

CARACTERÍSTICAS DAS RAINHAS DE *Apis mellifera* L. ORIUNDAS DE LARVAS COM DIFERENTES IDADES. II. MORFOMETRIA MULTIDIMENSIONAL⁽¹⁾

JOSÉ ALEXANDRE FELIZOLA DINIZ FILHO^(2,5), ETELVINA CONCEIÇÃO ALMEIDA DA SILVA⁽³⁾, JOSÉ CHAUD NETTO^(4,5) e MARIA LUISA TELES MARQUES FLORÊNCIO ALVES⁽³⁾

RESUMO: Modelos de estatística multidimensional foram utilizados para estudar características morfométricas de rainhas de *Apis mellifera* L. obtidas a partir de larvas com diferentes idades (12, 24, 36 e 48 horas). Diferenças significativas entre os grupos de idade foram encontradas para todos os caracteres analisados e, embora o intervalo de idade analisado não tenha propiciado a formação de indivíduos intermediários entre rainha e operária (intercasta) existe uma relação não linear entre os padrões de variação multidimensional (expressos em termos de tamanho e forma) e a idade.

Termos para indexação: morfometria multidimensional, *Apis mellifera*, determinação de castas, componentes principais, variáveis canônicas.

Characteristics of Apis mellifera L. queens obtained from larvae with different ages. II. Multivariate morphometrics

SUMMARY: Multivariate statistical methods were used to evaluate morphometric patterns of honey bee (*Apis mellifera* L.) queens obtained from larvae of different ages (12, 24, 36 and 48 hours). Significant differences between age groups were found for all characters analysed and, although intercaste individuals were not produced (due to the short age interval), there is a straight nonlinear relationship between multivariate morphometric patterns (in terms of size and shape variation) and age.

Index terms: multivariate morphometrics, *Apis mellifera*, caste differentiation, principal components, canonical variates.

INTRODUÇÃO

Em *Apis mellifera* L., como em todos os Hymenoptera eussociais, existe uma diferenciação morfo-fisiológica entre os indivíduos da colônia,

formando castas que possuem papéis distintos na organização social (MICHENER, 1974 e BRIAN, 1980). Em *Apis*, ovos de mesma constituição genética dão origem a larvas que, em função da quantidade e qualidade do alimento recebido, irão se diferenciar em rainhas férteis ou

- (1) Projeto IZ 14-012/88. Recebido para publicação em dezembro de 1993.
- (2) Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás - Campus II, Goiânia, GO.
- (3) Centro de Apicultura Tropical, Instituto de Zootecnia, Pindamonhangaba, SP.
- (4) Departamento de Biologia, IBRC/UNESP, Rio Claro, SP.
- (5) Bolsista do CNPq.

operárias estéreis (MICHENER, 1974). Existem diversas hipóteses para explicar a formação dessas castas (HAYDAK, 1943; WEAVER, 1962/1966 e SHUEL & DIXON, 1959), mas de fato o mecanismo de atuação dessas variações nutricionais sobre as larvas ainda não está bem elucidado (BROUWERS et al., 1987). Sabe-se, entretanto, que a variação nos diversos nutrientes recebidos pelas larvas associam-se a variações na dosagem de hormônio juvenil (HJ) (WEAVER, 1966; WIRTZ, 1974; BEETSAMA, 1979 e BROUWERS et al., 1987).

O ponto crítico da diferenciação rainha-operária ainda não foi definido de forma exata, mas diversos estudos têm demonstrado que variações no balanço dos nutrientes, em função da idade da larva, produzem resultados variados em termos de diferenciação rainha-operária (WEAVER, 1962; MITSUI et al., 1964; TABER & POOLE, 1973). As larvas de operárias irão se diferenciar em rainhas enquanto que larvas com três dias ou mais irão formar indivíduos intermediários entre as castas ou irão permanecer como operárias. Vários estudos têm avaliado características morfológicas e fisiológicas desses indivíduos intermediários (WEAVER, 1962; DIETZ, 1967; MITSUI et al., 1964; TABER & POOLE, 1973).

Neste trabalho utilizaram-se técnicas de análise estatística multidimensional a fim de avaliar a variação morfológica entre rainhas de *A. mellifera* produzidas a partir de larvas com diferentes idades (12 a 48 horas). Nesse intervalo de idade não são esperados indivíduos intermediários entre rainhas e operárias mas é possível que as variações encontradas permitam avaliar os aspectos biológicos do processo de diferenciação rainha-operária e mesmo obter resultados experimentais úteis para controle de rainhas produzidas em escala comercial.

MATERIAL E MÉTODOS

Para este estudo, um total de 31 rainhas de *A. mellifera* foram obtidas através do método da enxertia, a partir de uma colônia do Centro de Apicultura Tropical, em Pindamonhangaba, SP. As larvas foram transferidas em quatro grupos de idade: 12, 24, 36 e 48 horas.

Em cada rainha foram mensurados, com o auxílio de ocular micrométrica acoplada a estereomicroscópio, 13 caracteres morfológicos. Esses caracteres, expressos em milímetros e seguidos de um código alfanumérico de identificação foram os seguintes: 1. comprimento do escapo da antena (ESCP); 2. largura máxima da cabeça (LARG); 3. distância interorbital inferior (DIST); 4. comprimento da asa anterior (CPAN); 5. largura da asa anterior (LGAN); 6. comprimento da célula radial da asa anterior (CEL); 7. comprimento da porção apical da célula (PCEL); 8. comprimento da asa posterior (CPOS); 9. largura da asa posterior (LPOS); 10. comprimento do

fêmur posterior (CFEM); 11. comprimento da tibia posterior (CTIB); 12. comprimento do basitarso posterior (CBAS). 13. largura do basitarso posterior (LBAS). Também foi registrado o peso ao nascer de cada rainha (14. PESO).

Inicialmente, uma Análise de Variância (ANOVA) (SOKAL & ROHLF, 1981) foi utilizada afim de verificar a existência de diferenças significativas entre as rainhas obtidas a partir de cada um dos quatro grupos de larvas. O experimento é desbalanceado, uma vez que o número de rainhas obtidas a partir de cada grupo de idade foi diferente (quadro 1). O pressuposto de homocedasticidade foi testado através do teste de Bartlett (SOKAL & ROHLF, 1981).

Quadro 1. Valores médios dos 14 caracteres analisados nas rainhas obtidas a partir de larvas com diferentes idades (em horas)

Caracteres	Idades			
	12	24	36	48
PESO (g)	0,188	0,163	0,154	0,141
ESCP (mm)	1,347	1,334	1,272	1,241
LARG (mm)	3,941	3,882	3,813	3,828
DIST (mm)	2,497	2,407	2,369	2,400
CPAN (mm)	9,875	9,750	9,713	9,481
LGAN (mm)	3,247	3,189	3,197	3,081
CEL (mm)	3,297	3,232	3,263	3,166
PCEL (mm)	1,759	1,757	1,763	1,641
CPOS (mm)	4,756	4,589	4,591	4,509
LPOS (mm)	2,166	2,075	2,063	2,050
CFEM (mm)	3,244	3,075	3,072	3,041
CTIB (mm)	3,794	3,646	3,650	3,588
CBAS (mm)	2,384	2,314	2,263	2,222
LBAS (mm)	1,138	1,079	1,059	1,047
n	8	7	8	8

Afim de descrever os padrões gerais de variação morfológica entre as rainhas, foram aplicadas duas técnicas de estatística multidimensional (HARRIS, 1975; NEFF & MARCUS, 1980 e JOHNSON & WICHERN, 1992). Em primeiro lugar, uma Análise de Componentes Principais (ACP) foi aplicada ao conjunto total de dados afim de descrever as principais direções de variação de autovalores e autovetores de uma matriz de correlação (ou covariância) entre os p caracteres originais, produzindo combinações lineares destes, ortogonais entre si, mas de modo que a maior parte da variação existente seja descrita nos primeiros eixos multidimensionais.

A outra técnica utilizada foi a Análise de Variáveis Canônicas (AVC) que também consiste em encontrar novas combinações lineares dos p caracteres originais, ortogonais entre si, que visam maximizar a razão entre as matrizes de covariância "entre" e "dentro" dos grupos (no

presente caso, rainhas obtidas a partir de larvas de diferentes idades) (HUSSAINI et al., 1977 e NEFF & MARCUS, 1980). A AVC parte da extração de autovalores e autovetores de uma matriz H, dada por:

$$H = S^{-1}B$$

onde, S é a matriz de covariâncias "dentro" dos grupos e B é a matriz de covariância "entre" os grupos.

Nas duas análises, a importância de cada caráter, para cada um dos eixos multidimensionais, foi avaliada através de coeficientes de estrutura, que são a correlação linear de Pearson (r) entre cada caráter e os escores individuais de cada um dos eixos multidimensionais (NEFF & MARCUS, 1980).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios de cada caráter em cada um dos grupos de rainha analisados encontram-se no quadro 1. Os resultados da ANOVA, realizada em cada um dos caracteres, encontram-se no quadro 2, sendo possível perceber que todos eles apresentam diferenças significativas entre os grupos de rainha a nível de 5%. As variâncias dos grupos são homocedásticas, pois nenhum teste de Bartlett foi significativo a nível de 5%. Apesar das diferenças significativas entre os grupos, detectada pela ANOVA para todos os caracteres quantitativos, outras características morfológicas típicas de rainhas (forma da mandíbula, ausência de corbícula e forma do basitarso posterior) mantiveram-se inalteradas, de acordo com a idade, revelando assim uma ausência de indivíduos intermediários entre rainha e operária, como seria de se esperar considerando o intervalo de idade analisado.

Quadro 2. Resultados da ANOVA aplicada aos 14 caracteres analisados nas rainhas obtidas a partir de larvas com diferentes idades (em horas). QM_E e QM_D indicam as variâncias "entre" e "dentro" dos grupos de rainhas, respectivamente, e P a probabilidade de erro tipo I de cada valor de F calculado

Caracteres	QM _E	QM _D	F	P
PESO (g)	0,003	0,000	15,808	0,000
ESCP (mm)	0,020	0,002	13,077	0,000
LARG (mm)	0,027	0,005	4,965	0,007
DIST (mm)	0,024	0,003	8,178	0,000
CPAN (mm)	0,215	0,033	6,621	0,002
LGAN (mm)	0,039	0,009	4,145	0,015
CEL (mm)	0,025	0,006	4,227	0,014
PCEL (mm)	0,028	0,009	3,291	0,036
CPOS (mm)	0,086	0,007	12,946	0,000
LPOS (mm)	0,022	0,004	5,068	0,007
CFEM (mm)	0,067	0,005	12,511	0,000
CTIB (mm)	0,061	0,009	6,587	0,002
CBAS (mm)	0,039	0,005	7,231	0,001
LBAS (mm)	0,013	0,002	8,229	0,000

Valores de F com 3 e 27 graus de liberdade

Os padrões de diferenciação entre os grupos de rainhas podem ser melhor avaliados através das técnicas de estatística multidimensional que consideram todos os caracteres simultaneamente. Os coeficientes do primeiro componente principal encontram-se no quadro 3 e indicam quais caracteres são mais importantes para compor a principal direção de variação morfométrica da matriz de dados. Em morfometria, esse primeiro componente (CP I) é usualmente interpretado como um eixo de "tamanho" multidimensional quando todos os coeficientes possuem mesmo sinal e magnitudes semelhantes (NEFF & MARCUS, 1980), conforme o quadro 3. Assim, todos os caracteres encontram-se bastante relacionados ao primeiro componente principal (tamanho), que explica 58,24% da variabilidade total da matriz de dados. Em geral, as rainhas obtidas a partir de larvas de menor idade possuem escores maiores (e assim um maior tamanho) nesse eixo (figura 1).

Quadro 3. Coeficientes de estrutura do primeiro componente principal (CP I) e dos dois primeiros eixos obtidos na Análise de Variáveis Canônicas (AVC) para os 14 caracteres analisados

Caracteres	CP I	AVC	
		I	II
PESO (g)	0,773	0,538	0,689
ESCP (mm)	0,703	0,233	0,817
LARG (mm)	0,596	0,371	0,489
DIST (mm)	0,726	0,586	0,374
CPAN (mm)	0,849	0,294	0,608
LGAN (mm)	0,664	0,254	0,484
CEL (mm)	0,753	0,318	0,408
PCEL (mm)	0,635	0,046	0,446
CPOS (mm)	0,833	0,619	0,551
LPOS (mm)	0,800	0,523	0,390
CFEM (mm)	0,878	0,690	0,460
CTIB (mm)	0,826	0,543	0,446
CBAS (mm)	0,794	0,398	0,616
LBAS (mm)	0,795	0,539	0,527

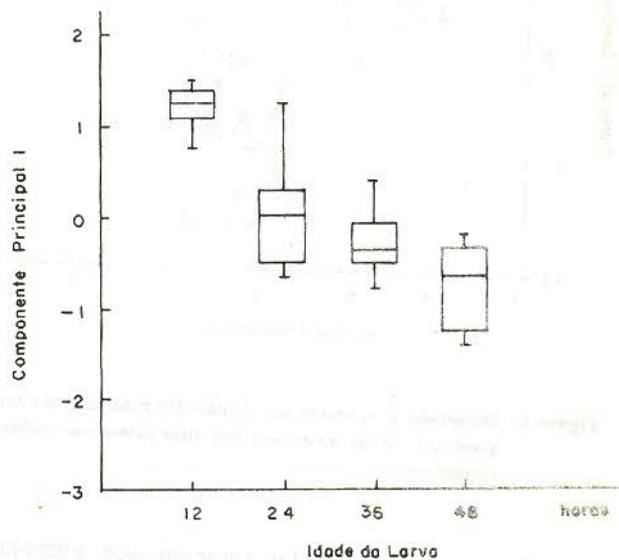


Figura 1. Relação entre os escores do primeiro componente principal e a idade (horas) das larvas

Os coeficientes de estrutura da AVC também encontram-se no quadro 3. Como foram estabelecidos 4 grupos de rainhas, podem ser calculadas 3 variáveis canônicas e, destas, apenas as duas primeiras foram significativas pelo teste de esfericidade de Bartlett (JOHNSON & WICHERN, 1992). A primeira variável canônica possui coeficientes com diferentes magnitudes, embora positivos, de modo que esse eixo não deve expressar bem as diferenças no tamanho generalizado do corpo dos indivíduos. De fato, a correlação entre os escores da primeira variável canônica com os escores do primeiro componente principal, embora significativa ($P < 0,01$), foi relativamente pequena ($r = 0,57$).

Isso indica que a principal variação "entre" os grupos de rainhas não corresponde necessariamente ao "tamanho" generalizado dos indivíduos, mas sim a outras variações de "forma". A segunda variável canônica, por sua vez, possui coeficientes de magnitude mais homogênea e apresenta uma maior correlação com o eixo de tamanho (CP 1) ($r = 0,67$).

A dispersão dos escores individuais no espaço das duas primeiras variáveis canônicas (figura 2) revela que os 4 grupos de rainhas podem ser bem discriminados a partir dos caracteres analisados, especialmente o grupo obtido com larvas de 12 horas, ao longo da primeira variável canônica. Os grupos de maior idade (24, 36 e 48) discriminam-se ao longo da segunda variável canônica.

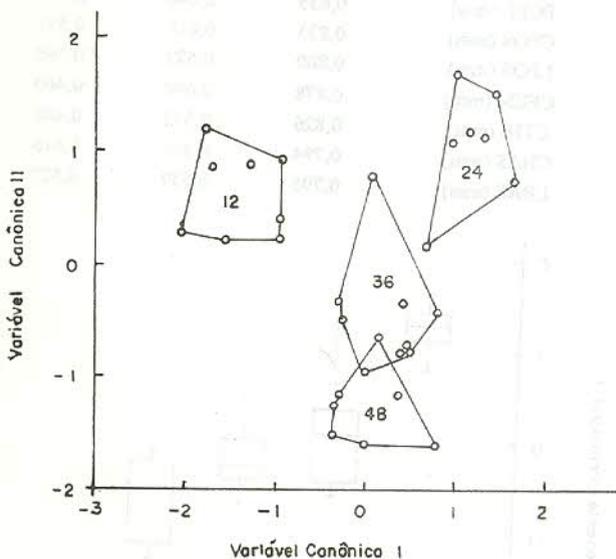


Figura 2. Dispersão dos escores individuais das rainhas dos quatro grupos de idade no espaço das duas primeiras variáveis canônicas

Os resultados obtidos indicam que, embora a amplitude de idade analisada (12 a 48 horas) não implique no aparecimento de indivíduos intercasta, variações nos

padrões morfométricos das rainhas resultantes dessas larvas ocorrem e estão associadas com o aumento dessa idade. Isso pode implicar que existe um efeito contínuo (mas não linear) no processo de determinação de castas em termos de variação quantitativa (tamanho do corpo), ou seja, à medida que a idade da larva aumenta, diminui sua potencialidade de alcançar os valores dos caracteres quantitativos alcançados pelas rainhas. Quando essa idade atinge um determinado limiar (por volta de 72 horas), outras características discretas (desenvolvimento dos ovários e forma de mandíbula e do basitarso, por exemplo) perdem totalmente a capacidade de atingir o padrão das rainhas e a larva se desenvolve em uma operária. Esses resultados implicam que outras características biológicas de distribuição contínua, algumas ligadas à produtividade em termos de apicultura (longevidade, resistência a doenças e fertilidade, por exemplo), podem apresentar um padrão semelhante de variação em função da idade da larva. Novos estudos (especialmente sobre desenvolvimento ovariano), portanto, podem sugerir que essa variação seja cuidadosamente considerada em termos de produção e melhoramento de rainhas em escala comercial.

AGRADECIMENTOS

À Pesquisadora Augusta Carolina de C. C. Moreti pela colaboração durante a fase experimental e pela leitura crítica do manuscrito original.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEETSAMA, J. The process of queen-worker differentiation in the honey bee. *Bee World*, Bucks, SL, 60(1):24-39, 1979.
- BRIAN, M. V. Social control over sex and caste in bees, wasps and ants. *Biol. Rev.*, London, 55:379-415, 1980.
- BROUWERS, E. V. M.; EBERT, R. & BEETSAMA, J. Behavioural and physiological aspects of nurse bees in relation to the composition of larval food during caste differentiation in the honeybee. *J. of Apic. Res.*, Gerrards Cross, Bucks, 26(1):11-23, 1987.
- DIETZ, A. The influence of environmental and nutritional factors on growth and caste determination of female honey bee. *Diss. Abstr. Intern. B*, Ann. Arbor, Mich., 27(12):4599-600, 1967.
- HARRIS, R. J. A primer of multivariate analysis. New York, Academic Press, 1975. 332p.
- HAYDAK, M. H. Larval food and development of castes in honey bee. *J. of Econ. Entomol.*, Manasha, Wis, 36:778-92, 1943.
- HUSSAINI, S. H.; GOODMAN, M. M. & TIMOTHY, D. H. Multivariate analysis and geographical distribution of the world collection of finger millet. *Crop. Sci.*, Madison, Wis, 17:257-63, 1977.
- JOHNSON, R. A. & WICHERN, D. W. Applied multivariate statistical analysis. 3.ed. London, Prentice-Hall, 1992. 642p.

- MICHENER, C. D. *The social behaviour of bees: a comparative study.* Cambridge, Belknap Press, 1974. 404p.
- MITSUI, T.; SAGAWA, T. & SANO, H. Studies on rearing honey bee larvae in laboratory. I. The effect of royal jelly taken from different ages of queen cells on queen differentiation. *J. of Econ. Entomol.*, Manasha, Wis, 57(4):518-21, 1964.
- NEFF, N. A. & MARCUS, L. F. *A survey of multivariate methods for systematics.* AMNH, NY, Privately Published, 1980. 233p.
- SHUEL, R. W. & DIXON, S. E. Studies in the mode of action of royal jelly in honeybee development. II. Respiration of newly emerged larvae on various substrates. *Can. J. of Zool.*, Ottawa, Ont., 37:803-13, 1959.
- SOKAL, R. R. & ROHLF, F. J. *Biometry.* 2.nd. New York, W. H. & Freeman, 1981. 859p.
- TABER, S. III & POOLE, H. K. Caste determination in honeybees: the production of queen-worker intermediates. *J. of Apic. Res.*, Gerrards Cross, Bucks, 12(2):111-16, 1973.
- WEAVER, N. Control of dimorphism in the female honeybee. *Science*, London, 138(3544):995, 1962.
- _____. Physiology of caste determination. *Ann. Rev. of Entomol.*, Palo Alto, CA, 11:79-102, 1966.
- WIRTZ, P. Differentiation in the honeybee larva: a histological, electron-microscopical and physiological study of caste induction in *Apis mellifera* L. *Apic. Abstr.*, Gerrards Cross, Bucks, 25(1):23, 1974.