



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Sônia Maria da Silva Rocha Araújo

CONTRIBUIÇÃO À CITOGENÉTICA DE *Trypoxylon* (*Trypargilum*)
albitarse FABRICIUS, 1804 (HYMENOPTERA, SPHECIDAE):

I. DINÂMICA DOS CROMOSSOMOS B

II. ESTUDOS DA NOR E NUCLEÓLOS

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) SÔNIA MARIA DA SILVA ROCHA ARAÚJO e aprovada pela Comissão Julgadora.

Silvia das Graças Pompolo

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Doutor em Biologia Celular e Estrutural
na área de Biologia Celular

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Silvia das Graças Pompolo

NIDADE BC
1ª CHAMADA UNICAMP
Ar15c
EX
OMBO BC/ 49723
ROC 16-83F100
DX
REÇO R\$ 11,00
DATA 18/06/02
1ª CPD

CM00169262-1

18 10 244859

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

Araújo, Sônia Maria da Silva Rocha
Ar15c Contribuição à citogenética de *Trypoxylon* (*Trypargilum*) *albitarse*
Fabricius, 1804 (Hymenoptera, Sphecidae): I. Dinâmica dos
Cromossomos B. II. Estudos da NOR e nucléolos/Sônia Maria da
Silva Rocha Araújo. –
Campinas, S.P.: [s.n.], 2002.

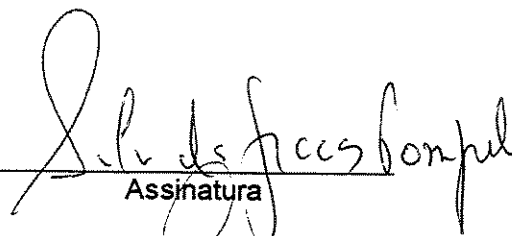
Orientadora: Silvia das Graças Pompolo
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Vespa. 2. Citogenética. 3. Nucléolo. I. Pompolo, Silvia das
Graças. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Biologia. III. Título.

Data da Defesa: 27/03/2002

BANCA EXAMINADORA

Profa.Dra. Silvia das Graças Pompolo (Orientadora)


Assinatura

Prof.Dr. Lucio Antonio de Oliveira Campos


Assinatura

Prof.Dr. Jorge Abdala Dergam dos Santos


Assinatura

Profa.Dra. Doralice Maria Cella


Assinatura

Prof.Dr. Luiz Antonio Carlos Bertollo


Assinatura

Profa.Dra. Luciana Bolsoni Lourenço


Assinatura

Profa.Dra. Shirlei Maria Recco Pimentel


Assinatura

20220325

A Jorge e Zipora, os melhores companheiros de
todos as horas.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar meus mais sinceros agradecimentos às seguintes pessoas que, direta ou indiretamente, colaboraram com a execução deste trabalho:

- A meus queridos pais e irmãos pelo constante estímulo e apoio incondicional em todos os momentos.
- A Jorge, por sua amizade, compreensão, dedicação, noites em claro, coleta de material, enfim por ter estado ao meu lado sempre e sem nunca quiexar-se.
- A minha querida filha, Zipora que, embora tendo crescido no meio de tantas teses, é uma pessoa maravilhosa, compreensiva e uma excelente amiga.
- À Profª. Dra. Silvia das Graças Pompolo, por sua orientação, auxílio e incentivo em todas as fases de realização deste trabalho.
- Ao prof. Dr. Juan Pedro Martínez Camacho, por receber-me em seu laboratório e cuja orientação e constante estímulo foram de suma importância para a conclusão desse trabalho.
- Às profas. Dras. Josefa Cabrero Hurtado e Maria Dolores López-León pelos constantes conselhos, orientação e pelo bom ambiente de trabalho que me proporcionaram.
- Ao prof. Dr. Francisco Perfectti Álvarez pela disponibilidade com a qual sempre me ajudou e esclareceu dúvidas e, principalmente, pela inestimável contribuição com as análises estatísticas.
- Aos Professores Doutores Jorge Abdala Dergam dos Santos e Lucio Antonio de O. Campos pela análise prévia desta tese.
- Aos Professores Doutores Doralice M. Cella, Jorge Abdala Dergam dos Santos, Lucio Antonio de O. Campos e Luiz Bertollo por sua participação como membros da banca de defesa.
- Às profas. Dras. Shirlei Maria Recco Pimentel e Luciana Bolsoni e à Klélia Aparecida de Carvalho, pela doação do pDM 238 e pelos ensinamentos e ajuda na realização da FISH.
- À Cynthia Canêdo da Silva, por sua inestimável ajuda em diferentes etapas desse trabalho

e pela preciosa oportunidade de orientá-la em sua iniciação científica.

- A todos os colegas do laboratório de Citogenética e Evolução de Insetos, e ao Estévão, pelos bons momentos compartilhados.

- Aos todos os companheiros do “grupo de investigación en Biología de Poblaciones de Orthopteros de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada”, pelos dois excelentes anos de convivência.

- Aos amigos Jose Maria Corral (Chema), Miguel Galiana (Mike), Mohamed Abdelaziz (Abdel), Mohammed Bakkali, Angel Martín Alganza, Rafael Ruiz de Assin (Rafa) pela amizade, companheirismos e pelos bons e divertidos momentos que passamos juntos.

- Às inesquecíveis amigas Vanessa, Inma e Maria, as melhores companheiras, confessoras, e incentivadoras que conheci. Sempre lembrarei de vocês com muito carinho!

- À Marla, minha amiga de toda vida, por sua ajuda incondicional e pelos nossos momentos de conversa (mesmo via e-mail) que sempre me ajudaram tanto.

- Meu agradecimento especial à Líliam Panagio, secretária do Departamento de Biologia Celular – IB, UNICAMP, por ter sido meu braço direito, ajudando-me e muitas vezes resolvendo por mim, todos os “abacaxis” que apareceram durante os anos que estive fora.

- À CAPES pela bolsa concedida, a qual me permitiu realizar essa tese.

RESUMO

Das 13 espécies de *Trypoxylon* com número cromossômico conhecido, somente *T. albitarse* possui cromossomos B, os quais são totalmente heterocromáticos e podem apresentar-se em dois tipos morfológicamente distintos, um metacêntrico e um acrocêntrico. Ao longo dos últimos cinco anos (1996 a 2000), 1003 espécimens de *T. albitarse* provenientes de 692 ninhos foram estudados citogeneticamente com relação à ocorrência, distribuição, frequência e evolução de seus cromossomos B e muitos destes indivíduos foram submetidos às técnicas de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) ou impregnação por nitrato de prata para localização dos genes ribossômicos e estudo dos nucléolos, respectivamente. Todos os espécimens analisados foram obtidos em diferentes populações naturais na Zona da Mata Mineira, das quais 11 estão localizadas no município de Viçosa (Amoras, Campus, Centro, Marrecos, Palmital, Paraíso, Silvestre, Vila Cristal, Vila Chaves, Fundão e Barrinha), duas no município de Cajuri (Cajuri e Arraial Paraguai), uma no município de Coimbra (Coimbra), uma no município de Porto Firme (Nova Ilha) e uma no município de Piranga (Piranga). Com exceção da população de “Centro”, as oito primeiras populações de Viçosa e a população de Porto Firme foram amostradas em dois intervalos de tempo diferentes (1996-1998 e 1998-2002), enquanto as populações dos municípios de Cajuri, Coimbra e Piranga, assim como as populações viçosenses de Fundão e Barrinha, foram estudadas apenas na segunda amostragem. Os resultados obtidos na primeira etapa de coletas revelaram que, em maior ou menor frequência, todas as populações analisadas possuem cromossomos B. Entre as populações de Viçosa, a grande maioria das fêmeas e machos analisados portaram um cromossomo B por genoma haplóide, ou seja, a mesma dosagem dos cromossomos do complemento A. Por outro lado, na única população analisada em Porto Firme, somente 14.3% dos indivíduos apresentaram cromossomos B. Considerando que uma das principais características dos cromossomos B é seu modo de transmissão não-mendeliano, a possibilidade de que, em Viçosa, os cromossomos B de *T. albitarse* estivessem regularizando seu comportamento meiótico e, conseqüentemente,

alcançando sua estabilização como um membro normal do complemento cromossômico, foi postulada. Na tentativa de testar esta hipótese, o processo de estabilização dos cromossomos B foi estatisticamente quantificado em todas as populações analisadas. Em Porto Firme, o índice de estabilização (SI) dos B foi bastante baixo, indicando uma invasão recente. Não obstante, em Viçosa, o SI foi igual a 100% em três diferentes populações, onde todos os indivíduos portavam um B por genoma haplóide e indicou uma forte tendência à estabilização dos B nas demais populações. Um estudo comparativo desses dados com os obtidos no seguinte período de amostragem forneceram evidências diretas do processo invasivo dos B em Porto Firme, onde a frequência de Bs aumentou drasticamente. Entretanto em Viçosa, a despeito do aumento em frequência do tipo metacêntrico e da significativa redução do tipo acrocêntrico em várias populações, a frequência geral de cromossomos B permaneceu estável. As novas populações analisadas, mostraram uma frequência de Bs e parâmetros de estabilidade semelhantes aos observados em Viçosa, indicando que se encontram em um estágio evolutivo similar, com a maioria dos indivíduos portando um cromossomo B por genoma haplóide e altos valores de SI. A técnica de FISH com sonda de rDNA não revelou a presença de genes ribossômicos nos cromossomos B, não obstante, demonstrou que, em *T. albitarse*, os genes ribossômicos estão localizados em toda extensão do braço heterocromático do cromossomo 14. Embora a técnica de impregnação por prata não tenha sido efetiva na localização cromossômica da NOR ativa, foi aplicada com bastante sucesso na quantificação da atividade nucleolar nos núcleos interfásicos de machos e fêmeas de *T. albitarse*, mostrando que, a despeito da grande variabilidade no tamanho do 'braço ribossômico' em machos e fêmeas dessa espécie, a atividade nucleolar é proporcional ao nível de ploidia dos indivíduos.

ABSTRACT

Among the 13 cytogenetically analysed species of *Trypoxylon* genus, only *T. albitarse* possess B chromosomes. Two types morphologically distinct of B chromosomes have been found in this wasp, one metacentric and other acrocentric, which are totally heterochromatic. Over the last five years (1996 to 2000), 1003 specimens of *T. albitarse* obtained from 692 nests, had been cytogenetically studied with respect to the occurrence, distribution, frequency and evolution of its B chromosomes. Many of these individuals had been subjected to techniques of fluorescent *in situ* hybridisation (FISH) or silver nitrate staining for location of ribosomal genes and nucleoli, respectively. All analysed individuals were collected in different natural populations in the Zona da Mata Mineira (Minas Gerais State, Brazil), of which 11 are located in the city of Viçosa (Amoras, Campus, Centro, Marrecos, Palmital, Paraíso, Silvestre, Vila Cristal, Villa Chaves, Fundão and Barrinha), two in the city of Cajuri (Cajuri and Arraial Paraguai), one in the city of Coimbra (Coimbra), one in the city of Porto Firme (Nova Ilha) and one in the city of Piranga (Piranga). Besides the Centro population, the eight first populations from Viçosa and the population of Porto Firme were sampled twice (1996-1998 and 1998-2002), while the populations located in Cajuri, Coimbra and Piranga, as well as Fundão and Barrinha (Viçosa), were studied only included in the second sampling. The results observed in the first stage of collections have revealed that, although in different frequency, all analysed populations possess B chromosomes. Among the Viçosa's populations, most bore females and males carried a B chromosome per haploid genome, the same dosage of standard (A) chromosomes. On the other hand, in Porto Firme, only 14.3% of individuals carried B chromosomes. Because one of the most conspicuous features of B chromosomes is their non-mendelian transmission mode, we hypothesized that at least in Viçosa, the B chromosomes of *T. albitarse* were regularizing their meiotic behaviour and, consequently, reaching their stabilization as a normal member of the normal chromosomal complement. To test this hypothesis, the stabilization process of B chromosomes was statistically

quantified in all populations. In Porto Firme, the stabilization index (SI) of the B was sufficiently low, indicating a recent invasion. On the other hand populations from Viçosa carried a B per haploid genome, the SI value was equal to 100% while the other populations indicated a strong trend toward the stabilization of B chromosomes. A comparative analysis performed with both set of data (obtained in the first and second period of sampling) had supplied direct evidences of the invasive process of B in Porto Firme, where the B frequency has increased significantly. However in Viçosa, in spite of the increase in the metacentric B frequency and the significant reduction, in some populations, in the acrocentric B frequency, the general frequency of B chromosomes remained stable. The additional populations sampled showed B frequency and stability parameters similar to these observed in the Viçosa region, indicating that they are in a similar evolutionary stage, with most individuals carrying one B per haploid genome and high SI values. Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) showed all ribosomal genes located in the heterochromatic arm of chromosome 14. The silver impregnation method was successfully applied in the nucleolar activity quantification of interfasic nuclei in males and females of *T. albitarse*. These results suggested that, despite the great variability in the size of ribosomal arm in this species, nucleolar activity is adjusted to the ploidy level.

ÍNDICE

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Aspectos biológicos e citogenéticos de <i>Trypoxylon</i> (<i>Trypargilum</i>) <i>albitarse</i>	1
1.1.1. Aspectos Biológicos	1
1.1.2. Aspectos Citogenéticos	2
1.2. Os cromossomos B	3
1.2.1. Origem e efeitos dos cromossomos B	5
1.2.1.1. Origem	5
1.2.1.2. Efeitos	6
1.2.2. Cromossomos B em Hymenoptera	10
1.3. O estudo dos nucleolos e NORs	10
1.3.1. O conteúdo dos genes ribossômicos sinteticamente ativos	11
1.3.2. Localização cromossômica dos genes ribossômicos e NORs	12
1.4. FISH e impregnanção com prata em Hymenoptera	14
2. OBJETIVOS	16
2.1. Justificativa	16
2.2. Objetivos Gerais	17

3. ARTIGOS	18
3.1. Integration of a B chromosome into the A genome of a wasp	18
3.2. Integration of a B chromosome into the A genome of a wasp, revisited	36
3.3. Genetic Load caused by variation in the amount of rDNA in a wasp	48
3.4. No dosage compensation in a haplo-diploid organism	68
4. CONCLUSÕES	84
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos biológicos e citogenéticos de *Trypoxylon* (*Trypargilum*) *albitarse*

1.1.1. Aspectos Biológicos

Dentre os 226 gêneros pertencentes à família Sphecidae, *Trypoxylon* é o segundo mais numeroso, com cerca de 355 espécies descritas (BOHART & MENKE 1976), das quais aproximadamente 77% pertencem ao subgênero *Trypoxylon* e as demais ao subgênero *Trypargilum*.

Trypoxylon albitarse, uma das primeiras espécies descritas no subgênero *Trypargilum*, é um vespóide de comportamento solitário, com ampla distribuição na América do Sul. Seus ninhos de barro, em forma de tubos de órgão, são muito comuns em paredes de residências e prédios. Contudo, esta espécie também é capaz de reutilizar e aprovisionar ninhos de barro preexistentes (AMARANTE 1991).

Os machos dessa espécie, como na grande maioria das espécies do subgênero *Trypargilum*, permanecem nos ninhos por longos períodos, enquanto as fêmeas capturam as presas; eles podem inclusive auxiliá-las em atividades como construção do ninho, transporte de presas para o interior do ninho e alocação destas dentro das células (BOHART & MENKE 1976; COVILLE 1982; AMARANTE 1991). Esse tipo de comportamento, que, segundo AMARANTE (1991), foge do usual em Hymenoptera, pode ser explicado como originado do comportamento territorial observado em várias espécies de Sphecidae, por meio do qual os machos assegurariam sua descendência, evitando que outros machos copulem com a fêmea antes da desova. Contudo, esta não parece ser uma

estratégia infalível, posto que fêmeas de *T. albitarse* podem copular com mais de um macho antes da postura (AMARANTE 1991), tornando, assim, desconhecida, a proporção de paternidade da prole que corresponde ao macho de guarda.

1.1.2. Aspectos Citogenéticos

Os primeiros estudos citogenéticos em *Trypoxylon* datam de princípios da década de 90 (HOSHIBA & IMAI 1993).

Constrastando com o grande número de espécies descritas neste gênero até o momento, somente 13 espécies têm números cromossômicos conhecidos, os quais variam de $2n=18$ a $2n=32$ (HOSHIBA & IMAI 1993; GOMES *et al.* 1995; 1997; ARAÚJO *et al.* 2000).

T. albitarse é uma das espécies de *Trypoxylon* (e provavelmente de Sphecidae) mais estudadas em nível citogenético. Seu número cromossômico básico, $2n=32$ para fêmeas e $n=16$ para machos, foi determinado por GOMES (1995), o qual observou variações em torno desses números. Dentre a amostra analisada, haviam fêmeas com $2n=34$ e machos com $n=17$, cujos cariótipos diferiam dos cariótipos básicos, somente pela presença de cromossomos adicionais. Posteriormente, a ocorrência de um sistema de cromossomos supranumerários (B) foi confirmada (ARAÚJO 1998).

ARAÚJO *et al.* (2000) descreveram o cariótipo básico (complemento A) de *T. albitarse* ($n=16$; $2n=32$) como sendo composto por 14 cromossomos pseudoacrocêntricos - cromossomo acrocêntricos com braço curto desenvolvido em função do crescimento saltatório de heterocromatina constitutiva (HOSHIBA & IMAI 1993) - e dois cromossomos acrocêntricos. Adicionalmente, também foram descritos dois tipos morfológicos de cromossomos B: um tipo metacêntrico e outro acrocêntrico, ambos totalmente heterocromáticos e diferenciáveis entre si somente pela posição do centrômero. Dentre estes dois tipos, predominaram os cromossomos B metacêntricos, enquanto o tipo acrocêntrico, foi proposto como sendo uma variante derivada do B metacêntrico, provavelmente originado a partir de rearranjos tais como deleção ou inversão pericêntrica,

uma vez que ambos tipos de B exibiram um comportamento similar em resposta a bandamentos (ARAÚJO *et al.* 2000).

1.2. Os cromossomos B

Muitos organismos eucariotos em populações naturais apresentam cromossomos extras, completamente dispensáveis ao genoma normal, os quais são chamados cromossomos B (JONES & REES 1982). Estes cromossomos podem ser considerados simbioses genômicos que, na maioria dos casos estudados, comportam-se como parasitas em detrimento do genoma hospedeiro (JONES & REES 1982; BEUKEBOOM 1994; CAMACHO *et al.* 2000).

Paradoxalmente, embora sejam considerados cromossomos dispensáveis, a presença dos Bs no genoma pode ser assegurada graças ao comportamento egoísta que estes exibem e que lhes permitem seguirem sua própria rota evolutiva (BEUKEBOOM 1994; CAMACHO *et al.* 1997). Este comportamento egoísta se torna evidente sobretudo pelo fato de que os Bs são meioticamente isolados dos cromossomos A, uma vez que não formam bivalentes e nem se associam com estes na metáfase I; e também por não apresentarem segregação em uma taxa mendeliana, podendo acumular-se nas células somáticas e, principalmente, nas células germinativas por meio de uma variedade de mecanismos de acúmulo e segregação preferencial (drive mechanisms) os quais lhes garantem uma taxa de transmissão que excede a dos cromossomos A (JONES 1991; CAMACHO *et al.* 1997; 2000).

O mecanismo de “drive” funciona para os cromossomos B como uma “faca de dois gumes”, pois uma vez que é uma das formas mais eficientes de garantir sua presença e permanência no genoma hospedeiro, também impede que estes se estabilizem como um membro normal do complemento A. Até o presente momento, se conhece muito poucas opções para solucionar esse dilema dos cromossomos B, das quais muitas são teóricas.

Dois modos aparentemente simples, embora drásticos, para impedir o mecanismo de “drive” de um cromossomo B seriam sua eliminação (CAMACHO *et al.* 1997) ou a sua integração ao genoma hospedeiro, com subsequente aumento do número cromossômico.

Esta integração ocorreria como consequência de mudanças coevolutivas nos cromossomos Bs e As, resultando na atenuação dos efeitos dos Bs a um nível de nulidade ou até mesmo a um estado benéfico destes cromossomos (KIMURA & KAYENO 1961; HEWITT 1973). Entretanto, resultados de pesquisas teóricas e empíricas indicam que a “queda de braços entre os cromossomos A e B também poderia levar a um ciclo infinito de neutralização de cromossomos B parasíticos pelo genoma hospedeiro (suprimindo temporariamente o mecanismo de “drive”), seguido por mutações que reestabeleceriam o “drive” dos Bs, reiniciando, assim, um novo ciclo (CAMACHO *et al.* 1997).

Um outro modo de supressão do “drive” e, conseqüentemente, de integração de um cromossomo B, foi sugerido a partir da observação de fusões espontâneas entre cromossomos A e Bs no gafanhoto *Eyprepocnemis plorans* (HENRIQUES-GIL *et al.* 1983; CABRERO *et al.* 1987) e em milho (MAGUIRE 1995). Entretanto, ainda que essa possibilidade não seja de todo descartada, a baixa frequência dessas fusões cromossômicas em populações naturais sugere a existência de algum tipo de impedimento à sua manutenção nas populações.

Uma alternativa bastante interessante e direta, embora até agora teórica, de integração de um cromossomo B, seria por meio da imitação (por parte dos Bs) do comportamento meiótico dos cromossomos A, o que permitiria aos Bs um pareamento estável durante a prófase em ambos os sexos (em organismos diplóides) com posterior segregação de um B a cada pólo na anáfase I e, conseqüentemente, para cada gameta. Contudo, a necessidade de realizar essa dupla proeza (na meiose de macho e fêmea) pode ser uma das maiores barreiras no caminho da integração dos Bs em organismos diplo-diplóides. Na realidade, o fato de que, em muitas espécies diplo-diplóides, os cromossomos B se acumulem em apenas um dos sexos, evidencia que, do ponto de vista de um B, as meioses de machos e fêmeas podem não ser idênticas (PIGOZZI & SOLARI 1998; WERREN 1991).

1.2.1. Origem e efeitos dos cromossomos B

1.2.1.1 Origem

Embora os cromossomos B venham sendo alvo de estudos desde 1907 quando foram descritos pela primeira vez (para revisão ver CAMACHO *et al.* 2000), sua origem ainda é bastante discutível. O ponto mais consensual a esse respeito é o de que estes podem ser derivados de cromossomos do complemento normal (JONES & REES 1982). Contudo, na atualidade, diversos estudos citológicos e moleculares vêm sendo realizados em espécies que apresentam esse tipo de cromossomos e os resultados obtidos têm possibilitado a elaboração de hipóteses mais concretas a respeito de sua origem. Entre essas hipóteses, duas têm recebido especial atenção por explicar a origem da maioria dos cromossomos B:

1. **Hipótese da origem intraespecífica**, a qual postula que os cromossomos Bs se originariam como subprodutos de rearranjos ocorridos nos cromossomos A (autossomos ou sexuais) do seu genoma hospedeiro; ou

2. **Hipótese da origem interespecífica**, na qual os Bs poderiam ser originados a partir dos cromossomos A (autossomos ou sexuais) de espécies relacionadas, mediante hibridação interespecífica (CAMACHO *et al.*, 2000).

Os exemplos mais frequentes na literatura são os de cromossomos B originados intraespecificamente a partir rearranjos em cromossomos autossômicos como em *Crepis capillaris* (JAMILENA *et al.*, 1995), *Secale cereale* (CUADRADO & JOUVE, 1994), *Zea mays* (STARK *et al.*, 1996) e *Brachycome dichromosomatica* (HOUBEN *et al.*, 1997), entre outros. No entanto, existem casos onde os Bs provêm de rearranjos em cromossomos sexuais, tal como no gafanhoto *Eyprepocnemis plorans* (HENRIQUES-GIL & ARANA, 1990; LÓPEZ-LEON *et al.*, 1994), no díptero *Glossina spp* (AMOS e DOVER, 1981) e na rã *Leiopelma hochstetteri* (GREEN, 1988; GREEN *et al.*, 1993; SHARBEL *et al.*, 1998).

Casos de cromossomos supranumerários originados interespecificamente são menos comuns na literatura, no entanto entre eles está um dos exemplos mais bem documentados a respeito da origem híbrida de um cromossomo B, o cromossomo PSR da vespa parasitóide

Nasonia vitripennis, o qual quando transmitido pelo espermatozóide ao ovócito induz a condensação e posterior perda dos cromossomos paternos, levando o ovo, que se desenvolveria em fêmea diplóide, a desenvolver-se em macho haplóide portador do PSR (WERREN, 1991). McALLISTER & WERREN (1997) por meio de análises filogenéticas utilizando sequências de DNA repetitivo isoladas do cromossomo PSR, mostraram que estas sequências eram bastante semelhantes às de outras espécies do gênero *Trichomalopsis*, que é filogeneticamente relacionado à *Nasonia*. Corroborando esses resultados, recentemente foram obtidas evidências experimentais da origem interespecífica de um fragmento cêntrico extra, a partir do cruzamento entre duas espécies de *Nasonia* (PERFECTI & WERREN 2001).

1.2.1.2. Efeitos

Durante muito tempo os cromossomos B foram considerados como elementos inertes ou subinertes, cujo efeito sobre caracteres exo ou endofenotípicos eram inexistentes ou dificilmente detectáveis (JONES & REES, 1982; LACADENA, 1996). De fato, considerando que a grande maioria dos cromossomos B é constituída em sua integridade por heterocromatina constitutiva, não é ilógico inferir sua inatividade gênica (HOUBEN *et al.* 1997). Entretanto, a despeito de sua atividade gênica, os cromossomos B também podem ser ‘cromossomicamente ativos’ (MORAIS-CECÍLIO *et al.* 2000), ou seja, são capazes de afetar o hospedeiro apenas por estarem presentes no genoma, sobretudo em altos números (KIRK & JONES 1970; JONES & PUERTAS 1993; DELGADO *et al.* 1995; MORAIS-CECÍLIO *et al.* 2000).

De um modo geral, os efeitos dos cromossomos B sobre o fenótipo do hospedeiro podem ser de natureza endo ou exofenotípica. Em ambos os casos, estes efeitos podem ser relativamente ‘vantajosos’, aparentemente neutros ou totalmente negativos e afetar o indivíduo em diferentes etapas do seu desenvolvimento. Exemplos de efeitos exofenotípicos de natureza diversa são especialmente comuns em centeio (JONES & PUERTAS 1993) e milho (JONES & REES 1982). Nesta última espécie particularmente,

os B podem influenciar inclusive no aumento do peso do grão (MOSS 1966), entretanto em outras situações a presença dos B, tanto em centeio como também em milho, pode levar a uma diminuição da germinação, produção de matéria seca e fertilidade (MÜNTZING 1963; REES & AYONOADU 1971).

Em muitas espécies de insetos, a associação dos B com determinadas manifestações exofenotípicas tem sido extensamente descritas há bastante tempo. No hemiptero *Pseudococcus obscurus* a presença dos Bs está associada a um aumento no comprimento da tibia (NUR, 1962). No Orthoptera *Camnula pellucida* estes provocam uma diminuição do comprimento do fêmur (NUR 1969), enquanto nos Diptera *Cnephia dacotensis* e *Cnephia ornitophila* os cromossomos B afetam o tamanho corporal das larvas (PROCUNIER 1975). Do mesmo modo, entre os Hymenoptera, se encontra um dos exemplos mais dramáticos do efeito exofenotípico de um cromossomo B, o cromossomo PSR observado nas vespas *Nasonia vitripennis* (WERREN 1991) e *Trichogramma kaykai* (STOUTHAMER *et al.* 2001), o qual altera drasticamente a razão sexual da população que o porta, convertendo em machos portadores de PSR, todos os ovos que normalmente se desenvolveriam em fêmeas (WERREN 1991).

Exemplos menos drásticos que este em *N. vitripennis* e *T. kaykai*, mas da mesma forma relevantes a respeito do efeito dos B sobre seus portadores, também podem ser observados em diferentes espécies animais e vegetais. Na Liliaceae *Allium schoenoprasum* demonstrou-se que a presença dos B é vantajosa para a germinação das sementes (PLOWMAN & BOUGOURD 1994). No vegetal *Plantago coronopus*, a presença de um único cromossomo B parece ser suficiente para produzir a esterilidade dos machos (PALIWAL & HYDE, 1959); em *Haplopappus gracilis* foi observada a associação entre a presença de cromossomos B e alterações na cor do fruto (JACKSON & NEWMARK, 1960); de igual modo em milho parece haver uma relação entre os B e o aspecto listrado de suas folhas (STAUB 1987). Entre as espécies animais onde se tem evidências de associação entre os cromossomos B e alguma manifestação exofenotípica, destacam-se a rã *Leiopelma hochestetteri* (GREEN 1988), onde se descreveu a existência de genes presentes no B e associados à determinação do sexo; e a espécie *Poecilia formosa*, onde os cromossomos B

parecem portar genes relacionados com a alteração na pigmentação da pele deste peixe, produzindo uma coloração em mosaico (SCHARTL *et al.* 1995).

Mais dificilmente perceptíveis, mas não menos importante são os casos em que a influência dos Bs se dá em nível endofenotípico.

Muito dos efeitos endofenotípicos dos B estão diretamente relacionados com alterações no fenótipo nuclear, seja por provocar a redução no conteúdo de ácidos nucleicos e proteínas nucleares (KIRK & JONES 1970) ou por alterar a organização nuclear da cromatina ribossômica (DELGADO *et al.* 1995). De igual modo, dado a frequente presença de genes ribossômicos em cromossomos B, estes também podem afetar a distribuição cromossômica e o conteúdo desses genes (HOUBEN *et al.* 1997). Contudo, mesmo quando desprovidos de genes ribossômicos ou qualquer gene de função conhecida, os cromossomos B ainda são capazes de afetar a atividade das regiões organizadoras de nucléolo (NORs) (MORAIS-CECÍLIO *et al.* 2000).

Por via de regra, a maioria das NORs localizadas em cromossomos B encontra-se em estado latente (JONES 1995; GREEN 1990). Contudo, evidências citológicas de B portadores de NORs ativas têm sido apresentadas na literatura. Na espécie de gafanhoto *Dichroplus pratensis*, o cromossomo B, embora meioticamente instável, apresenta genes ribossômicos ativos (BIDAU 1986); enquanto em *Eyprepocnemis plorans*, a NOR latente do cromossomo B tornou-se ativa após produzir-se a fusão do B com um autossomo (CABRERO *et al.* 1987). Um outro exemplo de cromossomos B portadores de NORs ativas são encontrados no Diptera *Chironomus plumosus* (KEYL & HAGELE, 1971).

Outros endoefeitos também têm sido atribuídos aos B, como por exemplo seu papel na indução da atividade isoenzimática da esterase I em *Scyllia autumnalis* (RUIZ-REJÓN *et al.* 1980) ou ainda seu efeito sobre o aumento da atividade nucleolar nas NORs dos cromossomos A de *Locusta migratoria* (SALCEDO *et al.* 1988) e *Eyprepocnemis plorans* (LÓPEZ-LEÓN *et al.* 1995; BAKKALI *et al.* 2001). BAKKALI (2001) discutindo a esse respeito, inferiu que o aumento da atividade da NOR nas células dos indivíduos portadores de B pode estar associado a uma maior necessidade celular em rRNA, gerada pela presença destes 'parasitas genômicos'.

A despeito de todos os efeitos endofenotípicos atribuídos aos B, nenhum tem sido tão extensamente estudado como sua influência sobre a frequência de quiasmas. Dados experimentais têm mostrado que, durante a meiose, os cromossomos B podem influenciar de distintas formas a frequência de quiasmas entre os bivalentes do complemento A. Em algumas espécies a presença dos B pode aumentar significativamente a frequência média de quiasmas (ABDEL-HAMMED *et al.* 1970) ou diminuí-la consideravelmente (CAMERON & REES 1967; TSUMOTO & SASAKI 1972). Em outras situações, não só a frequência média como também a variância intraindividual no número de quiasmas, pode ver-se alterada pela presença dos B, de modo que estas podem ser marcadamente superiores (JOHN & HEWITT 1965; CAMACHO *et al.* 1980; BAKKALI 2001) ou inferiores (CAMACHO *et al.* 1989) às observadas em indivíduos desprovidos de B.

Entre as diferentes teorias e hipóteses que tentam explicar essa interessante influência dos cromossomos B sobre a frequência de quiasmas, está a teoria da recombinação induzível (BELL & BURT 1990), a qual postula que os efeitos dos B sobre a frequência de quiasmas derivam de sua natureza parasítica. O genoma (hospedeiro), diante da presença de um cromossomo B (parasita), é induzido por este durante algum tempo, aumentar sua taxa de recombinação (por meio da frequência de quiasmas). Desde que o aumento da recombinação está diretamente relacionado com um aumento da variabilidade genética, esta resposta é positivamente selecionada e mantida nas populações.

De um modo geral, existem amplas evidências da influência dos cromossomos B em distintos processos celulares e fisiológicos tanto em vegetais como em animais. Contudo, deve-se enfatizar que os efeitos dos B estão condicionados tanto por variações espaciais e temporais, como também por condições ambientais que agem sobre diferentes populações de uma espécie. Dessa forma, é arriscado extrapolar os efeitos, detectados em uma dada população, para toda a distribuição de uma espécie. Convém que cada caso de efeito seja analisado rigorosamente e em muitas populações, sob as condições mais naturais possíveis (CAMACHO *et al.* 2000).

1.2.2. Cromossomos B em Hymenoptera

Considerando o amplo número de espécies que compreende a Ordem Hymenoptera, pode-se dizer que os cromossomos B são bastante raros nesta Ordem. Os poucos casos conhecidos foram relatados em apenas sete espécies de formigas, *Leptothorax spinosior* (IMAI, 1974), *Aphaenogaster rudis* (CROZIER, 1975), *Podomyrma adelaide* (IMAI et al. 1977), *Pseudolacius* sp2. e *Prenolepis jerdoni* (IMAI et al. 1984), *Lasius niger* (PALOMEQUE et al. 1990a), *Pheidole pallidula* (LORITE et al. 2000) duas espécies de vespa, *Nasonia vitripennis* (WERREN 1991) e *Trypoxylon albitarse* (ARAÚJO et al. 2000), e uma espécie de abelha, *Partamona helleri* (COSTA et al. 1992).

É possível que essa baixa ocorrência de cromossomos B seja mais uma consequência da escassez de estudos citogenéticos do que da baixa frequência de Bs, assim, a intensificação de estudos citogenéticos nessa ordem poderá revelar um número bastante maior de himenópteros portadores de Bs.

1.3. O estudo dos nucléolos e NORs

Os nucleolos sempre ocuparam um papel importante no estudo do crescimento celular e síntese protéica, mas seu papel preciso permaneceu desconhecido por muito tempo (MILLER & GURDON, 1970). HEITZ (1931) e McCLINTOCK (1934) foram os primeiros a associarem-nos com a síntese de RNA ribossômico e foi a própria McCLINTOCK (1934) quem os relacionou às regiões cromossômicas concretas, as quais chamou de regiões organizadoras de nucleolos (NORs). Estudos posteriores comprovaram a relação existente entre os nucléolos e a síntese de rRNA e mostraram que as NORs são as regiões cromossômicas que contêm sequências de DNA complementar ao rRNA (o rDNA), as quais localizam-se no interior dos nucléolos durante a interfase (PERRY, 1962; RITOSSA & SPIEGELMAN, 1965).

Os genes ribossômicos constituem uma classe de genes “medianamente repetitivos”, cujo número de cópias por genoma pode variar entre os diferentes organismos

(LONG & DAWID, 1980). De um modo geral (à exceção dos genes 5S), esses genes encontram-se reunidos, formando grupos ou “clusters” gênicos, cujas unidades de transcrição estão organizadas em tandem. Cada unidade de transcrição é formada pelas sequências que codificam para três dos quatro tipos de rRNA (18, 5.8 e 28S) e por sequências espaçadoras externas (ETs: External Transcribed Spacers) - que ladeiam os genes 18 e 28S nas extremidades 5' e 3', respectivamente - e internas (ITS: Internal Transcribed Spacers) - que separam as sequências codificadoras (18, 28 e 5.8S) entre si. Interrompendo as sucessivas unidades de transcrição, estão os espaçadores intergênicos (IGS), onde se localizam os elementos reguladores e intensificadores da expressão dos genes ribossômicos (SPEIR & BIRNISTIEL, 1974; REEDER, 1989; McSTAY & REEDER, 1990).

O número de genes ribossômicos pode ser bastante variável entre os distintos organismos. De um modo geral estima-se que seu número oscile entre 100 a 5000 cópias por genoma haplóide (LONG 1980; SUZUKI *et al.* 1990). Particularmente em organismos eucariotos, acredita-se que tanto a organização como a redundância desses genes tenha sido positivamente selecionada, por permitir uma síntese eficiente e satisfatória de rRNA para satisfazer os requerimentos celulares (HSU *et al.* 1975).

1.3.1. O conteúdo dos genes ribossômicos

Os genes ribossômicos foram uma das primeiras classes de multigenes com função e organização estabelecidas (REEDER, 1990). Entretanto, a despeito da variabilidade em torno do número de cópias desses genes, a quantidade de genes necessários para que haja uma síntese normal de rRNA ainda é desconhecida para a maioria das espécies (MILLER & GURDON, 1970).

Uma das características que tornam os genes ribossômicos únicos entre os demais, é o fato de que sua taxa de transcrição e distribuição no genoma, possam ser analisadas por meio de critérios citológicos. Essa característica se torna especialmente útil quando consideramos que polimorfismos para o número de genes ribossômicos são relativamente

comuns em espécies vegetais e animais, em virtude da grande susceptibilidade desses genes à alterações causadas por fenômenos de duplicações e deleções (MILLER & BROWN, 1969).

De fato, a ampla ocorrência de variações interindividuais, interpopulacionais e intersexuais na expressão das NORs (RITOSA & SPIEGELMAN, 1965; MERRY *et al.* 1983; SANCHÉZ *et al.* 1989; ZURITA *et al.* 1997; BAKALI *et al.* 2001) e no conteúdo de genes ribossômicos (MILLER & BROWN, 1969; WACHTLER *et al.*, 1986; KING *et al.* 1990; SUZUKI *et al.*, 1990; LEITCH & HESLOP-HARRISON, 1992; ZURITA *et al.* 1997; BAKALI *et al.* 2001), sugerem que esses tipos de alterações parecem ser relativamente bem tolerados em populações naturais e, de modo geral, não afetam o valor adaptativo dos indivíduos envolvidos. Uma razoável explicação para essa tolerância pode ser a capacidade dos genes nucleolares de apresentarem mecanismos de compensação de dose, permitindo aos organismos polimórficos manterem uma quantidade constante de material nucleolar (semelhante àquelas dos indivíduos normais), independentemente do número de genes presentes (MILLER & BROWN, 1969; MILLER & GURDON, 1970).

Entretanto, a capacidade de compensação de dose dos genes ribossômicos não parece ser ilimitada, desde que, conforme a literatura, grandes deleções, capazes de reduzir o número dos genes ribossômicos abaixo de um mínimo, podem ser deletérias (LONG & DAWID, 1980). Exemplos disso podem ser vistos em *Drosophila* (LYCKEGAARD & CLARK, 1991) e em *Xenopus laevis* (MILLER & GURDON, 1970) nos quais a redução no conteúdo de genes rRNA a uma taxa inferior à haploide resulta na produção de indivíduos mutantes e/ou na mortalidade dos embriões.

1.3.2. Localização cromossômica dos genes ribossômicos e NORs

A partir dos clássicos estudos de HEITZ (1931) e McCLINTOCK (1934), as NORs passaram a ser extensamente estudadas tanto em níveis citológicos como moleculares (CASPERSON, 1950; PERRY, 1962; FERGUSON-SMITH, 1964). Contudo, na maioria das vezes as informações obtidas com esses dois tipos de abordagem não foram

adequadamente integradas, o que parece ter contribuído para o significativo atraso no desenvolvimento de técnicas citológicas eficazes na detecção cromossômica das NORs (MILLER & BROWN, 1969).

Cronologicamente falando, a primeira técnica citológica utilizada para a localização de genes ribossômicos em cromossomos, foi a hibridação *in situ* (ISH). Muito embora o auge dessa técnica tenha sido alcançado somente na década de 80 (VERMA & BABU, 1995), a técnica de ISH com sondas radioativas de ácidos nucleicos, foi desenvolvida no final da década de 60 por Pardue e Gall e posteriormente utilizada na detecção dos genes ribossômicos em cromossomos humanos (HENDERSON *et al.* 1972). Depois da técnica de hibridação celular somática, a hibridação *in situ* foi a segunda técnica mais utilizada na localização e mapeamento de genes em seres humanos (BUCKLE & KEARNEY, 1994).

Embora a técnica de ISH tenha se constituído em uma poderosa ferramenta citogenética capaz de localizar de forma precisa todos os genes ribossômicos, independentemente de seu número e de sua atividade; os inconvenientes gerados pela manipulação de sondas radioativas, utilizadas inicialmente, levaram ao desenvolvimento de modos alternativos de marcação das sondas, tais como técnicas enzimáticas e fluorescentes. Particularmente a adaptação do método de marcação fluorescente das sondas, marcou o surgimento de uma variante da ISH, a hibridação *in situ* fluorescente (FISH), que é atualmente uma das técnicas mais utilizadas na detecção de sequências de DNA, notadamente do rDNA (VERMA & BABU, 1995; LACADENA, 1996).

Posteriormente ao surgimento da ISH foi desenvolvida a técnica de impregnação com nitrato de prata (AgNO_3) (GOODPASTURE & BLOOM, 1975; HOWELL & BLACK, 1980), a qual, por ser tecnicamente mais simples e economicamente mais acessível que a ISH, converteu-se no método mais utilizado para detecção das regiões organizadoras do nucléolo em preparações cromossômicas (ZURITA *et al.* 1998). Embora o mecanismo de ação desta técnica seja bastante discutível, costuma-se aceitar que o AgNO_3 , sob determinadas condições, deposita-se em todas as NORs transcricional ou potencialmente ativas (MEDINA *et al.* 1983).

As informações quantitativas e qualitativas proporcionadas pela FISH e impregnação com prata respectivamente, têm sido de singular importância no estudo das

NORs. O uso combinado dessas duas técnicas é, especialmente importante em estudos da variabilidade das NORs, pois enquanto a FISH permite estimar a quantidade relativa de rDNA presente em uma determinada NOR, a prata determina sua atividade transcricional (SUZUKI *et al.*, 1990; LEITCH & HESLOP-HARRISON, 1992; ZURITA *et al.* 1997;1998).

1.4. FISH e impregnação com prata em Hymenoptera

Dados sobre a localização cromossômica da região organizadora de nucléolos e/ou genes ribossômicos (seja por impregnação por prata ou hibridação *in situ*) são bastante escassos na ordem Hymenoptera. Por razões que ainda não foram totalmente esclarecidas, o emprego da impregnação argêntica em cromossomos de certos himenópteros não parece ser eficaz na localização das NORs (IMAI e TAYLOR, 1989).

IMAI & TAYLOR (1989) e IMAI *et al.* (1992) demonstraram que em formigas, durante a divisão celular, especialmente na metáfase, a impregnação com prata marcava a região centromérica de todos os cromossomos. A partir de tais resultados estes autores propuseram que em Hymenoptera, especialmente em formigas, a prata parece ter mais afinidade com proteínas cinetocóricas que com proteínas associadas à NOR, revelando, dessa forma, cinetócoro ao invés de NORs ativas.

Uma outra hipótese proposta por IMAI *et al.* (1992) para explicar a ausência de marcações AgNO₃ positivas nas NORs de himenópteros, seria a ausência, no nucléolo destes organismos, dos centros fibrilares, como observado em *Drosophila*. No entanto, alguns resultados satisfatórios na localização de NORs pela prata, em espécies de himenópteros, incluindo formigas, podem ser uma evidência em contra a essa hipótese (PALOMEQUE *et al.*, 1988; 1990b; LORITE *et al.* 1997; MENEZES, 1997; BALDANZA *et al.* 2000; MAFFEI *et al.* 2001).

A afinidade da prata por outras estruturas cromossômicas, além das NORs (SÁNCHEZ *et al.* 1995), pode ser um dos maiores complicadores na interpretação do padrão de impregnação argêntica em Hymenoptera. Por outro lado, a técnica de hibridação

in situ com sondas ribossômicas (particularmente a FISH), tem-se revelado uma ferramenta extremamente útil na localização dos genes ribossômicos (e, por extensão, das NORs) em diferentes espécies de himenópteros (HIRAI *et al.* 1994, LORITE *et al.* 1997; BEYE & MORITZ, 1993; BRITO *et al.* 1998).

Trabalhos envolvendo a combinação entre a FISH e a impregnação com a prata para o estudo das NORs em Hymenoptera são ainda escassos na literatura (LORITE *et al.* 1997; POMPOLO *et al.* 2001), contudo, mesmo quando a impregnação com prata não parece ser a técnica mais viável para a detecção das regiões organizadoras nucleolares, os resultados obtidos pelo emprego da FISH podem ser bastante informativos, não somente por permitirem a localização inequívoca de todas as NORs presentes no genoma, como também por serem úteis em estudos de caracterização ou evolução do cariótipo (GOSDEN *et al.* 1978; SUZUKI *et al.* 1992; PENDAS *et al.* 1993; HIRAI *et al.* 1994).

2. OBJETIVOS

2.1. Justificativa

O estudo dos cromossomos B na ordem Hymenoptera, seja pelo baixo número de espécies portadoras desses cromossomos ou pela suposta inexistência dos mesmos para a maioria das espécies, tem-se restringido à descrição da ocorrência e a caracterizações por bandamentos. Embora muitos cromossomos B de espécies animais e vegetais já tenham sido amplamente estudados, tanto em âmbito citogenético, como em outros campos do conhecimento genético e evolutivo; entre os himenópteros, aspectos básicos como o estudo da dinâmica destes cromossomos (ocorrência, frequência, transmissão etc.) ou seu estado evolutivo nas populações que os possuem, ainda são escassos.

ARAÚJO *et al.* (2000) detectaram e caracterizaram um sistema de cromossomos supranumerários presente em dez populações naturais de *T. albitarse*. Aspectos tais como morfologia dos cromossomos B e seu padrão de bandamento C e fluorocromos base-específicos foram determinados. O padrão de bandamento semelhante entre cromossomos A e B, bem como a abundância de pares de bases G-C na composição dos B, levaram estes autores a inferirem a origem dos B a partir de rearranjos em cromossomos do complemento A, particularmente do cromossomo portador de genes ribossômicos. Apesar disso, outras questões referentes à dinâmica e evolução dos B em *T. albitarse* permaneceram em aberto.

Com este trabalho damos seguimento ao estudo iniciado por ARAÚJO *et al.* (2000). As coletas de espécimens foram mantidas nas populações previamente amostradas por esses autores e novas populações foram selecionadas, de modo a permitir um estudo comparativo da distribuição, dinâmica e evolução dos cromossomos B em diferentes populações de *T. albitarse*, no decorrer de cinco anos.

2.2. Objetivos Gerais

O presente trabalho teve como objetivos principais:

1. Analisar a frequência e evolução dos cromossomos B de *T. albitarse* a partir dos dados obtidos por ARAÚJO *et al.* (2000);
2. Analisar comparativamente a frequência espaço-temporal dos cromossomos B, bem como seu estado evolutivo nestas populações, ao longo dos cinco anos de amostragem, com a manutenção das coletas nas mesmas populações selecionadas por ARAÚJO *et al.* (2000);
3. Estudar a distribuição e frequência dos B em novas populações de *T. albitarse*, comparar os resultados com os obtidos para as demais populações estudadas e comprovar se a dinâmica e estado evolutivo inferidos para os cromossomos B das ‘populações antigas’ são consistentes com o observado nas novas populações de *T. albitarse*.
4. Por meio de hibridação *in situ* fluorescente, identificar o cromossomo portador de genes ribossômicos e investigar a presença desses genes nos cromossomos B de *T. albitarse*.
5. Aspectos como a descoberta de apenas um cromossomo portador de genes ribossômicos por genoma haplóide em *T. albitarse*, a extrema variação no tamanho da região ribossômica deste cromossomos, aliado à ineficiência da técnica de impregnação com prata na localização cromossômica dos genes ribossômicos ativos nesta espécie, nos levaram a quantificar a atividade nucleolar em núcleos interfásicos de machos e fêmeas e inferir a respeito da atividade desses genes em relação à diferença de ploidia nessa espécie.

Integration of a B chromosome into the A genome of a wasp

S. M. S. R. Araújo^{1,3}, S. G. Pompolo², F. Perfectti³ and J. P. M. Camacho³

¹ Departamento de Biologia Celular, Universidade Estadual
de Campinas (UNICAMP), 13083 Campinas, SP, Brazil
e-mail: saraujo@ugr.es

² Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa (UFV),
36571-000 Viçosa, MG, Brazil
e-mail: spompolo@mail.ufv.br

³ Departamento de Genética, Facultad de Ciencias,
Universidad de Granada, E-18071 Granada, Spain
e-mail: fperfect@ugr.es
e-mail: jpmcamac@ugr.es

Short title: B chromosome integration into the A genome

Key words: B chromosomes, genomic parasitism, *Trypoxylon albitarse*

Summary

B chromosomes are genome symbionts whose presence in many eukaryote species is explained, in most cases, by their violation of Mendelian rules, usually based on meiotic or mitotic instability, leading to their accumulation in the germ line (drive). B chromosome integration in the genome as a regular member of the chromosome set, however, should imply the loss of drive. A possible way to surpass this difficulty is to regularise meiosis when the B is frequent in the population, in order to yield gametes with 1B. In diploid organisms, this task needs to be achieved in the two sexes, but in haplodiploids the problem simplifies to only the diploid sex. We have found in the solitary wasp *Trypoxylon albitarse* the first evidence of a B chromosome that is regularising its meiotic behavior and limiting its number to one B per haploid genome, the same dosage as the standard (A) chromosomes. It suggests a possible way for B chromosome integration as a regular member of the chromosome complement.

1. INTRODUCTION

Some individuals in many eukaryote populations harbour dispensable extra chromosomes, the so-called B chromosomes (Jones & Rees 1982). These may be considered as genomic symbionts which, in the majority of studied cases, exhibit parasitic behaviour to the detriment of their host genome (Jones & Rees 1982; Beukeboom 1994; Camacho *et al.* 2000). As a rule, B chromosomes lack the regular meiotic behaviour that guarantees normal chromosome segregation and Mendelian inheritance for the autosomes (two homologous chromosomes segregating to different gametes). This irregularity may constitute the basis for B accumulation in the germ line through a variety of drive mechanisms that enable B maintenance in natural populations (Jones 1991). B drive, however, also impedes B stabilisation as a normal member of the A chromosome set. Theoretical solutions to this trade-off could be either B elimination (Camacho *et al.* 1997) or B integration into the A genome with the subsequent increase in chromosome number.

The possibility of B chromosome integration into the host genome was pointed out long ago. One suggested mode of integration involves coevolutionary changes in the B chromosome and the A genome leading to the attenuation of B effects to a null or even beneficial state (Kimura & Kayano 1961; Hewitt 1973). Theoretical and empirical research, however, indicates that the arms race between the A and B chromosomes could also lead to an endless cycle of parasitic B neutralisation by the host genome followed by B mutations which re-establish transmission drive to begin a new cycle (Camacho *et al.* 1997). A second mechanism of B integration has been suggested by the observation of spontaneous fusions between A and B chromosomes in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* (Henriques-Gil *et al.* 1983; Cabrero *et al.* 1987) and maize (Maguire 1995). Although this possibility cannot be ruled out, the fact that neither of these chromosome fusions has invaded natural populations suggests the existence of major constraints for their frequency increase in natural populations. Alternatively, a more direct mode of B integration would be to imitate A chromosomes by acquiring regular meiosis, i.e. consistent pairing during prophase in both sexes (in diploid organisms), and segregating one B to each anaphase-I pole and thus to each gamete. The need for this double achievement (in both male and female meioses) is

likely a major barrier to this path of B integration in diploid organisms. In fact, most B chromosomes in diploid organisms do accumulate in only one sex, evidencing that male and female meiosis may not be identical from a B chromosome's perspective. In haplo-diploids, however, meiosis occurs in only one sex (the diploid one) and hence this may provide a more suitable context in which B chromosome integration may evolve.

In the present work, we report evidence for a B chromosome whose number is being limited to one B per haploid genome, the same dosage as the standard (A) chromosomes, in the wasp *Trypoxylon albitarse*. It suggests a possible way for B chromosome integration as a regular member of the chromosome complement.

2. MATERIALS AND METHODS

Trypoxylon albitarse (Hymenoptera, Sphecidae, Larrinae) is an approximately 2.5 cm sized solitary haplo-diploid wasp inhabiting mud nests and showing a wide distribution in South America. Chromosome number is known in only 12 out of 355 *Trypoxylon* species. Among these 12 species, chromosome number varies from $2n=18$ to $2n=32$ (Hoshiba & Imai 1993). Very little is known, however, about the behavioural ecology of this species. Each nest is occupied by a single female and a single guarding male whose paternity proportion of the nest brood is unknown. Females provide food (spiders) to each nest-cell before laying an egg in it. The offspring in a single nest exist at various developmental stages since eggs are laid sequentially depending on when the cells contain enough food for the future larvae.

Between 1996 and 1997, we sampled a total of 366 *T. albitarse* larvae from 159 nests collected at ten natural populations in the state of Minas Gerais, Brazil (Table 1). In each nest, we collected all available larvae but, due to sequential development, only a fraction of offspring per nest were at the appropriate stage for cytological analysis. In most nests, we analysed one male and one female, but in a few nests we analysed only one individual (of either sex) and in few others we analysed several individuals from the same sex (up to four). The cytological analyses (mainly C-banding and fluorochrome staining)

were performed on cerebral ganglia of larvae at the post-defecating stage, according to the techniques described in Araújo *et al.* (2000).

The statistical analysis of the data was performed by giving the same weight to each nest, independently of the number of individuals analysed, in order to avoid pseudo-replication due to the non independence of a same nest's individuals. For this purpose, for any variable, a mean per nest was obtained in those nests where several individuals had been analysed. All statistical comparisons were performed by means of non parametric tests, because all variables did not satisfy normality.

To compare B-chromosome number in males and females, we calculated the number of B-chromosomes per haploid A-genome (B_{hg}) and compared it between sexes by the Mann-Whitney test in each population separately. Kruskal-Wallis ANOVA was used for testing differences among populations.

Meiotic stabilisation is a possible process for a B chromosome to preserve its existence in the host genome. A B chromosome which acquires a meiotic behaviour similar to that of the A chromosomes, i.e. to pair at prophase and segregate to opposite poles at anaphase, would secure its presence in all gametes. Such an achievement in a haplodiploid organism like *T. albitarse* would inevitably lead to all females carrying two Bs and all males carrying one B, i.e. one B per haploid A-genome. To quantify the stabilisation process of the B chromosome, we calculated a stabilisation index (SI), which is defined as the proportion of individuals carrying one B per haploid A-genome. For a diploid organism this would coincide with the proportion of individuals carrying two Bs. Differences among populations were tested by the Kruskal-Wallis ANOVA, and differences between sexes by the Mann-Whitney test. Temporal variation for SI in each population was tested by the Kruskal-Wallis ANOVA.

We compared a matrix of between-population geographical distances with one of between-population SI differences, by means of a Mantel test, to measure the degree of relationship between both matrices and thus investigate possible SI spatial patterns. The significance of the test was obtained by permutation.

3. RESULTS

In addition to the standard A genome consisting of 32 chromosomes in the females and 16 chromosomes in the males, two types of B chromosomes were found. Both kinds of B chromosome were completely heterochromatic, but the predominant type was metacentric and the other was acrocentric. The acrocentric B chromosome could be a variant derived by deletion or pericentric inversion, since both B variants showed very similar response to C banding and fluorochrome techniques (Araujo *et al.* 2000). On this basis and from the absence of male larvae carrying the two B types in 15 nests where the mother carried both B types (as deduced from her progeny), we decided to consider both B types as a whole for subsequent analyses.

In populations from the Viçosa region, most females carry two B chromosomes and most males carry a single one (Figure 1). This observation suggests that a process of B stabilisation is taking place in the genome of *T. albitarse*. Such a process might have been completed in three populations (V. Cristal, Silvestre and Centro) where all females carried two Bs and all males carried one. In Nova Ilha, the single population analysed from the Porto Firme region, B chromosomes were found in only three males from three different nests (27.3%). This suggests that Bs might have recently invaded this locality.

The number of B chromosomes per haploid A-genome (B_{hg}) was compared between sexes and populations. No significant differences between sexes in any of the ten populations were found (results not shown), but differences among populations were significant (Kruskal-Wallis ANOVA: $H= 100.6$, $df= 9$, $p<0.0001$). The same result was obtained for the metacentric ($H= 45.6$, $df= 9$, $p< 0.0001$) and the acrocentric ($H= 24.0$, $df= 9$, $p=0.0043$) Bs separately.

We calculated the stabilisation index per nest, sex, and population (Figure 2). SI differed significantly among populations (range: 0.118-1; $H= 98.39$, $df= 9$, $p< 0.0001$) but not between sexes in any population (results not shown). The nine populations from the Viçosa region also differed significantly between them for the SI ($H= 24.08$, $df= 8$, $p=0.0022$), although the range was much shorter (0.816-1). A comparative analysis of the SI

between the four reproductive seasons studied showed no significant differences in most populations, with the exception of the Campus population (one of the most intensively sampled) that showed a significant tendency to stabilisation during this two-year period ($H= 12.31$, $df= 3$, $N= 33$ nests, $p= 0.0064$). The B was unstable in the first season (as deduced from the presence of several males with two B chromosomes) but stable in the other three successive seasons. The B chromosome was completely stabilised, or very close to completely stabilised, in populations from the Viçosa region, where B frequency was high (Figure 2). In contrast, the population with low B frequency (Nova Ilha) was rather far from B stabilisation. A Mantel test comparing a matrix of geographical distances between populations with one of population differences in the SI showed very good fit between both matrices ($Z= 0.881$, $P= 0.022$). This is consistent with B chromosome invasion from a centre of origin likely focused on Centro and Silvestre populations.

4. DISCUSSION

Our results are completely novel, and illuminate a simple way for B chromosomes to integrate themselves into the A genome, i.e. their stabilisation to the number of one B per haploid A genome (B_{hg}). Several populations (V. Chaves, Silvestre and Centro) seem to be at or near B stabilisation since all nests analysed contained individuals with one B_{hg} . The remaining populations from the Viçosa region showed B_{hg} close to one, although some variation is explained by the presence of some males with 0B or 2B, and some females with 1B, 3B or 4B. These signs of instability are characteristic of all known B chromosomes, although at a much higher degree (Jones & Rees 1982). For comparison, we have calculated the stabilisation index (SI) for B chromosomes in several species. SI was 0.036 in *Crepis capillaris* (Parker *et al.* 1991), 0.179 in *Allium schoenoprasum* (Holmes & Bougourd 1989), 0.020-0.250 in maize (Rosato *et al.* 1998), 0.097-0.130 in the mouse *Apodemus flavicollis* (Vujošević & Blagojević 1995), 0.034-0.452 in the grasshopper *Myrmeleotettix maculatus* (Hewitt & John 1970), and 0.400 in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* (Zurita *et al.* 1998). In sharp contrast, the B chromosome of *T. albitarse* reached SI values from 0.816 to one in the Viçosa region.

It has been shown in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* that B chromosomes need drive to invade populations and to establish a polymorphism (Camacho *et al.* 1997). In *T. albitarse*, it is likely that B chromosomes show meiotic drive in females at the initial phases of B chromosome invasion but when the B reaches high frequency, the drive be masked by regular B chromosome pairing and segregation during female meiosis. An extremely high tendency for regular B-pairing in females with two Bs, thus forming ova with 1B, could be therefore the key for B chromosome stabilisation in *T. albitarse*. It is clear that the possibility for this kind of stabilisation is easier in haplodiploid organisms because pairing and regular segregation needs to be achieved in the diploid sex only (see Introduction), although a regular mitotic behaviour of the B chromosome during spermatogenesis is also needed. It has been suggested that the Y chromosome in *Drosophila* possibly derived from a B chromosome (Hackstein *et al.* 1996). In this case, remarkably, meiotic regularisation would also need to be achieved in one sex only.

Pairing of B chromosomes has been suggested as a mechanism to avoid meiotic loss (Carlson & Roseman 1992). These authors proposed that the typical non-disjunction of some B chromosomes at meiosis increases the number of individuals with two B chromosomes thus minimizing B meiotic loss by increasing B bivalent frequency. For the same reason, pairing between the two Bs avoids their meiotic accumulation.

B chromosomes are rare in Hymenoptera, the scarce cases having been reported in only five ant species, *Leptothorax spinosior* (Imai 1974), *Aphaenogaster rudis* (Crozier, 1975), *Podomyrma adelaide* (Imai *et al.* 1977), *Pseudolacius sp2.* and *Prenolepis jerdoni* (Imai *et al.* 1984), two wasp species, *Nasonia vitripennis* (Werren 1991) and *T. albitarse* (Araújo *et al.* 2000; this paper), and a bee, *Partamona cupira* (Costa *et al.* 1992).

In the wasp *Nasonia vitripennis*, the 'paternal sex ratio' (PSR) B chromosome avoids meiotic loss by being transmitted only by the haploid sex (males), and thus bypassing meiosis in the diploid sex (females) (Werren 1991). PSR is transmitted through male gametes that fertilise ova to produce females. However, PSR causes the condensation and loss of the paternal chromosomes accompanying it, transforming the diploid zygote into a haploid B-carrying male (Werren *et al.* 1987).

Several evolutionary strategies could be followed by B chromosomes to persist in populations. The most widespread is to have accumulation mechanisms (e.g., chromosome meiotic drive or mitotic instability), but other strategies are also possible, including beneficial fitness effects to the host. This is the case for heterotic B chromosomes represented by the B chromosome of the chive *Allium schoepranoprasum* which improve survival from seed to seedling (Holmes & Bougourd 1989; Bougourd *et al.* 1995), or the B chromosome in the fungus *Nectria haematococca* which provides resistance to an antibiotic produced by the plant host (Miao *et al.* 1991). In addition, avoidance of meiotic loss by eluding meiosis (as PSR), or by regularization of the meiotic behaviour (as appears to occur in *T. albitarse*) also lead to B chromosome maintenance, although only the last mechanism is able to integrate B chromosomes as members of the A genome.

Acknowledgement

We thank M.J.P. Araújo for his assistance in the collection of specimens, L. Beukeboom and T. Sharbel for critical reading of the manuscript and useful comments, and S.T.P. Amarantes (Zoology Museum of USP) for his valuable information on the taxonomy of *T. albitarse*. This study was in part supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior and Conselho Nacional de Pesquisa (S.M.S.R.A and S.G.P.), and Ministério de Ciencias y Tecnología (BOS2000-1521) and Junta de Andalucía (CVI-165) (F.P. and J.P.M.C.).

REFERENCES

- Araújo, S. M. S. R., Pompolo, S. G., Dergam, J. A. S. & Campos, L. A. O. 2000 The B chromosome system of *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* (Hymenoptera, Sphecidae). 1. Banding analysis. *Cytobios* **101**, 7-13.
- Beukeboom, L. W. 1994. Bewildering Bs: an impression of the first B-chromosome conference. *Heredity* **73**, 328-336.
- Bougourd, S. M., Plowman, A. B., Ponsford, N. R., Elias, M. L., Holmes, D. S. & Taylor, S. 1995 The case for unselfish B-chromosomes: evidence from *Allium schoenoprasum*. In *Kew Chromosome Conference IV* (ed. P. E. Brandham & M. D. Bennet), pp. 21-34. Kew, UK: Royal Botanic Gardens.
- Cabrero, J., Alché, J. P. & Camacho, J. P. M. 1987 Effects of B chromosomes of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* on nucleolar organiser regions activity. Activation of a latent NOR on a B chromosome fused to an autosome. *Genome* **29**, 116-121.
- Camacho, J. P. M., Shaw, M. W., López-León, M. D., Pardo, M. C. & Cabrero J. 1997 Population dynamic of a selfish B chromosome neutralized by the standard genome in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Am. Nat.* **149**, 1030-1050.
- Camacho, J. P. M., Sharbel, T. F. & Beukeboom, L. W. 2000 B-chromosome evolution. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* **355**, 163-178
- Carlson, W. R. & Roseman, R. R. 1992 A new property of the maize B chromosome. *Genetics* **131**, 211 -223.

- Costa, M. A., Pompolo, S. G. & Campos, L. A. O. 1992 Supernumerary chromosomes in *Partamona cupira* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Rev. Bras. Genet.* **15**, 801-806.
- Crozier, R.H. 1975 *Hymenoptera*. In: John, B. (Ed.). *Animal cytogenetics*. Berlin: gebruder bornatraeger,. (Insecta, 7).
- Hackstein, J. H. P., Hochstenbach, R., Hauschteckjungen, E. & Beukeboom, L. W. 1996 Is the Y chromosome of *Drosophila* an evolved supernumerary chromosome? *Bioessays* **18**, 317-323.
- Henriques-Gil, N., Arana, P. & Santos, J. L. 1983 Spontaneous translocations between B chromosomes and the normal complement in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Chromosoma* **88**, 145-148.
- Hewitt, G. W. 1973 The integration of supernumerary chromosomes into the orthopteran genome. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **38**, 183-194.
- Hewitt, G. M. & John, B. 1970 The B-chromosome system of *Myrmeleotettix maculatus* (Thunb). IV. The dynamics. *Evolution* **24**, 169-180.
- Holmes, D. S. & Bougourd, S. M. 1989 B-chromosome selection in *Allium schoenoprasum*. 1. Natural populations. *Heredity* **63**, 83-87.
- Hoshiba, H. & Imai, H.T. 1993 Chromosome evolution of bees and wasps (Hymenoptera, Apocrita) on the basis of C-banding pattern analyses. *Jpn. J. Ent.* **61**, 465-492.
- Imai, H.T. 1974 B-chromosomes in the Myrmecine ant, *Leptothorax spinosior*. *Chromosoma* **45**, 431-444.

- Imai, H.T., Crozier, R.H. & Taylor, R.W. 1977 Karyotype evolution in Australian ants. *Chromosoma* **59**, 341-393.
- Imai, H.T., Brown Jr, W.L., Kubota, M., Young, H.S. & Tho, Y.P. 1984 Chromosome observations of tropical ants in western Malaysia. *Ann. Rep. Natl. Inst. Genet.* **34**, 66-69.
- Jones, R. N. 1991 B-chromosome drive. *Amer. Nat.* **137**, 430-442.
- Jones, R. N. & Rees, H. 1982 *B chromosomes*. New York: Academic Press.
- Kimura, M. & Kayeno, H. 1961 The maintenance of supernumerary chromosomes in wild populations of *Lilium callosum* by preferential segregation. *Genetics* **46**, 1699-1712.
- Maguire, M. P. 1995 A stably transmitted pair of translocated supernumerary chromosomes in maize. *Genome* **38**, 558-565.
- Miao, V. P., Covert, S. F. & VanEtten, H. D. 1991 A fungal gene for antibiotic resistance on a dispensable ('B') chromosome. *Science* **254**, 1773-1776.
- Parker, J. S., Jones, G. H., Edgar, L. A. & Whitehouse, C. 1991 The population cytogenetics of *Crepis capillaris* IV. The distribution of B-chromosomes in British populations. *Heredity* **66**, 211-218.
- Rosato, M., Chiavarino, A. M., Naranjo, C. A., Cámara-Hernández, J. & Poggio, L. 1998 Genome size and numerical polymorphism for the B chromosome in races of maize (*Zea mays* ssp. *mays*, Poaceae). *Amer. J. Bot.* **85**, 168-174.

- Vujošević, M. & Blagojević, J. 1995 Seasonal changes of B-chromosome frequencies within the population of *Apodemus flavicollis* (Rodentia) on Cer mountain in Yugoslavia. *Acta Theriologica* **40**, 131-137.
- Werren, J.H. 1991 The paternal-sex-ratio chromosome of *Nasonia*. *Am. Nat.* **142**, 224-241.
- Werren, J. H., Nur, U. & Eickbush, D. G. 1987 an extrachromosomal factor causing loss of paternal chromosomes. *Nature* **327**, 75-76.
- Zurita, S., Cabrero, J., López-León, M.D. & Camacho, J. P. M. 1998 Polymorphism regeneration for a neutralized selfish B chromosome. *Evolution* **52**, 274-277.

Table 1

Populations sampled, localisation and number of nests and larvae analysed.

population	district	geographical coordinates	nests	larvae	
				female	male
Amoras	Viçosa	20° 42' 46" S 42° 54' 08" W	26	30	26
Campus	Viçosa	20° 45' 54" S 42° 51' 31" W	20	22	24
Centro	Viçosa	20° 45' 05" S 42° 52' 50" W	6	1	7
Marrecos	Viçosa	20° 50' 17" S 42° 51' 51" W	22	34	36
Nova Ilha	Porto Firme	20° 43' 21" S 43° 05' 33" W	10	9	12
Palmital	Viçosa	20° 49' 20.9" S 42° 50' 58.3" W	18	28	27
Paraiso	Viçosa	20° 50' 05" S 42° 50' 58" W	12	7	14
Silvestre	Viçosa	20° 43' 34" S 42° 52' 45" W	11	7	11
V. Chaves	Viçosa	20° 45' 05" S 42° 50' 38" W	15	20	11
V. Cristal	Viçosa	20° 46' 08" S 42° 50' 17" W	19	21	19

Figure 1

B chromosomes in ten Brazilian populations of the wasp *T. albitarse*. Open bars correspond to females and solid bars to males.

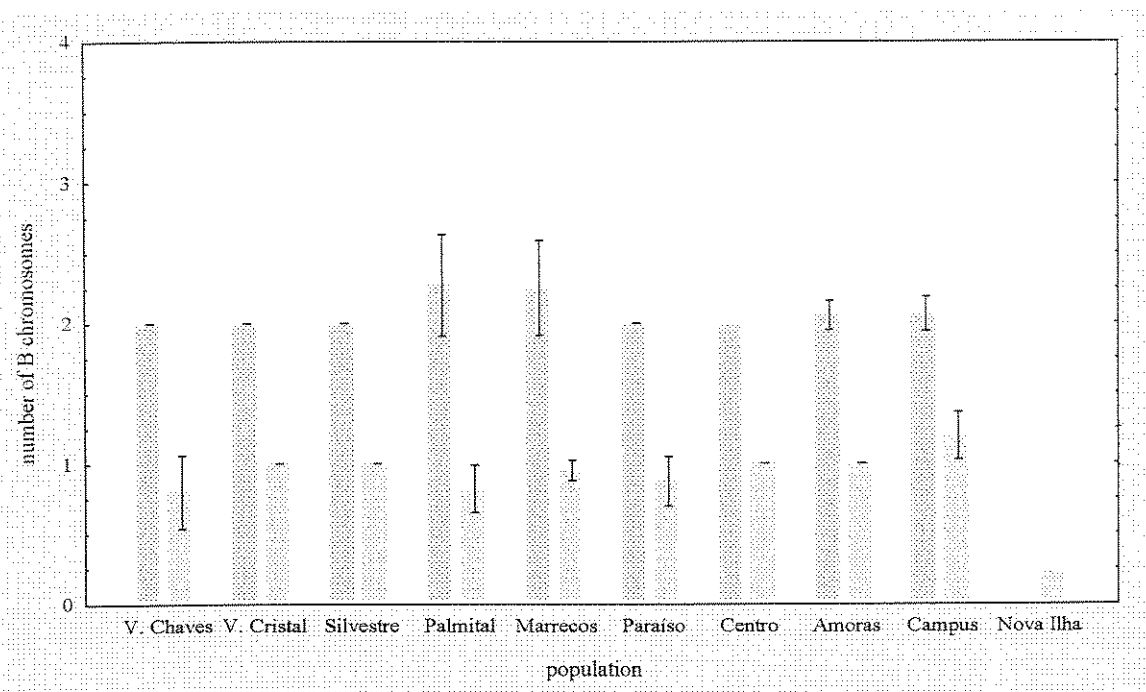
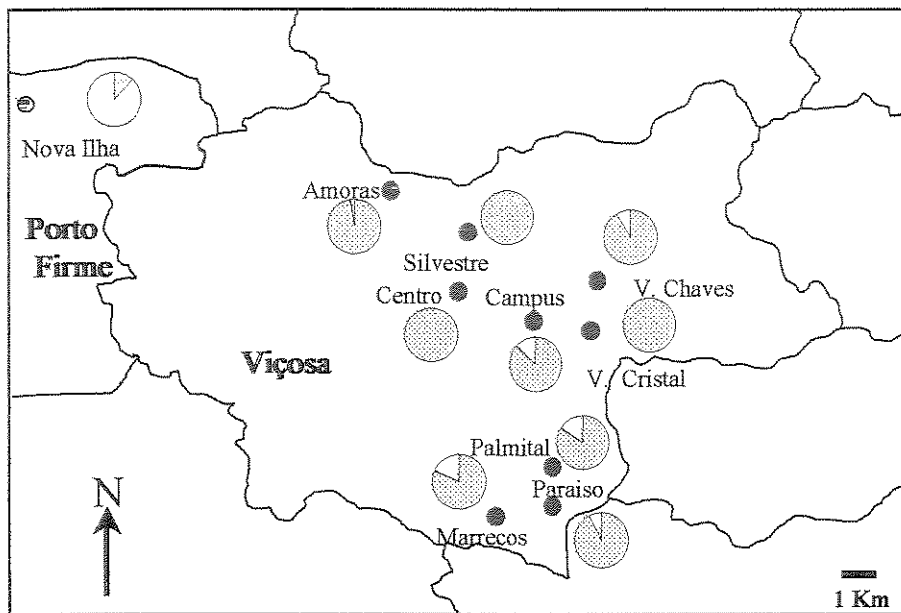


Figure 2

Geographical variation in the SI.



Integration of a B chromosome into the A genome of a wasp, revisited

S. M. S. R. Araújo^{1,3}, S. G. Pompolo², F. Perfectti³ and J. P. M. Camacho³

¹ Departamento de Biologia Celular, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 13083 Campinas, SP, Brazil
e-mail: saraujo@ugr.es

² Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa (UFV), 36571-000 Viçosa, MG, Brazil
e-mail: spompolo@mail.ufv.br

³ Departamento de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, E-18071 Granada, Spain
e-mail: fperfect@ugr.es
e-mail: jpmcamac@ugr.es

Short title: B chromosome integration, revisited

Key words: B chromosome frequency, population dynamics, *Trypoxylon albitarse*, drive, meiotic behaviour, integration.

Summary

A previous study showed that, in the haplodiploid solitary wasp *Trypoxylon albitarse*, most individuals carry one B chromosome per haploid genome, the same dosage as the standard (A) chromosomes, suggesting a possible regularization of B chromosome meiotic behaviour and its integration into the A genome. In a new sampling, we have analysed fifteen populations (including nine out of the ten previously analysed) to test the evolution of this integration process. The new results provide a direct report of the invasion process in the Porto Firme population, where B frequency has dramatically increased in only four generations. In the populations from the Viçosa region, however, B frequency has remained stable, although the principal B type, the metacentric one, has increased in frequency at the expense of the acrocentric one in several populations. The implications of these new results on the hypothesis of the integration of these B chromosomes, as regular members of the A genome, are discussed.

1. INTRODUCTION

B chromosomes are genome parasites maintained in natural populations of many eukaryote organisms at the expense of a variety of accumulations mechanisms (drive) in spite of their harmful effects on the host genome (Camacho *et al.* 2000). In nature, cases of coevolution towards mutualism have been reported, the most popular being the mitochondrion in the eukaryote cell. Explaining how this coevolutionary change takes place in natural populations is one of the most challenging issues of evolutionary biology. In a previous paper, we showed evidence that B chromosomes in the solitary haplodiploid wasp, *Trypoxylon albitarse*, are in the process of becoming regular members of the chromosome complement, because most individuals carried a single B per haploid genome, the same dosage as the standard (A) chromosomes (Araújo *et al.* 2001). We thus postulated that these B chromosomes need drive when they firstly invade a population but it is then lost when B number is regulated to one per haploid genome, most likely because of a high tendency of two Bs to pair in female meiosis. Under this scenario, B invasion and stabilization would be expected to be rapid, and both should lead to the presence of one B per haploid A genome in most individuals.

Our present work tries to test these expectations in a new sampling including nine populations previously analysed, and six new populations of the wasp *Trypoxylon albitarse* (Hymenoptera, Sphecidae, Larrinae). The results met all expectations of a rapid invasion and integration process, and suggest that the metacentric B is fitter than the acrocentric one.

2. MATERIAL AND METHODS

A total of 637 individuals (284 females and 353 males) from 533 nests of *T. albitarse* were collected at fifteen natural populations from five municipalities (Viçosa, Porto Firme, Cajuri, Coimbra and Piranga) on the forest zone of Minas Gerais state (Zona da mata mineira; Brazil), from January 1998 to December 2000 (Table 1). In Viçosa and Porto Firme, we resampled nine of the ten populations analysed previously (Araújo *et al.* 2001).

The methods for cytological and statistical analyses were essentially the same as in our previous report (Araújo *et al.* 2001). The five variables employed for analysis were (1) the number of B chromosomes per haploid A genome (B_{hg}), (2 and 3) the number of metacentric or acrocentric B chromosomes per haploid A genome (Met_{hg} and $Acro_{hg}$, respectively), (4) the stabilization index (B_{SI}) of B chromosomes, i.e. the proportion of individuals carrying one B per A haploid genome (Araújo *et al.* 2001), and (5) the SI of the metacentric B chromosome (Met_{SI}). In the Porto Firme population, some individuals showed intra-individual variation in B number. For statistical analysis, we used the most frequent B number in these mosaic individuals.

3. RESULTS AND DISCUSSION

We firstly analysed temporal variation in the populations sampled twice in the Porto Firme and Viçosa municipalities. The Porto Firme population (Nova Ilha) has showed a spectacular increase in B frequency in only two years, i.e. four generations (Table 2). This increase has been mainly achieved by the metacentric B, which was the only B variant present in the first sampling and the most frequent one in the second. The acrocentric B was absent in the first sampling and has appeared in the second at very low frequency (Fig. 1a). This suggests that the metacentric is the main B chromosome in this system and that the acrocentric is most likely a by-product derived from the metacentric B through deletion and/or inversion (Araújo *et al.* 2000). The high mutability of B chromosomes generating new variants is characteristic of some B chromosome systems, e.g. *Eyprepocnemis plorans* (López-León *et al.* 1993), and is one of the key properties granting a long life for B chromosome polymorphisms (Camacho *et al.* 1997).

This dramatic increase in B frequency provides direct evidence of an invasion episode by the metacentric B, which has passed from a mean frequency equal to 0.133 in the first sampling to 0.883 in the second. The only precedent of a direct report of B invasion in a natural population was shown in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* (Zurita *et al.* 1998). In parallel to the increase in B frequency, B_{SI} and Met_{SI} have increased up to values close to 0.5 (Fig. 1b-c), although they are still lower than those observed in

Viçosa (see Table 3). The occurrence of some mosaic individuals, showing cells with different number of B chromosomes, as well as the presence of some males with 0B or 2B and some females with 1B, 3B or 4B, might explain the lower SI in Porto Firme. In the Viçosa region, the mean frequency of mosaics was 2.5% among males and 7% among females. They were thus 2.77 times more frequent in females than in males. In Porto Firme, however, we found 3.3% of mosaics in males and 31.25% in females, 9.5 times more than in males. It is clear that B instability is lower in males (haploid) than females (diploid), and that instability in females is much higher in Porto Firme than Viçosa. It is interesting to note that the Porto Firme population has been analysed during a period in which B frequency has remarkably increased (suggesting a recent invasion), but populations from the Viçosa region have been analysed once B frequency was high (suggesting an older invasion). It is thus likely that B chromosomes, in Viçosa populations, have had more time for mitotic regularization in the diploid sex. In Porto Firme, the B chromosome has had to face new genetic backgrounds some of which may not facilitate its regular transmission. These signs of instability are commonly found in B chromosomes at higher or lower degree (for review, see Jones & Rees 1982).

In Viçosa, the eight reanalysed populations, as a whole, showed stability for B_{hg} (Fig. 1a) and Met_{SI} (Fig. 1b), but there were significant tendencies for Met_{hg} to increase and $Acro_{hg}$ to decrease (Fig. 1a). These changes in the frequency of these two B chromosomes have been paralleled by a decrease in B_{SI} (Table 3), and were particularly apparent in Amoras, Campus and Vila Cristal populations (Fig. 1c). It is interesting to comment, however, that the overall decrease of B_{SI} in Viçosa is clearly not due to changes in Met_{SI} , but, most likely, is related to the decrease of $Acro_{hg}$.

These results suggest an overall stability in B frequency in this region, although it is only apparent, because a replacement of the acrocentric B by the metacentric B seems to be taking place. The substitution of one B variant for another has previously been reported in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* and was based on the existence of drive for the replacing variant (Zurita *et al.* 1998). In *T. albitarse*, we have no data on B chromosome transmission but the frequency data suggest that transmission efficiency of the metacentric B is higher than that of the acrocentric B. Bearing in mind that the metacentric is the most

frequent B in all populations hitherto analysed and that its invasion ability seems to be very high (as was observed in Porto Firme), it is reasonable to argue that the metacentric B is fitter than the acrocentric one.

The six new populations sampled showed B frequency and stability parameters similar to those observed in the Viçosa region, indicating that they are in a similar evolutionary stage, with most individuals carrying one B per haploid genome and high SI values (see Fig. 1), which is logical given their proximity to Viçosa.

As a whole, our present results give strong support to our hypothesis on the integration of B chromosomes into the A genome of *T. albitarse* by the joint action of drive, which is necessary for the initial invasion, and regularization of B meiotic behaviour in the diploid sex, presumably because of a high tendency of Bs to pair. B chromosome frequency has increased very rapidly in Porto Firme, which is explainable with strong drive. We cannot rule out, however, that bearing one B per haploid genome might be beneficial for the host genome, in which case, invasion would also be rapid. An invaded population would rapidly tend to show most of its individuals harbouring one B per haploid genome, provided that drive (or selection) is strong and meiotic pairing of the two Bs, in 2B females, tends to suppress drive.

The possibility remains that the decrease in the frequency of the acrocentric B and the consequent overall decrease in SI is the result of the arms race between the A and B chromosomes (Camacho *et al.* 1997). In other B chromosome systems, the usual outcome of the arms race is the suppression of B drive (Nur & Brett 1985, 1987, 1988; Shaw & Hewitt, 1990; Herrera *et al.* 1996; Camacho *et al.* 1997). In *T. albitarse*, if our hypothesis is right, drive is suppressed by the regularization of B meiotic pairing. For this reason, suppression of drive is not necessary for the host because it is achieved by the parasite itself. The existence of a low degree of B mitotic instability and a certain rate of mutation of the metacentric into the acrocentric B, which seems to be less fitter, are two additional obstacles that the metacentric B needs to pass to become a regular member of the A chromosome complement.

Acknowledgements

We thank M.J.P. Araújo for his assistance in the collection of specimens and C.C. Silva for her laboratorial assistance. This study was in part supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior and Conselho Nacional de Pesquisa (S.M.S.R.A and S.G.P.), and Ministerio de Ciencia y Tecnología (BOS2000-1521) and Junta de Andalucía (CVI-165) (F.P. and J.P.M.C.).

REFERENCES

- Araújo, S. M. S. R., Pompolo, S. G., Dergam, J. A. S. & Campos, L. A. O. 2000 The B chromosome system of *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* (Hymenoptera, Sphecidae). 1. Banding analysis. *Cytobios* **101**, 7-13.
- Araújo, S. M. S. R., Pompolo, S. G., Perfectti, F. & Camacho J. P. M. 2001 Integration of a B chromosomes into the A genome of a wasp. *Proc. R. Soc. Lond. B* **268**, 1127-1131.
- Camacho, J.P.M., Shaw, M.W., López-León, M.D., Pardo, M.C. & Cabrero, J. 1997 Population dynamics of a selfish B chromosome neutralized by the standard genome in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Am. Nat.* **149**, 1030-1050.
- Camacho, J. P. M., Sharbel, T. F. & Beukeboom, L. W. 2000 B-chromosome evolution. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* **355**, 163-178.
- Herrera, J.A., López-León, M.D., Cabrero, J., Shaw, M.W. & Camacho, J. P. M. 1996 Evidence for B chromosome drive suppression in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Heredity* **76**, 633-639.
- Jones, R. N. & Rees, H. 1982 *B chromosomes*. New York: Academic Press.
- López-León, M. D., Cabrero, J., Pardo, M. C., Viseras, E., Camacho, J. P. M. & Santos, J. L. 1993. Generating high variability of B chromosomes in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Heredity* **71**, 352-362.
- Nur, U. & Brett, B. L. H. 1985 Genotypes suppressing meiotic drive of a B chromosome in the mealy bug *Pseudococcus obscurus*. *Genetics* **110**, 73-92.

- Nur, U. & Brett, B. L. H. 1987 Control of meiotic drive of B chromosomes in the mealy bug *Pseudococcus affinis (obscurus)*. *Genetics* **115**, 499-510.
- Nur, U. & Brett, B. L. H. 1988 Genotypes affecting the condensation and transmission of heterochromatic B chromosomes in the mealy bug *Pseudococcus affinis*. *Chromosoma* **96**, 205-212.
- Shaw, M. W. & Hewitt, G. M. 1990 B chromosomes, selfish DNA and theoretical models: where next? In *Oxford Surveys in Evolutionary Biology*, Vol.7 (ed. D. Futuyma & J. Antonovics), pp. 197-223. Oxford University Press.
- Zurita, S., Cabrero, J., López-León, M.D. & Camacho, J. P. M. 1998 Polymorphism regeneration for a neutralized selfish B chromosome. *Evolution* **52**, 274-277.

Table 1

Number of nests collected and individuals analysed cytologically in the new sampling. The first eight populations and Nova Ilha were also sampled in Araújo *et al.* (2001).

Population	district	geographical coordinates	Nests	Specimens analysed	
				females	males
Nova Ilha (Nil)	Porto Firme	20° 43' 21" S 43° 05' 33" W	36	32	30
Amoras (Amo)	Viçosa	20° 42' 46" S 42° 54' 08" W	43	20	18
Campus (Cam)	Viçosa	20° 45' 54" S 42° 51' 31" W	60	22	28
Vila Cristal (Cri)	Viçosa	20° 46' 08" S 42° 50' 17" W	53	30	29
Palmital (Pal)	Viçosa	20° 49' 20.9" S 42° 50' 58.3" W	37	35	39
Paraíso (Par)	Viçosa	20° 50' 05" S 42° 50' 58" W	18	8	9
Marrecos (Mar)	Viçosa	20° 50' 17" S 42° 51' 51" W	38	8	21
Silvestre (Sil)	Viçosa	20° 43' 34" S 42° 52' 45" W	21	10	8
Vila Chaves (Cha)	Viçosa	20° 45' 05" S 42° 50' 38" W	14	12	20
Barrinha (Bar)	Viçosa	20° 45' 11.5" S 42° 52' 49.5" W	58	22	36
Fundao (Fun)	Viçosa	20° 44' 55.6" S 42° 49' 28.7" W	36	15	22
Cajuri (Caj)	Cajuri	20° 47' 17.4" S 42° 47' 39.7" W	67	29	53
Vila Paraguai (Vpa)	Cajuri	20° 45' 38.3" S 42° 44' 58.3" W	20	10	16
Coimbra (Coi)	Coimbra	20° 51' 21.9" S 42° 48' 15.2" W	10	10	14
Piranga (Pir)	Piranga	20° 40' 18.7" S 43° 18' 28.3" W	22	21	10
Total			533	284	353

Table 2

Comparison of five population parameters between the two sampling periods in the Nova Ilha population from the Porto Firme region, by means of the Mann-Whitney test. See abbreviations in materials and methods. N = Number of nests analysed. P_b = Probability corrected for the sequential Bonferroni method.

	1997	1999	U	P	P_b
	Mean ($N=10$)	Mean ($N= 36$)			
B_{hg}	0.133	0.962	24.5	0.000035	0.000175
Met_{hg}	0.133	0.883	38.5	0.000165	0.000660
$Acro_{hg}$	0	0.079	155.0	0.505557	
B_{SI}	0.133	0.529	91.0	0.017786	0.053358
Met_{SI}	0.133	0.436	113.0	0.074386	

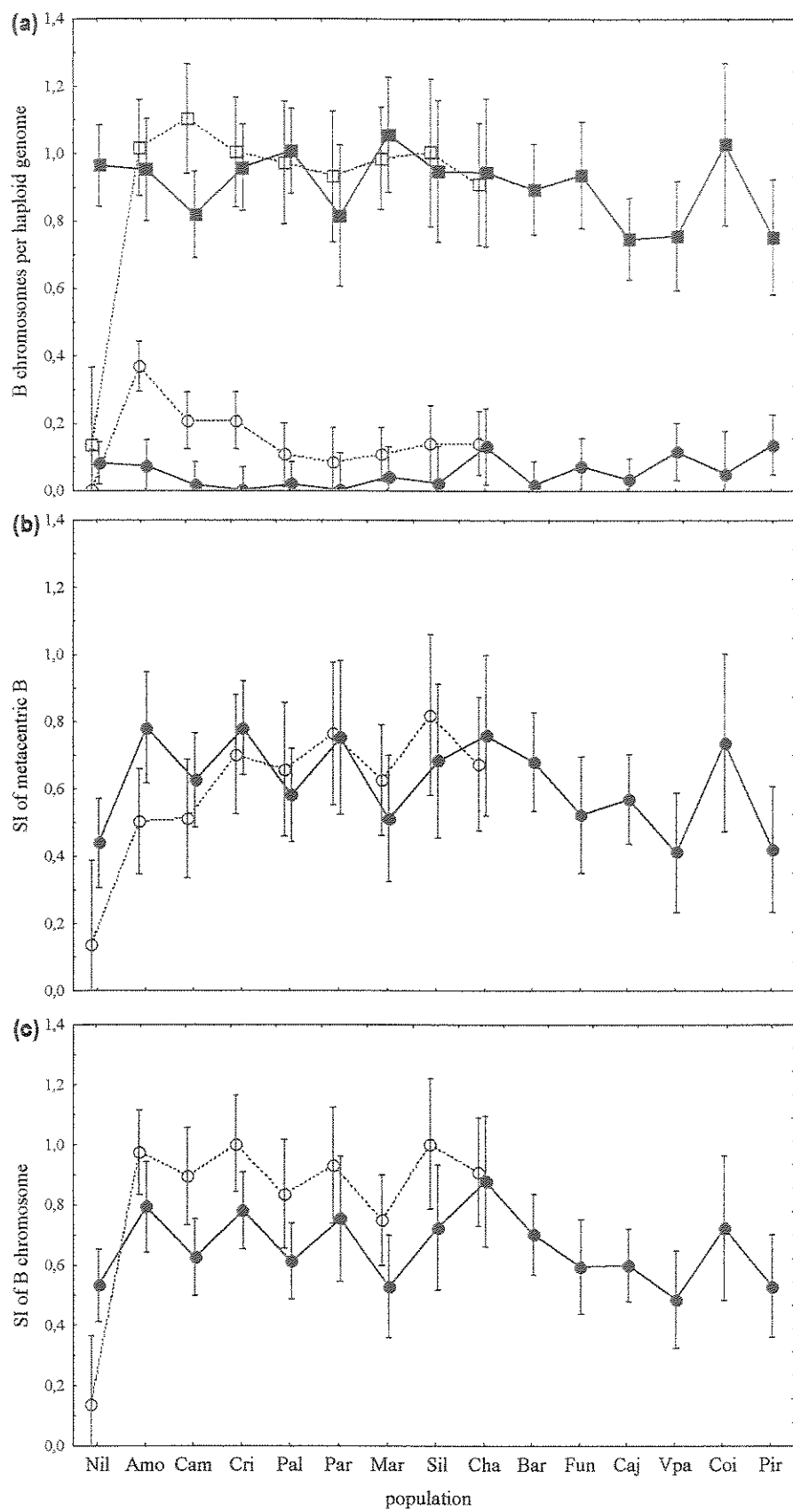
Table 3

Comparison of five population parameters between the two sampling periods in the eight populations from the Viçosa region, by means of the Mann-Whitney test. See abbreviations in materials and methods. N = Number of nests analysed. P_b = Probability corrected for the sequential Bonferroni method.

Item	1996-97	1998-00	U	P	P_b
	Mean ($N=146$)	Mean ($N= 173$)			
B_{hg}	0.993	0.937	11030.5	0.051456	
Met_{hg}	0.810	0.908	10513.0	0.009933	0.0297990
$Acro_{hg}$	0.183	0.029	7295.5	<0.000001	<0.000005
B_{SI}	0.904	0.693	9015.5	0.000011	0.0000440
Met_{SI}	0.633	0.673	11589.0	0.205089	

Figure 1

B chromosome evolution in 15 Brazilian populations of the wasp *Trypoxylon albitarse*. (a) Total number of B chromosomes (B_{hg} ; squares) and number of acrocentric chromosomes ($Acro_{hg}$; circles) per haploid A genome, (b) Stabilization index for the metacentric B chromosome (Met_{SI}), (c) Stabilization index for all kinds of B chromosomes (B_{SI}). Populations analysed by Araújo *et al.* (2001) are represented by open squares or circles and are joined by a dotted line. See population codes in Table 1.



Genetic load caused by variation in the amount of rDNA in a wasp

Sônia Maria da Silva Rocha Araújo^{1,3}, Cynthia Canêdo da Silva², Silvia das Graças Pompolo², Francisco Perfectti³ and Juan Pedro Martínez Camacho³.

¹ Departamento de Biologia Celular, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 13083 Campinas, SP, Brazil; e-mail: saraujo@ugr.es

² Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa (UFV), 36571-000 Viçosa, MG, Brazil; e-mail: spompolo@mail.ufv.br

³ Departamento de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, E-18071 Granada, Spain; e-mail: fperfect@ugr.es; jpmcamac@ugr.es

Short title: Genetic load caused by rDNA variation

Key words: genetic load, rDNA, rRNA genes, NOR, *Trypoxylon albitarse*, Hymenoptera

Correspondence to: Sônia Maria da Silva Rocha ARAÚJO, Departamento de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, E-18071 Granada, Spain. E-mail: saraujo@ugr.es

Summary

Extensive variation for the size of the short (heterochromatic) arm of chromosome 14 was found in the wasp *Trypoxylon* (*Trypargilum*) *albitarse*. Ten different variants were differentiated by size and C-banding pattern. Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) revealed that ribosomal DNA in this species is clustered in the darkly C-banded parts of the heterochromatic short arm of chromosome 14. On this basis, we got an indirect estimate of the amount of rDNA from the area of these dark C-bands. The significant absence of the three chromosome variants with lower amounts of rDNA suggests the existence of a threshold marking the minimum amount of rDNA which is tolerable in haploidy, and hence that these three variants are lethal in males. This implies about 4% genetic load in the population caused by variation in rDNA amount.

1. INTRODUCTION

Intraspecific variation in the size and number of nucleolus organizing regions (NORs), and consequently in the number of rRNA genes, seems to be common in several animal groups, e.g. grasshoppers (White *et al.* 1982), fish (Moreira-Filho *et al.* 1984; Sánchez *et al.* 1990; Martínez *et al.* 1993; Castro *et al.* 1994, 2001; Viñas *et al.* 1996; Ferro *et al.* 2001;), amphibians (Miller & Gurdon 1970; Schmid 1982, King *et al.* 1990), reptiles (Bickham & Rogers 1985) and mammals (Miller 1981). Given the important role these genes play in cell metabolism and their wide variation in natural populations, it is very interesting to ascertain whether this variation is essentially neutral or, on the contrary, some variants are forbidden by natural selection. For instance, in the brown trout, the extensive size polymorphism of the principal NOR (on chromosome 11) seems to be inherited in a Mendelian fashion (Castro *et al.* 1998) and essentially neutral (Martínez *et al.* 1993). In other cases, however, some kind of selection has been invoked to explain the absence of homozygous combinations (Schmid 1982).

The existence of a single rDNA cluster per haploid genome is usually considered plesiomorphic in most organisms. Variations on this starting point might take place in two directions: (i) the single locus may grow or decrease in gene number, or (ii) new loci may appear as a result of non-homologous recombination or transposition (Schubert and Wobus, 1985; Phillips *et al.* 1988). In principle, the increase in rRNA gene number should be well tolerated, at least meanwhile most copies are usually active. High amounts of inactive rDNA seems to be, however, tolerated in some organisms, an extreme case being the grasshopper *Stauroderus scalaris* (López-León *et al.* 1999). But the reduction of rRNA gene number below a minimum, might result deleterious whenever cell needs are not satisfied (Miller & Brown 1969; Miller & Gurdon 1970; Lyckegaard & Clarck 1991).

Trypoxylon (Trypargilum) albitarse, a solitary haplodiploid wasp (males $n=16$; females $2n=32$) inhabiting mud nests, is one of the few cytogenetically studied species in the Sphecidae family, with about 8,000 species. Like the majority of the Sphecidae, *T. albitarse* is not an economically important species, but recent studies have revealed the singular evolutionary value of this species by harbouring the only known B chromosomes

with a chance to be integrated into the A genome (Araújo *et al.* 2001). The standard chromosome complement of *T. albitarse* (males $n=16$ and females $2n=32$) is composed by fourteen pseudoacrocentric chromosomes, as Imai (1991) named hymenopteran chromosomes with a heterochromatic short arm, and two acrocentric chromosomes. In addition, most individuals carry one metacentric or acrocentric heterochromatic B chromosome per haploid genome (Araújo *et al.* 2001). In the standard complement, heterochromatic regions are restricted to the short arm of all chromosomes (Araújo *et al.* 2000). In this report, we show that *T. albitarse* bear a single rDNA cluster located in chromosome 14, which is highly variable in size. This variation implies at least 4% genetic load due to the lethality of those chromosome variants with rDNA amount below a threshold in the haploid sex.

MATERIAL AND METHODS

A total of 592 larvae of *Trypoxylon albitarse* were collected in the municipalities of Viçosa (20° 45' S, 42° 52' W), Porto Firme (20° 43' S, 43° 05' W) and Cajuri (20° 47' 17.4" S, 42° 47' 39.7" W) (Minas Gerais, Southeast Brazil) from January 1998 to December 2000. All cytogenetic techniques were carried out in cerebral ganglia of post-defecating larvae, according to IMAI *et al.* (1988). The C-banding procedure was that described by POMPOLO & TAKAHASHI (1990). For *in situ* hybridization, the pDm 238 plasmid (ROIHA *et al.* 1981), which contains the whole ribosomal unit (18, 28 and 5.8S), and the intervening sequences, of *Drosophila melanogaster* was biotin labelled by the nick translation reaction and used as a probe to analyse the chromosome location of ribosomal genes. Fluorescent *in situ* hybridization (FISH), was performed according to the protocol of VIEGAS-PÉQUIGNOT (1992).

The C-banding preparations were analysed and photographed, in an OLYMPUS BX-60 microscope, with HQ, ISO 25 film, whereas the FISH preparations were analysed and photographed with an OLYMPUS BX-60 epifluorescence microscope, equipped with a fluorescence filter (510-550nm wavelength) for detection of propidium iodide and a

fluorescence filter (450-480nm wavelength) for detection of fluorescein signal. Photographs were taken with Kodak Multispeed, ISO 400 film.

Since there exists a correlation between the number of rRNA genes and the size of the C-band harbouring them (White *et al.* 1982), we measured the C-band area in order to get an indirect estimate of the amount of rDNA in chromosome 14. For this purpose, a total of 20 C-banded mitotic cells (two for each type of chromosome 14), at similar level of chromosomal condensation, were observed at the microscope under a 100X objective, photographed and digitalized. The area of the dark C-bands in the heterochromatic arm of chromosome 14 was measured in arbitrary units (a.u.) using the Image J program, version 1.20s [<http://rsb.info.nih.gov/ij/>]. Hardy-Weinberg equilibrium was tested with the help of the Arlequin program (SCHNEIDER *et al.* 2000).

RESULTS

Our sampling strategy was completely blind in respect to sex, because sex was deduced from ploidy level after cytological analysis. Therefore, our cytological results provide a good estimate of sex ratio in the analysed larval stage. As Table 1 shows, 54.6% out of the 592 individuals analysed cytologically were males, implying that sex ratio is slightly male-biased ($\chi^2_1 = 4.93$, $P = 0.026$).

Chromosome 14 showed extensive variation in the size of the heterochromatic short arm. The C-banding technique permitted us to differentiate ten variants of this chromosome, some of them including both dark and light C-bands in the short arm (Fig. 1). All ten variants were observed in females. In males, however, only seven of them were present, since types 8, 9 and 10 (those with less amount of darkly C-banded regions) were not detected. No homozygous females were found for these three variants. The frequencies of the ten different variants (Table 1) differed between sexes ($\chi^2_9 = 31.36$, $P = 0.00026$) and among populations ($\chi^2_{126} = 207.07$, $P = 0.000007$) (Table 1). The most frequent variants were 2 (0.285), 4 (0.370) and 7 (0.185), the only variants that appeared in all populations analysed. Sex differences were mainly due to the absence of variants 8, 9 and 10 in males

and to difference in the frequency of variant 4 which was more frequent in males (see Table 1). Karyotypic frequencies in females fitted Hardy-Weinberg expectations in all populations analysed (results not shown). In the total sample, however, there was a significant deficit of heterozygotes (0.700 observed versus 0.786 expected) (Exact test using a Markov chain: $P = 0.00039$), most likely reflecting population subdivision. The frequency of variants 8, 9 and 10 in females was, as a whole, 7.8% (see Table 1). Assuming that all chromosome 14 variants are equally viable in haploidy, about 25 males carrying any of these three variants would be expected among the 323 males analysed. The absence of males carrying these variants was thus significant ($\chi^2_1 = 27.35$, $P < 0.000001$).

FISH analysis showed that all rRNA genes are located in the heterochromatic arm of chromosome 14 (Fig. 2). To ascertain whether there is a correspondence between the C-banding and FISH patterns, we performed FISH to the different chromosome 14 variants. The results showed that the rRNA genes are contained in the darkly C-banded regions of the heterochromatic arm of this chromosome. For instance, compare the FISH of variant no. 6, in the inset of Fig. 2, with its C-banding pattern in Fig. 1. This correspondence permitted us an indirect quantification of the amount of rRNA genes contained in the different variants of chromosome 14, by measuring the area of dark C-bands in the heterochromatic arm. The results, expressed in arbitrary units provided by the measuring software (see methods), showed a huge variation: 70, 55, 43, 41, 34, 31, 31, 26, 18 and 8 a.u. for variants 1-10, respectively.

As expected, females (diploid) carried a mean amount of rDNA (84.19 a.u.) about the double that of males (haploid) (43.78 a.u.) ($t = 37.6$, $P < 0.000001$). No differences were observed among populations for the amount of rDNA in females ($F = 1.55$, $df = 14, 254$, $P = 0.095$) or males ($F = 0.77$, $df = 14, 308$, $P = 0.707$).

The absence of males carrying those variants with the lower amount of rDNA suggests the existence of a threshold under which the number of rRNA genes could not be enough to satisfy cell needs for rRNA. This threshold could be about 30 a.u. since the minimum amounts found in both sexes were 31 a.u. in males and 39 a.u. in females. Therefore, the absence of variants 8-10, which contain rDNA under the threshold, seems to be lethal in males. Since these variants cannot be transmitted through males, no

homozygous females can exist (and they were not observed). In consequence, the genetic load, derived from the existence of chromosome variants bearing rDNA amounts under the threshold, is that due to the appearance of males carrying these variants among the progeny of heterozygous females also carrying them, which is the product of the sum of the frequencies of all three variants in females (7.8%) and male frequency in these populations (54.6%). The overall genetic load for all populations analysed was thus 4.26%.

DISCUSSION

FISH has shown the existence of a single chromosome, per haploid genome, carrying rRNA genes in *T. albitarse*. Since the occurrence of a single chromosome pair carrying the NOR appears to be a primitive character (HSU *et al.* 1975), this result is in agreement with the taxonomic classification of the Sphecidae, which is considered one of the most primitive group in the Hymenoptera order (BOHART & MENKE 1976).

Variability in NOR size has been reported in diverse organisms, including hymenopterans (ROUSSELET *et al.* 2000), and seems to be associated with alterations in the number of ribosomal genes (MILLER & BROWN, 1969; MILLER & GURDON 1970; JIMÉNEZ *et al.* 1988, ZURITA *et al.* 1998). In the grasshopper *Warramaba virgo*, it has been shown that rRNA gene counts are proportional to the size of the corresponding C-bands (WHITE *et al.* 1982). In *T. albitarse*, the correspondence of dark C-bands in the short arm of chromosome 14 with the heterochromatin containing the rRNA genes permits to infer that the variation observed in this chromosome implies variation in the amount of rDNA. A total of ten different chromosome variants were found in the 15 populations analysed, with three of them (2, 4 and 7) being the most frequent and three other (8-10) being absent from males.

The absence of significant differences among populations for the total amount of rDNA in both males and females suggests the existence of a rigid control on the extensive variation observed for this amount. This might be performed by natural selection acting against males carrying, in their single chromosome 14, amounts of rDNA below a possible threshold that might be about 30 a.u. This forbids variants 8-10 in males, where they seem

to be lethal. Therefore, females cannot be homozygous for these variants because they cannot inherit them from their father. In general, slight variations in the amount of rRNA genes, caused by rearrangements, do not seem to affect individual fitness (MILLER & BROWN, 1969; MILLER & GURDON 1970). Nevertheless, large deletions reducing the number of rRNA genes below a minimum could be harmful and even lethal (LYCKEGAARD & CLARCK 1991), resulting in small nucleolar organizers that forms small nucleoli or do not form nucleoli at all (MILLER & BROWN 1969; MILLER & GURDON 1970). For instance, in *Drosophila melanogaster*, the gene *bobbed*, which contains the rDNA on sex chromosomes, does not require physical integrity but only a critical number of functional units (rDNA cistrons) (KARPEN *et al.* 1988; GATTI and PIMPINELLI, 1992). The minimum number of rRNA genes necessary to satisfy cell needs is quite variable, but it is generally assumed that reductions in the number of rRNA genes to less than the haploid number (i.e., in diploid organisms, 50% reductions), frequently affect the viability of individuals (MILLER & GURDON 1970; LONG & DAVID 1980). In haplodiploid organisms, the haploid sex acts as a filter for the variation of rDNA amount, with all those variants below the minimum being eliminated by natural selection. *T. albitarse* is a nice example, with the rDNA richest variant of chromosome 14 (no. 1) bearing about the double than the estimated threshold of 30 u.a.

The variants of chromosome 14 in *T. albitarse*, with different amounts of rDNA, are most likely arisen through recombination in females heterozygous for two different variants or through unequal crossing over in any kind of females. On the resulting variation, natural selection might be acting by eliminating those variants carrying amounts of rDNA under the minimum resulting viable in the haploid sex. We have no evidence on possible inviability of chromosome 14 variants with increased rDNA amounts (e.g. variant 1), which are undoubtedly derived from the same crossover processes, but we cannot rule out the possibility that selection also marks an upper limit for rDNA amount in chromosome 14. The frequent loss of nucleolus organizing regions (NORs) in plants after polyploidization (VAUGHAN *et al.* 1993) might be indicative of such a control. In any case, we can conclude that the populations of *T. albitarse* suffer, on average, a minimum genetic load of about 4% due to the lethality of variants 8-10 in males.

In spite of the lethality of males carrying low amounts of rDNA, sex ratio is slightly male biased. This suggests that primary sex ratio (that in the zygotes) should be even more strongly biased.

Acknowledgement

We thank M. J. P. Araújo for his assistance in the collection of specimens and Dr. S. M. Recco-Pimentel (IB-UNICAMP) for supplying the pDm and her laboratory facilities. This work was supported by grants from CAPES and CNPq and FAPEMIG. F.P and J.P.M.C were supported by by Spanish Dirección General de Investigación (BOS2000-1521) and Plan Andaluz de Investigación (Grupo CVI-165).

REFERENCES

- ARAÚJO S. M. S. R., POMPOLO S. G., DERGAM J. A. S., CAMPOS L. A. O. 2000 The B chromosome system of *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* (Hymenoptera, Sphecidae) I. Banding analysis. *Cytobios* **101**: 7-13.
- ARAÚJO, S. M. S. R., POMPOLO, S. G., PERFECTTI, F., CAMACHO J. P. M. 2001 Integration of a B chromosomes into the A genome of a wasp. *Proc. R. Soc. Lond. B* **268**: 1127-1131.
- BICKHAM, J. W. & ROGERS, D. S. 1985 Structure and variation of the nucleolus organizer regions in turtles. *Genetica* **67**, 171-184.
- BOHART R. M., MENKE A. S. 1976 Sphecidae wasps of the world: a generic revision. Univ. California Press, Berkeley.
- BUTLER, D. K. & METZENBERG, R. L. 1990 Expansion and contraction of the nucleolus organizer region of *Neurospora*: changes originate in both proximal and distal segments. *Genetics* **126**, 325-333.
- CASTRO, J., RODRÍGUEZ, S., ARIAS, J., SÁNCHEZ, L. & MARTÍNEZ, P. 1994 A population analysis of Robertsonian and Ag-NOR polymorphism in brown trout (*Salmo trutta*). *Theor. Appl. Genet.* **89**, 105-111.
- CASTRO, J., SÁNCHEZ, L. & MARTÍNEZ, P. 1998 Analysis of the inheritance of NOR size variants in brown trout (*Salmo trutta*). *J. Hered.* **89**, 264-266.
- CASTRO, J., RODRÍGUEZ, S., PARDO, B. G., SÁNCHEZ, L. & MARTÍNEZ, P. 2001 Population análisis of an unusual NOR-site polymorphism in brown trout (*Salmo trutta* L.). *Heredity* **86**: 291-302.

- CHINDAMPORN, A., IWAGUCHI, S., NAKAGAWA, Y., HOMMA, M. & TANAKA, K. 1993 Clonal size-variation of rDNA cluster region on chromosome XII of *Sacharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* **139**, 1409-1415.
- DOVER G. A., FLAVEL, R.D. 1984 Molecular coevolution: DNA divergence and the maintenance of function. *Cell* **38**: 622-623.
- FERRO, D.A.M., NÉO, D.M., MOREIRA-FILHO, O., BERTOLLO, L.A.C. 2001 Nucleolar organizing regions, 18S and 5S rDNA in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): populations distribution and functional diversity. *Genetica* **110**: 55-62.
- GATTI, M., PIMPINELLI, S. 1992 Functional elements in *Drosophila melanogaster* heterochromatin. *Annu. Rev. Genet.* **26**: 239-275.
- HIRAI H., YAMAMOTO M-T., OGURA K., SATTA Y., YAMADA M., TAYLOR W., IMAI H. T. 1994 Multiplication of 28S rDNA and NOR activity in chromosomes evolution among ants of the *Myrmecia pilosula* species complex. *Chromosoma* **103**: 171-178.
- HSU T. C., SPERITO S. E., PARDUE M. L. 1975 Distribution of 18-28S ribosomal genes in mammalian genomes. *Chromosoma* **53**: 25-36.
- IMAI, H.T. 1991 Mutability of constitutive heterochromatin (C-bands) during eukaryotic chromosomal evolution and their cytological meaning. *Jpn. J. Genet.* **66**: 635-661.
- IMAI H. T., HIRAI H., SATTA Y., SHIROISHI T., YAMADA M., TAYLOR R. W. 1992 Phase specific Ag-staining of nucleolar organizer regions (NORs) and kinetochores in the Australian ant *Myrmecia croslandi*. *Jpn. J. Genet.* **67**: 437-447.

- IMAI H. T., TAYLOR R. W., CROSLAND M. W. J., CROZIER R. H. 1988 Modes of spontaneous chromosome mutation and karyotype evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis. *Jpn. J. Genet.* **63**: 113-125.
- JIMÉNEZ R., BURGOS M., DIAZ DE LA GUARDIA, R. 1988 A study of the silver staining significance in mitotic NORs. *Heredity* **60**: 125-127.
- KARPEN, G.H., SCHAEFER, J.E., LAIRD, C.D. 1988 A *Drosophila* rRNA gene located in euchromatin is active in transcription and nucleolus formation. *Genes Dev.* **2**: 1745-1763.
- LONG E. O. & DAWID I. B. 1980 Repeated genes in eukaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* **49**: 727-764.
- LORITE P., ARÁNEGA A. E., LUQUE F., PALOMEQUE T. 1997 Analysis of the nucleolar organizing regions in the ant *Tapinoma nigerrimum* (Hymenoptera, Formicidae). *Heredity* **78**: 578-582.
- LYCKEGAARD E. M. S., CLARK A. G. 1991 Evolution of ribosomal RNA gene copy number on the sex chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Biol. Evol.* **8**: 458-474.
- MILLER L., BROWN D. D. 1969 Variation in the activity of nucleolar organizer and their ribosomal gene content. *Chromosoma* **28**: 430-444.
- MILLER L., GURDON J. B. 1970 Mutations affecting the size of the nucleolus in *Xenopus laevis*. *Nature* **227**: 1108-1110.

- MOREIRA-FILHO, O., BERTOLLO, L.A.C., GALETTI, P.M. 1984 Structure and variability of nucleolar organizer regions in Parodontidae fish. *Can. J. Genet. Cytol.* **26**: 564-568.
- PALOMEQUE T., CHICA E., CANO M. A. & DIAZ DE LA GUARDIA, R. 1998 Karyotypes, C-banding and chromosome location of active nucleolar organizing regions in *Tapinoma* (Hymenoptera, Formicidae), *Genome* **30**, 277-280.
- POMPOLO, S. G. & TAKAHASHI, C. S. 1990 Chromosome number and C-banding in two wasp species of the genus *Polistes* (Hymenoptera, Polistinae, Polistini). *Insec. Sociaux* **37**: 251-257.
- ROIHA H., MILLER J. R., WOODS L. E., GLOVER D. M. 1981 Arrangements and rearrangements of sequences flanking the two types of rDNA insertion in *D. melanogaster*. *Nature* **290**: 749-753.
- ROUSSELET J., GÉRI C., HEWITT G. M. & LEMEUNIER, F. 1998 The chromosome of *Diprion pini* and *D. similis* (Hymenoptera: Diprionidae): implications for karyotype evolution. *Heredity* **81**: 573-578.
- ROUSSELET J., MONTI L., AUGER-ROZENBERG M.-A., PARKER J. S. & LEMEUNIER, F. 2000 Chromosome fission associated with growth of ribosomal DNA in *Neodiprion abietis* (Hymenoptera: Diprionidae). *Proc. R. Soc. Lond. B* **267**: 1819-1823.
- SCHNEIDER S., ROESSLI D. & EXCOFFIER L. 2000. Arlequin ver. 2000: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry laboratory. University of Geneva. Switzerland.

- VAUGHAN H.E., JAMILENA, M., RUIZ REJÓN, C., PARKER, J.S., GARRIDO-RAMOS, M.A. 1993 Loss of nucleolar-organizer regions during polyploid evolution in *Scilla autumnalis*. *Heredity* 71: 574-580.
- VIÉGAS-PÉQUIGNOT E. 1992. *In situ hybridization to chromosomes with biotinylated probes*. (In :In situ hybridization: a practical approach. D. Willernson ed. Oxford University Press, Oxford): 137-158.
- WHITE, M.J.D., DENNIS, E.S., HONEYCUTT, R.L., CONTRERAS, N., PEACOCK, W.J. 1982 Cytogenetics of the parthenogenetic grasshopper *Warramaba virgo* and its bisexual relatives. IX. The ribosomal RNA cistrons. *Chromosoma* 85: 181-199.
- ZURITA F., JIMÉNEZ R., BURGOS M., DÍAZ DE LA GUARDIA R. 1998 Sequential silver staining and in situ hybridization reveal a direct association between rDNA levels and the expression of homologous nucleolus organizing regions: a hypothesis for NOR structure and function. *J. Cell Sci.* 111: 1433-1439.
- ZURITA F., SÁNCHEZ A., BURGOS M., JIMÉNEZ R., DÍAZ DE LA GUARDIA R. 1997 Interchromosomal, intercellular and interindividual variability of NORs studied with silver staining and *in situ* hybridization. *Heredity* 78: 229-234.

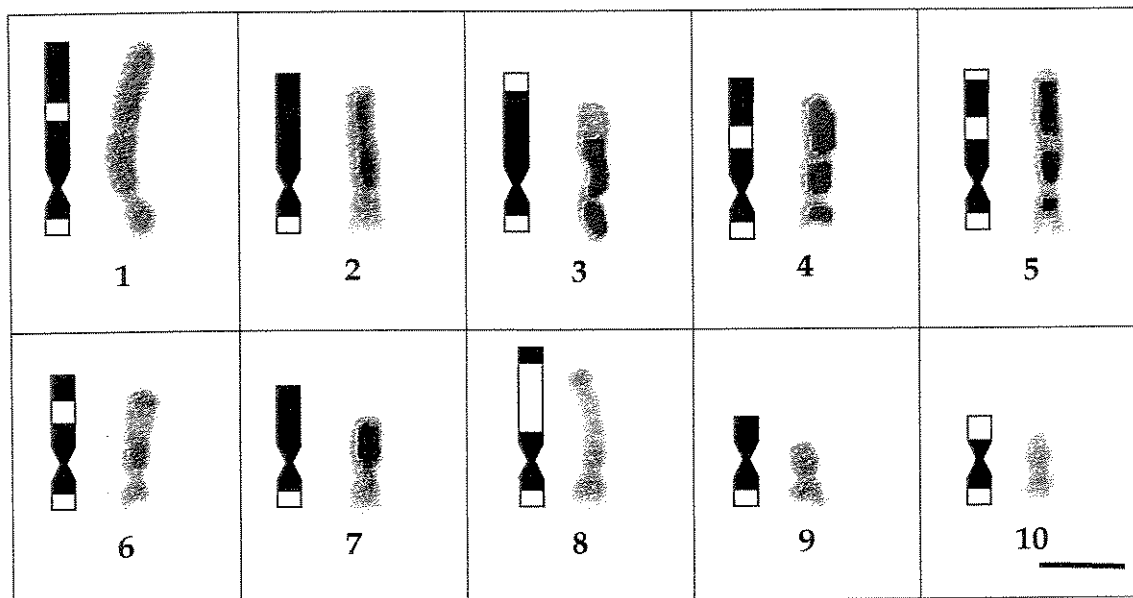
Table 1Frequency of all ten chromosome 14 variants in *T. albitarse*.

Population	Sex	N	Variant for chromosome 14									
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Amoras	Male	18	0	0.333	0	0.500	0.111	0	0.056	0	0	0
	Female	19	0	0.342	0	0.263	0.158	0	0.158	0	0.079	0
	Total	37	0	0.339	0	0.339	0.143	0	0.125	0	0.054	0
Campus	Male	28	0.036	0.321	0	0.321	0.071	0.036	0.214	0	0	0
	Female	22	0.045	0.409	0.068	0.295	0.000	0.023	0.023	0.023	0.114	0
	Total	50	0.042	0.375	0.042	0.306	0.028	0.028	0.097	0.014	0.069	0
V.Cristal	Male	27	0.037	0.370	0	0.296	0.111	0	0.185	0	0	0
	Female	28	0.036	0.393	0.018	0.196	0.054	0	0.161	0.036	0.107	0
	Total	55	0.036	0.386	0.012	0.229	0.072	0	0.169	0.024	0.072	0
Palmital	Male	35	0.029	0.314	0.057	0.343	0.086	0.029	0.143	0	0	0
	Female	33	0.091	0.273	0.015	0.348	0.015	0	0.212	0	0.030	0.015
	Total	68	0.069	0.287	0.030	0.347	0.040	0.010	0.188	0	0.020	0.010
Paraíso	Male	9	0	0.333	0	0.222	0.222	0	0.222	0	0	0
	Female	8	0.063	0.188	0	0.250	0.250	0	0.188	0	0.063	0
	Total	17	0.040	0.240	0.000	0.240	0.240	0	0.200	0	0.040	0
P.Firme	Male	30	0	0.233	0.067	0.500	0.000	0	0.200	0	0	0
	Female	32	0	0.297	0.063	0.328	0.016	0	0.250	0.016	0.031	0
	Total	62	0	0.277	0.064	0.383	0.011	0	0.234	0.011	0.021	0
Marrecos	Male	21	0	0.286	0	0.476	0.143	0	0.095	0	0	0
	Female	7	0	0.143	0	0.571	0.000	0	0.000	0	0.286	0
	Total	28	0	0.229	0	0.514	0.086	0	0.057	0	0.114	0
Silvestre	Male	8	0	0.500	0	0.500	0.000	0	0.000	0	0	0
	Female	10	0	0.150	0	0.350	0.050	0.100	0.250	0	0.100	0
	Total	18	0	0.250	0	0.393	0.036	0.071	0.179	0	0.071	0
V.Chaves	Male	20	0	0.450	0	0.300	0.050	0	0.200	0	0	0
	Female	12	0	0.333	0.042	0.292	0.083	0	0.167	0	0.042	0.042
	Total	32	0	0.386	0.023	0.295	0.068	0	0.182	0	0.023	0.023
Barrinha	Male	36	0	0.139	0.056	0.444	0.028	0	0.333	0	0	0
	Female	22	0	0.227	0	0.386	0.023	0.045	0.250	0.023	0.045	0
	Total	58	0	0.188	0.025	0.413	0.025	0.025	0.288	0.013	0.025	0

Fundao	Male	21	0	0.381	0	0.238	0.095	0.048	0.238	0	0	0
	Female	15	0	0.367	0.033	0.300	0.167	0	0.100	0	0.033	0
	Total	36	0	0.373	0.020	0.275	0.137	0.020	0.157	0	0.020	0
Cajuri	Male	30	0	0.200	0	0.667	0.000	0	0.133	0	0	0
	Female	19	0	0.211	0.026	0.289	0.079	0	0.263	0	0.079	0.053
	Total	49	0	0.206	0.015	0.456	0.044	0	0.206	0	0.044	0.029
A.Paragu	Male	16	0	0.375	0	0.313	0.063	0	0.250	0	0	0
	Female	11	0	0.364	0	0.455	0.045	0	0.136	0	0	0
	Total	27	0	0.368	0	0.395	0.053	0	0.184	0	0	0
M.Grande	Male	14	0	0.214	0	0.571	0	0	0.214	0	0	0
	Female	10	0	0.250	0.050	0.400	0	0	0.300	0	0	0
	Total	24	0	0.235	0.029	0.471	0	0	0.265	0	0	0
Piranga	Male	10	0	0.100	0	0.900	0	0	0.000	0	0	0
	Female	21	0	0.095	0.024	0.595	0.048	0	0.214	0	0.024	0
	Total	31	0	0.096	0.019	0.654	0.038	0	0.173	0	0.019	0
All populations	Male	323	0.009	0.291	0.019	0.427	0.062	0.009	0.183	0	0	0
	Female	269	0.020	0.283	0.026	0.342	0.056	0.009	0.186	0.009	0.061	0.007
	Total	592	0.017	0.285	0.024	0.370	0.058	0.009	0.185	0.006	0.041	0.005

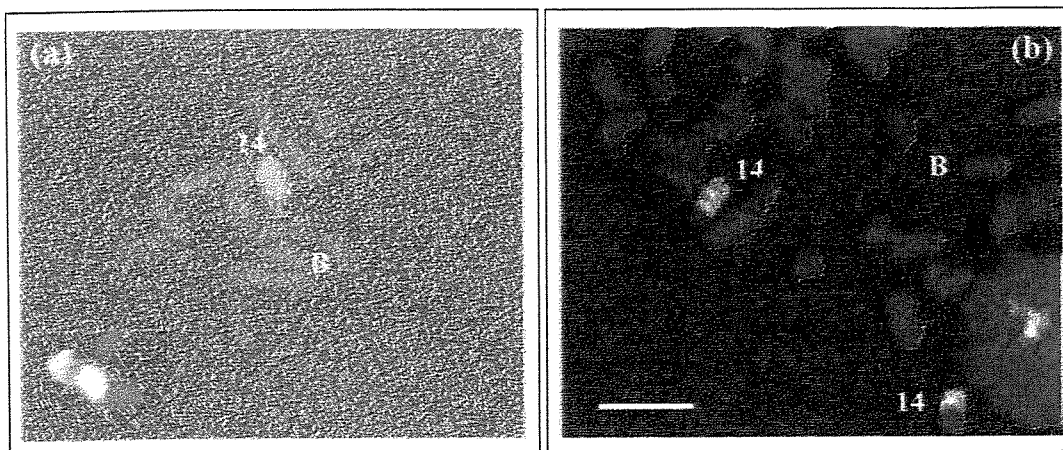
Figure 1

C- banding pattern and ideogram showing the ten distinct types of chromosome 14 of *T. albitarse*. Bar = 5 μ m.



Figures 2

FISH on mitotic chromosomes of males and females of *T. albitarse*. (a). Male ($n=17$) with one rRNA genes-carrying chromosome. In detail, the chromosome 14 type 6. (b). Partial female metaphase ($2n=34$) showing two rRNA carrying chromosome. Bar = $5\mu\text{m}$.



This article will be submitted to *Heredity*

No dosage compensation In a haplodiploid organism

**Sônia Maria da Silva Rocha Araújo^{1,2}, Francisco Perfectti², Juan Pedro
Martínez Camacho²**

1. Departamento de Biologia Celular, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Brazil

2. Departamento de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Spain

Key words: Dosage compensation, nucleolar area, ploidy level, B chromosomes, *Trypoxylon albitarse*

Short title: Nucleolar area adjusted to ploidy in *T. albitarse*

Correspondence to: Sônia Maria da Silva Rocha ARAÚJO, Departamento de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, E-18071 Granada, Spain. E-mail: saraujo@ugr.es

Summary

The occurrence of a dosage compensation mechanism for genes in haplodiploid organisms, in parallel with the case of sex-linked genes in heterogametic species, has been postulated since long, although barely demonstrated. In some organisms, in which dosage compensation mechanisms have been extensively studied, it has been observed that the nucleolus organizer region (NOR) of compensated males could increase in activity to satisfy cell needs for ribosomal RNA. This should imply the formation of larger nucleoli (relative to nucleus size) in males than females. To test this hypothesis in a haplodiploid species, we have measured nucleolus and nucleus area in interphase cells of males and females larvae of the solitary wasp *Trypoxylon albitarse*. The results have shown that nucleolus size (relative to nucleus size) does not differ between sexes. This suggests that NOR activity reaches similar degree in both sexes, consequently the rRNA amount is adjusted to ploidy level.

INTRODUCTION

Haplodiploid organisms are product of a interesting mode of reproductive behaviour, which make them genetically different to other organisms in aspects such as asymmetrical genetic segregation, maternal effects and even dosage compensation in the haploid male (Liu & Smith, 2000). Particularly, the occurrence of a dosage compensation mechanism for genes in haplodiploid organisms has been postulated since long although scarcely demonstrated.

In diplo-diploid heterogametic organisms with a single rDNA cluster in the X chromosome, it is expected that nuclear area is similar in both sexes. In this case, dosage compensation should result in nucleolar areas about similar in males and females or even larger nucleolar area in males. In any case, we should observe larger nucleoli relative to nucleus size. Alternatively, in haplo-diploid organism, where nuclear area is greater in the diploid sex, the compensation should imply the formation of nucleoli, with about the same absolute size, in both sexes and, consequently, larger nucleoli size (relative to nucleus size) in the haploid sex. With dosage compensation is also conceivable that the absolute nucleolar area is larger in the haploid sex.

The ability of some organisms to increase their rDNA content as form of dosage compensation mechanism is a well established fact (Miller & Gurdon, 1970) and it has been demonstrated in organisms as different as *Xenopus laevis* (Barr & Esper, 1963; Brown & Gurdon, 1964; Miller & Gurdon, 1970) and *Drosophila melanogaster* (Tartof, 1971; Kalumuck & Procnier, 1984), but, however it has never been investigated in Hymenoptera.

Trypoxylon (Trypargilum) albitarse is a Brazilian haplodiploid solitary wasp ($n=16$; $2n=32$) carrying B chromosomes possibly evolving towards their integration into the A genome (ARAÚJO *et al.* 2001), and showing a single rDNA-carrying chromosome per haploid genome, i.e. chromosome 14 (Araújo *et al.*, in preparation), thus constituting an ideal material to test the rRNA dosage compensation hypothesis in a hymenopteran. The results suggest that the rRNA dosage necessary for a cell is simply regulated by its ploidy level, rending unnecessary any additional dosage compensation mechanism for the rRNA genes in this haplodiploid species.

MATERIAL AND METHODS

Trypoxylon albitarse specimens were collected in the municipality of Viçosa (20° 45' 05" S, 42° 52' 50" W; Minas Gerais, Southeast Brazil), from October 1998 to February 2000. Cytological preparations from cerebral ganglia were made according to IMAI (1988). A total of 33 specimens (10 females and 10 males with B chromosomes, and 13 males without B chromosomes) were analyzed by the silver staining method as described by Howell & Black (1980). A total of 330 interphase nuclei (10 nuclei per individual) and their respective nucleoli (Fig. 1) were observed at the microscope under a 100X objective, photographed, digitalized and measured (in arbitrary units) using the Image J program, version 1.20s [<http://rsb.info.nih.gov/ij/>]. The results were statistically evaluated by a nested analysis of variance (Nested ANOVA). To estimate measurement error (ME), 30 (of the 330) randomly chosen interphase nuclei were remeasured, and the ME was calculated according to Yezerinac *et al.* (1992). Since ME was very low (0,22%), we considered the measurement procedure highly appropriate for the objective proposed.

RESULTS AND DISCUSSION

In *T. albitarse*, both silver staining and fluorescent *in situ* hybridization with ribosomal probes have failed to reveal the presence of any rDNA genes on B chromosomes (Araújo *et al.* in preparation). Notwithstanding this result, effects of B chromosomes (which are supposed to be genetically inert) upon several aspects of nuclear phenotype (Kirk & Jones, 1970), rDNA organization (Delgado *et al.*, 1995), and nucleolar activity (Morais-Cecílio *et al.*, 2000) have been broadly described. Considering these examples, we tested for possible effects of B chromosome presence on nucleolar activity of *T. albitarse*. Therefore, a nested ANOVA was performed, using B chromosome number (0 or 1) and individual as factors, with individual nested within B number (Fig. 2). In both sexes, no significant association was observed between B chromosome presence and nucleus area ($F=3.58$; $P=0.072$), the number of nucleoli ($F=0.05$; $P=0.834$), nucleolus area ($F=0.10$; $P=0.750$) or nucleolus area

relative to nucleus area ($F=0.57$; $P=0.458$). So in *T. albitarse*, neither nucleolus nor nucleus size are affected by B chromosome presence.

An ANOVA with nucleolus area as dependent variable, sex as fixed factor and individual as random factor showed very significant difference between males and females ($F=22.27$; $P=0.0005$), with mean female nucleolus area being about twice that in males (Fig. 3a). Likewise, females showed a higher number of nucleoli ($N=10$; Mean= 1.68; $\pm S.E.=0.58$) higher than males ($N=23$; Mean= 1.23; $\pm S.E.=0.45$; $F=14.93$; $P=0.0005$), and also a larger nucleus area ($F=26.90$; $P=0.0001$) (Fig. 3b). Conversely, nucleolus area relative to nucleus area showed no significant difference between sexes ($F=0.44$; $P=0.834$), indicating that NOR activity, relative to gene contents, reaches similar degree in both sexes (Fig. 4), if sealed the ploidy level.

Dosage compensation in rRNA genes operates at the level of information transfer from DNA to RNA (Mukherjee & Beermann, 1965), permitting that reduced amounts of rRNA genes, can be over expressed to produce as much rRNA and nucleolar material as normal animals (Barr & Esper, 1963; Brown & Gurdon, 1964). On the other hand, some evidences have pointed out that the compensation rule is not universal since, in some species, the amount of nucleolar material is associated with the number of rRNA genes (Humphrey, 1961; Miller & Brown, 1969). This seems to be also true in *T. albitarse* since our research has not detected any dosage compensation in the nucleolar activity of haploid males. Nevertheless, the present findings show that, in this species, nucleolar size is adjusted to ploidy level. This suggests that haplodiploidy itself regulates rRNA amounts with no need for a specific mechanism of dosage compensation, at least in the organs and developmental stages analyzed.

Acknowledgments

We thank M. J. P. Araújo for his assistance in the collection of specimens. This work was supported by grants from CAPES, CNPq (S.M.S.R.A and S.G.P) and Junta de Andalucía (CVI-165) (F.P. and J.P.M.C.).

REFERENCES

- ARAÚJO, S. M. S. R., POMPOLO, S. G., PERFECTTI, F., CAMACHO J. P. M. 2001. Integration of a B chromosomes into the A genome of a wasp. *Proc. R. Soc. Lond. B* **268**: 1127-1131.
- BARR H. J. & ESPER H. 1963. Nucleolar size in cells of *Xenopus laevis* in relation to nucleolar competition. *Exp. Cell Res.* **31**: 211-214.
- BROWN D. D. & GURDON J. B. 1964. Absence of ribosomal rRNA synthesis in the anucleolate mutant of *Xenopus laevis*. *Proc. nat. Acad. Sci.* **51**: 139-146.
- CASSIDY J. D. 1975. The parasitoid wasps *Habrobracon* and *Mormoniella*. In: R. C. King (ed) Hand -book of Genetics pp. 173-203. Plenum Press, New York.
- CRUZ-LANDIM C. & BEIG D. 1981. Meiose nos Hymenoptera. *Ci. e Cult.* **33**: 937-966.
- DELGADO M., MORAIS-CECÍLIO L. NEVES N., JONES R. N. & VIEGAS W. 1995. The influence of B chromosomes on rDNA organisation in rye interphase nuclei. *Chromos. Res.* **3**: 487-491.
- HOWELL W. M., BLACK D. A. 1980. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a one step method. *Experientia* **36**: 1014-1015.
- HUMPHREY R. R. 1961. A chromosomal deletion in the Mexican axolotl (*Siredom mexicanum*) involving the nucleolar organizer and the gene for dark color. *Amer. Zool.* **1**: 361.

- KALUMUCK K. E. & PROCUNIER J. D. 1984. Non-selective amplification of ribosomal DNA repeat units in compensating genotypes of *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Genet.* **22**: 453-465.
- KIRK D. & JONES R. N. 1970. Nuclear genetic activity in B-chromosomes rye, in terms of the quantitative interrelationship between nuclear protein, nuclear RNA and histone. *Chromosoma* **31**: 241-254.
- LIU F.-H. & SMITH S. M. 2000. Estimating quantitative genetic parameters in haplodiploid organisms. *Heredity* **85**: 373-382, 2000.
- MILLER L. & BROWN, D. D. 1969. Variation in the activity of nucleolar organizer and their ribosomal gene content. *Chromosoma* **28**: 430-444.
- MILLER L., GURDON J. B. 1970. Mutations affecting the size of the nucleolus in *Xenopus laevis*. *Nature* **227**: 1108-1110.
- MITTWOCH U., KALMUS H. & WEBSTER W. S. 1966. Deoxyribonucleic acid values in dividing and non-dividing cells of male and female larvae of the honey bee. *Nature* **210**: 264-266.
- MORAIS-CECÍLIO L., DELGADO M., JONES R. N. & VIEGAS W. 2000. Modification of wheat rDNA loci by rye B chromosomes: a chromatin organization model. *Chromos. Res.* **8**: 341-351.
- MUKHERJEE A. S. & BEERMANN, W. 1965. Synthesis of ribonucleic acid by the X-chromosomes of *Drosophila melanogaster* and the problem of dosage compensation. *Nature* **207**: 785-786.

- PANNUTI, A. & LUCCHESI, J. 2000. Recycling to remodel: evolution of dosage-compensation complexes. *Curr. Opin. Genet. & Dev.* **10**: 644-650.
- RASCH E. M., CASSIDY J. D. & KING R. C. 1975. Estimates of genome size in haplo-diploid species of parasitoid wasps. *J. Histochem. Cytochem.* **24**: 317.
- RASCH E. M., CASSIDY J. D. & KING R. C. 1977. Evidence for dosage compensation in parthenogenetic Hymenoptera. *Chromosoma* **59**: 323-340.
- TARTOF K. D. 1971. Increasing the multiplicity of ribosomal RNA genes in *Drosophila melanogaster*. *Science* **171**: 294.
- YEZERINAC S. M., LOUGHEED S. C. & HANDFORD P. 1992. Measurement error and morphometric studies: statistical power and observer experience. *Syst. Biol.* **41**: 471-482.

Fig. 1 Interphase nuclei of male (A) and female (B) of *T. albitarse*. Nu = nucleoli. Bar = 5µm.

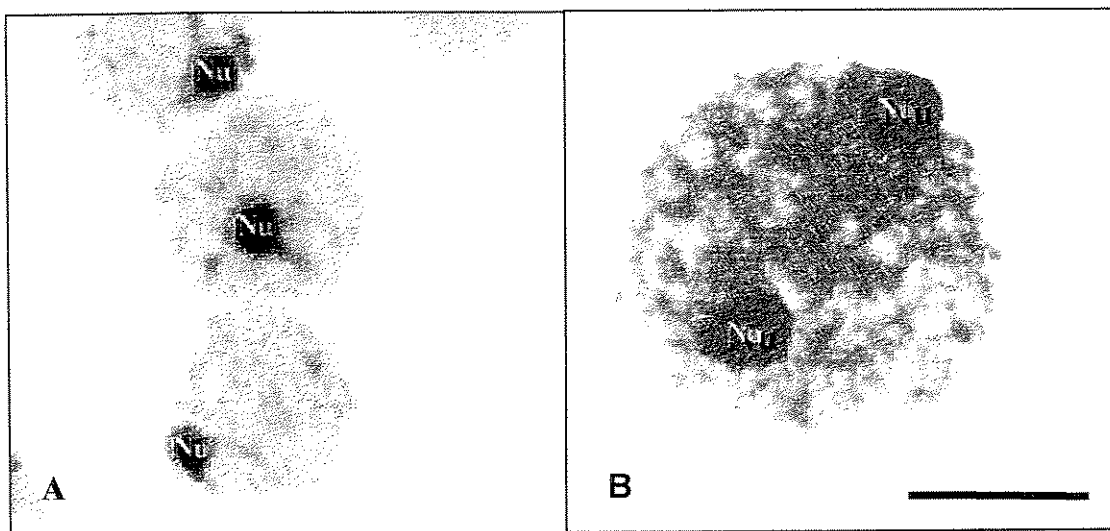


Fig. 2 Absence of effects of B chromosomes on the mean number of nucleoli in *T. albitarse*.

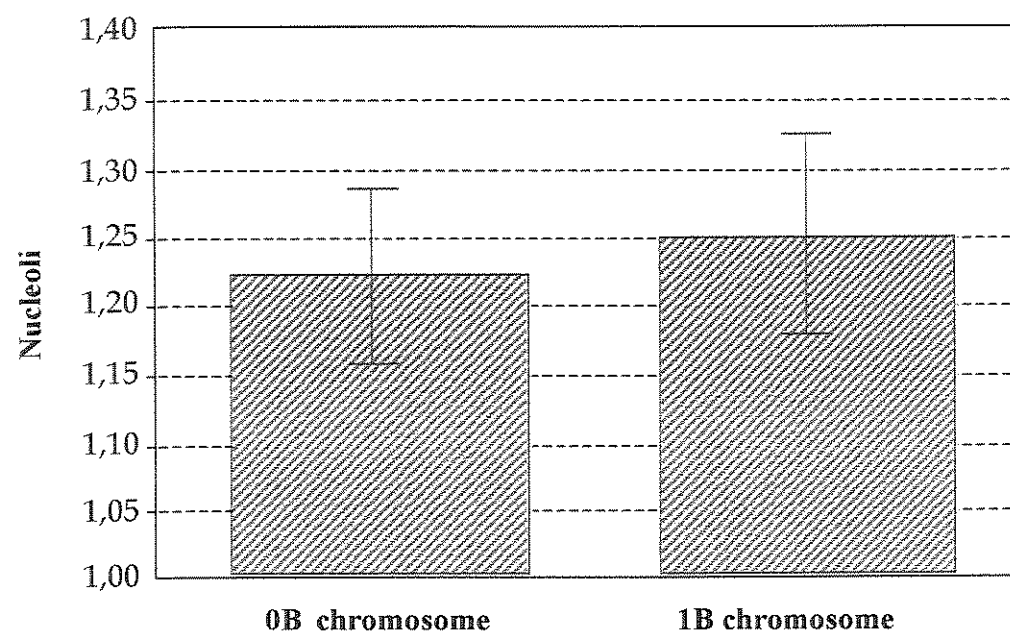


Fig. 3 Nucleolus (A) and nucleus (B) area in females and males of *T. albitarse*.

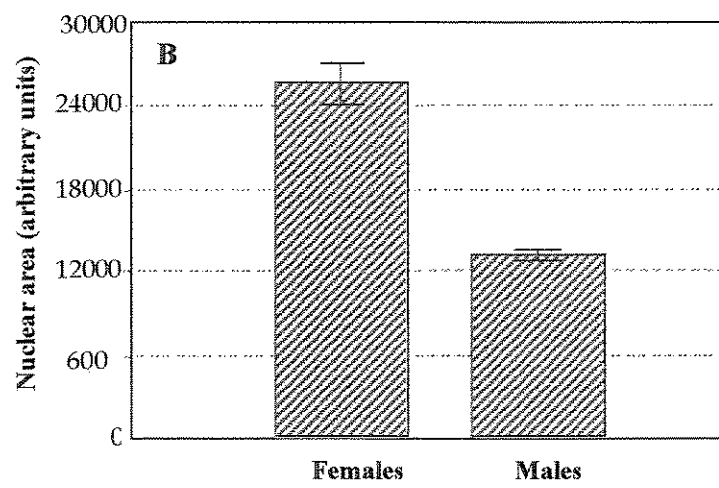
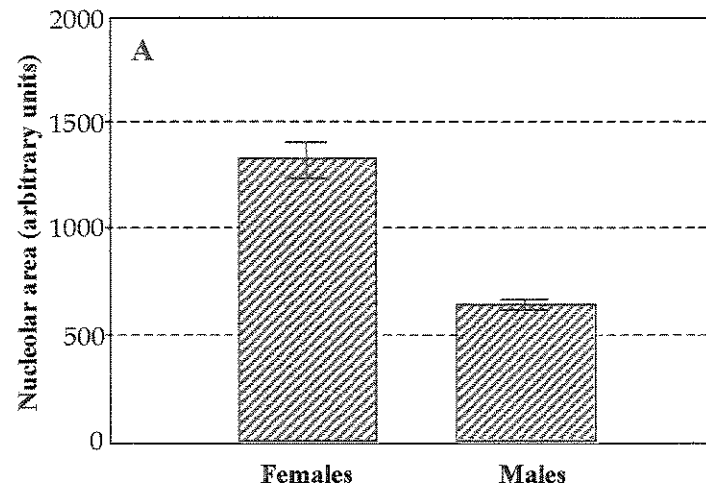
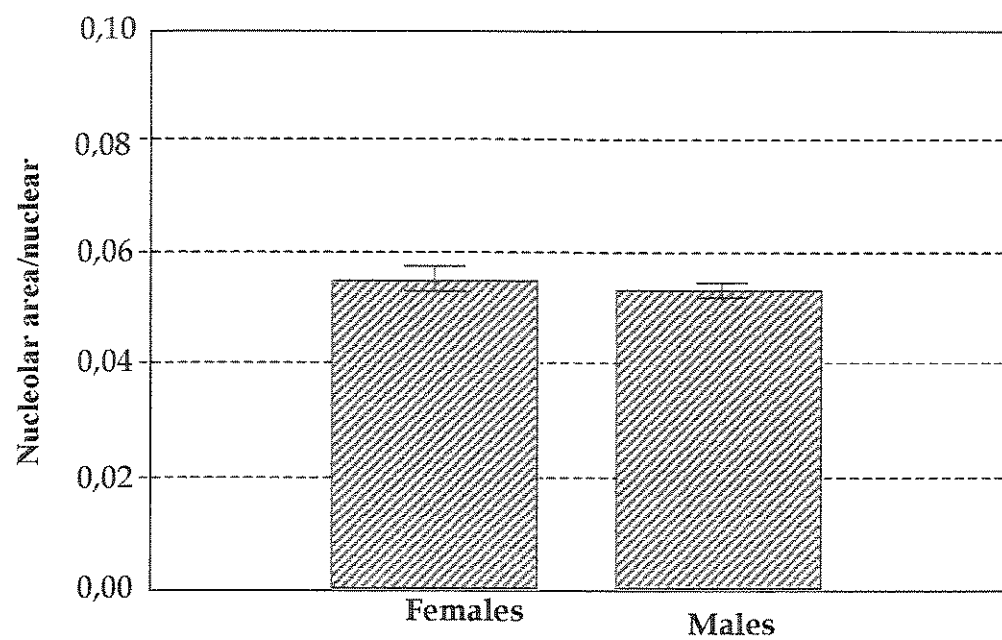


Fig. 4 Nucleolus area relative to nucleus area in females and males of *T. albitarse*.



4. CONCLUSÕES

Como uma contribuição à citogenética da vespa solitária *Trypoxylon albitarse*, esse trabalho abordou diversos aspectos da dinâmica dos cromossomos supranumerários encontrados em diferentes populações dessa espécie (durante dois períodos amostrais), sobretudo aqueles referentes à frequência e estado evolutivo desses cromossomos. Paralelamente, a localização cromossômica dos genes ribossômicos foi determinada e um estudo comparativo da área nucleolar em machos e fêmeas de *T. albitarse* foi realizado. Uma análise interpretativa dos resultados e sua comparação com os conhecimentos já disponíveis, nos permitiram concluir que:

✓ Em todas as populações de Viçosa, a grande maioria dos indivíduos possui um cromossomo B por genoma haplóide, a mesma dose apresentada pelos cromossomos do complemento normal, sugerindo uma possível regularização do comportamento meiótico dos B de *T. albitarse*.

✓ O índice de estabilização dos cromossomos B de *T. albitarse* (SI), definido como a proporção de indivíduos portando um B por genoma haplóide, demonstrou uma forte tendência à estabilização e, conseqüentemente, à integração dos cromossomos B como um membro regular do complemento cromossômico normal de *T. albitarse* em todas as populações de Viçosa.

✓ Em Porto Firme, onde somente 14.3% dos indivíduos possuíam cromossomos supranumerários o SI foi bastante baixo, indicando uma invasão recente dos B.

✓ Apesar da significativa variação interpopulacional observada no primeiro período amostral (1996-1997), as populações analisadas no período de 1998-2000 apresentaram resultados muito mais homogêneos, sugerindo que o processo de

estabilização dos B está se consolidando não apenas em nível temporal como também espacial.

✓ Por outro lado, em Nova Ilha (Porto Firme), em virtude de uma significativa invasão do cromossomo B metacêntrico, ambas frequência de B_{hg} e Met_{hg} aumentaram significativamente. Não obstante, provavelmente devido a um considerável número de indivíduos apresentando cromossomos B instáveis ou portando números diferentes a um B por genoma haplóide, não foi observado um aumento significativo do SI nessa população.

✓ A importante redução na frequência de cromossomos B acrocêntricos em todas as populações e ao longo do tempo, afetou temporal e espacialmente o SI dos cromossomos B, no entanto o índice de estabilização dos cromossomos metacêntricos (MetSI) não variou significativamente nos cinco anos de amostragem.

✓ A análise geral dos resultados evidencia uma forte tendência à eliminação dos cromossomos B acrocêntricos e por outro lado à manutenção dos B metacêntricos, cuja frequência por genoma haploide vem aumentando a longo dos anos, sugerindo sua provável integração ao genoma A de *T. albitarse*.

✓ A aplicação da técnica de FISH não revelou a presença de genes ribossômicos nos cromossomos B de *T. albitarse*. Nesta espécie, a região organizadoras do nucléolo corresponde exatamente à heterocromatina constitutiva presente no ‘braço curto’ do cromossomo 14, o qual, em virtude de rearranjos diversos em seu braço ribossômico, apresentou uma significativa variação no número de genes ribossômicos.

✓ Ao todo, dez tipos diferentes de cromossomos 14 foram identificados entre os indivíduos analisados. Desses tipos, aqueles portando pequenas áreas de banda-C (e consequentemente de rDNA) foram observados apenas em fêmeas, mas nunca em machos. Uma estimativa indireta da quantidade de rDNA de cada um desses tipos cromossômicos, revelou uma significativa ausência de três variantes do cromossomo 14 (aquelas portando menos que 30 unidades arbitrárias de rDNA) e sugeriu a existência de um limite mínimo

para a quantidade de rDNA (a qual deve ser tolerada pelos machos haplóides), uma vez que a presença de qualquer uma dessas três variantes parece ser letal para os machos, representando uma carga genética de aproximadamente 4% para as populações de *T. albitarse*.

✓ A medida da área nuclear e nucleolar em larvas de machos e fêmeas de *T. albitarse* demonstraram que, nessa espécie e no estágio analisado, a atividade nucleolar é proporcional ao nível de ploidia dos indivíduos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-HAMMED F., ROTHMAN D. L. & FLINN R. R. 1970. Structural and numerical aberrations in natural populations of the grasshopper *Melanoplus differentialis differentialis*. *Genetics*, **64** (suppl.), 1.
- AMARANTE, S. T. P. 1991. Biologia e comportamento reprodutivo de *Trypoxylon* (*Trypargilum*) *albitarse* F. (Hymenoptera: Sphecidae). M. Sc. Thesis, Universidade de São Paulo.
- AMOS A., DOVER G. 1981. The distribution of repetitive DNAs between regular and supernumerary chromosomes in species of *Glossina* (tsetse): a two-step process in the origin of supernumeraries. *Chromosoma* **81**: 673-690.
- ARAÚJO S. M. S. R. 1998. Variação cariotípica em populações de *Trypoxylon* (*Trypargilum*) *albitarse* (Hymenoptera, Sphecidae) nas regiões de Viçosa e Porto Firme, MG. M. Sc. Thesis, Universidade Federal de Viçosa.
- ARAÚJO S. M. S. R., POMPOLO S. G., DERGAM J. A. S., CAMPOS L. A. O. 2000. The B chromosome system of *Trypoxylon* (*Trypargilum*) *albitarse* (Hymenoptera, Sphecidae) I. Banding analysis. *Cytobios* **101**: 7-13.
- ARAÚJO, S. M. S. R., POMPOLO, S. G., PERFECTTI, F., CAMACHO J. P. M. 2001. Integration of a B chromosomes into the A genome of a wasp. *Proc. R. Soc. Lond. B* **268**: 1127-1131.

- BAKKALI M. 2001. Evolución de los cromosomas B del saltamontes *Eyrepocnemis plorans* en Marruecos. Ph.D. Thesis, Universidad de Granada.
- BAKKALI M., CABRERO J., LÓPEZ-LEÓN M. D., PERFECTTI F., CAMACHO J. P. M. 2001b. Population differences in the expression of nucleolus organizer region in the grasshopper *Eyrepocnemis plorans*. *Protoplasma* **217**: 185-190.
- BALDANZA F., GAUDIO L., VIGGIANI C. 2000. Cytotaxonomic studies of *Encarsia Förster* (Hymenoptera: Aphelinidae). *Bull. Entomol. Res.* **89**: 209-215.
- BELL G. & BURT A. 1990. B-chromosomes: germ line parasites which induce changes in host recombination. *Parasitology* **100**: S19-S26.
- BEUKEBOOM L. W. 1994. Bewildering Bs: an impression of the first B-chromosome conference. *Heredity* **73**: 328-336.
- BEYE M., MORITZ R. F. A. 1993. *In situ* hybridization of rDNA on chromosomal of the honeybee, *Apis mellifera*, L. *Experientia* **49**: 337-338.
- BIDAU C. J. 1986. A nucleolar-organizing B chromosomes showing segregation-distortion in the grasshopper *Dichroplus pratensis* (Melanoplinae, Acrididae). *Genetica* **73**: 201-210.
- BOHART R. M., MENKE A. S. 1976. Sphecidae wasps of the world: a generic revision. Univ. California Press, Berkeley.
- BRITO-RIBON R. M., POMPOLO S. G., MARTINS M. F., BARROS E. G., SAKAMOTO-HOJO E. T. 1998. Estudo da origem de cromossomos supranumerários em *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae) por meio de hibridação *in situ*

- fluorescente e coloração com fluorocromos. Anais do 3º Encontro sobre Abelhas 3: 213-218.
- BUCKLE V. J., KEARNEY L. 1994. New methods in cytogenetics. Curr. Opin. Genet. Devel. 4: 374-382.
- CABRERO J., ALCHE J. P., CAMACHO J. P. M. 1987. Effects of B chromosomes of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* on nucleolar organiser regions activity. Activation of a latent NOR on a B chromosome fused to an autosome. Genome 29: 116-121.
- CAMACHO J.P.M., CARBALLO A. R., CABRERO J. 1980. The B-chromosome system of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* subsp. *Plorans* (Charpentier). Chromosoma 80: 163-176.
- CAMACHO J.P.M., CABRERO J., VISERAS E., NAVAS-CASTILLO J. & ALCHE J. P. 1989. Efectos de la heterocromatina supernumeraria sobre la formación de los quiasmas y la actividad nucleolar. (In: Genetica, contribuciones de la Genética española en homenaje al Profesor Sañudo. J. Fernández Piqueras, C. Sentis, C. López Ferandéz y J. J. Gonzáles Aguilera ed. Ceuta, Madrid): 109-122.
- CAMACHO J. P. M., SHARBEL T. F., BEUKEBOOM L. W. 2000. B chromosomes evolution. Phill. Trans. R. Soc. Lond. B 355: 163-178.
- CAMACHO J. P. M., SHAW M. W., LÓPEZ-LEÓN M. D., PARDO M. C., CABRERO J. 1997. Population dynamic of a selfish B chromosome neutralized by the standard genome in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. Am. Nat. 149: 1030-1050.
- CAMERON F. M. & REES H. 1967. The influence of B-chromosomes on meiosis in *Lolium*. Heredity 22: 446-450.

- CASPERSON T. 1950. Cell growth and cell function. W. W. Norton and Co., New York.
- COSTA M. A., POMPOLO S. G., CAMPOS L. A. O. 1992. Supernumerary chromosomes in *Partamona cupira* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). Rev. Bras. Genet. **15**: 801-806.
- COVILLE R. E. 1982. Wasps of the genus *Trypoxylon* subgenus *Trypargylum* in North America (Hymenoptera: Sphecidae). Univ. California Press, Berkley.
- CROZIER R.H. 1975. *Hymenoptera*. (In: Animal cytogenetics, Insecta, 7. B. John ed. Gebruder Borntraeger, Berlin).
- CUADRADO A. , JOUVE N. 1994. Highly repetitive sequences in B-chromosomes of *Secale cereale* revealed by fluorescence in situ hybridization. Genome **37**: 709-712.
- DELGADO M., MORAIS-CECÍLIO L. NEVES N., JONES R. N. & VIEGAS W. 1995. The influence of B chromosomes on rDNA organisation in rye interphase nuclei. Chromos. Res. **3**: 487-491.
- GOMES L. F. 1995. Estudos citogenéticos em vespas do gênero *Trypoxylon* (Hymenoptera, Sphecidae, Larrinae, Trypoxylonini). M. Sc. Thesis. Universidade Federal de Viçosa.
- GOMES L. F., POMPOLO S. G., CAMPOS L. A. O. 1995. Cytogenetic analysis of three species of *Trypoxylon* (*Trypoxylon*) (Hymenoptera, Sphecidae, Larrinae). Rev. Bras. Genet. **18**: 173-176.
- GOMES L. F., POMPOLO S. G., CAMPOS L. A. O. 1997. Karyotype evolution in wasps of the genus *Trypoxylon* (subgenus *Trypargylum*) (Hymenoptera, Sphecidae). Rev. Bras. Genet. **20**: 177-183.

- GOODPASTURE C., BLOMM S. E. 1975. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver-staining. *Chromosoma* **53**: 37-50.
- GOSDEN J., LAWRIE S., SEUANEZ H. 1978. Ribosomal and human-homologous repeated DNA distribution in the orangután (*Pongo pigumaeus*). Comparison with the distribution of these DNAs in the other species of the Hominidae. *Cytogenet. Cell Genet.* **21**: 1-10.
- GREEN D. M. 1988. Cytogenetics of the endemic New Zealand frog *Leiopelma hochstetteri*: extraordinary supernumerary chromosome variation and a unique sex-chromosome system. *Chromosoma* **97**: 55-70.
- GREEN, D. M. 1990. Muller's Ratchet and the evolution of supernumerary chromosomes. *Genome* **33**: 818-824.
- GREEN D. M., ZEYL C. W., SHARBEL T. F. 1993. The evolution of hypervariable sex and supernumerary (B) chromosome in the relict New Zealand frog, *Leiopelma hochstetteri*. *J. Evol. Biol.* **6**: 417-441.
- HEITZ E. 1931. Die Ursache der gesetzmäßigen zahl, lage, form und größe pflanzlicher Nucleolen. *Planta* **12**: 775-784.
- HENDERSON A. S., WARBURTON D., ATWOOD K. C. 1972. Localization of ribosomal DNA in the human chromosome complement. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **69**: 3394-3398.
- HENRIQUES-GIL N., ARANA P. 1990. Origin and substitution of B chromosomes in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Evolution* **44**: 747-753.

- HENRIQUES-GIL N., ARANA P., SANTOS J. L. 1983. Spontaneous translocations between B chromosomes and the normal complement in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Chromosoma* **88**: 145-148.
- HENRIQUES-GIL N., SANTOS J. L. , GIRALDEZ R. 1982a. B-chromosome polymorphism and interchromosomal chiasma interference in *Eyprepocnemis plorans* (Acrididae: Orthoptera). *Chromosoma* **85**: 349-359.
- HENRIQUES-GIL N., SANTOS J.L., GIRALDEZ R. 1982b. Genotype-dependent effect of B-chromosome on chiasma frequency in *Eyprepocnemis plorans* (Acrididae: Orthoptera). *Genetica* **59**: 223-227.
- HEWITT G. W. 1973. The integration of supernumerary chromosomes into the orthopteran genome. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **38**: 183-194.
- HIRAI H., YAMAMOTO M-T., OGURA K., SATTA Y., YAMADA M., TAYLOR W., IMAI H. T. 1994. Multiplication of 28S rDNA and NOR activity in chromosomes evolution among ants of the *Myrmecia pilosula* species complex. *Chromosoma* **103**: 171-178.
- HOSHIBA H., IMAI H. T. 1993. Chromosome evolution of bees and wasps (Hymenoptera, Apocrita) on the basis of C-banding pattern analyses. *Jpn. J. Ent.* **61**: 465-492.
- HOUBEN A., LEACH C. R., VERLIN D., ROFE R., TIMMIS J. N. 1997. A repetitive DNA sequence common to the different B chromosome of the genus *Brachycome*. *Chromosoma* **106**: 513-519.
- HOWELL W. M., BLACK D. A. 1980. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a one step method. *Experientia* **36**: 1014-1015.

- HSU T. C., SPERITO S. E., PARDUE M. L. 1975. Distribution of 18-28S ribosomal genes in mammalian genomes. *Chromosoma* **53**: 25-36.
- IMAI H.T. 1974. B-chromosomes in the Myrmecine ant, *Leptothorax spinosior*. *Chromosoma* **45**, 431-444.
- IMAI H.T., BROWN Jr W.L., KUBOTA M., YOUNG H.S., THO Y.P. 1984. Chromosome observations of tropical ants in western Malasya. *Ann. Rep. Natl. Inst. Genet.* **34**: 66-69.
- IMAI H.T., CROZIER R.H., TAYLOR R. W. 1977. Karyotype evolution in Australian ants. *Chromosoma* **53**: 341-393.
- IMAI H. T., HIRAI H., SATTA Y., SHIROISHI T., YAMADA M., TAYLOR R. W. 1992. Phase specific Ag-staining of nucleolar organizer regions (NORs) and kinetochores in the Australian ant *Myrmecia croslandi*. *Jpn. J. Genet.* **67**: 437-447.
- IMAI H.T., TAYLOR R.W. 1989. Chromosomal polymorphisms involving telomere fusion, centric inactivation and centromere shift in the ant *Myrmecia (pilosula)* n=1. *Chromosoma* **98**: 456-460.
- JAMILENA M., GARRIDO-RAMOS M., RUÍZ-REJÓN M., RUÍZ-REJÓN C., PARKER J. S. 1995. Characterization of repeated sequences from microdissected B chromosomes of *Crepis capillaris*. *Chromosoma* **104**: 113-120.
- JONES R. N. 1991. B-chromosome drive. *Amer. Nat.* **137**: 430-442.
- JONES R. N. 1995. B Chromosomes in plants. *New Phytol.* **131**: 411-434.

- JONES R. N. & PUERTAS M. J. 1993. The B-chromosomes of rye (*Secale cereale* L.). (In: Frontiers in Plant Science Research. K. K. Dhir & T. S. Sareen ed. Bhagwati Enterprises, Delhi): 81-112.
- JONES R. N., REES H. 1982. B chromosomes. Academic Press, New York.
- JOHN B. & HEWITT G. M. 1965. The B chromosome system of *Myrmeleotettix maculatus*. I. The mechanism. *Chromosoma* **16**: 548-578.
- KEYL H. G., HAGELE K. 1971. B chromosomen bei *Chironomus*. *Cromosoma* **35**: 403-417.
- KIMURA M., KAYENO H. 1961. The maintenance of supernumerary chromosomes in wild populations of *Lillium callosum* by preferential segregation. *Genetics* **46**: 1699-1712.
- KING M., CONTRERAS N., HONEYCUTT R. L. 1990. Variation within and between nucleolus organizer region in Australian hylid frogs (Anura) shown by 18S+28S *in situ* hybridization. *Genetica* **80**: 17-29.
- KIRK D. & JONES R. N. 1970. Nuclear genetic activity in B-chromosomes rye, in terms of the quantitative interrelationship between nuclear protein, nuclear RNA and histone. *Chromosoma* **31**: 241-254.
- LACADENA J. R. 1996. Citogenética. Complutense, Madrid.
- LEITCH I. J., HESLOP-HARRISON J. S. 1992. Physical mapping of the 18S-5.8S-26S rRNA genes in barley by *in situ* hybridization. *Genome* **35**: 1013-1018.

- LONG E. O., DAWID I. B. 1980. Repeated genes in eukaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* **49**: 727-764.
- LÓPEZ-LEÓN M. D., CABRERO J. & CAMACHO J. P. M. 1995. Changes in DNA methylation during development in the B chromosome NOR of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Heredity* **74**: 296-302.
- LÓPEZ-LEON M. D., NEVES N., SCHWARZACHER T., HESLOP-HARRISON T. S., HEWITT G. M., CAMACHO J. P. M. 1994. Possible origin of a B chromosome deduced from its DNA composition using double FISH technique. *Chromosome Res.* **2**: 87-92.
- LORITE P., ARÁNEGA A. E., LUQUE F., PALOMEQUE T. 1997. Analysis of the nucleolar organizing regions in the ant *Tapinoma nigerrimum* (Hymenoptera, Formicidae). *Heredity* **78**: 578-582.
- LORITE P., CARRILLO J. A., GARCIA M. F. & PALOMEQUE T. 2000. Chromosome numbers in Spanish Formicidae III. Subfamily Myrmicinae (Hymenoptera). *Sociobiology* **36**: 555-570.
- LYCKEGAARD E. M. S., CLARK A. G. 1991. Evolution of ribosomal RNA gene copy number on the sex chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Biol. Evol.* **8**: 458-474.
- MAFFEI E. M., POMPOLO S. G., SILVA JR J. C., CAIXEIRO A. P., ROCHA M. P., DERGAM J. A. 2001. Silver staining of nucleolar organizer regions (NOR) in some species of Hymenoptera (bees and parasitic wasp) and Coleoptera (lady-beetle). *Cytobios* **104**: 119-25.

- MAGUIRE M. P. 1995. A stably transmitted pair of translocated supernumerary chromosomes in maize. *Genome* **38**: 558-565.
- McALLISTER B. F., WERREN J. H. 1997. Hybrid origin of a B chromosome (PSR) in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. *Chromosoma* **106**: 243-253.
- McCLINTOCK B. 1934. The relation of a particular chromosomal element to the development of the nucleoli in *Zea mays*. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* **21**: 294-328.
- McSTAY B., REEDER R. H. 1990. An RNA polymerase I termination site can stimulate the adjacent ribosomal gene promoter by two distinct mechanism in *Xenopus laevis*. *Genes Dev.* **4**: 1240-1252.
- MEDINA F. J., RISUEÑO M.C., SÁNCHEZ-PINA M. A., FERNÁNDEZ-GOMEZ M. E. 1983. A study of nucleolar silver staining in plant cells. The role of argyrophilic proteins in nucleolar physiology. *Chromosoma* **88**: 149-155.
- MENEZES M. B. F. 1997. Caracterização citogenética e análise da heterocromatina constitutiva em *Tetragonisca angustula angustula* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). M. Sc. Thesis. Universidade Federal de Viçosa.
- MERRY D. E., PATHAK S., VANDEBERG J. L. 1983. Differential NOR activities in somatic and germ cells of *Monodelphis domestica* (Marsupialia, Mammalia). *Cytogenet. Cell Genet.* **35**: 244-251.
- MILLER L., BROWN D. D. 1969. Variation in the activity of nucleolar organizer and their ribosomal gene content. *Chromosoma* **28**: 430-444.
- MILLER L., GURDON J. B. 1970. Mutations affecting the size of the nucleolus in *Xenopus laevis*. *Nature* **227**: 1108-1110.

- MORAIS-CECÍLIO L., DELGADO M., JONES R. N. & VIEGAS W. 2000. Modification of wheat rDNA loci by rye B chromosomes: a chromatin organization model. *Chromos. Res.* **8**: 341-351.
- MOSS J. P. 1966. The adaptative significance of B chromosomes in rye. *Chromos. Today* **1**: 15-23.
- NUR U. 1962. A supernumerary chromosome with an accumulation mechanism in the lecanoid genetic system. *Chromosoma* **13**: 249-271.
- PALOMEQUE T., CHICA E., CANO M. A . 1988. Karyotypes, C-banding, and chromosomal location of the active nucleolar organizing regions in *Tapinoma* (Hymenoptera, Formicidae). *Genome* **30**: 277-280.
- PALOMEQUE T., CHICA E., DIAZ DE LA GUARDIA, R. 1990a. Karyotype, C-banding, chromosomal location of active nucleolar organizing regions, and B-chromosomes in *Lasius niger* (Hymenoptera, Formicidae). *Genome* **33**: 267-272.
- PALOMEQUE T., CHICA E., CANO M. A., DÍAZ DE LA GUARDIA R. 1990b. Development of silver stained structures during spermatogenesis in different genera of Formicidae. *Genetica* **81**: 51-58.
- PENDAS A. M., MORÁN P., CARCÍA-VAZQUEZ, E. 1993. Multi-chromosomal location of ribosomal RNA genes and heterochromatin association in the brown trout. *Chromos. Res.* **1**: 63-67.
- PERFECTTI F., WERREN J. H. 2001. The interspecific origin of B chromosomes: experimental evidence. *Evolution* **55**: 1069-1073.

- PERRY R. P. 1962. The cellular sites of synthesis of ribosomal and 4S RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **48**: 2179-2186.
- PIGOZZI M. I. & SOLARI A. J. 1998. Germ Cell restriction and regular transmission of an accessory chromosome that mimics a sex body in the Zebra finch, *Taeniopygia guttata*. *Chromos. Res.* **6**: 105-113.
- PLOWMAN A.B., BOUGOURD M. 1994. Selectively advantageous effects of B chromosomes on germination behaviour in *Allium schoenoprasum* L. *Heredity* **72**: 587-593.
- POMPOLO S. G., ROCHA M. P., DERGAM J. A., FERNÁNDES A., CAMPOS L. A. O. 2001. DNA characterization and karyotypic evolution in the bee genus *Melipona* (Hymenoptera, Meliponinae). *Chromos. Res.* **9**: 76.
- REEDER R. H. 1989. Regulatory elements of the generic ribosomal gene. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1**: 466-474.
- REER R. H. 1990. rRNA synthesis in the nucleolus. *Trends Genet.* **6**: 390-395.
- RITOSSA F. M., SPIEGELMAN S. 1965. Localization of DNA complementary to ribosomal RNA in the nucleolus organizer of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **53**: 737-745.
- RUIZ-REJÓN M., POSSE F. & OLIVER J. L. 1980. The B chromosome system of *Scilla autumnalis* (Liliaceae): Effects at the isozyme level. *Chromosoma* **79**: 341-348.
- SÁNCHEZ A., BURGOS M., JIMENEZ R., DÍAZ DE LA GUARDIA R. 1989. Quantitative analysis of silver staining of the nucleolar organizing region in *Eliomys quercinus*. *Genome* **32**: 978-982.

- SÁNCHEZ A., STITOU S., ZURITA F., JIMENEZ R., BURGOS M., DÍAZ DE LA GUARDIA R. 1995. Cytogenetic peculiarities in the Algerian Hedgehog: silver strains not only NORs but also heterochromatic blocks. *Heredity* **75**: 10-16.
- SCHARTL M., NANDA I., SCHLUPP I., WILDE B., EPPLEN J. T., SCHMID M., PARFEZALL J. 1995. Incorporation of subgenomic amounts of DNA as compensation for mutational load in a gynogenetic fish. *Nature* **373**: 68-71.
- SHARBEL T. F., GREEN D. M., HOUBEN A. 1998. B chromosome origin in the endemic New Zealand frog *Leiopelma hochstetteri* through sex chromosome devolution. *Genome* **41**: 14-22.
- SPEIR J., BIRNISTIEL M. L. 1974. Arrangement of the 5.8S RNA cistrons in the genome of *Xenopus laevis*. *J. Mol. Biol.* **87**: 237-256.
- STARK E. A., CONNERTON I., BENNET S. T., BARNES S. R., PARKER J. S., FORSTER J. W. 1996. Molecular analysis of the structure of the maize B-chromosome. *Chromosome Res.* **4**: 15-23.
- STAUB R. W. 1987. Leaf striping correlated with the presence of B chromosomes in maize. *J. Hered.* **78**: 71-74.
- STOUTHAMER R., TILBORG M., JONG J. H., NUNNEY L. & LUCK R. F. 2001. Selfish element maintains sex in natural populations of a parasitoid wasp. *Proc. R. Soc. Lond. B* **268**: 617-622.
- SUZUKI H., KURIHARA Y., KANEHISA T., MORIWAKI K. 1990. Variation in the distribution of the silver staining nucleolus organizer regions on the chromosomes of the wild mouse, *Mus musculus*. *Mol. Biol. Evol.* **7**: 271-282.

- SUZUKI H., SAKURAI S., NISHIMURA M., KOMINAMI R., MORIWAKI, K. 1992. compensatory changes in silver-stainability of nucleolar organizer regions in mice. *Jpn. J. Genet.* **67**: 217-232.
- TSUMOTO L. & SASAKI M. 1972. Effect of B chromosomes on chiasma frequency of A chromosomes in rye. *Wheat inf. Serv.* **33-34**: 28-30.
- VERMA R. S., BABU A. 1995. Human chromosomes: principles and techniques. McGraw Hill, New York.
- WACHTLER F., HOPMAM A. H., WIEGANT J., SCHWARZACHER H. G. 1986. On the position of nucleolus organizer region (NORs) in interphase nuclei: studies with a new, non autoradiographic *in situ* hybridization method. *Exp. Cell Res.* **167**: 227-240.
- WERREN J.H. 1991. The paternal-sex-ratio chromosome of *Nasonia*. *Am. Nat.* **142**: 224-241.
- ZURITA F., SÁNCHEZ A., BURGOS M., JIMÉNEZ R., DÍAZ DE LA GUARDIA R. 1997. Interchromosomal, intercellular and interindividual variability of NORs studied with silver staining and *in situ* hybridization. *Heredity* **78**: 229-234.
- ZURITA F., JIMÉNEZ R., BURGOS M., DÍAZ DE LA GUARDIA R. 1998. Sequential silver staining and *in situ* hybridization reveal a direct association between rDNA levels and the expression of homologous nucleolus organizing regions: a hypothesis for NOR structure and function. *J. Cell Sci.* **111**: 1433-1439.