idade e máximo de 48 horas), dos favos das determinadas colônias de produção para as cúpulas (realeiras artificiais) que podem ser de cera (natural), plástico ou acrílico (artificiais) (Garcia et al., 2000; Mouro e Toledo, 2004; Garcia e Nogueira-Couto, 2005; Nogueira-Couto e Couto, 2006). O cuidado com as larvas é fundamental, a desidratação e o transporte errado podem ocasionar a morte das mesmas, levando a perdas de produção. A quantidade de geleia real obtida por cúpula varia conforme o tempo que a cúpula é deixada dentro da colônia. Segundo Levy et al. (1993), Barbosa e Martinho (1994) e Queiroz et al. (2001) as maiores produções de geleia real de abelhas *Apis mellifera* são encontradas em coletas efetuadas de 44 a 64

horas após a transferência das larvas. Garcia e Nogueira-Couto (2005), trabalhando com abelhas africanizadas, relatam que a extração da geleia real pode ser realizada em torno de 69 horas após a transferência das larvas, porém, as maiores produções de geleia real são obtidas 72 horas após o processo da transferência (Garcia et al., 1989).

Por ser considerado o maior produtor de geleia real, a China, desde 1980, trabalha na seleção de linhagens de colônias de abelhas *Apis mellifera* produtoras de geleia real, assim obtiveram um aumento na produção anual de 2 kg, em 1980, para 10 kg, em 2003. Para tanto, utilizam técnicas de substituição da rainha, melhoradas de geração a geração por acasalamento isolado, inseminação instrumental e biologia molecular. Nos dias de hoje, o resultado desses esforços vem destacando a China como sendo responsável por 60% da produção mundial, garantindo o posto de maior produtor, oferecendo produção anual de 2.000 toneladas, produção média de 8 kg por colônia/ano ou 300g a cada três dias de coleta (Jianke et al., 2003; Jianke e Aiping, 2005; Sabatini et al., 2009).

Apesar do Brasil apresentar as condições favoráveis à produção apícola, os produtores ainda possuem níveis variados de tecnologia e experiência prática, obtendo diferentes níveis produtivos (Levy et al., 1993). Alguns trabalhos relatam uma grande variação na produção de geleia real para abelhas *Apis mellifera* africanizadas de 188 a 234 mg/cúpula ou 1,68 a 3,96 mg/coleta (Queiroz et al., 2001; Mouro e Toledo, 2004; Garcia e Nogueira-Couto, 2005; Toledo e Mouro, 2005; Faquinello et al. 2011 – no prelo).

O melhoramento genético em qualquer população tem como objetivo o aumento das frequências dos genes desejáveis dos loci de importância econômica por meio da seleção (Bergmann, 2001). Desta forma, o melhoramento genético das abelhas tem como objetivo aumentar a frequência do número de colônias que produzem acima da média da geração a partir da qual foi feita a seleção, visando linhagens que apresentem determinadas características de interesse econômico ao apicultor (Kerr, 1972).

A seleção é baseada na avaliação genética, que depende da estimação dos componentes de (co) variância e dos parâmetros genéticos para identificação das abelhas geneticamente superiores (Faquinello et al., 2011 – no prelo). A seleção de abelhas com genótipos superiores envolve o uso de técnicas de substituição de rainhas melhoradas, inseminação instrumental e seleção assistida por marcadores moleculares (Harbo e Rinderer, 2005).

A rainha é a peça chave no melhoramento, é a única fêmea fértil, responsável por toda postura, e suas qualidades herdáveis, estão intimamente relacionadas com as atividades da colônia (Faquinello et al., 2011– no prelo). Assim, para o apicultor interessa ter todas as suas colônias encabeçadas por rainhas jovens e com características desejáveis, que possam ser transmitidas a sua prole, como longevidade, capacidade de postura de 2.000 a 3.000 ovos por dia, cria homogênea e resistência a doenças (Alber, 1965; Cobey, 2003; Jianke et al., 2004). Todas essas características da rainha são de fundamental importância para manter o potencial de produção da colônia, e podem ser obtidas pela seleção de linhagens apropriadas para a exploração intensiva de mel, polinização, própolis e geleia real (Kerr, 1972).

1.4. Do genoma à Família das proteínas principais da geleia real (MRJPs)

O genoma é o conjunto de genes de uma espécie, ou seja, todo o conjunto de DNA que ele carrega em suas células (Deloukas et al., 1998). A sequência de nucleotídeos destes genes determina a informação genética, a ser transcrita para um mRNA e traduzidas em proteínas que irão realmente desempenhar as funções celulares que mantêm os organismos vivos (Hahn, 1998; Ban et al., 1999). As proteínas são polímeros de aminoácidos que podem agir como enzimas, anticorpos, hormônios, componentes estruturais, receptores celulares, dentre outros. Todas as proteínas são resultados da expressão gênica em uma célula, isto é, o processo de transcrição do gene produzindo uma molécula de RNA mensageiro e o processo de tradução da informação gênica contida na sequência de ribonucleotídeos deste RNA em uma sequência de aminoácidos que irá constituir uma cadeia polipeptídica que passará por modificações pós traducionais formando a proteína (Ban et al., 1999).

Os estudos de sequenciamento do genoma, iniciados nos anos 1990, desenvolveram-se rapidamente e atualmente encontram-se disponíveis as sequências completas de genes de diferentes organismos, como plantas, animais e até mesmo o genoma humano (Silva e Silva et al., 2007). O genoma de *A. mellifera* foi sequenciado pela importância dessas abelhas como polinizadoras e como modelo de estudos do comportamento social. O sequenciamento completo foi publicado em outubro de 2006, pelo consórcio internacional de sequenciamento do genoma da abelha (The Honey Bee Genome Sequencing Consortium, 2006). Com a disponibilidade do genoma sequenciado se tem agora, condições de realizar abordagens de bioinformática

comparativa para se identificar fenômenos exclusivos das abelhas, tanto nos níveis da genômica como da proteômica (Teixeira et al., 2007).

O termo proteômica foi inicialmente introduzido em 1995 e foi definido como sendo as proteínas expressas em um genoma ou tecido (Wilkins et al., 1997). Enquanto o genoma representa a soma de todos os genes de um indivíduo, o proteoma não é uma característica fixa de um organismo, podendo se modificar dependendo das condições e estímulos em que determinado organismo está exposto. O proteoma altera com o estado de desenvolvimento do tecido ou mesmo sob as condições nas quais o indivíduo se encontra (Di Ciero e Bellato, 2002), sendo um conjunto de ferramentas que permite visualizar alterações das proteínas, e que veio para esclarecer melhor os mecanismos bioquímicos e fisiológicos ao nível molecular (Dutt e Lee, 2000).

A proteômica visa o estudo da estrutura, função e o controle dos sistemas biológicos pela análise das várias propriedades das proteínas, incluindo também os estudos da sequência (identidade), abundância, atividade e estruturas das proteínas expressas por uma célula, assim como as modificações e interações sofridas pelas proteínas (Williams e Hochstrasser, 1997). Com as informações advindas dos estudos proteômicos, pode-se analisar qualquer fenômeno que implique modificações no conteúdo proteico de uma célula ou tecido; afinal, o proteoma é o equivalente ao genoma decodificado, tendo todas as proteínas expressas pela célula detentora deste genoma. Neste sentido, a abelha *A. mellifera*, entre os himenópteros, tem sido alvo de estudos com abordagem proteômica (Teixeira et al., 2007), destacando as proteínas MRJPs como foco de estudo e questionamento.

No desenvolvimento larval de *Apis mellifera*, a disponibilidade de nitrogênio pode ser crítica para o rápido crescimento de larvas jovens, bem como para o desenvolvimento da rainha (Drapeau et al., 2006), sendo que algumas regiões das MRJPs podem ser concentradas em aminoácidos ricos em nitrogênio, garantindo elevados níveis estocados de nitrogênio, levantando hipóteses de que as MRJPs têm um importante papel na nutrição das abelhas (Schmitzová et al., 1998).

Os genes das *mrjps* codificam um grupo de proteínas que apresentam uma origem evolutiva comum com as proteínas Yellow da *Drosophila melanogaster* (Albert et al., 1999). O genoma da *Drosophila* codifica pelo menos sete membros da família Yellow (Maleszka e Kucharski, 2000), cujos loci estão envolvidos na pigmentação larval (Walter et al., 1991), ao contrário das *mrjps* que possuem função nutricional das larvas.

Os genes que codificam para as proteínas principais da geleia real começaram a ser identificados nos estudos de Klaudiny et al. (1994) e Albert et al. (1996). Após esses estudos pioneiros, vários trabalhos foram publicados com o objetivo de identificar e caracterizar novos genes codificadores das proteínas MRJPs (Schmitzová et al., 1998; Albert et al., 1999; Albert e Klaudiny, 2004). Estudos realizados por Santos et al., (2005) verificaram em fração sobrenadante da secreção da glândula hipofaríngea de operárias nutrizas de *A. mellifera*, 34 proteínas, sendo que 27 pertencem à família das MRJPs. Várias isoformas das MRJP1, MRJP2, MRJP3, MRJP4 e MRJP5 foram identificadas neste estudo, como também a presença das MRJP6, MRJP7 e MRJP8.

Sendo a MRJP1 a glicoproteína dominante da geleia real, representa 48% do total de proteínas solúveis (Simúth et al., 2004), bem como a MRJP3, que existe em cinco isoformas e juntamente com as MRJP2 e MRJP5 são consideradas as reservas biológicas de nitrogênio para o rápido desenvolvimento das abelhas (Majtán et al., 2006).

Por análises de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e de sequenciamento de DNA foram observados que os diferentes alelos dos genes que codificam as proteínas MRJP3 e MRJP5 diferem em extensão como resultado de um número variável de unidades básicas repetidas em uma região desses genes (Albert et al., 1999). Os autores atribuíram que o polimorfismo destas proteínas é consequência da presença de uma região com número variado de sequências repetitivas em tandem (VNTR- *Variable Number of Tandem Repeats*). Investigações nas diferenças moleculares em quatro tipos de MRJP3 e em dois tipos de MRJP5 mostraram que o polimorfismo dessas proteínas está ligado com a variabilidade de tamanho da sequência VNTR, que é determinada geneticamente, em ambas as regiões repetitivas entre abelhas na mesma colônia (Schmitzová et al., 1998).

Portanto, pode-se observar que as MRJPs são bem caracterizadas em *A. mellifera* (Albert et al., 1996; 1999; Schmitzová et al., 1998; Albert e Klaudiny, 2004; Drapeau et al., 2006). No entanto, dados na literatura sobre o uso das MRJPs como marcadores moleculares em estudos de estrutura genética de populações e como marcadores de seleção associados ao melhoramento da produção de geleia real ainda são escassos (Baitala, 2007).

REFERÊNCIAS

- Alber M.A. (1965) A study of queen-rearing methods, *Bee World* 46, 25-31.
- Albert S., Klaudiny J., Simúth J. (1996) Newly discovered features of the updated sequence of royal jelly protein RJP57-1, longer repetitive region on C-terminus and homology to *Drosophila melanogaster* yellow protein, *J. Apicult. Res.* 35, 63–68.
- Albert S., Klaudiny J., Simúth J. (1999) Molecular characterization of MRJP3, highly polymorphic protein of honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly, *Insect Biochem. Molec.* 29, 427–434.
- Albert S., Klaudiny J. (2004) The MRJP/yellow protein family of *Apis mellifera*: identification of new members in the EST library, *J. Insect Physiol.* 50, 51–59.
- Albert S., Klaudiny J. (2007) MRJP9, an ancient protein of the honeybee MRJP family with non-nutritional function, *J. Apicult. Res.* 46, 99–104.
- Alice Pinto M., Sheppard W.S., Johnston J.S., Rubink W.L., Coulson R.N., Schiff N.M., Kandemir I., Patton J.C. (2007) Honey bees (Hymenoptera: Apidae) of African origin exist in non-africanized areas of the southern United States: evidence from mitochondrial DNA, *Ann. Entomol. Soc. Am.* 100, 289-295.
- Baitala T.V. (2007) Análise genética das proteínas principais da geléia real (MRJPs) em abelhas *Apis mellifera*, africanizadas produtoras de geléia real, Ph.D. Thesis, Universidade Estadual de Maringá, PR, Brazil, 88p.
- Baitala T.V., Faquinello P., Toledo V.A.A., Mangolin C.A., Martins E.N., Rúvolo-Takasusuki M.C.C. (2010) Potential use of major royal jelly proteins (MRJPs) as molecular markers for royal jelly production in Africanized honeybee colonies, *Apidologie* 41, 160–168.
- Ban N., Nissen P., Hansen J., Capel M., Moore P.B., Steitz T.A. (1999) Placement of protein and RNA structures into a 5 Å - resolution map of the 50S ribosomal subunit, *Nature* 400, 841-847.
- Barbosa S.B.P., Martinho M.R. (1994) Produção de geléia real em abelhas *Apis mellifera* L, Caderno Ômega da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Série Zootecnia, Recife.
- Benson K. (1985) Africanized honey bees: their tactics of conquest, *Am. Bee J.* 125, 435-437.
- Beetsma J. (1979) The process of queen-worker differentiation in the honeybee, *Bee World* 60, 24-39.
- Bergmann J.A.G. (2001) Avaliação genética, in: Pereira J.C.C., (ed.) Melhoramento genético aplicado à produção animal, FEPMVZ, pp. 502-515.

- Boreham M.M., Roubik D.W. (1987) Population change and control of Africanized honeybees in the Panama canal area, *Bull. Entomol. Soc. Am.* 33, 34-9.
- Brown R. (1989) Hive products: pollen, propolis and royal jelly, *Bee World* 70, 109-117.
- Cobey S. (2003) The extraordinary honey bee mating and a simple field dissection of the spermatheca – part 1, *Am. Bee J.* 143, 67-69.
- Chambó E.D.; Garcia R.C.; Oliveira N.T.E.; Chiréa A. (2009) Polinização em genótipos de girassol pela ação de insetos polinizadores, *Varia Scientia* 09, 131-139.
- Chen L.C., Chen S.Y. (1995) Changes in protein components and storage stability of royal jelly under various conditions, *Food Chem.* 54, 195–200.
- Chen S., Li J., Zhong B., Su S. (2005) Microsatellite analysis of royal jelly producing traits of Italian honeybee (*Apis mellifera ligustica*), *Chin. J. Genet.* 32, 1037–1044.
- Chiari W.C., Toledo V.A.A., Rúvolo-Takasusuki M.C.C., Attencia V.M; Costa F.M., Kotaka C.S., Sakaguti E.S., Magalhães H.R. (2005) Floral biology and behavior of Africanized honeybees *Apis mellifera* in soybean (*Glycine max* L. Merrill), *Braz. Arch. Biol. Technol.* 48, 367 – 378.
- Chiari W.C., Toledo V.A.A., Hoffmann-Campo C.B., Rúvolo-Takasusuki M.C.C., Arnaut de Toledo T.C.S.O., Lopes T.S. (2008) Pollination by *Apis mellifera* in transgenic soy (*Glycine max* (L.) Merrill) Roundup Ready[™] cv. BRS 245 RR and conventional cv. BRS 133/polinizacao por *Apis mellifera* em soja transgenica [*Glycine max* (L.) Merrill] Roundup Ready[™] cv. BRS 245 RR e convencional cv. BRS 133, *Acta Sci. Anim. Sci.* 30, 267-271.
- Crailsheim K., Stolberg E. (1989) Influence of diet, age and colony condition upon intestinal proteolytic activity and size of the hypopharyngeal glands in the honeybee (*Apis mellifera* L.), *J. Insect Physiol.* 35, 595-602.
- Crane E. (1990) Bees and beekeeping: science, practice and world resources, Heinemann Newnws, Oxford, New York.
- De Groot A.P. (1953) Protein and amino acid requirements of the honey bee (*Apis mellifera*), *Phys. Comp. Oec.* 3, 197-285.
- De Jong D. (1996) Africanized honey bees in Brazil, forty years of adaptation and success, *Bee World* 77, 67-70.
- De Paula J. (2008) Mel do Brasil: as exportações brasileiras de mel no período de 2000/2006 e o papel do Sebrae, SEBRAE, Brasília.
- Di Ciero L., Bellato C.M. (2002) Proteoma: avanços recentes em técnicas de eletroforese bidimensional e espectrometria de massa, *Biotecnol. Ciênc. Desenvol.* 29, 158-164.

- Del Lama M.A., Souza R.O., Durán X.A.A., Soares A.E.E. (2004) Clinal variation and selection on MDH allozymes in honeybees in Chile, *Hereditas*, 140, 149-153.
- Deloukas P., and 64 Others. (1998) A physical map of 30,000 human genes, *Science* 282, 744–746.
- Deseyn J., Billen J. (2005) Age-dependent morphology and ultrastructure of the hypopharyngeal gland of *Apis mellifera* workers (Hymenoptera, Apidae), *Apidologie* 36, 49-57.
- Dutt M.J., Lee K.H. (2000) Proteomic analysis, *Curr. Opin. Biotechnol.* 11, 176-179.
- Drapeau M.D., Albert S., Kucharski R., Prusko C., Maleszka R. (2006) Evolution of the yellow/major royal jelly protein family and the emergence of social behavior in honey bees, *Genome Res.* 16, 1385–1394.
- Faquinello, P. (2010) Heterogeneidade de variâncias e interação genótipo - ambiente na avaliação genética em abelhas *Apis mellifera* africanizadas para produção de geleia real, Ph.D. Thesis, Universidade Estadual de Maringá, PR, Brazil, 77 p.
- Faquinello P., Toledo V.A.A., Martins E.N., Oliveira C.A.L., Sereia M.J., Costa-Maia F.M., Rúvolo-Takasusuki M.C.C. (2011) Parameters for royal jelly production in Africanized honeybees, *Sociobiol.* 57, 1-15.
- Francoy T.M. (2007) Variabilidade genético – morfológica em populações neotropicais de *Apis mellifera*, Ph.D. Thesis, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, SP, Brazil, 163p.
- Free J.B. (1980) A organização social das abelhas (*Apis*), EDUSP, São Paulo.
- Free J.B. (1993) Insect pollination of crops, Academic Press, London.
- Garcia R.C., Nogueira-Couto R.H., Malerbo-Souza D.T. (1989) Efeitos do fornecimento de farelo de trigo sobre o desenvolvimento da glândula hipofaríngea e produção de geleia real em colméias de *Apis mellifera*, *Ciênc. Zootec.* 4, 6-8.
- Garcia R.C., Malerbo-Souza D.T., Nogueira-Couto R.H. (2000) Cúpulas comerciais para produção de geleia real e rainhas em colméias de abelhas *Apis mellifera*, *Sci. Agric.* 57, 367-370.
- Garcia R.C., Nogueira-Couto R.H. (2005) Produção de geleia real por abelhas *Apis mellifera* italianas, africanizadas e descendentes de seus cruzamentos, *Acta Sci. Anim. Sci.* 27, 17–22.
- Garcia-Amoedo L.H., Almeida-Muradian L.B. (2007) Physicochemical composition of pure and adulterated royal jelly, *Quím. Nova* 30, 257–259.
- Gonçalves L.S. (1974) The introduction of the african bees (*Apis mellifera adansonii*) into Brazil and some comments on their spread in South America, *Am. Bee J.* 114, 414-419.

- Gonçalves L.S. (1979) Genetic improvement of *Apis mellifera* and technological developments in Brazil, *Apiacta* 14, 43-48.
- Gonçalves L.S. (1985) Africanized bees, in: Morse R., Hopper T. (Ed.), *The illustrated encyclopedia of beekeeping*, New York: E.P. Dutton, pp. 54-55.
- Gonçalves L.S. (2006) Desenvolvimento e expansão da apicultura no Brasil com abelhas africanizadas, *Revista SEBRAE* 3, 14-16.
- Greenleaf S.S., Kremen C. (2006) Wild bees enhance honey bees' pollination of hybrid sunflower, *PNAS* 103, 13890-13895.
- Hahn S. (1998) The role of TAFs in RNA polymerase II transcription, *Cell* 95, 579-582.
- Harbo J.R., Rinderer T.E. (2005) Breeding and genetics of honeybees, US Department of Agriculture, *Agriculture Handbook No. AH-335*.
- Haydak M.H. (1970) Honey bee nutrition, *Annu. Rev. Entomol.* 15, 143-156.
- Huang Z.Y., Otis G.W. (1989) Factors determining hypopharyngeal gland activity of worker honey bees, *Insectes Soc.* 36, 264-276.
- Jansen D.H. (1980) *Ecologia vegetal nos trópicos*, EDUSP, São Paulo.
- Jianke L., Shenglu C., Boxiong Z., Songrun S. (2003) Optimizing royal jelly production. Good queens are a must!, *Am. Bee J.* 143, 221-223.
- Jianke L., Zihong Y., Aiping W. (2004) Historical evolution of chinese apitherapy and health care - part II of II parts, *Am. Bee J.* 144, 357-360.
- Jianke L., Aiping W. (2005) Comprehensive technology for maximizing royal jelly production, *Am. Bee J.* 145, 661-664.
- Kamakura M., Mitani N., Fukuda T., Fukushima M. (2001) Antifatigue effect of fresh royal jelly in mice, *J. Nutri. Sci. Vitaminol.* 47, 394-401.
- Kerr W.E. (1957) Introdução de abelhas africanas no Brasil, *Brasil Apic.* 3, 211-213.
- Kerr W.E. (1967) The history of introduction of African bees to Brazil, *S. Afr. Bee J.* 39, 3-5.
- Kerr W.E. (1972) Melhoramento em abelhas, in: Camargo J.M.F. (Ed.), *Manual de apicultura*, Agronômica Ceres, pp. 97-115.
- Kerr W.E., Vencovsky R. (1982) Melhoramento genético em abelhas - I. Efeito do número de colônias sobre o melhoramento, *Rev. Bras. Genet.* 2, 219-285.

- Koshio S., Almeida-Muradian L.B. (2003) Aplicação da CLAE para determinação do ácido 10 hidróxi-2-decenóico (10-HDA) em geléia real pura e adicionada a mel brasileiro, *Quím. Nova* 25, 670-673.
- Klaudiny J., Hanes J., Kulifajova J., Albert S., Simúth J. (1994) Molecular cloning of two cDNAs from the head of the nurse honey bee (*Apis mellifera* L.) coding for related proteins of royal jelly, *J. Apicult. Res.* 33, 105–111.
- Knecht D., Kaatz H.H. (1990) Patterns of larval food production by hypopharyngeal glands in adult worker honey bee, *Apidologie* 21, 457–468.
- Krell R. (1996) Value-added product from beekeeping, FAO, Agricultural Services Bulletin, 124.
- Levy P.S., Silva R.M.B., Paranhos B.A.J., Moreti A.C.C.C. (1993) Influência do tempo entre a transferência das larvas e a colheita sobre a produção de geléia real de abelhas africanizadas (*Apis mellifera*), *Bol. Ind. Anim.* 50, 113-117.
- Lercker G., Caboni M.F., Vecchi M.A., Sabatini A.G., Nanetti A. (1992) Caratterizzazione dei principali costituenti della gelatina reale, *Apicoltura* 8, 27–37.
- Liu J.R., Yang Y.C., Shi L.S. et al. (2008) Antioxidant properties of royal jelly associated with larval age and time of harvest, *J. Agric. Food Chem.* 56, 11447-11452.
- Liming W., Jinhui Z., Xiaofeng X. et al. (2009) Fast determination of 26 amino acids and their content changes in royal jelly during storage using ultra-performance liquid chromatography, *J. Food Comp. Anual* 22, 242-249.
- Maleszka R., Kucharski R. (2000) Analysis of drosophila yellow-B cDNA reveals a new family of proteins related to the royal jelly proteins in the honeybee and to an orphan protein in an unusual bacterium *Deinococcus radiodurans*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 270, 773-776.
- Majtán J., Kováčová E., Bíliková K., Simúth J. (2006) The immunostimulatory effect of the recombinant apalbumin 1–major honeybee royal jelly protein–on TNF α release, *Int. Immunopharm.* 6, 269-278.
- Melliou E., Chinou I. (2005) Chemistry and bioactivity of royal jelly from Greece, *J. Agric. Food Chem.* 53, 8987-8992.
- Mouro G.F., Toledo V.A.A. (2004) Evaluation of *Apis mellifera* Carniolan and Africanized honey bees in royal jelly production, *Braz. Arch. Biol. Technol.* 47, 469-476.
- Münsted K., Georgi R.V. (2003) Royal jelly – a miraculous product from the bee hive?, *Am. Bee J.* 143, 647-650.
- McGregor S.E. (1976) Insect pollination of cultivated crop plants, *Agriculture Handbook*, Washington.

- Naiem E.S., Hrassnigg N., Crailsheim K. (1999) Nurse bees support the physiological development of young bees (*Apis mellifera* L.), *J. Comp. Physiol.* 169, 271-279.
- Nogueira Neto P. (1972) Notas sobre a história da apicultura no Brasil, in: Camargo J.M.F. (Ed.), *Manual de apicultura, Agronômica Ceres*, pp. 17-32.
- Nogueira-Couto R.H., Couto L.A. (2006) *Apicultura: manejo e produtos*, 3e ed., FUNEP, Jaboticabal.
- Oliveira M.L., Cunha J.A. (2005) Abelhas africanizadas *Apis mellifera scutellata* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera: Apidae: Apinae) exploram recursos na floresta amazônica?, *Acta Amazôn.* 35, 389 – 394.
- Ohashi K., Natori S., Kubo T. (1997) Change in the mode of gene expression of the hypopharyngeal gland cells with an age-dependent role change of the worker honeybee *Apis mellifera* L., *Europ. J. Biochem.* 249, 797-802.
- Pernal S.F., Currie R.W. (2000) Pollen quality of fresh and 1-year-old single pollen diets for worker honey bees (*Apis mellifera* L.), *Apidologie* 31, 387-409.
- Queiroz M.L., Barbosa S.B.P., Azevedo M. (2001) Produção de geléia real e desenvolvimento de abelhas *Apis mellifera*, na região semi-árida de Pernambuco, *Rev. Bras. Zootec.* 30, 449-453.
- Rembold H., Czoppelt C.H., Rao P.J. (1974) Effect of juvenile hormone treatment on caste differentiation in honeybee *Apis mellifera*, *J. Insect Physiol.* 20, 1193-1202.
- Rinderer T.E., Oldroyd B.P., Sheppard W.S. (1993) Africanized bees in the U.S., *Scient. Amer.* 12, 52-58.
- Robinson G.E. (1995) Hormonal and genetic regulation of division of labor in honey bee colonies: You're only as old as you feel, *Am. Bee J.* 135, 169-170.
- Rosmilah M., Shahnaz M., Patel G., Lock J., Rahman D., Masita A., Noormalin A. (2008) Characterization of major allergens of royal jelly *Apis mellifera*, *Trop. Biomed.* 25, 243–251.
- Scarselli R., Donadio E., Giuffrida M.G., Fortunato D., Conti A., Balestreri E., Felicioli R., Pinzauti M., Sabatini A.G., Felicioli A. (2005) Towards royal jelly proteome, *Proteomics* 5, 769-776.
- Schmitzová J., Kludiny J., Albert S., Schröder W., Schreckengost W., Hanes J., Júdová J., Simúth J. (1998) A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L., *Cell. Mol. Life Sci.* 54, 1020–1030.
- Schönleben S., Sickmann A., Mueller M.J., Reinders J. (2007) Proteome analysis of *Apis mellifera* royal jelly, *Anal. Bioanal. Chem.* 389, 1087–1093.

- Sabatini A.G., Marcazann G.L., Caboni M.F., Bogdanov S., Almeida-Muradian L.B. (2009) Quality and standardisation of royal jelly, *Journ. ApiProd. ApiMed. Science* 1, 16-21.
- Santos K.S., Dos Santos L.D., Mendes M.A., De Souza B.M., Malaspina O., Palma M. S. (2005) Profiling the proteome complement of the secretion from hypopharyngeal gland of Africanized nurse-honeybees (*Apis mellifera* L.), *Insect Biochem. Molec. Biol.* 35, 85–91.
- Sereia J.M., Toledo V.A.A., Rúvolo-Takasusuki M.C.C., Sekine E.S., Faquinello P., Costa-Maia F.M. (2010) Viabilidade financeira da produção de geleia real com abelhas africanizadas suplementadas com diferentes nutrientes, *Acta Sci. Anim. Sci.* 32, 467-474.
- Silva de Moraes R.L.M., Cruz-Landim C. (1984) Influência da densidade populacional no comportamento dos núcleos das glândulas hipofaríngeas de *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae), *Naturalia* 9, 27-33.
- Silva e Silva A.M., Corrêa G.C., Reis E.M. (2007) Proteômica-uma abordagem funcional do estudo do genoma, *Saúde & Amb. Rev.* 2, 01-10.
- Simúth J. (2001) Some properties of the main protein of honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly, *Apidologie* 32, 69–80.
- Simúth J., Bíliková K., Kováčová E., Kuzmová Z., Schroder W. (2004) Immunochemical approach to detection of adulteration in honey: physiologically active royal jelly protein stimulating TNF- alpha release is a regular component of honey, *J. Agric. Food Chem.* 52, 2154-2158.
- Simpson J., Riedel I.B.M., Wilding N. (1968) Invertase in the hypopharyngeal glands of the honeybee, *J. Apicult. Res.* 7, 29-36.
- Suwannapong G., Seanbualuang P., Wongsirl S. (2007) A histochemical study of the hypopharyngeal glands of the dwarf honey bees *Apis andreniformis* and *Apis florea*, *J. Apicult. Res.* 46, 260-263.
- Shepherd A.J., Gorse D., Thornton J.M. (1999) Prediction of the location and type of b-turn types in proteins using neural networks, *Protein Sci.* 8, 1045-1055.
- Takenaka T., Kaatz H.H. (1987) Protein synthesis by hypopharyngeal glands of worker honey bees, in: Eder J., Rembold H. (Ed.), *Chemistry and biology of social insects*, München: Peperny, pp.166-167.
- Teixeira R.R., Calábria L.K., Espindola F.S. (2007) Estudos proteômicos da abelha *Apis mellifera* e dos produtos da colméia, *Biosci. J.* 23, 125-133.
- Toledo V.A.A., Fritzen A.E.T., Neves C.A., Rúvolo-Takasusuki M.C.C., Sofia S.H., Terada Y. (2003) Plants and pollinating bees in Maringá, state of Paraná, Brazil, *Braz. Arch. Biol. Technol.* 46, 705–710.

- Toledo V.A.A., Mouro G.F. (2005) Produção de geleia real com abelhas africanizadas selecionadas e cárnicas híbridas, *Rev. Bras. Zootec.* 34, 2085-2092.
- Toledo V.A.A., Neves C.A., Alves E.M., Oliveira J.R., Ruvolo-Takasusuki M.C.C., Faquinello P. (2010) Produção de geleia real em colônias de abelhas africanizadas considerando diferentes suplementos proteicos e a influência de fatores ambientais, *Acta Sci. Anim. Sci.* 32, 101-108.
- The HoneyBee Genome Sequencing Consortium (2006) Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*, *Nature* 443, 931-949.
- Viuda-Martos M., Ruiz-Navajas Y., Fernández-López J., Pérez-Álvarez J.A. (2008) Functional properties of honey, propolis, and royal jelly, *J. Food Sci.* 73, 117-124.
- Walter M.F., Black B.C., Afshar G., Kermabon A.Y., Wright, T.R.F., Biessmann H. (1991) Temporal and spatial expression of the yellow gene in correlation with cuticle formation and DOPA decarboxylase activity in *Drosophila* development, *Dev. Biol.* 147, 32-45.
- Wang D. (1965) Growth rates of young queen and worker-honeybee larvae, *J. Apicult. Res.* 4, 3-5.
- Wegener J., Lorenz M.W., Bienefeld K. (2009) Physiological consequences of prolonged nursing in the honey bee, *Insectes. Soc.* 56, 85-93.
- Williams K.L., Hochstrasser D.F. (1997) Introduction to the proteome, in: Wilkins M.R., Williams K.L., Appel R.D., Hochstrasser D.F. (Ed.), *Proteome research: new frontiers in functional genomics*, Springer, pp 1–12.
- Wilkins M.R., Lindskog I., Gasteiger E., Bairoch A., Sanchez J.C., Hochstrasser D.F., Appel R.D. (1997) Detailed peptide characterisation using peptidemass - a world-wide web accessible tool, *Electrophoresis* 18, 403-408.
- Yatsunami K., Echigo T. (1985) Antibacterial activity of royal jelly, *Bull. Fac. Agric.* 25, 13-22.
- Zhang L., Wang Z., Sagotsky J.A., Deisboeck T.S. (2009) Multiscale agent-based cancer modeling, *J. Math. Biol.* 58, 545–559.

Avaliação de marcadores microssatélites MRJPs em colônias de *Apis mellifera* africanizadas selecionadas para a produção de geleia real

Resumo

A identificação de marcadores moleculares, em especial as proteínas principais da geleia real (MRJPs), para abelhas melhores produtoras contribui com o desenvolvimento de novas estratégias de programas de melhoramento para produção de geleia real. Nesse estudo, foi avaliada a variabilidade genética dos locos *Mrjp3*, *Mrjp5* e *Mrjp8* de *A. mellifera* africanizadas selecionadas para produção de geleia real e a fixação dos alelos durante o processo de reprodução selecionada. Os três locos analisados foram polimórficos e produziram um total de 16 alelos, tendo sido identificados quatro novos alelos para o locus *Mrjp5*. O número de alelos efetivos para o locus *Mrjp3* foi de 3,81 alelos. A heterozigosidade média observada foi de 0,4905 indicando um elevado grau de variabilidade genética para os locos analisados. Os elevados valores de Fis para os locos *Mrjp3*, *Mrjp5* e *Mrjp8* (0,4096; 0,1102 e 0,2847 respectivamente) indicam excesso de homozigotos. A seleção de rainhas *A. mellifera* africanizadas para produção de geleia real está mantendo os alelos *mrjp3* C, D e E, apesar do alelo C ter ocorrido com baixa frequência. Os valores de heterozigosidade e de Fis mostram que a variabilidade genética das rainhas está diminuindo para os locos analisados, havendo excesso de homozigotos, mas o grande número de zangões que fecundam as rainhas dificulta a produção de genótipos homozigotos para o locus *Mrjp3*. Será necessário realizar acasalamentos pelo método de inseminação instrumental com genótipos conhecidos dos zangões, para aumentar a eficiência do programa de melhoramento de abelhas *A. mellifera* africanizadas e contribuir com a qualidade e eficiência de apiários comerciais produtores de geleia real.

Palavras-chave: proteínas principais da geleia real/ *Mrjp3*/melhoramento genético/ polimorfismo

Evaluation of microsatellite markers MRJPs in colonies of Africanized *Apis mellifera*
selected for the production of royal jelly

Abstract

The identification of molecular markers, especially the major proteins of royal jelly (MRJPs) for bee producing better contributes to the development of new strategies for breeding programs to produce royal jelly. In this study the genetic variability of loci *Mrjp3*, *Mrjp5* and *Mrjp8* africanized *A. Mellifera* selected for royal jelly production and the fixation of alleles during the process of selective breeding were evaluated. The three analyzed loci were polymorphic and produced a total of 16 alleles, having been identified four new alleles for *Mrjp5*. The number of effective alleles for the *Mrjp3* locus was 3.81 alleles. The average observed heterozygosity was 0.4905 indicating a high degree of genetic variability of the loci analyzed. The high values of F_{IS} for *Mrjp3*, *Mrjp5* and *Mrjp8* (0.4096; 0.1102; 0.2847, respectively) indicate an excess of homozygotes. The selection of queens of Africanized *A. mellifera* for royal jelly the production is maintaining the *Mrjp3* *C*, *D* and *E* alleles, although the *C* allele occurred with low frequency. The *Mrjp5* locus is also being selected. The heterozygosity and F_{IS} values show that the genetic variability of the queens is decreasing for the analyzed loci, with the occurrence of excess of homozygotes, but the large number of drones that fertilize the queens jeopardize the production of homozygous genotypes for MRJP3. It will be necessary to conduct matings using instrumental insemination with known genotype of drones to increase the efficiency of Africanized *A. mellifera* bees improvement programs and contribute to quality and efficiency of royal jelly commercial production in apiaries.

Key words: major royal jelly proteins; MRJP3; genetic improvement; polymorphisms

1. Introdução

A geleia real é uma secreção cremosa, sintetizada e secretada pelas glândulas mandibulares e hipofaríngeas, localizadas na cabeça das abelhas operárias nutrízes entre o quinto e o 15º dia de vida (Haydak, 1970; Knecht e Kaatz, 1990; Schmitzová et al., 1998).

De modo geral, a geleia real apresenta aspecto leitoso, fortemente ácido, altamente nitrogenado e com odor e sabor característico (Chen e Chen, 1995; Melliou e Chinou, 2005; Liu et al., 2008). Possui densidade de aproximadamente 1,1 g/cm³ (Lercker et al., 1992) e é parcialmente solúvel em água, sua viscosidade varia de acordo com a idade e também conteúdo de água. É um produto apícola amplamente reconhecido pela sua composição complexa contendo vários elementos minerais, proteínas, aminoácidos, esteroides, fenóis, carboidratos, vitaminas, lipídios, além de outras substâncias desconhecidas (Garcia-Amoedo e Almeida-Muradian, 2007).

Para as abelhas a geleia real é uma fonte natural de aminoácidos essenciais, lipídios, vitaminas, acetilcolina e outros nutrientes (Schmitzová et al., 1998), além de possuir destacada importância no seu processo de reprodução e desenvolvimento. Toda larva fêmea com menos de três dias de idade pode se desenvolver como operária ou rainha, dependendo da alimentação fornecida pelas abelhas nutrízes. Após o período de três dias somente larvas escolhidas pelas operárias a se tornarem rainhas recebem a geleia real como fonte exclusiva de alimentação (Winston, 1992; Drapeau et al., 2006).

Dentre os diversos produtos das abelhas, a geleia real tem sido alvo de inúmeros estudos, não só em função de seu papel na alimentação das abelhas, mas também por várias outras propriedades. De forma geral, os efeitos terapêuticos da geleia real têm mostrado atuação como ação antibiótica, antifúngica, anti-inflamatória, atuação no aumento da resistência do organismo, atua também na regeneração dos tecidos, além de reduzir os níveis plasmáticos de colesterol e triglicérides e atividade anti-hipertensiva (Yatsunami e Echigo, 1985; Oka et al., 2001; Matsui et al., 2002; Koshio e Almeida-Muradian, 2003; Münsted e Georgi, 2003; Kohno et al., 2004).

A geleia real contém várias proteínas com peso molecular que varia entre 47 e 80kDa (Hanes e Simúth, 1992), que constituem o grupo de proteínas principais da geleia real (*Major Royal Jelly Proteins* - MRJPs), que juntas constituem entre 82 e 90% do total de proteínas da geleia. As MRJPs contêm uma quantidade relativamente alta de aminoácidos, característica que suporta a hipótese de que as MRJPs têm um importante papel na nutrição das abelhas (Schmitzová et al., 1998).

Vários estudos foram realizados para identificar, caracterizar e sequenciar as MRJPs em *A. mellifera* (Klaudiny et al., 1994; Albert et al., 1996; 1999a; 1999b; Schmitzová et al., 1998; Albert e Klaudiny, 2004; Drapeau et al., 2006).

Foram identificadas nove proteínas da família MRJP, sendo que cinco destas proteínas (MRJP1, MRJP2, MRJP3, MRJP4 e MRJP5) representam aproximadamente 82% do conteúdo total da geleia real, e cujos genes codificadores estão localizados no cromossomo 11 (Drapeau et al., 2006). Estudos de sequenciamento revelaram que os genes que codificam as proteínas MRJP3 e MRJP5 contêm regiões de sequências repetitivas hipervariáveis (VNTR, *Variable Number of Tandem Repeats*) com diferentes tamanhos, sequências e localizações, que podem resultar em alta variabilidade genética e, portanto, podem ser usados para fazer genotipagens de indivíduos em diferentes estudos envolvendo *A. mellifera* (Schmitzová et al., 1998; Albert et al., 1999b).

Pelo método de análise de microssatélite, Albert et al. (1999b) detectaram alta variabilidade do locus *Mrjp3* que é consequência da presença de uma região com número variado de sequências repetitivas localizada na região C-terminal da região codificadora da MRJP3. Esta grande variabilidade genética encontrada na MRJP3, devido à região repetitiva, revela um grande potencial de utilizar essa proteína como marcador genético para variados estudos em abelhas *A. mellifera* (Beye et al., 1998).

Apesar do grande número de estudos relacionados com a família MRJP de *A. mellifera*, pouco se sabe do uso potencial desses marcadores moleculares em estudos de genética de populações e como marcadores de seleção associados à produção de geleia real.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar a variabilidade genética dos locos *Mrjp3*, *Mrjp5* e *Mrjp8* de *A. mellifera* africanizadas produtoras de geleia real, para a identificação de marcador molecular associado com a produção de geleia real. Esses resultados contribuirão com o incremento de novas estratégias para aumentar a produção de geleia real em apiários comerciais.

2. Material e Métodos

2.1. Coleta das amostras biológicas

Para este estudo foram utilizadas operárias nutrízes de *A. mellifera* africanizadas provenientes do Apiário Central da Fazenda Experimental Iguatemi da Universidade Estadual de Maringá (FEI/UEM).

Em 2006, foram selecionadas 15 rainhas que apresentaram as maiores produções de geleia real. A partir dessas matrizes selecionadas, foram produzidas rainhas filhas que são mantidas até a presente data, no Apiário Central (FEI/UEM).

As nutrízes foram coletadas de sete colônias matrizes, alojadas em colmeias do tipo Langstroth, destinadas à produção de geleia real. As rainhas dessas caixas foram acasaladas naturalmente e avaliadas para a produção de geleia real, apresentando alta produção.

De cada colônia foram coletadas 20 nutrízes, sendo que as mesmas foram selecionadas por meio de coloração/idade e coletadas dos favos. Essas abelhas foram imediatamente sacrificadas, armazenadas em frascos fechados, devidamente identificados, e congeladas a -20°C para as análises laboratoriais.

2.2. Extração e quantificação do DNA genômico

O DNA genômico foi extraído de 20 operárias nutrízes de cada matriz analisada, totalizando 140 indivíduos.

O método para extração do DNA total, descrito por Bardakci e Skibinski (1994), foi adaptado para ser utilizado para *A. mellifera*. O tórax foi macerado em 400 μL do tampão de lise (50 mM de Tris-HCl pH 8,0; 50 mM de EDTA pH 8,0; 100 mM de NaCl e 1% de SDS) e 10 μL de proteinase K (5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). As amostras foram mantidas a 55°C durante 4 horas. A purificação do DNA foi realizada com solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). A precipitação dos ácidos nucleicos foi feita usando acetato de sódio (3M) e etanol absoluto gelado na proporção de 0,25:2,5 em relação ao volume recuperado, permanecendo incubado a -20°C *overnight*. O DNA precipitado foi separado por centrifugação a 10.300 $\times\text{g}$ por 10 minutos. O DNA foi ressuscitado em tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) e tratado com 3 μL de RNase (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

A integridade e quantificação do DNA foram avaliadas em gel de agarose 0,8% com tampão TAE 1X (Tris, Ácido acético, EDTA, pH 8,0). A quantidade de DNA

presente em cada amostra foi estimada por meio de comparação com concentrações conhecidas e graduadas de DNA-padrão (phago λ). Os géis foram corados com banho de brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g/mL}$) e as bandas de DNA visualizadas sob luz ultravioleta; a imagem foi capturada pelo sistema L-PIX HE molecular imaging.

2.3. Amplificação de PCR

As reações de PCR foram realizadas usando *primers* específicos sintetizados para amplificar as regiões repetitivas do locus *mrjp3* (Albert et al., 1999b) e *mrjp5* (Albert et al., 1999a) e para amplificar o locus *mrjp8* (Klaudiny et al., 1994): *mrjp3* (*forward*: ATG TAA TTT TGA AGA ATG AAC TTG; *reverse*: TGT AGA TGA CTT AAT GAG AAA CAC); *mrjp5* (*forward*: AGA CTC TTC AAA CGG TCG TTG C; *reverse*: CTG TAA TTT CAT ACT TAA AGC CAT) e *mrjp8* (*forward*: TTG CGA AGT GAA TGG ATC; *reverse*: TTA TTT TTG GCA ACC ACT TCG).

Em um volume de reação de 20 μL foi utilizado tampão Tris-KCl 1X (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50 mM), 0,5 μM de cada *primer*, 0,1 mM de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), uma unidade de Taq Platinum DNA Polimerase (Invitrogen). Para otimização das reações de amplificações foram adotadas concentrações específicas de MgCl_2 e do DNA molde em relação ao *primer* utilizado (Tab. I).

Dessa forma, para os *primers* MRJP3, MRJP5 e MRJP8 foram adotadas as concentrações de 1,7; 1,5; e 3,0 mmol/L de MgCl_2 , respectivamente. A concentração do DNA molde adotada para o *primer* MRJP3 foi de 10 ng/ μL e para os *primers* MRJP5 e MRJP8 de 20 ng/ μL .

As reações de amplificação foram realizadas em um termociclador Techne TC-512 e as condições de amplificações para os *primers* MRJP3 e MRJP5 foram baseadas na metodologia descrita por Albert e Schmitz (2002); o processo de amplificação foi iniciado por uma desnaturação inicial em 94°C por dois minutos, seguido de 30 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 54°C e 1 min a 72°C. A reação foi completada com uma extensão final de 10 minutos a 72°C.

Para a amplificação do DNA utilizando o *primer* MRJP8, as condições foram baseadas na metodologia descrita por Albert e Klaudiny (2004); o processo de amplificação foi iniciado por uma desnaturação em 94°C por cinco minutos, seguido de 35 ciclos de 50s a 94°C, 50s a 50°C e 100s a 72°C. A reação foi completada com uma extensão final de 10 minutos a 72°C.

Os produtos das ampliações foram separados em gel de agarose 2%, preparado com tampão TBE 0,5X (44,5 mM Tris, 44,5 mM ácido bórico e 1 mM EDTA). Para o preparo deste gel foi utilizado 50% de agarose comum e 50% de agarose MetaPhor (Cambrex). A separação foi realizada a 60 Volts por 5 horas. Os géis foram corados com banho de brometo de etídio (0,5 µg/mL) e as bandas de DNA amplificadas foram visualizadas sob luz ultravioleta. A imagem foi capturada pelo sistema L-PIX HE molecular imaging. Para estimar o tamanho dos alelos amplificados foi utilizado o marcador de peso molecular de 100 pares de base (Invitrogen).

2.4. Análise dos dados

As análises dos dados moleculares envolveram a interpretação das bandas de DNA genômico obtida, e a estatística F (Fis, Fit e Fst), estatística H de Nei (1973) e o número de alelos efetivos foram estimados com o programa POPGENE 1.31 (Yeh et al., 1999).

3. Resultados

Os três locos analisados, que codificam para as proteínas MRJP3, MRJP5 e MRJP8, foram polimórficos num total de 16 alelos (Tab. II). O número de alelos efetivos foi de 3,81 para a MRJP3; 3,13 para MRJP5 e 2,56 para MRJP8 com valor médio de 3,17 alelos.

Os valores obtidos pelo teste do χ^2 são apresentados na Tabela III, e das sete colônias analisadas, para o locus *Mrjp3* todas apresentaram desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg; para o locus *Mrjp5* cinco colônias e para o locus *Mrjp8* três colônias.

Os valores da heterozigosidade, média observada nos três locos analisados, foram de 0,4905; indicando um elevado grau de diversidade genética para as amostras analisadas (Tabela IV).

Os valores de Fis apresentados na Tabela V, indicam que as colônias analisadas apresentam excesso de homozigotos.

Na Tabela VI, são apresentados os genótipos das rainhas e dos prováveis zangões que originaram as operárias analisadas. Houve grande contribuição dos zangões para a variabilidade genética detectada nos locos das MRJPs analisadas, porque as rainhas foram fecundadas por no mínimo dois e no máximo cinco zangões.

4. Discussão

Baitala et al. (2010), analisando os locos *Mrp3*, *Mrjp5* e *Mrjp8* em *Apis mellifera* africanizada selecionadas para a produção de geleia real observaram sete alelos para a MRJP3 com 410 pb (A); 460 pb (B); 480 pb (C); 510 pb (D); 530 pb (E); 580 pb (F); 610 pb (G). O locus *Mrjp5* apresentou seis alelos com tamanhos de 570 pb (A); 590 pb (B); 610 pb (C); 620 pb (D); 680 pb (E); 720 pb (F).

No presente estudo, houve uma alteração de alelos detectados para as MRJP3 e MRJP5. Pode ser observado que os alelos A e B da MRJP3 detectados anteriormente por Baitala et al. (2010) não foram encontrados nas rainhas analisadas (Tab. II). Para a MRJP5 foram detectados os alelos D, E e F observados por Baitala et al. (2010) e quatro novos alelos, denominados de H (650 pb), I (750 pb), J (780 pb) e K (800 pb). Será necessário realizar o sequenciamento desses alelos para comparação com bases de dados para verificar se foram descritos anteriormente ou são alelos novos. Na Figura I, observam-se os fragmentos amplificados para os três locos analisados e seus respectivos alelos.

A MRJP8 apresentou os mesmos alelos descritos por Baitala et al. (2010) (Tab. II). Os alelos D e E do locus *Mrjp3* apresentaram as maiores frequências 0,3357 e 0,3107 respectivamente (Tab. II), mostrando que no processo de seleção de rainhas produtoras de geleia real esses alelos estão sendo mantidos, apenas o alelo C que também tem potencial como marcador para produção de geleia real teve uma frequência pequena (0,0321).

O número de alelos efetivos para MRJP3 (3,81) mostra que os alelos que estão sendo selecionados para esse locus (C, D e E), provavelmente, são aqueles que apresentam maior contribuição para a produção de geleia real.

O equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foi testado como mostra a Tabela III. Esses resultados indicam que o locus *Mrjp3* está sob seleção, não foi observado EHW nas sete colônias analisadas. O locus *Mrjp5* e *Mrjp8* provavelmente não estão sendo selecionados, pois foi observado EHW nas colônias 3, 5 e 6 para a *Mrjp5* e 2, 6 e 7 para a *Mrjp8* (Tab.III).

Tais resultados permitem inferir que a MRJP5 e a MRJP8, provavelmente, não estão sendo selecionadas, diferentemente da MRJP3, que está passando pelo processo de seleção.

Será importante em novos estudos continuar analisando os genótipos das MRJP3 e MRJP5 em conjunto com a produção de geleia real. Será importante ainda,

desenvolver novas investigações em nível de expressão gênica ou proteômica para identificar o real papel dessas proteínas para a geleia real.

Os valores estimados de heterozigidade observada indicam que há alto grau de polimorfismo para os três loci analisados (Tab. IV), enquanto que os valores de Fis mostram que os três loci estão com excesso de homozigotos (Tab. V). Apenas os alelos *H*, *I*, *J* e *K* do loco *Mrjp5* não apresentaram deficiência de heterozigotos, e o alelo *A* do locus *Mrjp8*.

Os valores de heterozigidade obtidos foram menores quando comparados com os resultados de Baitala et al. (2010), em um estudo inicial do processo de seleção de abelhas *A. mellifera* africanizadas produtoras de geleia real da UEM. No experimento de Baitala et al. (2010), a heterozigidade média observada foi de 0,5827 para a MRJP3, MRJP5 e MRJP8. No presente estudo, o valor médio de heterozigidade observada foi de 0,4905. Portanto, a seleção para a MRJPs e a produção de geleia real está levando a homozigose desses loci, em especial a MRJP3 que apresentou o menor valor de heterozigidade observada, 0,4286 (Tab. IV).

Outro estudo que avaliou os valores de heterozigidade de abelhas melíferas sob processo de seleção para produção de geleia real foi realizado por De la Rúa et al. (2001). Nesse caso a heterozigidade média observada para oito loci microssatélites de *A. mellifera* das Ilhas Canárias variaram de 0,312 a 0,432.

Os valores elevados de heterozigidade podem ser explicados pelo número de zangões que acasalaram com as rainhas selecionadas (Tab. VI). Nos acasalamentos naturais as fêmeas de *A. mellifera* podem copular com até 17 zangões, aumentando a sua variabilidade genética. Nas sete rainhas analisadas, no presente estudo, foram identificados genes de dois a cinco prováveis zangões por rainha (Tab. VI).

Mesmo ocorrendo os acasalamentos naturais as rainhas estão sendo levadas a homozigose, que pode ser verificado pelos valores elevados de Fis. A MRJP3 apresentou os maiores valores de Fis mostrando que o processo de seleção está fixando os alelos de interesse para a produção de geleia real.

A seleção reprodutiva altera as características genéticas de uma determinada população que acaba sendo influenciada pelo processo de transmissão desses genes de geração em geração (Falconer, 1987). Além disso, é importante manter um grau de variabilidade genética, porque estes polimorfismos dentro de uma população resultam em maior potencial de resposta para o melhoramento seletivo, principalmente em criações de animais para produção (Page e Kerr, 1991).

Finalmente, torna-se necessário iniciar o processo de fecundação instrumental, ou seja, cada fêmea ser fecundada com o sêmen de apenas um zangão. Essa metodologia é importante porque os acasalamentos naturais promovem o aumento da variabilidade genética, introduzindo novos alelos que não são de interesse para o melhoramento. Os resultados da heterozigosidade mostram essa interferência, como pode ser observado nos altos valores detectados e que correspondem aos alelos introduzidos pelos zangões (Tab. VI).

A manutenção das matrizes de *A. mellifera* africanizadas, melhores produtoras de geleia real, permitirá o estabelecimento do programa de melhoramento genético, possibilitando o fornecimento de rainhas para apiários comerciais, melhorando e valorizando a exploração deste produto de alto valor comercial.

A seleção de rainhas de *A. mellifera* africanizadas, melhores produtoras de geleia real, está mantendo os alelos *C*, *D* e *E* do loco *Mrjp3*, sendo que os alelos *D* e *E* desse locus estão em maior frequência nas rainhas analisadas. A inseminação instrumental com um único zangão é necessária para a obtenção de rainhas homozigotas para os alelos da MRJP3 de interesse e estabelecimento do programa de melhoramento de abelhas *A. mellifera* africanizadas para produção de geleia real.

Referências

- Albert S., Klaudiny J., Simúth J. (1996) Newly discovered features of the updated sequence of royal jelly protein RJP57-1, longer repetitive region on C-terminus and homology to *Drosophila melanogaster* yellow protein, J. Apicult. Res. 35, 63–68.
- Albert S., Bhattacharya D., Klaudiny J., Schmitzová J., Simúth J. (1999a) The family of major royal jelly proteins and its evolution, J. Mol. Evol. 49, 290-297.
- Albert S., Klaudiny J., Simúth J. (1999b) Molecular characterization of MRJP3, highly polymorphic protein of honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly, Insect Biochem. Molec. 29, 427–434.
- Albert S., Schmitz J. (2002) Characterization of major royal jelly protein-like DNA sequences in *Apis dorsata*, J. Apicult. Res. 41, 75-85.
- Albert S., Klaudiny J. (2004) The MRJP/yellow protein family of *Apis mellifera*: identification of new members in the EST library, J. Insect Physiol. 50, 51–59.
- Baitala T.V., Faquinello P., Toledo V.A.A., Mangolin C.A., Martins E.N., Ruvolo-Takasusuki M.C.C. (2010) Potential use of major royal jelly proteins (MRJPs) as molecular markers for royal jelly production in Africanized honeybee colonies, Apidologie 41, 160-168.

- Bardakci F., Skibinski D.O. (1994) Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification, *Heredity* 73, 117-123.
- Beye M., Neumann P., Schmitzova J., Kloudiny J., Albert S., Simuth J., Felder M., Moritz R.F.A. (1998) A simple non-radioactive DNA fingerprinting method for identification of patrines in honeybee colonies, *Apidologie* 29, 255–263.
- Chen L.C., Chen S.Y. (1995) Changes in protein components and storage stability of royal jelly under various conditions, *Food Chem.* 54, 195–200.
- De La Rúa P., Galián J., Serrano J., Moritz R.F.A. (2001) Genetic structure and distinctness of *Apis mellifera* L. populations from the Canary Islands, *Molec. Ecol.* 10, 1733-1742.
- Drapeau M.D., Albert S., Kucharski R., Prusko C., Maleszka R. (2006) Evolution of the yellow/major royal jelly protein family and the emergence of social behavior in honey bees, *Genome Res.* 16, 1385–1394.
- Falconer, D.S. (1987) *Introdução à genética quantitativa*, Viçosa, UFV, Minas Gerais.
- Garcia-Amoedo L.H., Almeida-Muradian L.B. (2007) Physicochemical composition of pure and adulterated royal jelly, *Quím. Nova* 30, 257–259.
- Hanes J., Simúth J. (1992) Identification and partial characterization of the major jelly protein of the honeybee (*Apis mellifera* L.), *J. Apicult. Res.* 31, 22-26.
- Haydak M.H. (1970) Honey bee nutrition, *Annu. Rev. Entomol.* 15, 143-156.
- Knecht D., Kaatz H.H. (1990) Patterns of larval food production by hypopharyngeal glands in adult worker honey bee, *Apidologie* 21, 457–468.
- Koshio S., Almeida-Muradian L.B. (2003) Aplicação da CLAE para determinação do ácido 10 hidróxi-2-decenoico (10-HDA) em geléia real pura e adicionada a mel brasileiro, *Quím. Nova* 25, 670-673.
- Kohno K., Okamoto I., Sano O., Arai N., Iwaki K., Ikeda M., Kurimoto M. (2004) Royal jelly inhibits the production of proinflammatory cytokines by activated macrophages, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 138-145.
- Kludiny J., Hanes J., Kulifajova J., Albert S., Simúth J. (1994) Molecular cloning of two cDNAs from the head of the nurse honey bee (*Apis mellifera* L.) coding for related proteins of royal jelly, *J. Apicult. Res.* 33, 105–111.
- Lercker G., Caboni M.F., Vecchi M.A., Sabatini A.G., Nanetti A. (1992) Caratterizzazione dei principali costituenti della gelatina reale, *Apicoltura* 8, 11-21.
- Liu J.R., Yang Y.C., Shi L.S., Peng C.C. (2008) Antioxidant properties of royal jelly associated with larval age and time of harvest, *J. Agric. Food Chem.* 56, 11447-11452.

- Matsui T., Ykiyoshi A., Doi S., Sugimoto H., Yamada H., Matsumoto K. (2002) Gastrointestinal enzyme production of bioactive peptides from royal jelly protein and their antihypertensive activity, *J. Nutr. Biochem.* 13, 80-86.
- Melliou E., Chinou I. (2005) Chemistry and bioactivity of royal jelly from Greece, *J. Agric. Food Chem.* 53, 8987-8992.
- Münsted K., Georgi R.V. (2003) Royal jelly – a miraculous product from the bee hive?, *Am. Bee J.* 143, 647-650.
- Nei M. (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 3321-3323.
- Oka H., Emori Y., Kobayashi N., Hayashi Y., Nomoto K. (2001) Suppression of allergic reactions by royal jelly in association with the restoration of macrophage function and improvement of Th1/Th2 cells responses, *Int. Immunopharmacol.* 1, 521-532.
- Page R.E., Kerr W.E. (1991) Honey bee genetics and breeding, in: Spivak M., Fletcher D.J.C., Breed M.D., (Ed.), *The "African" honey bee*, Colorado: Westview Press, pp.157-86.
- Schmitzová J., Klaudivy J., Albert S., Schröder W., Schreckengost W., Hanes J., Júdová J., Simúth J. (1998) A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L., *Cell. Mol. Life Sci.* 54, 1020–1030.
- Winston M.L. (1992) The biology and management of Africanized honey bees, *Ann. Rev. Entomol.* 37, 173-193.
- Yatsunami K., Echigo T. (1985) Antibacterial activity of royal jelly, *Bull. Fac. Agric.* 25, 13-22.
- Yeh F.C., Boyle T.Y.Z., Xiyan J.M. (1999) POPGENE Version 1.31: Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis, University of Alberta and Center for International Forestry Research.

Legenda de tabelas

Tabela I - Condições da PCR para a amplificação dos lócus das MRJPs de abelhas *A. mellifera* africanizadas

Lócus	<i>Mrjp3</i>		<i>Mrjp5</i>		<i>Mrjp8</i>	
MgCl ₂ (mmol/L)	1,7		1,5		3,0	
DNA (ng/μL)	10,0		20,0		20,0	
Condições da PCR	T (°C)	Tempo	T (°C)	Tempo	T (°C)	Tempo
	Desnaturação	94 30 s	94 30 s	94 30 s	94 50 s	
Anelamento	54 30 s	54 30 s	50 50 s			
Extensão	72 1 min.	72 1 min.	72 100 s			

Tabela II – Locus das MRJPs de *A. mellifera* africanizadas produtoras de geleia real analisados mostrando o tamanho dos alelos em pares de bases (pb) e as frequências alélicas (f) obtidas para as sete colônias avaliadas

Alelo	<i>Mrjp3</i>		<i>Mrjp5</i>		<i>Mrjp8</i>	
	pb	F	Pb	f	PB	f
<i>A</i>	410 *	-	570 *	-	360 *	0,0143
<i>B</i>	460 *	-	590 *	-	370 *	0,1786
<i>C</i>	480 *	0,0321	610 *	-	390 *	0,5321
<i>D</i>	510 *	0,3357	620 *	0,2643	420 *	0,2750
<i>E</i>	530 *	0,3107	680 *	0,4393	-	-
<i>F</i>	580 *	0,1786	720 *	0,2357	-	-
<i>G</i>	610 *	0,1429	-	-	-	-
<i>H</i>	-	-	650	0,0036	-	-
<i>I</i>	-	-	750	0,0250	-	-
<i>J</i>	-	-	780	0,0143	-	-
<i>K</i>	-	-	800	0,0179	-	-

*descritos por Baitala et al. (2010)

Tabela III – Teste do qui-quadrado (χ^2) para verificar o equilíbrio de Hardy-Weinberg dos loci analisados por colônia de *A. mellifera* africanizadas. GL= graus de liberdade; P = probabilidade

Colônia	<i>Mrjp3</i>	<i>Mrjp5</i>	<i>Mrjp8</i>
Col. 1	$\chi^2 = 22,41$ GL= 1 P= 0,000002	$\chi^2 = 42,88$ GL= 10 P= 0,000005	$\chi^2 = 1,91$ GL= 3 P= 0,590386
Col. 2	$\chi^2 = 25,92$ GL= 6 P= 0,000230	$\chi^2 = 5,30$ GL= 1 P= 0,021285	$\chi^2 = 8,28$ GL= 3 P= 0,040488
Col. 3	$\chi^2 = 15,30$ GL= 6 P= 0,01801	$\chi^2 = 3,73$ GL= 3 P= 0,291503	$\chi^2 = 2,95$ GL= 6 P= 0,814983
Col. 4	$\chi^2 = 12,31$ GL= 3 P= 0,006387	$\chi^2 = 18,99$ GL= 10 P= 0,040307	$\chi^2 = 2,32$ GL= 3 P= 0,507901
Col. 5	$\chi^2 = 13,78$ GL= 3 P= 0,003207	$\chi^2 = 3,10$ GL= 6 P= 0,795217	$\chi^2 = 0,43$ GL= 1 P= 0,509893
Col. 6	$\chi^2 = 12,00$ GL= 3 P= 0,007364	$\chi^2 = 1,85$ GL= 10 P= 0,997351	$\chi^2 = 3,27$ GL= 1 P= 0,070525
Col. 7	$\chi^2 = 5,20$ GL= 3 P= 0,157724	$\chi^2 = 11,65$ GL= 3 P= 0,0088686	$\chi^2 = 3,52$ GL= 1 P= 0,060373

*p>0,05 – está em equilíbrio de Hardy-Weinberg

*p<0,05 – não está em equilíbrio de Hardy-Weinberg

Tabela IV – Valores de heterozigosidade observada (Ho) e esperada (He) por locus das colônias de abelhas *A. mellifera* africanizadas analisadas

Locus	(Ho)	(He)
<i>Mrjp3</i>	0,4286	0,7285
<i>Mrjp5</i>	0,6071	0,6848
<i>Mrjp8</i>	0,4357	0,6113
Média	0,4905	0,6749
Desvio padrão	0,1011	0,0593

Tabela V – Índice de fixação (Fis) para os loci das MRJPs de *A. mellifera* africanizadas produtoras de geleia real analisadas

Alelo/locus	<i>Mrjp3</i>	<i>Mrjp5</i>	<i>Mrjp8</i>
<i>A</i>	-	-	-0,0145
<i>B</i>	-	-	0,3183
<i>C</i>	0,4260	-	0,1250
<i>D</i>	0,3274	0,1918	0,4805
<i>E</i>	0,6165	0,1155	-
<i>F</i>	0,5617	0,0484	-
<i>G</i>	0,0667	-	-
<i>H</i>	-	-0,0036	-
<i>I</i>	-	-0,0256	-
<i>J</i>	-	-0,0145	-
<i>K</i>	-	-0,0182	-
Total	0,4188	0,1077	0,2847

Tabela VI – Genótipos das sete rainhas de *A. mellifera* africanizadas produtoras de geleia real analisadas e dos prováveis zangões que participaram da fecundação

Colônia	<i>Mrjp3</i>		<i>Mrjp5</i>		<i>Mrjp8</i>	
	Rainha	Zangão	Rainha	Zangão	Rainha	Zangão
Col. 1	<i>DE</i>	<i>D;E</i>	<i>DE</i>	<i>D;E;K;I;J</i>	<i>CD</i>	<i>A;C;D</i>
Col. 2	<i>DE</i>	<i>E;F;G</i>	<i>EF</i>	<i>E;F</i>	<i>BC</i>	<i>B;C;D</i>
Col. 3	<i>DE</i>	<i>D;E;F;G</i>	<i>DE</i>	<i>D;E;F</i>	<i>BC</i>	<i>A;B;C;D</i>
Col. 4	<i>CE</i>	<i>C;E;G</i>	<i>DE</i>	<i>D;E;F;I;J</i>	<i>BC</i>	<i>B;C</i>
Col. 5	<i>EF</i>	<i>D;E;F</i>	<i>DE</i>	<i>D;E;F;I</i>	<i>BC</i>	<i>B;C</i>
Col. 6	<i>DE</i>	<i>C;D;E;F</i>	<i>DE</i>	<i>D;E;F;H;J</i>	<i>CD</i>	<i>C;D</i>
Col. 7	<i>FG</i>	<i>E;F;G</i>	<i>EF</i>	<i>D;E;F</i>	<i>CD</i>	<i>C;D</i>

Legenda de figuras

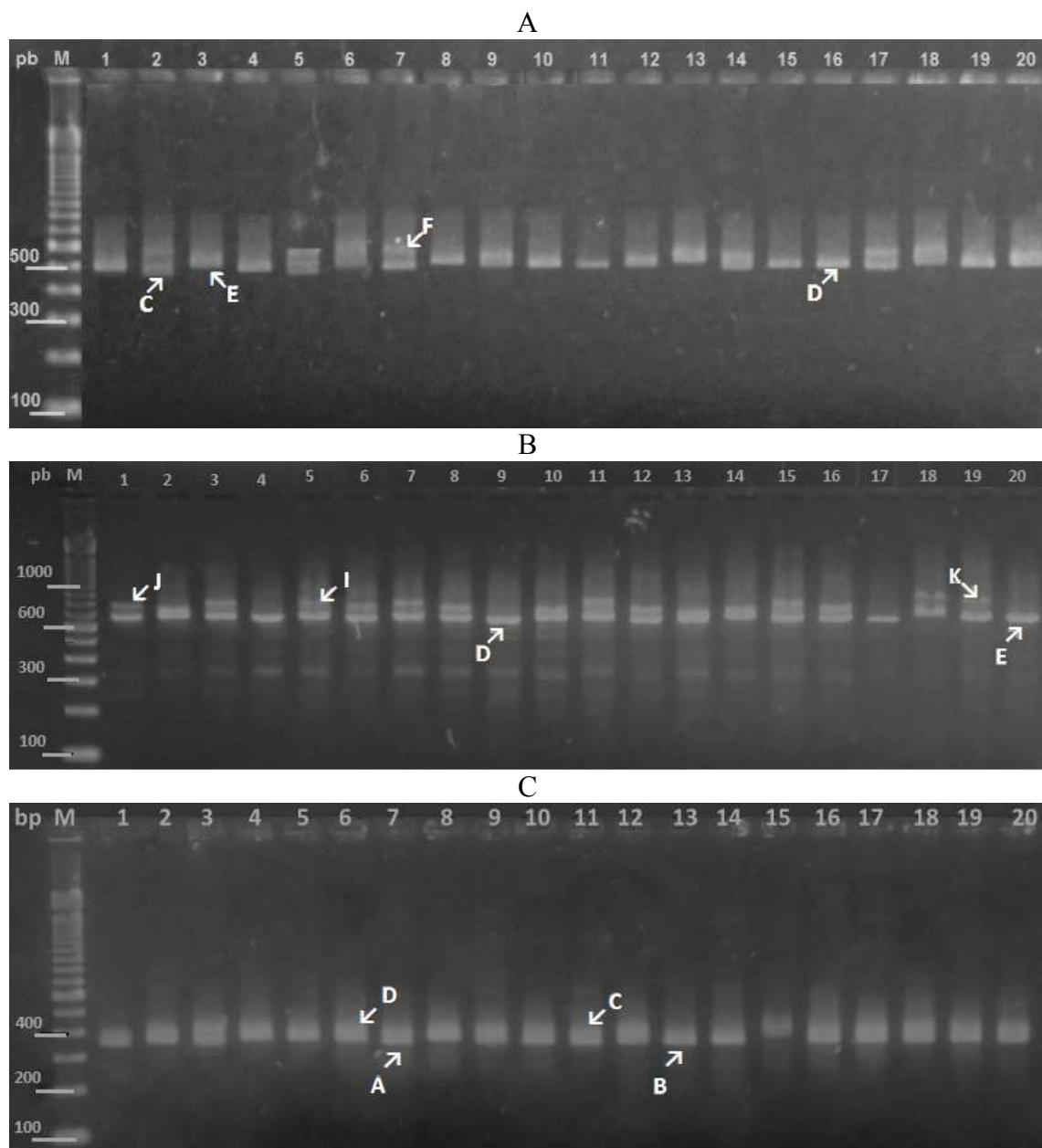


Figura 1 – Perfil eletroferético dos locos das MRJPs de abelhas *Apis mellifera* africanizadas. (A) Fragmentos amplificados para o locus *Mrjp3*; (B) Fragmentos amplificados para o loco *Mrjp5*; (C) Fragmentos amplificados para o locus *Mrjp8*. M= Marcador de peso molecular de DNA (DNA Ladder-Invitrogen). As setas e as letras indicam os alelos identificados para cada locus.