

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

SECRETARIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
I. B.

André Roberto Mampumbu

**ANÁLISE CITOGENÉTICA DA HETEROCROMATINA E DA
NOR EM POPULAÇÕES DE ABELHAS SEM FERRÃO *Friesella
schrottkyi* (FRIESE, 1900) (Hymenoptera: Apidae: Meliponini).**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
André Roberto Mampumbu
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Silvia das Graças Pompolo

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

UNIDADE Bc
Nº CHAMADA T/UNICAMP
M311a
V _____ EK _____
TOMBO BC/ 51351
PROC 16.837102
C _____ DX _____
PREÇO R\$ 11,00
DATA 25/10/02
Nº CPD _____

CM00175731-6

BIB ID 265403

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

M311a

Mampumbu, André Roberto

Análise citogenética da heterocromatina e da NOR em populações de abelhas sem ferrão *Friesella schrottkyi* (Fries, 1900) (Hymenoptera: Meliponini)/André Roberto Mampumbu. --
Campinas, SP:[s.n.], 2002

Orientadora: Silvia das Graças Pompolo

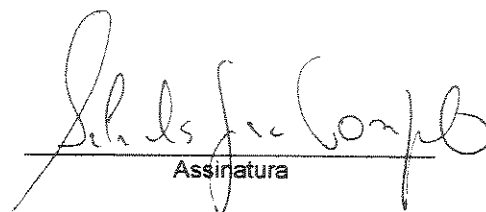
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia

1. Citogenética. 2. Heterocromatina. 3. Cariótipos. II. Pompolo, Silvia das Graças. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

DATA DA DEFESA: 28/08/2002

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Silvia das Graças Pompolo (Orientadora)



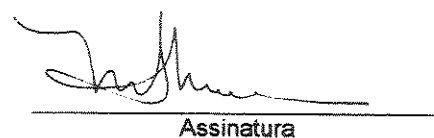
Assinatura

Profª Drª Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira



Assinatura

Profª Drª Maria Aparecida Marin Morales



Assinatura

Profª Drª Shirlei Maria Recco Pimentel

Assinatura

02805/2002

Se Deus é por nós, quem será contra nós? Rom 8, 31.

À DEUS.

Aos meus pais Moisés Ndambi Mampumbu e Matilde Sungo.

Aos meus irmãos pela confiança e incentivo.

A minha avó Delfina Lando e meus avôs José Geraldo Mampumbu,
André Roberto Casimiro Zinga e Faustino Manquema (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

À CAPES pelo apoio financeiro.

À Profª Drª Silvia das Graças Pompolo, pela orientação, seriedade e pela oportunidade cedida. Minha gratidão é eterna.

Ao Curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural da Universidade Estadual de Campinas, pela oportunidade.

Aos Professores da Pós-graduação de Biologia Celular e Estrutural-IB, UNICAMP

Ao Ex. Delegado da Educação Tiago Conde.

Ao ex. Governador Provincial de Cabinda, Augusto da Silva Tomás.

Ao Governo Provincial de Cabinda, pelo suporte financeiro na Graduação.

À Universidade Federal de Viçosa, pela formação em Ciências Biológicas.

Aos Professores da UFV, Gizele, Drª Isabela e Dr. Sérgio.

Ao Prof. Dr. Pedro pela sua disponibilidade e ajuda na análise estatística.

Aos Professores Dr. Lúcio Antonio de O. Campos, Dr. Lino Neto e Dr. Jorge Abdala Dergam dos Santos.

Ao Professor Dr. Paulo De Marcos e seus orientados, Maria, Marília e Marquinho, pela ajuda no esboço dos gráficos.

À secretária da Pós-graduação de Biologia Celular e Estrutural-IB, UNICAMP, Lílíam.

Aos funcionários do Apiário da UFV representados por Iris Stancioli.

Ao funcionário do laboratório de Citogenética de Insetos, José Estevão.

Aos membros da banca, pela disponibilidade.

Aos colegas de laboratório de Citogenética de Insetos, Drª Eliana, Drª Sônia, Marla, Clea, Paula, Virgínia, Canedo, Anderson, Bruno e Davy.

À Luciana Lisboa e a turma de Ciências Biológicas (Bio/94) pela amizade.

As amigas da Pós-graduação da UNICAMP, Adelina e Karina.

À técnica do laboratório de citogenética da UNICAMP, Klélia pela realização da técnica de hibridação *in situ*.

Meus agradecimentos aqueles que confiaram na honestidade do meu trabalho e também aqueles que, por um motivo alheio a minha vontade não me compreenderam; deles carreguei a marca da experiência e a força da superação; muito obrigado.

ÍNDICE

Resumo.....	VII
Abstract.....	VIII
1- INTRODUÇÃO.....	1
1.1- Considerações gerais sobre Meliponini.....	1
1.2- Análise Citogenética da Tribo Meliponini.....	2
1.3- Heterocromatina.....	3
1.4- Técnicas de bandamento cromossômico.....	4
1.4.1- Bandamento C e Fluorocromos.....	5
1.5- Região organizadora de nucléolo	6
2- OBJETIVOS.....	8
2-1- Justificativa.....	8
2-2- Objetivos específicos.....	9
3-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	10
4- Artigo.....	17
• INTRODUÇÃO.....	19
• MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
• RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
• Coloração convencional e banda C.....	22
• Coloração sequencial com fluorocromos (DA/DAPI/CMA ₃).....	23
• Hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH), banda NOR e suas relações com fluorocromo CMA ₃	23
• Número de nucléolos por núcleo e sua relação com ploidia.....	27
• Tabelas	30
• Legendas das Figuras.....	31
5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
6- CONCLUSÕES.....	53
7- ANEXO.....	55

RESUMO

Friesella é um gênero monotípico da tribo Meliponini com distribuição geográfica restrita ao sul-sudeste do Brasil. O objetivo deste trabalho foi análise citogenética do gênero *Friesella* para a compreensão da organização e evolução do genoma da tribo Meliponini, utilizando técnicas de coloração com Giemsa, banda C e fluorocromos para localizar e conhecer a natureza da heterocromatina; banda NOR e hibridação *in situ*, para a localização dos genes ribossômicos e para o estudo do número de nucléolos. Foram analisadas citogeneticamente 10 colônias provenientes dos Estados de Minas Gerais e Espírito Santo. Determinou-se o número cromossômico de $2n=34$ (fêmeas) e de $n=17$ (machos). A fórmula cariotípica é $2K=18A^M+ 16A$. A heterocromatina localizou-se nos braços curtos dos cromossomos acrocêntricos (A) e nos braços médio e longo dos cromossomos pseudo-acrocêntricos (A^M). Os tipos morfológicos observados (A^M , A) teriam surgido de cromossomos metacêntricos que sofreram fissões cêntricas seguidas de crescimento "em tandem" da heterocromatina. Os padrões obtidos com os fluorocromos base-específicos (DA/DAPI/CMA₃) demonstraram que a heterocromatina foi predominantemente rica em AT (DAPI⁺), com exceção do quinto par (A^M), que apresentou heterocromatina GC. Esta heterocromatina foi marcada pela CMA₃ e hibridizou com a sonda de rDNA (18S, 5.8S e 28S), o que demonstrou correlação entre CMA₃⁺ e FISH⁺. Foram encontradas três variantes cromossômicas, o que permitiu separar as colônias em dois grupos de acordo com as médias do comprimento do quinto par heteromórfico. Foi possível confirmar pela banda NOR, que estes cromossomos estavam envolvidos com a região organizadora de nucléolo. Observou-se uma variação de 1 a 4 nucléolos nos dois grupos analisados. A variação em número de nucléolos (1 a 4) observados em fêmeas (diplóides), foi considerado resultado de células com níveis diferentes de ploidia. O tamanho do nucléolo não diferiu entre os dois grupos, o que sugere um grau de atividade nucleolar similar e, conseqüentemente, que haja um controle na quantidade de rRNA transcrito independente do número de "clusters" de rDNA.

ABSTRACT

Friesella is a monotypic genus of the tribe Meliponini with geographical distribution restricted to southern and southeastern Brazil. The objective of this work was to analyze cytogenetic of genus *Friesella* to understand organization and evolution of genome of tribe Meliponini using conventional staining (Giemsa), C-banding and coloration with fluorochromes to characterize the localization and the nature of heterochromatin. NOR banding and *in situ* hybridization were applied for ribosome genes localization and to determine the number of nucleoli. Ten colonies were analyzed cytogenetically from the states of Minas Gerais and Espírito Santo. Chromosomal numbers of $2n=34$ and $n=17$ were determined for females and males respectively. The karyotypic formula was $2K=18A^M+16A$. The heterochromatin was localized in short arm achrocentrics (A) and in the medium and long arms of pseudoacrocentrics (A^M). The observed morphological types (A, A^M) might be derived from metacentric chromosomes that suffered centric fission, followed by tandem growth of the heterochromatin. The patterns obtained with specific-base fluorochromes (CA/DAPI/CMA₃) showed that the heterochromatin was predominantly AT (DAPI⁺) except for the fifth pair of (A^M) which bore GC heterochromatin. This heterochromatin was marked by CMA₃ and hybridized with 18S, 5.8 and 28S rDNA probes, which showed correlation between CMA₃⁺ and FISH⁺. Three chromosomes variants allowed to separate the colonies in two groups according to mean length of the fifth heteromorphic pair. NOR banding patterns of this same pair demonstrated that those chromosomes were also involved with the nucleolus organizer region. Both groups displayed a variation in nucleoli numbers from one to four, which was considered to be a result of different levels of ploidy in diploid females. Nucleolus size did not differ between the groups, suggesting similar nucleolar activity rate in both groups. We concluded there is a control in amount of transcribed rRNA that is independent of the number of rDNA clusters.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Considerações gerais sobre a tribo Meliponini.

Os insetos constituem um grande grupo zoológico, dividido em várias ordens. A Ordem Hymenoptera é um grupo extremamente diverso que compreende as formigas, vespas e abelhas (LASALLE e GAULD, 1993; NOGUEIRA-NETO, 1997). Muitas espécies de himenópteros se desenvolvem como parasitas ou predadores de outros insetos e, por essa razão, têm uma função natural na regulação da população de insetos fitófagos. Talvez, mais importante que seu valor econômico, seja o seu valor ambiental, que é um componente vital para o ecossistema terrestre (LASALLE e GAULD, 1993).

A subfamília Apinae, que pertence à família Apidae, agrupa as tribos Euglossini, Bombini, Apini e Meliponini (ROIG-ALSINA e MICHENER, 1993). Os meliponíneos, conhecidos como abelhas indígenas, se distinguem dos demais Apidae, principalmente pela redução da venação alar (célula marginal aberta no ápice, 2ª e 3ª submarginais ausentes e a 1ª ausente ou vestigial) e pela atrofia do ferrão (NOGUEIRA-NETO, 1997; CAMARGO, 1989). A tribo Meliponini é considerada uma das maiores visitantes de plantas nativas nos trópicos e contribui para a polinização eficiente de plantas cultivadas (HEARD, 1999).

Apresentam distribuição em grande parte das regiões de clima tropical e algumas importantes regiões de clima temperado subtropical. Portanto, essas abelhas são encontradas na maior parte do continente americano (CAMARGO, 1989; CAMARGO e PEDRO, 1992; NOGUEIRA-NETO, 1997).

Segundo CAMARGO (1989), *Friesella* é um gênero monotípico, apresenta uma distribuição Neotropical e restrita ao sul-sudeste do Brasil. Durante muito tempo, foi considerada uma abelha tipicamente paulista, mas também é encontrada na região de Viçosa - Minas Gerais. É uma abelha pequena (3-5mm), popularmente conhecida por mirim-preguiça. Constrói seus ninhos em ocos pequenos (mourões de cerca, paredões de pedra e em áreas urbanas) (NOGUEIRA-NETO, 1970).

A característica que faz os himenópteros serem muito interessantes do ponto de vista reprodutivo é o sistema de determinação sexual por partenogênese arrenótoca (arrenotoquia), ou seja, a origem dos machos a partir de ovos não fertilizados. A haplo-diploidia consiste num sistema genético no qual os machos são haplóides e as fêmeas

diplóides. Está portanto, presente no sexo masculino apenas o genoma materno, razão pela qual se diz que os machos não têm progenitor masculino. Além da arrenotoquia, ocorrem outros tipos de partenogênese nos himenópteros, como a telitoquia, a deuterotoquia e a partenogênese cíclica ou alternante. Os diferentes tipos podem ser encontrados na mesma família e até no mesmo gênero. Destes, a partenogênese arrenótoca é a mais freqüente; é a maneira pela qual o sexo nas abelhas é determinado (CRUZ-LANDIM, 1984; CRUZ-LANDIM e BEIG, 1980).

1.2- Análise Citogenética da Tribo Meliponini

O estudo citogenético da tribo Meliponini foi iniciado por KERR em 1948, que determinou os números cromossômicos $n=9$ e $2n=18$ cromossomos para duas espécies do gênero *Melipona*. Mais tarde foi ampliado para 25 gêneros e 47 espécies analisadas, com uma variação de $n=8$ a $n=18$, sendo $n=17$ o número predominante (KERR, 1952, 1969, 1972; KERR e SILVEIRA, 1972). Posteriormente, mais trabalhos citogenéticos são apresentados na literatura com variação de $n=8$ a $n=19$ (HOSHIBA, 1988; COSTA *et al.* 1992; POMPOLO 1992;1994; HOSHIBA e IMAI, 1993; POMPOLO e CAMPOS, 1995; MOREIRA, 1997; MENEZES, 1997; BRITO *et al.* 1997; BRITO, 1998; ROCHA e POMPOLO, 1998; CAIXEIRO, 1999; BRITO-RIBON *et al.* 1999; ROCHA, 2000). A análise citogenética de *F. schrottkyi* se limitava, até então, à morfologia e ao número cromossômico (POMPOLO 1992;1994), sendo o cariótipo observado correspondente a $2n=34$, diplóide para fêmeas e haplóide, $n=17$, para machos. TARELHO (1973) observou $n=18$ em duas colônias analisadas de *F. schrottkyi* de Ribeirão Preto (SP).

Segundo a teoria de interação mínima (IMAI *et al.* 1988, 1994; IMAI, 1991), a ocorrência de interações cromossômicas não-específicas durante a intérfase é determinada pela relação entre o tamanho do genoma e o volume nuclear dos oócitos e espermatócitos. Se esta proporção for alta (genoma grande/núcleo pequeno), a probabilidade de ocorrência de interações cromossômicas será elevada, ocasionando mutações deletérias, como translocações recíprocas. Foi então sugerida por IMAI *et al.* (1986) que o caminho seguido na evolução do cariótipo teria sido uma forte seleção, atuando para o aumento do número cromossômico, a fim de diminuir o risco de translocações recíprocas gerado em um cariótipo com um número baixo e de tamanho grande. O processo mais eficiente para atingir este aumento seria a ocorrência de fissões

cêntricas. O crescimento da heterocromatina, após a fissão cêntrica em um dos braços do cromossomo seria para a recuperação da estabilidade do telômero.

Vários trabalhos têm demonstrado a ocorrência de heteromorfismo em relação ao tamanho da banda C (heterocromatina) na ordem Hymenoptera, como foi observado em vespas do gênero *Trypoxylon* (GOMES, 1995; SCHER, 1996; ARAÚJO, 2000) e em abelhas no gênero *Plebeia* (CAIXEIRO, 1999).

Em algumas espécies desta ordem foi observada a poliploidização. WORKER e KROL-PALUCH (1985) trabalharam com vários tecidos de *Apis mellifera carnica* e observaram um alto grau de poliploidia na fase larval do desenvolvimento.

1.3- Heterocromatina

A primeira definição da heterocromatina foi dada por Heitz (1928) (in JOHN, 1988), que a definiu como segmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros que se mantêm condensados durante todo ciclo celular. De acordo com PIECZARKA e MATTEVI (1998), a heterocromatina é composta em grande parte por DNA altamente repetido, se replica mais lentamente na fase S e possui ainda a característica de corar diferencialmente quando submetida a determinados tratamentos.

O enigma fundamental da presença de regiões cromossômicas heterocromáticas é que embora tais regiões sejam extensas, compreendendo uma proporção do genoma dos eucariotos superiores, elas parecem inertes do ponto de vista funcional ou genético. Porque o genoma dos organismos superiores contém tal quantidade de material genético de pouco significado biológico? Ou, alternativamente, quais são as forças evolutivas que resultam na manutenção e estabilidade da heterocromatina? Uma das respostas seria que ela é mantida inteira por processos estocásticos ou por processos internos com benefícios para si mesmo e não para todo organismo (heterocromatina egoísta) (PALUMBO *et al.* 1994).

Outros autores defendem a idéia que a heterocromatina contém funções biológicas. Neste caso, a aparente inatividade da heterocromatina pode ser devida a peculiar organização do material genético, produzindo poucas funções que existem e/ou a dificuldade para detectar as funções heterocromáticas por análise genética convencional (PALUMBO *et al.* 1994).

Várias funções tem sido propostas para a presença da heterocromatina no genoma das espécies: recuperação da estabilidade telomérica (IMAI, 1991; IMAI *et al.* 1986;1988;1994), após eventos de fissão cêntrica nos cromossomos; reconhecimento de centrômeros homólogos e proteção estrutural de centrômeros e de genes ribossomais (*in* SUMNER, 1990); proteção de porções eucromáticas do genoma em núcleos interfásicos contra o ataque de substâncias mutagênicas e clastogênicas (HSU, 1975); recurso para criação de novos genes (IMAI, 1991); estabilização de regiões espiralizadas de cromossomos, como os centrômeros e telômeros, facilitando rearranjo cromossômico e recombinação (VERMA e BABU, 1987).

1.4- Técnicas de bandamento cromossômico

Inicialmente os cromossomos eram vistos predominantemente uniformes, diferenciados somente pela presença quase invariável do centrômero, o qual tem sido referido como constrição primária. Na segunda década de 70, houve uma revolução no estudo citogenético, principalmente pelo uso de várias técnicas de bandamento. Algumas técnicas produzem um padrão diferenciado ao longo dos braços cromossômicos, evidenciando regiões claras e escuras, que são chamadas de bandas. Outras técnicas produzem marcações muito específicas no cromossomo, que aparecem como bandas transversais de diferentes intensidades, que são linearmente arranjadas em padrões característicos para cromossomos específicos (VERMA e BABU, 1987).

Quando os cromossomos são examinados com diferentes técnicas citogenéticas, revela-se uma grande variabilidade entre os mesmos. Muitas das variações envolvem diferenças no tamanho ou propriedades de marcação de segmento da heterocromatina e tamanho da NOR. A variação entre cromossomos homólogos sem implicar que as diferentes formas sejam necessariamente descontínuas, foi denominado de heteromorfismo (SUMNER, 1990).

Métodos de bandamentos são, portanto, relevantes para entender a estrutura e função dos cromossomos e a interpretação da tendência evolutiva entre diferentes genomas (Darling e Abbott, 1992) (*in* BELLA *et al.* 1995).

1.4.1- Banda C e Fluorocromos

Uma das técnicas utilizadas para estudar a heterocromatina (banda C) foi introduzida por SUMNER (1972). Essa envolve a remoção preferencial do DNA de regiões eucromáticas, resultando na coloração seletiva da heterocromatina em cromossomos metafásicos e no núcleo interfásico (SUMNER, 1990).

A referida técnica tem sido empregada em espécies da Ordem Hymenoptera, proporcionando uma boa caracterização dos padrões de distribuição da heterocromatina. Espécies de vespas do gênero *Trypoxylon* foram estudadas por GOMES *et al.* (1995, 1997), SCHER (1996) e ARAÚJO *et al.* (2000). CAIXEIRO (1999) comparou os cariótipos de quatro espécies de abelha sem ferrão do gênero *Plebeia* ($2n=34$), tendo observado diferença com relação a morfologia e distribuição de heterocromatina. BRITO (1998) e BRITO-RIBON *et al.* (1999) estudaram o gênero *Partamona*. ROCHA (2000) observou variação da heterocromatina em cromossomos de espécies do gênero *Melipona*. MENEZES (1997) analisou o cariótipo de *Tetragonisca angustula*. Três espécies do gênero *Frieseomelitta* foram estudadas por MOREIRA (1997).

Uma ampla variedade de fluorocromos tem sido usada na coloração de cromossomos para estudar a natureza da heterocromatina. Estes fluorocromos podem ser classificados, de acordo com afinidade, por dois tipos específicos de bases de DNA (AT ou GC) (VERMA e BABU, 1995).

O fluorocromo DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole) (base específica AT) foi utilizado pela primeira vez para bandamento cromossômico por Schweizer e Nagl (1976) (in SUMNER, 1990). Desde então tem sido usado em combinação com CMA₃ (cromomicina A₃) e mitramicina ambos (base específica GC) para produzir padrões de bandas complementares. Os diferentes padrões são observados pela troca de comprimento de onda da luz excitante. Diversos fluorocromos, AT específico, têm sido combinados com outros fluorocromos que mostram GC específico, como resultados, padrões diferentes podem ser demonstrados em cromossomo individual (SUMNER, 1990; BELLA *et al.* 1995).

A cromomicina A₃ (base específica GC) foi usada primeiramente por Schweizer (in SUMNER 1990), em cromossomos de plantas. Esse autor verificou que regiões heterocromáticas mostravam brilho intenso quando coradas com cromomicina A₃, mas

apresentavam fluorescências tênues quando submetidas ao fluorocromo DAPI (SUMNER, 1990)).

1.5- Região organizadora de nucléolo

A região organizadora de nucléolo (NOR) é região do DNA que contém os principais genes de rRNA (18S, 5.8S e 28S rDNA). O nucléolo é a organela na interfase onde estes genes se localizam, além do material que se acumula ao redor da NOR (maior parte de rRNAs, seus precursores quanto proteínas ribossomais específicas) (SCHWARZACHER e WACHTLER, 1983; REEDER, 1990).

Em nucléolos de mamíferos existem três subestruturas denominadas de acordo com a sua aparência em microscopia eletrônica: 1-Centro fibrilar que contem o DNA ribossomal e ambas as enzimas RNA polimerase I e topoisomerase I. Deste modo, o centro fibrilar é o sítio onde os rRNAs são gerados. 2-Componente fibrilar denso, estrutura que possui fibrilarina, proteínas associadas com U3 (pequenos ribonucleoproteínas nucleares "snRNP"). 3- Componente granular que é composta de partículas precursoras de ribossomos em estágios de maturação, antes de exportar para o citoplasma (REEDER, 1990).

Os ribossomos contêm quatro tipos de rRNA que são designados pelo seu coeficiente de sedimentação "5S 18S, 5.8S e 28S" e grande número de proteínas (Wilson, 1982) (in SUMNER, 1990). Os rRNAs 18S, 5.8S e 28S são todos derivados da grande molécula pesada precursora 45S (Attardi e Amaldi, 1970) (in SUMNER, 1990). O rRNA 5S é sintetizado por genes separados que ocupam estruturalmente sítios diferentes nos cromossomos em relação aos outros rRNAs.

A região organizadora de nucléolo (NOR) ativa é detectada pelo método de impregnação com prata (AgNO_3) em cromossomos metafásicos e em núcleos interfásicos (HOWELL, 1977; REEDER, 1990; MILLER *et al.* 1976; LORITE *et al.* 1997). Análise química demonstrou que a prata impregna proteínas ácidas de natureza não-histônicas (SCHWARZACHER e WACHTLER, 1983; HOWELL, 1977).

Em citogenética molecular, a principal técnica utilizada atualmente é a hibridação *in situ* fluorescente (FISH). Inicialmente era utilizada para localizar seqüências repetidas de DNA em cromossomos metafásicos, mas seu campo de aplicação está progressivamente diversificado. Entretanto, constitui uma ferramenta útil para o

estabelecimento do mapa genômico (ABDELMOULA *et al.* 2000). Com a sonda de rDNA é possível obter a localização precisa de todos genes ribossômicos, independente da sua atividade (CHENG *et al.* 1995). Se os genes ribossomais estão dispersos como pequenos "clusters", é interessante ressaltar o maior grau da eficiência da técnica de hibridação *in situ* em relação a banda NOR (HSU *et al.* 1975).

A identificação de NOR por fluorocromos base específica GC (CMA₃ ou MM - mitramicina) foi observado em anfíbios (ALMEIDA-TOLEDO, *et al.* 1989; SCHMID, 1980; SCHMID e GUTTENBACH, 1988), em peixes (CASTRO *et al.* 1996; DEIANA *et al.* 2000; GALETTI *et al.* 1984, 1995; MESTRINER *et al.* 1995; MARTINS e GALETTI Jr., 1998; MARTINEZ-LAGE *et al.* 1994; MARTINS e GALETTI, 1999; SANTOS e SOUZA, 1998b; SCHMID e GUTTENBACH, 1988; UEDA *et al.* 1987), em répteis (SCHMID e GUTTENBACH, 1988), aves (SCHMID e GUTTENBACH, 1988) e em plantas (CERBAH *et al.* 1995; ZOLDO *et al.* 1999), em insetos (LORITE *et al.* 1997; MANDRIOLI *et al.* 1999).

O número e tamanho de "clusters" de rDNA pode variar entre indivíduos e populações. A variação em número e tamanho de "clusters" de rDNA permitiram a MARTÍNEZ *et al.* (1993) separar a espécie *Salmo trutta* em 5 grupos. Com base nessas características afirmaram que a medida dos tamanhos das NORs estão bem correlacionados com a quantidade de prata depositada, mostrando que o aumento da NOR segue paralelo a quantidade de genes de rDNA.

2- OBJETIVOS

2.1- Justificativa

A tribo Meliponini apresenta uma diversidade de gêneros e espécies e os dados citogenéticos obtidos oferecem uma variedade de resultados que enriquecem em muito o estudo da biologia desses insetos. O número cromossômico varia de $n=8$ a $n=19$, sendo $n=17$ o número predominante. Dados de citogenética de *Friesella schrottkyi* na literatura são controversos. TARELHO (1973) determinou $n=18$ cromossomos e POMPOLO (1992, 1994) encontrou $n=17$, $2n=34$. Os aspectos gerais e detalhados tais como morfologia dos cromossomos, padrão da distribuição e da natureza da heterocromatina, número e tamanho da NOR, possibilitam uma melhor caracterização dos cromossomos de *Friesella schrottkyi* e maior esclarecimento das relações entre as diversas espécies.

Estes dados poderão ajudar na compreensão dos mecanismos envolvidos na evolução deste gênero, considerando a hipótese da evolução cromossômica (teoria de interação mínima) de IMAI *et al.* (1988, 1994) e IMAI (1991) em relação à tribo Meliponini.

2.2- Objetivos específicos

O presente trabalho teve como objetivos em *Friesella schrottkyi*:

- 1- Descrever o cariótipo, com base na localização e organização da heterocromatina a partir de técnicas de banda-C e fluorocromos.
- 2- Identificar os cromossomos carreadores de NORs por técnicas de hibridação *in situ*, fluorocromos e banda NOR.
- 3- Observar se ocorre variação na quantidade de “clusters” dos genes de rDNA e comparar a sua atividade nucleolar em núcleos interfásicos de fêmeas nas populações estudadas.

3- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELMOULA, N. B., PORTNOI, M., VIALARD, F., AMOURI, A., AKKER, J. V. & TAILLEMITE, J. (2000). *Medicine/Sciences*, 16: 1405-1411.
- ALMEIDA-TOLEDO, L. F., STOCKER, A. J., FORESTI, F. & TOLEDO-FILHO, S. A. (1989). Fluorescence *in situ* hybridization with DNA probes on chromosomes of two nucleolus organizer region phenotypes of a species of *Eigenmannia* (Pisces, Gymnotoidei, Sternopygidae). *Chrom. Res.*, 4: 301-305.
- ARAÚJO, 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.
- BELLA, J. L., FERNÁNDEZ, J. L. & GOSÁLVEZ, J. (1995). C-banding plus fluorochrome staining shows differences in C-, G-, and metaphase chromosomes. *Genome*, 38: 864-868.
- BRITO, R. M. (1998). Caracterização citogenética de duas espécies do gênero *Partamona* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) Universidade Federal de Viçosa.
- BRITO, R. M., COSTA, M. A. & POMPOLO, S. G. (1997). Characterization and distribution of supernumerary chromosomes in 23 colonies of *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Brazil. J. Genet.*, 20: 185-188.
- BRITO-RIBON, R. M., MIYAZAWA, C. S. & POMPOLO, S. G. (1999). First karyotype characterization of four species of *Partamona* (Friese, 1980) (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) in Mato Grosso State, Brasil. *Cytobios*, 100: 19-26.
- CAIXEIRO, A. P. A. (1999). Caracterização citogenética da heterocromatina constitutiva e sua implicação na evolução do cariótipo de espécies do gênero *Plebeia* (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) Universidade Federal de Viçosa.
- CAMARGO, M. F. (1989). Comentários sobre a sistemática de Meliponinae (HYMENOPTERA, APIDAE). In: Simpósio anual da ACIESP. Anais. Ribeirão Preto, S P. 68: 41-61.
- CAMARGO, J. M. F. & PEDRO, S. R. M. (1992). Systematics, phylogeny and biogeography of the Meliponinae (Hymenoptera, Apidae): a mini-review. *Apidologie*, 23: 509-522.

- CASTRO, J., VIÑAS, A. SÁNCHEZ, L. & MARTÍNEZ, P. (1996). Characterization of an atypical NOR site polymorphism in brown *trutta* (*Salmo trutta*) with Ag-and CMA₃-staining, and fluorescent *in situ* hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.*, 75: 234-239.
- CERBAH, M., COULAUD, J., GODELLE, B. & SILJAK-YAKOVLEV, S. (1995). Genome size, fluorochrome banding, and karyotype evolution in some *Hypochoeris* species. *Genome*, 38: 689-695.
- CHENG, B. F., HENEEN, W. K. & PEDERSEN, C. (1995). Ribosomal RNA gene loci and their nucleolar activity in *Brassica alboglabra* Bailey. *Hereditas*, 123: 169-173.
- COSTA, M. A., POMPOLO, S. G. & CAMPOS, L. A. O. (1992). Supernumerary chromosomes in *Partamona cupira* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Rev. Brasil. Genet.*, 15: 801-806.
- CRUZ-LANDIM, C. (1984). Haplo-diploidia em Hymenoptera. *Rev. Brasil. Genet.*, VII: 433-449.
- CRUZ-LANDIM, C. & BEIG, D. (1980). Meiose nos Hymenoptera. *Ci. e Cult.*, 33: 937-966.
- DEIANA, A. M., CAU, A. SALVADORI, S. COLUCCIA, E. CANNAS, R., MILIA, A. & TAGLIAVINI, J. (2000). Major and 5S ribosomal sequences of the larges mouth bass *Micropterus salmoides* (Perciforme, Centrarchidae) are localized in GC-rich regions of the genome. *Chrom. Res.*, 8: 213-218.
- GALETTI JR., FORESTI, F.; P. M. BERTOLLO, L. A. C. & FILHO, O. M. (1984). Characterization of eighth species of Anostomidae (Cypriniformes) fish in the basis of the nucleolar organizing region. *Caryologia*, 37: 401-406.
- GALETTI JR., P. M.; MESTRINER, C. A; MONACO, P. J. & RASCH, E. M. (1995). Post-zigotic modifications and intra- and inter-individual nuclear organizing regions variations in fish: report of a case involving *Leporinus friderici*. *Chrom. Res.*, 3: 285-290.
- GOMES, L. F., POMPOLO, S. G. & CAMPOS, L. A. O. (1995). Cytogenetic analysis of three species of *Trypoxylon* (Hymenoptera, Sphecidae, Larrinae). *Rev. Brasil. Genet.*, 18: 173-176.
- GOMES, L. F., POMPOLO, S. G. & CAMPOS, L. A. O. (1997). Karyotype evolution in wasps of the genus *Trypoxylon* (subgenus *Trypargilum*) (Hymenoptera, Sphecidae). *Brazil. J. Genetics*, 20: 177-183.
- HEARD, T. A. (1999). The role of stingless bees in crop pollination. *Annu. Rev. Entomol.*, 44: 183-206.

- HOSHIBA, H. (1988). Karyological analysis of a stingless bee, *Melipona favosa* (Apidae, Hymenoptera). *Cytologia*, 53: 153-156.
- HOSHIBA, H. & IMAI, H. T. (1993). Chromosome evolution of bees and wasps (Hymenoptera, Apocrita) on basis of C-banding pattern analyses. *Jpn. J. Ent.*, 61: 465-492.
- HOWELL, W. M. (1977). Visualization of ribosomal gene activity: silver stains proteins associated with rRNA transcribed from oocyte chromosomes. *Chromosoma*, 62: 361-367.
- HSU, T. C. (1975). A possible function of constitutive heterochromatin: the bodyguard hypothesis. *Genetics*, 79: 137-150.
- HSU, T. C., SPIRITO, S. E. & PARDUE, M. L. (1975). Distribution of 18+28S ribosomal genes in mammalian genomes. *Chromosoma*, 53: 25-36.
- IMAI, H. T., MARUYMA, T., GOJOBORI, T., INOUE, Y. & CROZIER, R. H. (1986). Theoretical bases for karyotype evolution. 1 The minimum-interaction hypothesis. *Am. Nat.*, 128: 900-920.
- 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., TAYLOR, R. W. & CROZIER, R. H. (1988). Modes of spontaneous chromosomal mutation and karyotype evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis. *Jpn. J. Genet.*, 63: 159-155.
- IMAI, H. T., TAYLOR, R. W. & CROZIER, R. H. (1994). Experimental bases for the minimum interaction theory. I. Chromosome evolution in ants of the *Myrmecia pilosula* species complex (Hymenoptera: Formicidae: Myrmecinae). *Jpn. J. Genet.*, 69: 137-182.
- JOHN, B. (1988). The biology of heterochromatin. In: VERMA, R. S. (Ed). *Heterochromatin molecular and structural aspects*. New York: Cambridge University Press, p. 1-147.
- KERR, W. E. (1948). Estudos sobre o gênero *Melipona*. *Ann. Esc. Agr. "Luiz de Queiroz"* 5: 181-276.
- KERR, W. E. (1952). A variação do número de cromossomos na evolução dos Hymenoptera. *Sci. Genet.*, 4: 182-190.
- KERR, W. E. (1969). Some aspects of the evolution of social bees (Apidae). *Evol. Biol.*, 3: 119-175.

- KERR, W. E. (1972). Numbers of chromosomes in some species of bees. *J. Kans. Entomol. Soc.*, 45: 111-122.
- KERR, W. E. & SILVEIRA, Z. V. (1972). Karyotypic evolution and corresponding taxonomic implications. *Evolution*, 26: 197-212.
- LASALLE, J. & GAULD, I. D. (1993). Hymenoptera and biodiversity. In: LASALLE, J. e GAULD, I. D. *Hymenoptera: Their diversity, and their impact on the diversity of other organisms*. C. A. B. International, UK.
- 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.
- MANDRIOLI, M., MANICARDI, G. C., BIZZARO, D. & BIANCHI, U. (1999). NOR heteromorfism within a parthenogenetic lineage of the aphid *Megoura viciae*. *Chrom. Res.*, 7: 157-162.
- MARTÍNEZ, P., VIÑAS, A., BOUZA, C., CASTRO, J. & SÁNCHEZ, L. (1993). Quantitative analysis of the variability of nucleolar organizer regions in *Salmo trutta*. *Genome*, 36: 1119-1123.
- MARTINS, C. & GALETTI Jr., P. M. (1998). Karyotype similarity between two sympatric *Schizodon* fish species (Anostomidae, Characiformes) from the Paraguay River basin. *Genet. Mol. Biol.*, 21: 355-360.
- MARTINS, C. & GALETTI JR, P. M. (1999). Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chrom. Res.*, 7: 363-367.
- MARTÍNEZ-LAGE, A., GONZÁLEZ-TIZÓN, A. & MÉDEZ, J. (1994) Characterization of different chromatin types in *Mytilus galloprovincialis* L. after C-banding, fluorochrome and restriction endonuclease treatments. *Heredity*, 72: 242-249.
- MENEZES, M. B. F. (1997). Caracterização citogenética e análise da heterocromatina constitutiva em *Tetragonisca angustula angustula* (Hymenoptera, Meliponinae) Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) Universidade Federal de Viçosa.
- MESTRINER, C. A., BERTOLLO, L. A. C. & GALETTI JR., P. M. (1995). Chromosome banding and synaptonemal complexes in *Leporinus lacustris* (Pisces, Anostomidae): analyses of a sex system. *Chrom. Res.*, 3: 440-443.
- MILLER, D. A., DEV, V. G., TANTRAHAHI, R. & MILLER J. (1976). Suppression of human nucleolus organizer activity in mouse-human somatic hybrid cells. *Exp. Cell Res.*, 101: 235-243.

- MOREIRA, C. M. L. C. (1997). Caracterização cariotípica de três espécies do gênero *Friesomelitta* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) Universidade Federal de Viçosa.
- NOGUEIRA-NETO, P. (1997). *A Vida e Criação de Abelhas Indígenas Sem Ferrão*. Editora Nogueirioplis. São Paulo.
- NOGUEIRA-NETO, P. 1970. *A Criação de Abelhas Indígenas sem Ferrão*. 2º ed. Editora Tecnapis, São Paulo.
- PALUMBO, G., BERLOCO, M., FANTI, L., BOZZETTI, M. P., MASSARI, S. CAIZZI, R. CAGGESE, C., SPINELLI, L. & PIMPINELLI, S. (1994). Interaction systems between heterochromatin and euchromatin in *Drosophila melanogaster*. *Genetica*, 94: 267-274.
- PIECZARKA, J. C. & MATTEVI, M. (1998). Heterocromatina constitutiva. Ribeirão Preto: *Sociedade Brasileira de Genética. Série Monografias nº 7*. 248p.
- POMPOLO, S. G. & CAMPOS, L. A. O. (1995). Karyotypes of two species of stingless bees, *Leurotrigona muelleri* and *Leurotrigona pusilla* (Hymenoptera, Meliponinae). *Rev. Brasil. Genet.*, 18: 181-184.
- POMPOLO, S. G. (1992). Estudos citogenéticos em Meliponinae. *Naturalia* (Edição especial): 62-66.
- POMPOLO, S. G. (1994). Análise dos cariótipos de 19 gêneros de abelhas da subfamília Meliponinae. In: Encontro Sobre Abelhas. 1. Ribeirão Preto. *Anais.. Ribeirão Preto. Legis Summa*: 143-146.
- REEDER, R. H. (1990). rRNA synthesis in the nucleolus. *Trends Genet.*, 6: 390-395.
- ROCHA, M. P. (2000). Análise cariotípica de dez espécies do gênero *Melipona* Illiger, 1806 (Hymenoptera, Apidae), baseada em padrões de heterocromatina. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) Universidade Federal de Viçosa.
- ROCHA, M. P. & POMPOLO, S. G. (1998). Karyotypes and heterochromatin variation (C-bands) in *Melipona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Genet. Mol. Biol.*, 21: 41-45.
- ROIG-ALSINA, A. & MICHENER, C. D. (1993). Studies of the phylogeny and classification of long-tongued bees (Hymenoptera:Apoidea). *Univers. Kansas Scien. Bul.*, 55: 123-173.

- SANTOS, N. & SOUZA, M. J. (1998). Use of fluorochromes chromomycin A₃ and DAPI to study constitutive heterochromatin and NORs in four species of bats (Phyllostomidae). *Caryologia*, 51: 265-278.
- SCHER, R. (1996). Diversidade cariotípica em uma população de *Trypoxylon* (*Trypargilum*) *nitydum* (Hymenoptera, Sphecidae) do Parque Florestal Estadual do Rio Doce (MG). Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) Universidade Federal de Viçosa.
- SCHMID, M. (1980). Chromosome banding in Amphibia. IV. Differentiation of GC- and rich chromosome regions in Anura. *Chromosoma*, 77: 83-103.
- SCHMID, M. & GUTTENBACH, M. (1988). Evolutionary diversity of reverse (R) fluorescent chromosome bands in vertebrates. *Chromosoma*, 97: 101- 104.
- SCHWARZACHER, H. G. & WACHTLER, F. (1983). Nucleolus organizer regions and nucleoli. *Hum. Genet.*, 63: 89-99.
- SUMNER, A. T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res.*, 75: 304-306.
- SUMNER, A. T. (1990). *Chromosome Banding*. Unwin Hyman, London.
- TARELHO, Z. V. S. (1973). Contribuição ao estudo citogenético dos Apoidea. Dissertação (Mestre em Ciências) USP, Riberão Preto.
- UEDA, T., IRIE, S., & KATO, Y. (1987). Longitudinal differentiation of metaphase chromosomes of Indian muntjac as studied by restriction enzyme digestion, in situ hybridization with cloned DNA probes and distamycin A plus DAPI fluorescence staining. *Chromosoma*, 95: 251- 257.
- VERMA, R. S. & BABU, A. (1987). Chromosome structure: euchromatin and heterochromatin. *Int. Rev. Cytol.*, 108: 1-60.
- VERMA, R. S. & BABU, A. (1995). Human chromosomes. *Principles and techniques*. New York: Me Graw Hill Inc.
- WOYKE, J & KROL-PALUCH, W. (1985). Changes in tissue polyploidization during development of worker, queen, haploid and diploid drone honeybees. *J. Apic. Res.*, 24: 214-224.
- ZOLDOS, V., PAPES, D., CERBAH, M., PANAUD, O., BESENDRFER, V. & SILJAK-YAKOVLEV, V. (1999). Molecular-cytogenetic studies of ribosomal genes and

heterochromatin reveal conserved genome organization among 11 *Quercus* species.
Theor Appl Genet., 99: 969-977.

4– Artigo

(A ser submetido a publicação)

**ANÁLISE CITOGENÉTICA DA HETEROCROMATINA E DA NOR EM
POPULAÇÕES DE ABELHAS SEM FERRÃO *Friesella schrottkyi*
(FRIESE, 1900) (Hymenoptera: Apidae: Meliponini).**

ANDRÉ ROBERTO MAMPUMBU e SILVIA DAS GRAÇAS POMPOLO

¹Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 13083-970 Campinas, São Paulo.

²Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa (UFV), 36571-000 Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

Título resumido: Análise citogenética de *Friesella schrottkyi*.

Palavras chaves: *Friesella schrottkyi*, Cariótipo, Heterocromatina, Heteromorfismo, NOR, Ploidia.

INTRODUÇÃO

A família Apidae agrupa as tribos: Euglossini, Bombini, Apini e Meliponini (ROIG-ALSINA e MICHENER, 1993). *Friesella* é um gênero monotípico da tribo Meliponini que apresenta uma distribuição restrita ao sul-sudeste do Brasil (CAMARGO, 1989).

Diversos dados citogenéticos da tribo Meliponini estão disponíveis na literatura (KERR, 1948, KERR, 1952, 1969, 1972; KERR e SILVEIRA, 1972; HOSHIBA, 1988; COSTA *et al.* 1992; HOSHIBA e IMAI, 1993; POMPOLO e CAMPOS, 1995; MOREIRA, 1997; MENEZES, 1997; BRITO *et al.* 1997; BRITO, 1998; ROCHA e POMPOLO, 1998; CAIXEIRO, 1999; BRITO-RIBON *et al.* 1999; ROCHA, 2000).

Segundo a teoria de interação mínima (IMAI *et al.* 1988, 1994; IMAI, 1991), a ocorrência de interações cromossômicas não-específicas durante a intérfase é determinada pela relação entre o tamanho do genoma e o volume nuclear dos oócitos e espermatócitos. Se esta proporção for alta (genoma grande/núcleo pequeno), a probabilidade de ocorrência de interações cromossômicas será elevada, ocasionando mutações deletérias, como translocações recíprocas. Foi então sugerida por IMAI *et al.* (1986) que o caminho seguido na evolução do cariótipo teria sido uma forte seleção, atuando para o aumento do número cromossômico, a fim de compensar o risco de translocações recíprocas, gerado em um cariótipo com um número baixo e cromossomos de tamanho grande. O processo mais eficiente para atingir este aumento seria a ocorrência de fissões cêntricas. O crescimento da heterocromatina, após a fissão cêntrica em um dos braços do cromossomo seria para a recuperação da estabilidade do telômero. Alguns autores têm se baseado na teoria da interação mínima (IMAI *et al.* 1986; 1988; 1994) para explicar a evolução cromossômica para diversas espécies da tribo Meliponini (POMPOLO e CAMPOS, 1995; CAIXEIRO, 1999; MOREIRA, 1997; MENEZES, 1997; BRITO, 1998).

O presente trabalho teve como objetivo a análise citogenética do gênero *Friesella* para compreensão da organização e evolução do genoma da tribo Meliponini, utilizando técnicas de coloração com Giemsa, banda C, coloração com fluorocromos para a localização e natureza da heterocromatina; banda NOR e hibridação *in situ* para localização dos genes ribossômicos e estudo do número de nucléolos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas 10 colônias de *Friesella schrottkyi*, registradas em ordem numérica: cinco provenientes de Viçosa, MG (366, 561, 582, 583 e 658); duas provenientes de Paula Cândido, MG (604, 605), duas de Guaraciaba, MG (607 e 617) e uma proveniente de Anchieta, ES (480) (Tabela 1). Todas estas colônias estão acondicionadas em caixas apropriadas e situadas no Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

A análise citogenética foi feita a partir de gânglios cerebrais de larvas pós-defecantes, segundo a metodologia proposta por IMAI *et al.* (1988). Após 24 horas da preparação, as lâminas foram submetidas a diferentes técnicas citogenéticas (Anexo 1).

A tripla coloração (DA/DAPI/CMA₃) foi feita de acordo com o protocolo proposto por SCHWEIZER (1980). Algumas destas lâminas foram coradas com Giemsa.

Na técnica de banda C foi utilizado o método BSG (Hidróxido de Bário/Solução Salina/Giemsa) de SUMNER (1972), com modificações, segundo POMPOLO e TAKAHASHI (1990).

A técnica de banda NOR (Ag-NOR) foi realizada de acordo com HOWELL e BLACK (1980), com algumas modificações, segundo MAFFEI *et al.* (2001).

A técnica de hibridação *in situ* foi realizada de acordo com os procedimentos propostos por VIÉGAS-PÉQUIGNOT (1992). Foi utilizado o clone *pDm 238*, que contém uma unidade do cistron ribossomal de *Drosophila melanogaster* (18S, 5.8S e 28S mais seqüências intergênicas) inserido em um plasmídeo *pBR 322* (ROIHA *et al.* 1981). Algumas destas lâminas foram em seguida submetidas à Ag-NOR.

As lâminas foram analisadas em microscópio Olympus BX-60 acoplado com epi-iluminador. Para análise das lâminas submetidas a DA/DAPI/CMA₃ e hibridação *in situ*, utilizou-se filtros WB (=330 a 385nm), para fluoresceína e CMA₃ e WU (=450 a 480nm), para DAPI.

As melhores metáfases observadas foram fotografadas com filme T-MAX ISO 100 e Kodak color ISO 100, para as técnicas de fluorocromos e FISH, respectivamente. O filme Kodak HQ ISO 25 foi utilizado para as técnicas de banda C e coloração com Giemsa.

Os cromossomos foram classificados seguindo a nomenclatura proposta por IMAI (1991): cromossomos acrocêntricos (A) em que a heterocromatina localiza-se em toda extensão do braço curto e pseudo-acrocêntricos (A^M) são aqueles em que a heterocromatina localiza-se em toda extensão dos braços médio e longo dos cromossomos. Para a montagem do cariótipo, os cromossomos foram separados em dois grupos, A^M e A, seguindo uma ordem decrescente de braço eucromático.

Foi utilizado o programa de análise de imagem (Image-Pro-Plus), acoplado ao microscópio Olympus BX-60, para obter medidas dos cromossomos envolvidos na região organizadora de nucléolo (NOR) e os comprimentos das circunferências dos nucléolos (Ag-NOR positivo) e dos núcleos. Em cromossomos metafásicos, as medidas foram obtidas do comprimento total de cada um dos cromossomos envolvidos na NOR. Um número de 10 pares heteromórficos (cromossomos que apresentaram diferenças no tamanho dos braços heterocromáticos) foram selecionados em cada um dos 10 indivíduos na colônia 582; o mesmo foi feito para a colônia 607, perfazendo um total de 200 pares. Estes dados foram submetidos aos testes F e Tukey.

Para obter medidas dos comprimentos das circunferências de núcleos e nucléolos, foram selecionados 40 núcleos ao acaso (10 núcleos com um, 10 núcleos com dois, 10 núcleos com três e 10 núcleos com quatro nucléolos) em cada um dos 10 indivíduos das colônias 561 e 607, totalizando 800 núcleos analisados. Em seguida, os dados dos núcleos e nucléolos foram submetidos aos testes F e Tukey. Para obter os volumes dos nucléolos e seus respectivos núcleos foram usadas as fórmulas $C=2\pi R$, $R=C/2\pi$, tendo convertido as fórmulas $V=4/3\pi R^3$, $V=4/3\pi (C/2\pi)^3$ em $(V=1/6\pi^2 C^3)$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Coloração convencional e banda C

Neste trabalho, o número cromossômico ($2n$ para fêmeas e n para machos) de *Friesella schrottkyi* foi confirmado em $2n=34$ (Fig.1) e $n=17$ em todas colônias analisadas. TARELHO (1973) analisou duas colônias de *F. schrottkyi* de Ribeirão Preto (SP) e concluiu que o número cromossômico era $n=18$. Contudo, POMPOLO (1992; 1994), analisando uma colônia, também de Ribeirão Preto (S.P), detectou $2n=34$, para fêmeas e $n=17$, para machos. O resultado observado por TARELHO (1973), pode ter sido consequência da fissão cêntrica de um dos cromossomos A^M , originando o número cromossômico de $n=18$.

O padrão de banda C, mostrou que a heterocromatina se localiza no braço curto dos cromossomos acrocêntricos (A) e no braço longo e médio de cromossomos pseudo-acrocêntricos (A^M) (Fig. 1). A fórmula cariotípica (k para machos e $2k$ para fêmeas) para esta espécie foi $2K=18A^M + 16A$.

Muitos autores têm se baseado na teoria da interação mínima (IMAI *et al.* 1986; 1988; 1994) para explicar a evolução cromossômica de diversas espécies de himenópteros, como em formigas (MARIANO, 2000), em vespas (HOSHIBA, 1988; HOSHIBA e IMAI, 1993; ARAÚJO *et al.* 2000), em abelhas (POMPOLO e CAMPOS, 1995; CAIXEIRO, 1999; MOREIRA, 1997; MENEZES, 1997; BRITO, 1998). A constituição morfológica dos cromossomos e a distribuição da heterocromatina em *F. schrottkyi* sugerem que a diferenciação do cariótipo ocorreu devido a fissão cêntrica e adição da heterocromatina em um dos braços.

No complemento diplóide de *F. schrottkyi*, o quinto par (A^M) apresentou um heteromorfismo em relação ao tamanho da heterocromatina (Fig. 1). Foram também observados cariótipos homomórficos, carregando os dois cromossomos menores, mas nunca os dois maiores (Fig. 1). Para identificar o par heteromórfico ou homomórfico, todas as lâminas coradas com Giemsa e banda C/Giemsa foram pré-tratadas por coloração sequencial DA/DAPI/CMA₃. Todas as colônias foram utilizadas para rastrear a presença do heteromorfismo e homomorfismo além do padrão de bandas fornecidas por estes fluorocromos no complemento cromossômico inteiro (Anexo 1). Foram observados na colônia 561, 70% de indivíduos heteromórficos e 30% homomórficos; na colônia 582, 95%

heteromórficos e 5% homomórficos. No genoma haplóide, foi observada a presença tanto de cromossomo maior quanto menor na proporção de 50% (colônia 561).

Em himenópteras a ocorrência de heteromorfismo em relação ao tamanho dos braços heterocromáticos, foi observado em vespas do gênero *Trypoxylon* (GOMES *et al.* 1995, 1997), nas espécies *Trypoxylon (Trypargilum) nitidum* (SCHER, 1996) e *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* (ARAÚJO *et al.* 2000), em abelhas do gênero *Frieseomelitta*, nas espécies *F. varia* e *F. flavicornis* (MOREIRA, 1997) e no gênero *Plebeia*, nas espécies *Plebeia sp1*, *Plebeia sp2*, *Plebeia remota* e *Plebeia droryana* (CAIXEIRO, 1999).

Coloração seqüencial com fluorocromos DA/DAPI/CMA₃

A coloração seqüencial demonstrou que a heterocromatina é preferencialmente DAPI⁺ e CMA₃⁻, exceto no quinto par. Este apresentou uma região CMA₃⁺ e DAPI⁻, que se estendeu da região intersticial à telomérica (Fig. 2).

Essa técnica possibilitou separar as colônias com mais precisão em dois grupos, conforme as médias cromossômicas do quinto par (Tabela 2): grupo I (colônias 366, 480, 561, 582, 583, 604, 605, 617 e 658) com médias "0,3154 e 0,2385" e grupo II (colônia 607) com médias "0,5094 e 0,2634" (Fig.3). O teste F indicou que houve diferença significativa no tamanho entre os pares (F=60,543; P<5%). O teste Tukey discriminou três variantes cromossômicas (um cromossomo pequeno "0,2385", um médio "0,3154 - 0,2634" e um grande "0,5094") (Fig. 3). O grupo I porta os cromossomos "médio e pequeno" e o grupo II porta os cromossomos grande e médio (Fig. 4).

Em *Tetragonisca angustula*, MENEZES (1997) observou que as regiões de banda C⁺ dos cromossomos metafásicos eram predominantemente composta por pares de bases AT (DAPI⁺). Nos gêneros *Melipona* (ROCHA *et al.* 2002), *Partamona* (BRITO, 1998) e *Plebeia* (CAIXEIRO, 1999) foi confirmado o caráter heterogêneo da heterocromatina. Em vespas da espécie *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse*, por outro lado, a heterocromatina foi predominantemente em pares de bases GC (ARAÚJO *et al.* 2000).

Hibridação *in situ* fluorescente (FISH), banda NOR (Ag-NOR) e suas relações com o fluorocromo CMA₃

A técnica de FISH mostrou a existência de um par de cromossomos por genoma diplóide, carreando os genes de rDNA em *F. schrottkyi*. A marcação localizou-se da região intersticial à telomérica do braço heterocromático, no quinto par (Fig. 5).

A impregnação por prata (Ag-NOR) foi observada no quinto par cromossômico, tendo evidenciado diferença no número de "clusters" entre os homólogos do par heteromórfico. No complemento haplóide, a impregnação foi observada em um cromossomo (Fig. 6).

Para confirmar se os sítios de rDNA, identificados pela FISH nos cromossomos de *F. schrottkyi*, se expressam também no núcleo interfásico, foi realizada coloração sequencial FISH/NOR nos núcleos interfásicos. Após esse tratamento foi observada uma correspondência da marcação, portanto, confirmando que todos os "clusters" de genes de rDNA estão sendo expressos no núcleo interfásico (Fig. 7).

A técnica de hibridação *in situ* fluorescente mostrou um resultado similar ao obtido com a técnica de fluorocromo CMA₃ (base específica GC). Esta similaridade foi observada no braço heterocromático na região intersticial a telomérica do quinto par cromossômico. Este resultado indicou que nesta região predominam os pares de base GC, semelhante com a NOR do genoma da maioria dos eucariotos (Reed e Philips, 1995) (*in* LORITE *et al.* 1997). As NORs em *F. schrottkyi* são prata positiva, CMA₃⁺ e DAPI⁻. Esses dados são coincidentes com o padrão de hibridação *in situ* observado também em formiga *Tapinoma nigerrimum* por LORITE *et al.* (1997).

A localização dos principais "clusters" de rDNA, por fluorocromos base-específica GC (CMA₃ ou MM - mitramicina), foi observado também em anfíbios (ALMEIDA-TOLEDO, *et al.* 1989; SCHMID, 1980; SCHMID e GUTTENBACH, 1988), em peixes (CASTRO *et al.* 1996; DEIANA *et al.* 2000; GALETTI *et al.* 1984, 1995; MESTRINER *et al.* 1995; MARTINS e GALETTI Jr., 1998; MARTINEZ-LAGE *et al.* 1994; MARTINS e GALETTI, 1999; SANTOS e SOUZA, 1998b; SCHMID e GUTTENBACH, 1988; UEDA *et al.* 1987), em répteis (SCHMID e GUTTENBACH, 1988), aves (SCHMID e GUTTENBACH, 1988) e em plantas (CERBAH *et al.* 1995; ZOLDO *et al.* 1999). Segundo SUMNER (1990) a riqueza em GC da região organizadora de nucléolo é devido às seqüências de rDNA (18S e 28S), enquanto a região espaçadora se torna mais variável.

No geral, duas explicações têm sido formuladas para explicar a CMA₃⁺ na NOR: a primeira seria que os genes de rDNA são intercalados com seqüências altamente repetidas da heterocromatina ricas em GC associadas com a NOR e a segunda seria que o próprio complexo rDNA são por si mesmos constituídos destas seqüências repetidas (PENDÁS *et al.* 1993) (Pardue *et al.* 1973) (*in* ZOLDOS *et al.* 1999).

Ao contrário, em mamíferos como ratos, camundongos e gorilas (SCHMID e GUTTENBACH, 1988) e em peixes como esturjão (FONTANA 1994), a NOR não mostra fluorescência positiva com CMA₃. A falta desta fluorescência, observada em mamíferos, tem sido atribuída a poucas seqüências genômicas ricas em GC no DNA ribossomal (SCHMID e GUTTENBACH, 1988). Talvez o tamanho total dos “clusters” de rDNA na NOR é um fator decisivo na estabilidade do fluorocromo. A fração do genoma que codifica para rRNA em mamíferos é conhecido ser a menor entre os eucariotos (Sinclair e Brown, 1971; *in* SCHMID e GUTTENBACH, 1988). UEDA *et al.* (1987) estudando cromossomos de cervos utilizaram enzima de restrição Hae III, para remover DNA rico em pares de base GC. A fluorescência foi reduzida em cada NOR, estando de acordo com o fato de que os genes de rDNA são ricos em pares de bases GC.

Essas regiões de NORs fortemente fluorescentes não se estendem dentro da região adjacente (SCHMID, 1980, 1982). Em *F. schrottkyi* os segmentos cromossômicos adjacentes a NORs são constitutivamente heterocromáticos em todos indivíduos analisados (Fig. 8), em conformidade com os dados obtidos em anfíbios (SCHMID, 1982; SCHMID 1978a; SCHMID 1978b), peixes (GALETTI *et al.* 1991).

De acordo com HSU *et al.* (1975), muitos citologistas já acreditavam que na maioria das espécies a NOR estava sempre localizada dentro do segmento da heterocromatina. Em *F. schrottkyi*, análises de FISH, CMA₃ e banda C mostraram que genes de rDNA estão associados à heterocromatina no quinto par e foram sempre banda C⁺ (Fig. 8). Este resultado está de acordo com o observado em vespa *Trypoxylon albitarse* (ARAÚJO, 2002), em anfíbios (SCHMID, 1978a; 1978b), em moluscos (MARTÍNEZ-EXPÓSITO *et al.* 1997) e em plantas *Hypochaeris* (CERBAH *et al.* 1998). Tem sido sugerido que genes ou famílias de genes associados com seqüências de DNA altamente repetidas, estão sujeitos a um aumento em número de cópias pela freqüência de trocas desiguais em relação às seqüências simples repetidas (FUJIWARA *et al.* 1998; ZOLDO *et al.* 1999). É possível que estes blocos de heterocromatina restrinjam a recombinação dentro da NOR por prevenir a formação de quiasmas ou forçando quiasmas a serem formados em outras regiões. Este segmento heterocromático teria genes que regulam a expressão da NOR (KING *et al.* 1990); induzem rearranjos, deleções espontâneas, duplicações ou trocas desiguais de cromátides irmãs (KOEHER *et al.* 1997; MANTOVANI *et al.* 2000).

A diferença de tamanho da NOR que se observa entre os cromossomos homólogos é um evento comum na maioria dos vertebrados, como em anfíbios (BUSIN *et al.* 2001; KING *et al.* 1990; LOURENÇO *et al.* 2000; LOURENÇO *et al.* 1998; SCHMID, 1978a; SCHMID, 1978b), em peixes (FORESTI *et al.* 1981; GALETTI *et al.* 1984; MESTRINER *et al.* 1995; WASKO e GALETTI, 2000; MARTINS e GALETTI, 1999; ROSSI *et al.* 1996; TAKAI e OJIMA, 1992; DEIANA *et al.* 2000; FONTANA *et al.* 1996), em invertebrados como moluscos (INSUA e THIRIOT-QUIÉVREUX, 1991) e em insetos (MANDRIOLI *et al.* 1999). Esse heteromorfismo tem sido explicado pela ocorrência de duplicação ou triplicação "em tandem" das seqüências de rDNA, "crossing-over" desigual de cromátides irmãs, incluindo deleções (SCHMID, 1982; FORESTI *et al.* 1981; GALETTI *et al.* 1995; JANKUN *et al.* 1998).

SCHMID (1982) observou em anuros, duplicações e triplicações em uma das NORs em ambos os sexos, por essa razão, indivíduos homomórficos com as duas NORs maiores seriam esperados entre os indivíduos analisados. Entretanto estes indivíduos não foram encontrados. A possível explicação é que presença de cromossomos homomórficos com duas NORs maiores seria uma condição letal, e isto comandaria distúrbio desenvolvimental na embriogênese. Deste modo, é comum em anfíbios indivíduos heteromórficos e homomórficos com as duas NORs menores. Em *Trypoxylon albitarse* ARAÚJO *et al.* (2002) não observaram a variante cromossômica de pouca quantidade de genes de rDNA em machos e em fêmeas na forma homomórfica. Foi sugerido um limiar sobre o qual o número de genes não seria suficiente para satisfazer as necessidades em rRNA para célula. Em abelha sem ferrão *F. schrottkyi*, estudada no presente trabalho, a ausência do par homomórfico com as duas NORs maiores, provavelmente acarretaria consequências deletérias para os organismos.

Na Tribo Meliponini, além de *F. schrottkyi* ($2n=34$) com um par de NOR, foi observado essa condição também nos gêneros *Melipona* ($2n=18$) (MAFFEI *et al.* 2001; ROCHA *et al.* 2002) e *Plebeia* ($2n=34$) (MAFFEI *et al.* 2001). Quatro cromossomos com NOR foi verificado no gênero *Tetragonista* ($2n=34$) (MENEZES, 1997). O cariótipo com um par de NOR é considerado ancestral em relação aos que apresentam NORs distribuídas em diversos cromossomos. Admite-se que a NOR, por meio das translocações e inversões, teria sido transferida para outros cromossomos como pacotes completos e não como múltiplas pequenas unidades distribuídas através do genoma

(SCHMID 1978a, HSU *et al.* 1975). Contudo, não é conhecida nenhuma vantagem seletiva das múltiplas NORs para a sobrevivência da espécie (HSU *et al.* 1975).

O cariótipo de *Acipenser naccarii* apresentou $2n=188\pm4$ e a localização dos genes de rDNA, observado pela técnica de hibridação *in situ* 28S, produziu um sinal intercalado no telômero, estendendo-se de 10 para 12 cromossomos (FONTANA *et al.* 1999). Dados de cinco espécies de formigas do gênero *Myrmecia*, com $2n=3, 8, 10, 18$ e 27 , mostraram uma correlação positiva entre aumento do número de cromossomos e números de genes de rDNA (de 2 para 10) (HIRAI *et al.* 1994;1996). Este aumento estaria relacionado com o evento de rearranjos ocorridos em cromossomos portadores de genes de rDNA e que, portanto, a evolução do cariótipo, com base no número de genes rDNA por cromossomos estaria de acordo com a teoria da interação mínima. Porém, estes mesmos autores discutem que nem sempre ocorre essa correlação. O cromossomo que originalmente carrega genes de rDNA pode não sofrer rearranjos cromossômicos (HIRAI *et al.* 1994). O direcionamento reverso, envolvendo redução em número de cromossomos carregando genes de rDNA durante a evolução, é teoricamente possível, como resultado de combinação de fusão cêntrica e inversões (HIRAI *et al.* 1994).

Em *F. schrottkyi*, a localização dos genes para rDNA (18S, 5.8S e 28S) da região intersticial à telomérica em um par de cromossomos (morfologia pseudo-acrocêntrico) por conjunto diplóide e a presença de heterocromatina adjacente, indicam que esse cromossomo portador sofreu rearranjos do tipo fissão e que portanto está de acordo com a teoria da interação mínima proposta por IMAI *et al.* (1986, 1988, 1994).

Número de nucléolos por núcleo e sua relação com a ploidia.

A técnica de Ag-NOR foi efetiva na localização cromossômica da NOR ativa e foi aplicada com êxito na quantificação da atividade nucleolar em núcleos interfásicos de fêmeas, devido à variação no tamanho do braço cromossômico. Em núcleos interfásicos de fêmeas foram observadas variações de um a quatro nucléolos por núcleo (Fig. 9). Foi necessário testar se a variação do número de nucléolos por núcleo apresentava a mesma atividade nucleolar. Para isto, as colônias foram separadas em dois grupos com base nas diferenças nos "clusters" dos genes de rDNA. A atividade da região organizadora do nucléolo seria maior no grupo II por apresentar um cromossomo com mais de dois

"clusteres" e outro com dois, em relação ao grupo I que apresentou um cromossomo com dois "clusteres" e outro com um. Para testar essa hipótese, foram medidos os comprimentos das circunferências dos núcleos e nucléolos interfásicos de *F. schrottkyi* dos dois grupos de cromossomos. No grupo I, o volume dos nucléolos em núcleos com um, dois, três e quatro nucléolos foi $F=174,3249$; $P<5\%$ e dos núcleos foi de $F=22,2755$; $P<5\%$. O teste F mostrou que houve diferença significativa entre os volumes de um, dois, três e quatro nucléolos. O teste Tukey permitiu discriminar que o volume de $1<2<3<4$. Os volumes dos núcleos foram semelhantes quando os mesmos apresentavam 1 ou 2 e 3 ou 4 nucléolos ($1=2$ e $3=4$) (Fig. 10).

No grupo II, o volume dos nucléolos em núcleos com um, dois, três e quatro nucléolos foi $F=121,0923$; $P<5\%$ e dos núcleos foi de $F=62,2669$; $P<5\%$. O teste F mostrou que houve diferença significativa entre os volumes de um, dois, três e quatro nucléolos. O teste Tukey permitiu discriminar que o volume de $1<2<3<4$. Os volumes dos núcleos foram semelhantes quando os mesmos apresentavam 1 ou 2 e 3 ou 4 nucléolos ($1=2$ e $3=4$) (Fig. 10).

Comparando a atividade nucleolar dos dois grupos, independente do número de nucléolos, foi $F=0,0268$; $P>5\%$ e núcleos $F=1,7837$; $P>5\%$. O teste F mostrou que não existe diferença significativa entre a atividade nucleolar dos nucléolos e núcleos nos dois grupos (Fig. 11). Do mesmo modo, não existe diferença entre os núcleos nos dois grupos. O resultado tem mostrado que a atividade nucleolar é similar em ambos os grupos (Tabelas 3), apesar das diferenças de número de "clusteres" de rDNA. A ausência de diferença significativa na atividade nucleolar, entre os dois grupos em fêmeas, sugere um controle na atividade dos genes de rDNA.

Quando o genoma contém somente um par de NOR, o número máximo esperado de nucléolos em célula diplóide é dois. De qualquer modo, o número máximo de nucléolos não excederia ao número máximo de NORs presentes no genoma (HSU *et al.* 1975). Em células humanas, o número máximo de nucléolos seria de 10, entretanto, este número raramente é alcançado. Em células diferenciadas, que perderam a capacidade de retornar ao ciclo celular, tal como neurônios e células de Sertoli, o aspecto de um nucléolo por núcleo é predominante, igualmente em organismos contendo múltiplas NORs como em humanos e ratos (HSU *et al.* 1975). Aparentemente existe uma especificidade de orientação entre os cromossomos na intérfase, o qual permite a convergência de todas as NORs para localização centralizada em células altamente diferenciadas, enquanto a

dispersão de NORs prevalece em células menos diferenciadas (HSU *et al.* 1975). Diferença considerável em tamanho e número de nucléolos em diferentes células indica que NORs ativas têm se fundido para participar na formação de um único nucléolo ou para formação de um número reduzido de nucléolos (CERBAH *et al.* 1998; SCHMID e GUTTENBACH, 1988; SCHWARZACHER e WACHTLER, 1983; CHENG *et al.* 1995; SCHMID, 1982).

Vários trabalhos sugerem que a poliploidização ocorre em células somáticas de abelha *Apis mellifera* (MITTWOCH *et al.* 1966; WOYKE e KROL-PALUCH, 1985). Estudos em núcleos de zangões jovens e larvas de operárias mostraram considerável grau de poliploidia, mas a maior parte das células que estava se dividindo era haplóide em macho e diplóide em fêmeas. Estes resultados mostraram que uma grande proporção de células que não se dividem em zangões jovens e larvas de operárias de *Apis mellifera* se tornam poliplóides logo que emergem do ovo. O núcleo se torna poliplóide derivado do processo que envolve sucessivas duplicações de cromossomos na ausência da divisão celular (MITTWOCH *et al.* 1966).

Em *F. schrottkyi*, por apresentar dois cromossomos que carregam a NOR, o número máximo de nucléolos esperados por núcleo diplóide é dois. Os resultados dos testes demonstraram que a variação em número de um a quatro nucléolos nos núcleos interfásicos, pode ser considerada como resultado de células em níveis de ploidias diferentes no gânglio cerebral.

Dados obtidos neste trabalho oferecem as primeiras investigações dos processos que têm dado lugar à evolução cromossômica desta espécie, o que é de grande importância na continuação do estudo da evolução do genoma da tribo Meliponini. Além disso, este estudo dá um exemplo da função desempenhada pela fissão cêntrica na evolução e organização do genoma.

Tabelas

Tabela 1. Número de colônias, local de coleta e número de indivíduos de *Friesella schrottkyi* analisados citogeneticamente.

Colônia	Local de coleta	Fêmeas/machos
366	Viçosa (MG)	23
480	Anchieta (ES)	48/2
582	Viçosa (MG)	54
583	Viçosa (MG)	53
561	Viçosa (MG)	63/5
604	Paula Cândido (MG)	43/2
605	Paula Cândido (MG)	40/2
607	Guaraciaba (MG)	47
617	Guaraciaba (MG)	44
658	Viçosa (MG)	51/11

Tabela 2. Colônias de *F. schrottkyi* separadas em dois grupos, de acordo com o comprimento médio do par cinco heteromórfico (unidade arbitrária).

Grupos	Colônias	cromossomo maior	cromossomo menor	Morfologia do cromossomo maior	Morfologia do cromossomo menor
I	366, 480, 561, 582, 583, 658, 604, 605 e 617	0,3156	0,2385	A ^M	A ^M
II	607	0,5094	0,2634	A ^M	A ^M

Tabela 3 Comparação dos volumes de nucléolos e núcleos dos grupos I e II independente do número de nucléolos (unidade arbitrária).

Grupo	Volume médio dos nucléolos	Volume médio dos núcleos
I	138,070	830,283
II	139,595	989,671

LEGENDAS DAS FIGURAS

Figura 1. a) Cariograma de cromossomos mitóticos metafásicos de fêmea de *F. schrottkyi* ($2n=34$) submetidos a coloração com Giemsa, pré-corados com fluorocromos DA/DAPI/CMA₃ evidenciando o heteromorfismo no quinto par (colônia 582). b) O quinto par homomórfico (colônia 561). c) Cariograma de cromossomos mitóticos metafásicos de fêmea submetido a banda-C mostrando heteromorfismo no quinto par (colônia 582). (A^M): cromossomos de morfologia pseudo-acrocêntrica. (A): cromossomos de morfologia acrocêntrica.

Figura 2. Metáfase mitótica de macho de *F. schrottkyi* (colônia 658) submetida à coloração seqüencial DA/DAPI/CMA₃. a) CMA₃. A seta indica a região CMA₃⁺. b) DAPI. Os braços heterocromáticos são DAPI⁺ exceto a região do cromossomo indicada pela seta (DAPI⁻).

Figura 3. Comprimento médio dos cromossomos do grupo I (cromossomos 1 e 2) e grupo II (cromossomos 3 e 4).

Figura 4. Colônias de *F. schrottkyi* separadas em grupos de acordo as médias do par heteromórfico, após submetidas a coloração seqüencial DA/DAPI/CMA₃. a) grupo I (colônia 582). b) grupo II (colônia 607). No esquema do cariograma, a região branca indica eucromatina; cinza indica Banda-C⁺/CMA₃⁻, preto indica CMA₃⁺.

Figura 5. Metáfases mitóticas de *F. schrottkyi* submetidas à hibridação *in situ* fluorescente (FISH). a) Fêmea, setas indicam marcações FISH⁺ do par heteromórfico (colônia 561). b) Macho, seta indica marcação FISH⁺ em um cromossomo (colônia 658).

Figura 6. *F. schrottkyi* (colônia 561). a) Metáfase mitótica de macho submetida à técnica Ag-NOR. Seta indica NOR⁺. b) Par heteromórfico com NOR⁺.

Figura 7. Núcleos interfásicos de *F. schrottkyi* (colônia 561) submetidos a: a) FISH e b) Ag-NOR.

Figura 8. Representação do par número cinco de *F. schrottkyi*. a) banda C⁺ (colônia 582), b) CMA₃⁺ (colônia 561), c) FISH⁺ (colônia 561). No esquema do cariograma, a região branca indica eucromatina exceto na região do centrômero; cinza indica Banda C, preta indica CMA₃⁺ e FISH⁺.

Figura 9. Variação em número de nucléolos em núcleos de fêmea de *F. schrottkyi* submetidos a Ag-NOR (colônia 582).

Figura 10. Diferenças dos volumes nucleolar e nuclear de *F. schrottkyi* dos grupo I e II. (Volume nucleolar I, volume nuclear I) e grupo II (volume nucleolar II e volume nuclear II). d1= volume de um nucléolo do grupo I. c1=volume de dois nucléolos do grupo I. b1= volume de três nucléolos do grupo I. a1= volume de quatro nucléolos do grupo I. B1=volume dos núcleos com um e dois nucléolos do grupo I. A1=volume dos núcleos com três e quatro nucléolos do grupo I. d2= volume de um nucléolo do grupo II. c2=volume de dois nucléolos do grupo II. b2= volume de três nucléolos do grupo II. a2= volume de quatro nucléolos do grupo II. B2=volume dos núcleos com um e dois nucléolos do grupo II. A2=volume dos núcleos com três e quatro nucléolos do grupo II. Colunas com letras iguais não apresentam diferença significativa.

Figura 11. Comparação dos volumes nucleolar e nuclear dos grupos I e II.

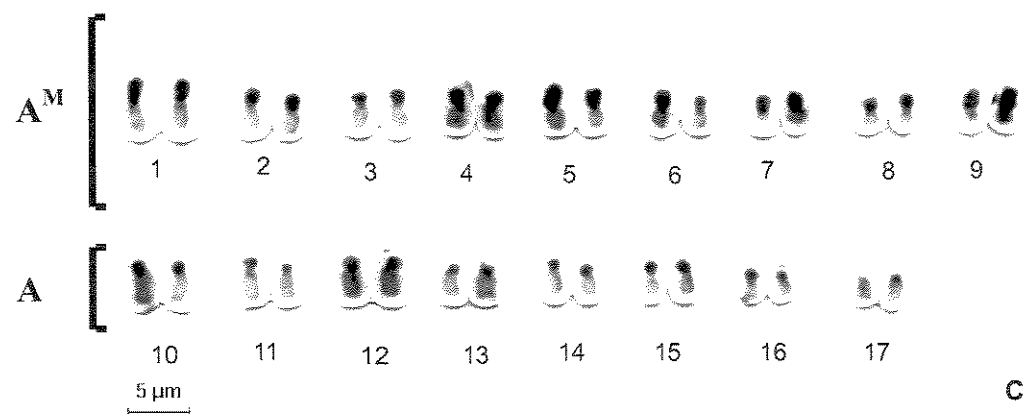
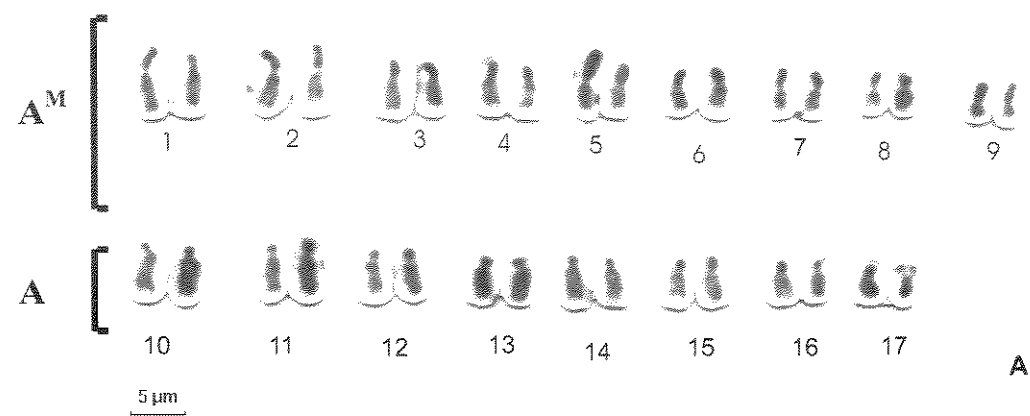


Fig.1

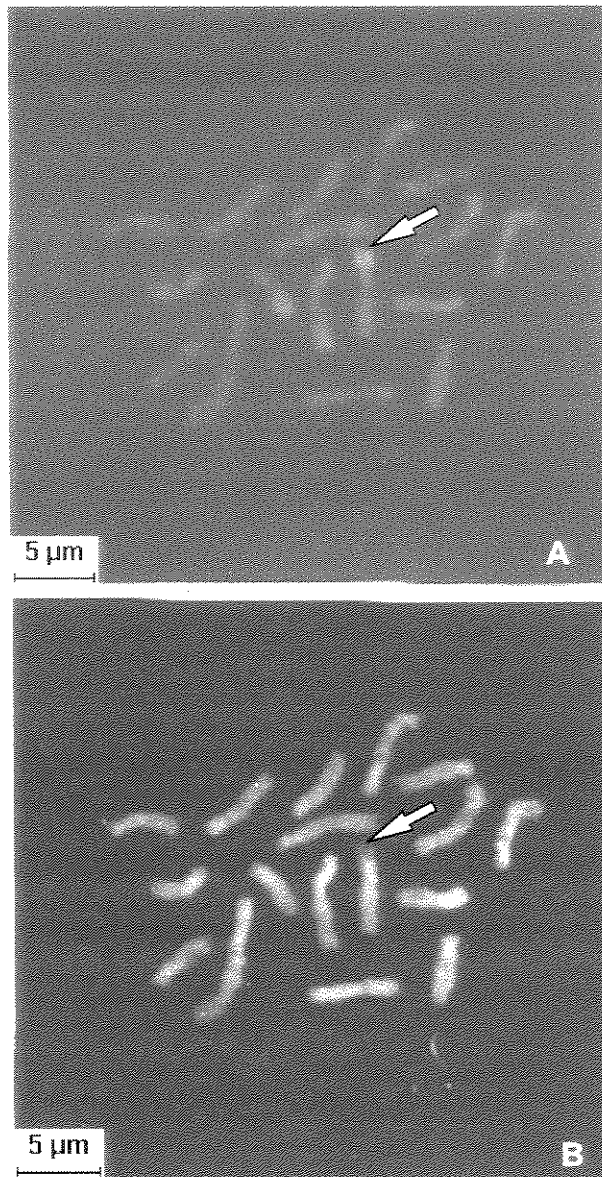


Fig.2

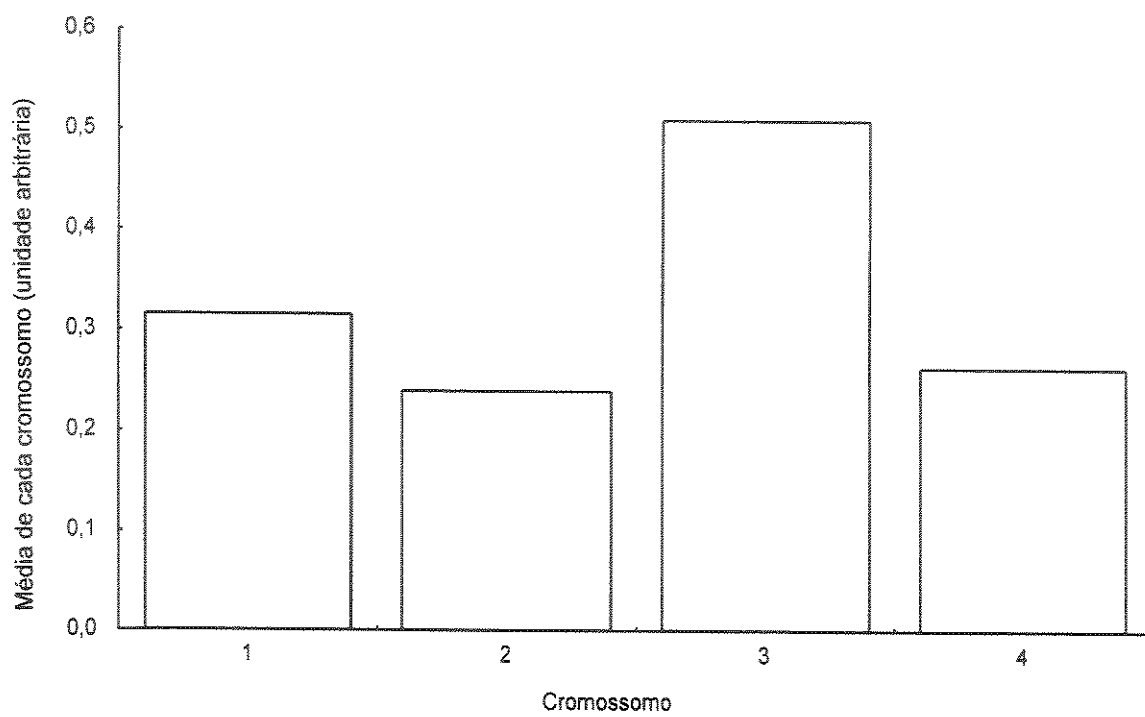


Fig. 3

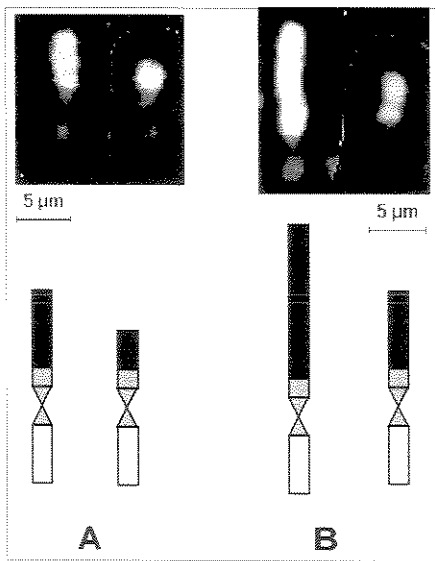


Fig. 4

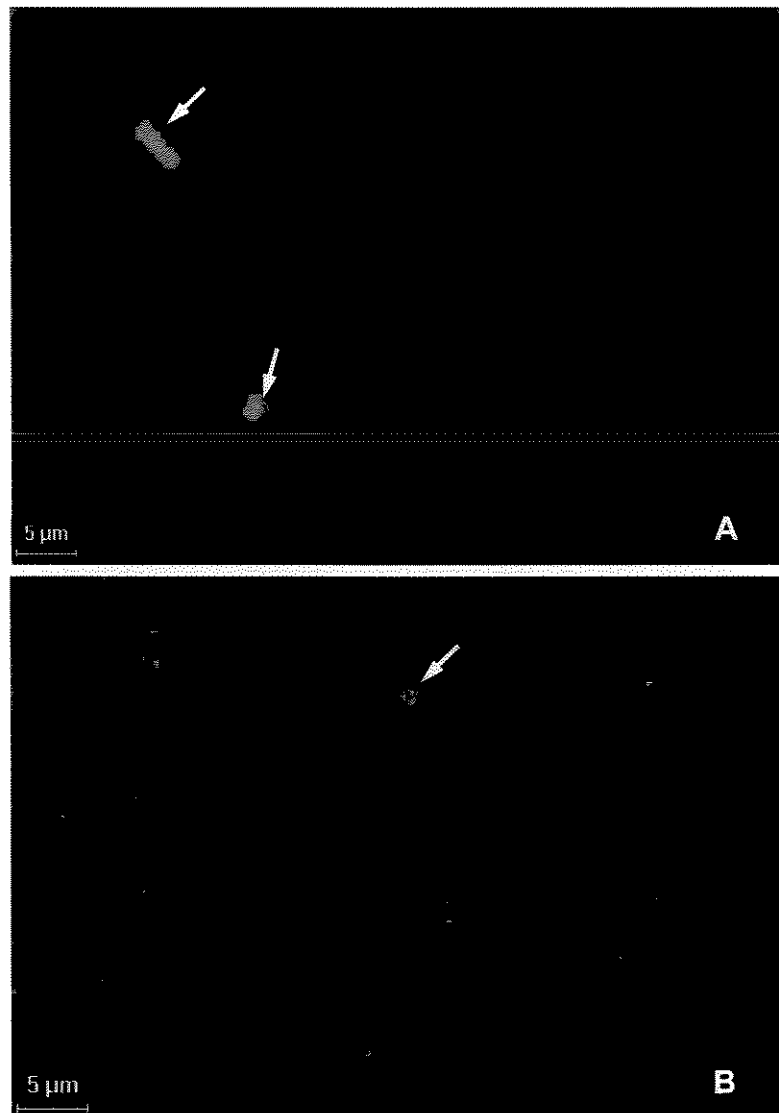


Fig. 5

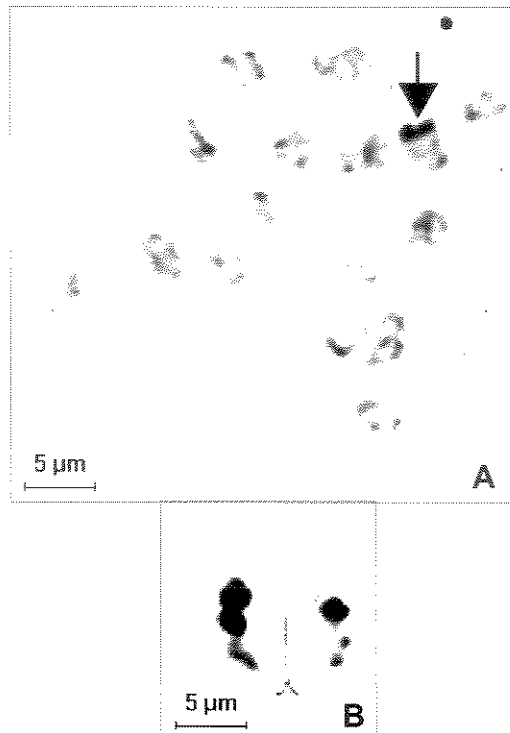


Fig. 6

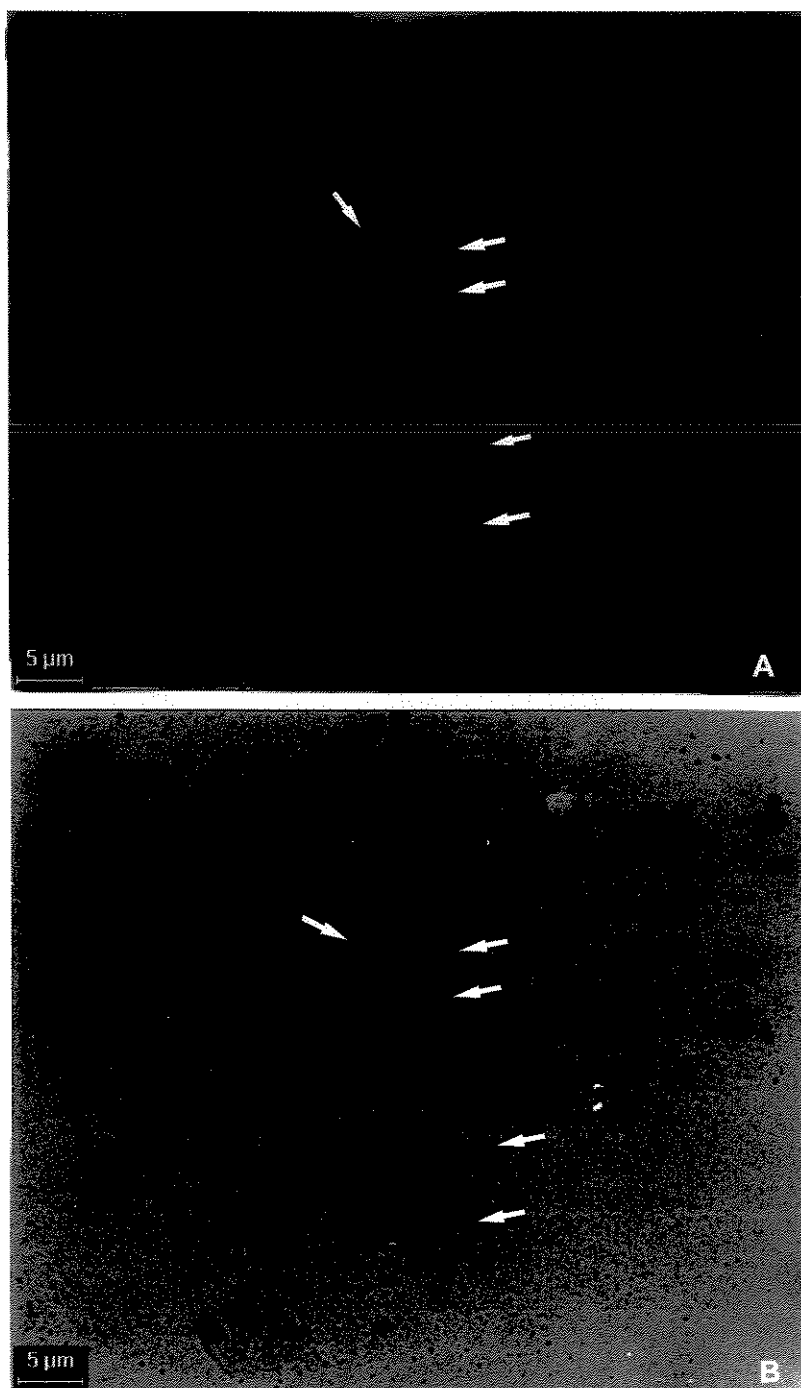


Fig. 7

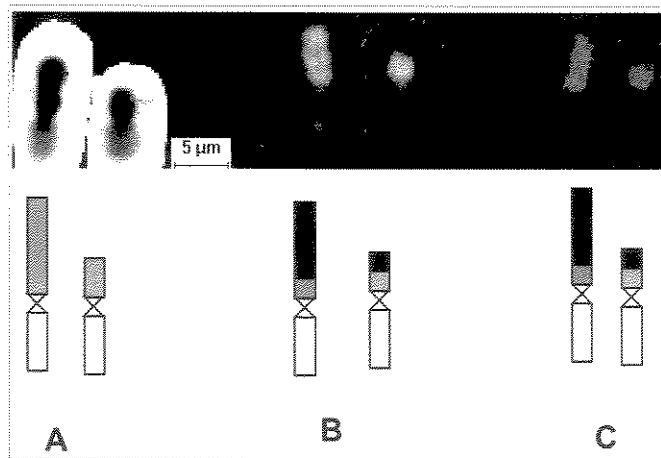


Fig. 8

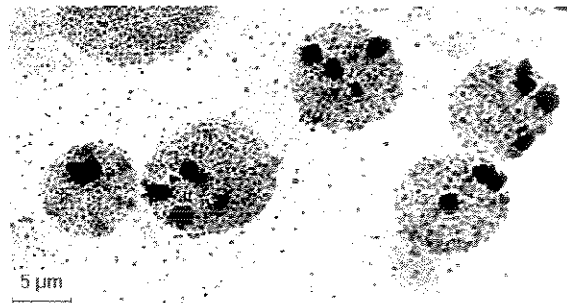


Fig. 9

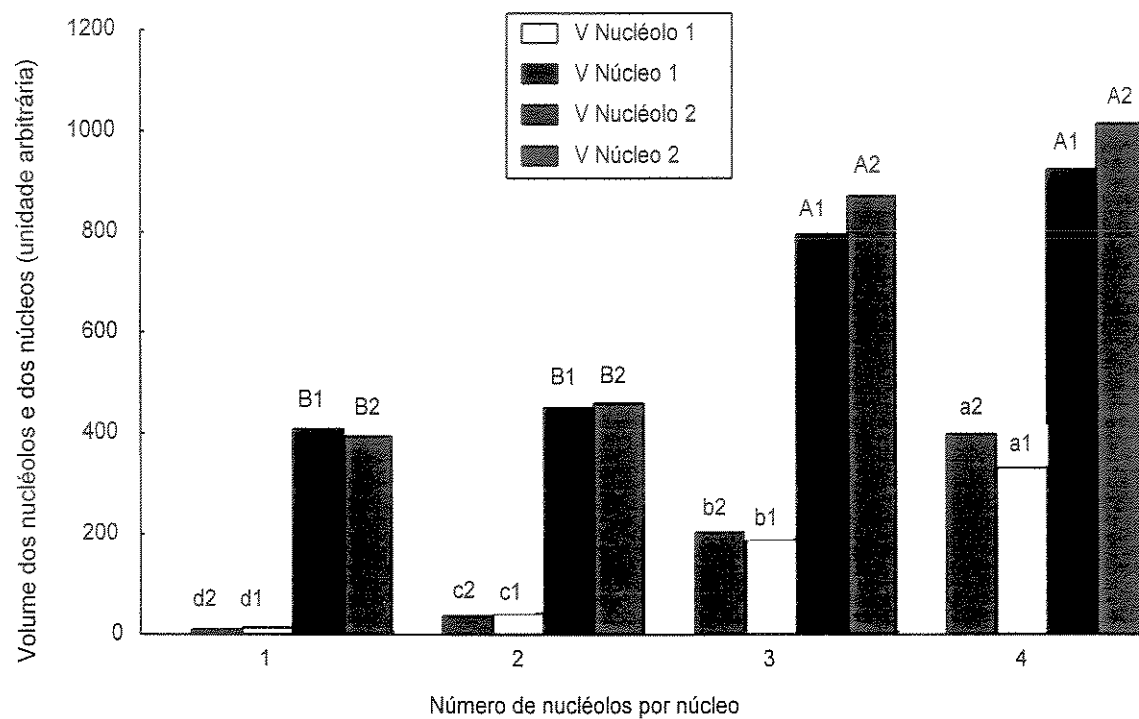


Fig.10

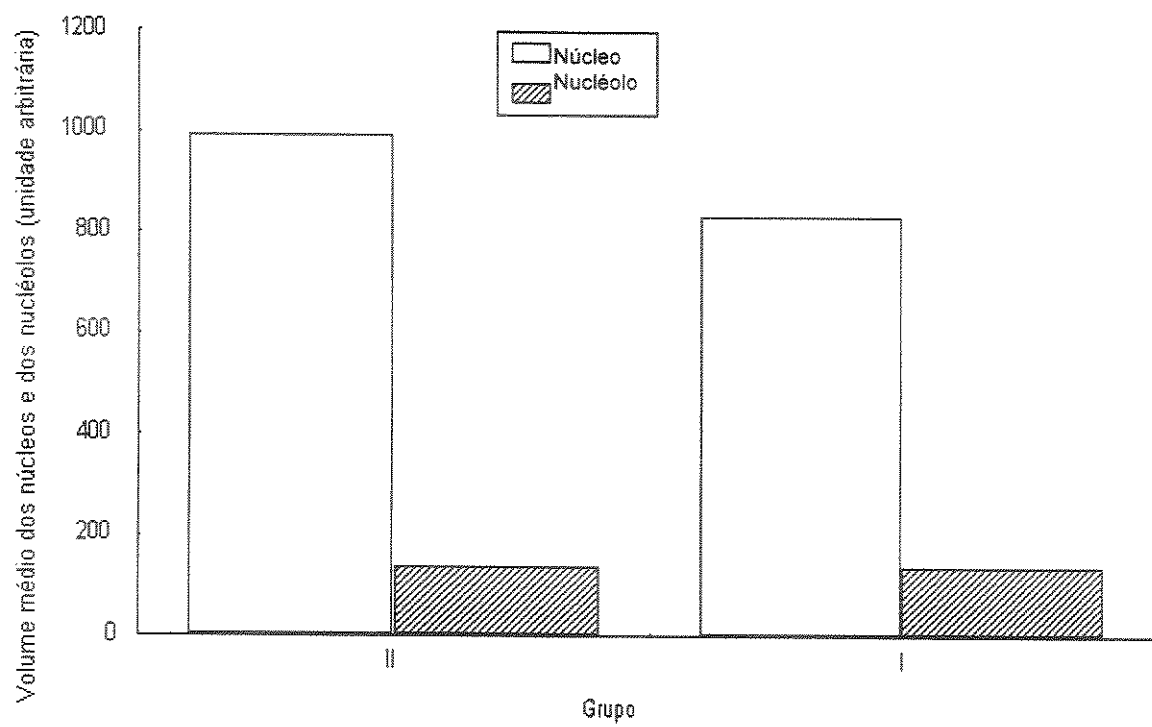


Fig.11

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA-TOLEDO, L. F., STOCKER, A. J., FORESTI, F. & TOLEDO-FILHO, S. A. (1989). Fluorescence *in situ* hybridization with DNA probes on chromosomes of two nucleolus organizer region phenotypes of a species of *Eigenmannia* (Pisces, Gymnotoidei, Sternopygidae). *Chrom. Res.*, 4: 301-305.
- ARAÚJO, 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, M. S. R. (2002). Contribuição à citogenética de *Trypoxylon* (*trypargilum*) *albitarse* FABRICIUS, 1804 (HYMENOPTERA, SPHECIDAE): I. Dinâmica dos cromossomos B. II. Estudo da NOR e nucléolos. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural) Universidade Estadual de Campinas.
- BRITO, R. M. (1998). Caracterização citogenética de duas espécies do gênero *Partamona* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) Universidade Federal de Viçosa.
- BRITO, R. M., COSTA, M. A. & POMPOLO, S. G. (1997). Characterization and distribution of supernumerary chromosomes in 23 colonies of *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Brazil. J. Genet.*, 20: 185-188.
- BRITO-RIBON, R. M., MIYAZAWA, C. S. & POMPOLO, S. G. (1999). First karyotype characterization of four species of *Partamona* (Friese, 1980) (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) in Mato Grosso State, Brasil. *Cytobios*, 100: 19-26.
- BUSIN, C. S., VINCIPROVA, G. & RECCO-PIMENTEL, S. M. (2001). Chromosomal rearrangements as the source of variation in the number of chromosomes in *Pseudis* (Amphibia, Anura). *Genetica*, 110: 131-141.
- CAIXEIRO, A. P. A. (1999). Caracterização citogenética da heterocromatina constitutiva e sua implicação na evolução do cariótipo de espécies do gênero *Plebeia* (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) Universidade Federal de Viçosa.
- CAMARGO, M. F. (1989). Comentários sobre a sistemática de Meliponinae (HYMENOPTERA, APIDAE). In: Simpósio anual da ACIESP. Anais. Ribeirão Preto, S P, 68: 41-61:

- CASTRO, J., VIÑAS, A. SÁNCHEZ, L. & MARTÍNEZ, P. (1996). Characterization of an atypical NOR site polymorphism in brown trout (*Salmo trutta*) with Ag-and CMA₃-staining, and fluorescent *in situ* hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.*, 75: 234-239.
- CERBAH, M., COULAUD, J., GODELLE, B. & SILJAK-YAKOVLEV, S. (1995). Genome size, fluorochrome banding, and karyotype evolution in some *Hypochoeris* species. *Genome*, 38: 689-695.
- CERBAH, M., COULAUD, J. & SILJAK-YAKOVLEV, S. (1998). rDNA organization and evolutionary relationships in the genus *Hypochoeris* (Asteraceae). *Jour. Hered.*, 89: 312-318.
- CHENG, B. F., HENEEN, W. K. & PEDERSEN, C. (1995). Ribosomal RNA gene loci and their nucleolar activity in *Brassica alboglabra* Bailey. *Hereditas*, 123: 169-173.
- COSTA, M. A., POMPOLO, S. G. & CAMPOS, L. A. O. (1992). Supernumerary chromosomes in *Partamona cupira* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Rev. Brasil. Genet.*, 15: 801-806.
- CRUZ-LANDIM, C. (1984). Haplo-diploidia em Hymenoptera. *Rev. Brasil. Genet.*, VII: 433-449.
- CRUZ-LANDIM, C. & BEIG, D. (1980). Meiose nos Hymenoptera. *Ci. e Cult.* 33: 937-966
- DEIANA, A. M., CAU, A. SALVADORI, S. COLUCCIA, E. CANNAS, R., MILIA, A. & TAGLIAVINI, J. (2000). Major and 5S ribosomal sequences of the larges mouth bass *Micropterus salmoides* (Perciforme, Centrarchidae) are localized in GC-rich regions of the genome. *Chrom. Res.*, 8: 213-218.
- FONTANA, F. (1994). Chromosomal nucleolar organizer regions in four sturgeon species as marker of karyotype evolution in Acipenseriformes (Pisces). *Genome*, 37: 888- 892.
- FONTANA, F. LANFREDI, M. ROSSI, R.; BRONZI, P. & ARLATI, G. (1996). Karyotypic characterization of *Acipenser gueldenstaedti* with C- AgNO₃, and fluorescence banding techniques. *Ital. j. Zool.*, 63: 113-118.
- FONTANA, F., LANFREDI, M., CHICCA, M., CONGIU, L., TAGLIAVINI, J. & ROSSI, R. (1999). Fluorescent in situ hybridization with rDNA probes on chromosomes of *Acipenser ruthenus* and *Acipenser naccarii* (Osteichthyes Acipenseriformes). *Genome*, 42: 1008-1012.
- FORESTI, F., TOLEDO, A. L. F. & TOLEDO-F, S. A. (1981). Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. *Cytogenet. Cell. Genet.*, 31: 137-144.

- FUJIWARA, A., ABE, S., YAMAHA, E., YAMAZAKI, F. & YOSHIDA, M. C. (1998). Chromosomal localization and heterochromatin association of ribosomal RNA gene loci and silver-stained nucleolar organizer region in salmonid fishes. *Chrom. Res.*, 6: 463-471.
- GALETTI JR., FORESTI, F.; P. M BERTOLLO, L. A. C & FILHO, O. M. (1984). Characterization of eighth species of Anostomidae (Cypriniformes) fish in the basis of the nucleolar organizing region. *Caryologia*, 37: 401-406.
- GALETTI JR., P. M.; MESTRINER, C. A; MONACO, P. J. & RASCH, E. M. (1995). Post-zigotic modifications and intra- and inter-individual nuclear organizing regions variations in fish: report of a case involving *Leporinus friderici*. *Chrom. Res.*, 3: 285-290.
- GALETTI JR., P.M; CESAR, A. C. G & VENERE, P. C. (1991). Heterochromatin and NORs variability in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Caryologia*, 44: 287-292.
- GOMES, L. F., POMPOLO, S. G. & CAMPOS, L. A. O. (1995). Cytogenetic analysis of three species of *Trypoxylon* (Hymenoptera, Sphecidae, Larrinae). *Rev. Brasil. Genet.*, 18: 173-176.
- GOMES, L. F., POMPOLO, S. G. & CAMPOS, L. A. O. (1997). Karyotype evolution in wasps of the genus *Trypoxylon* (subgenus *Trypargilum*) (Hymenoptera, Sphecidae). *Brazil. J. Genetics*, 20: 177-183.
- HIRAI, H., YAMAMOTO, M., OGURA, K., SATTA, Y., YAMADA, M. & TAYLOR, R. W. (1994). Multiplication of 28S rDNA and NOR activity in chromosome evolution among ants of the *Myrmecia pilosula* species complex. *Chromosoma*, 103: 171-178.
- HIRAI, H., YAMAMOTO, M., TAYLOR, R.W. & IMAI, H. T. (1996). Genomic dispersion of 28S rDNA during karyotypic evolution in the ant genus *Myrmecia* (Formicidae). *Chromosoma*, 105: 190-196.
- HOSHIBA, H. (1988). Karyological analysis of a stingless bee, *Melipona favosa* (Apidae, Hymenoptera). *Cytologia*, 53: 153-156.
- HOSHIBA, H. & IMAI, H. T. (1993). Chromosome evolution of bees and wasps (Hymenoptera, Apocrita) on basis of C-banding pattern analyses. *Jpn. J. Ent.*, 61: 465-492

- HOWELL, W. M. (1977). Visualization of ribosomal gene activity: silver stains proteins associated with rRNA transcribed from oocyte chromosomes. *Chromosoma*, 62: 361-367.
- HOWELL, W. M. & BLACK, D. A. (1980). Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, 36: 1014-1015.
- HSU, T. C., SPIRITO, S. E. & PARDUE, M. L. (1975). Distribution of 18+28S ribosomal genes in mammalian genomes. *Chromosoma*, 53: 25-36.
- IMAI, H. T., MARUYMA, T., GOJOBORI, T., INOUE, Y. & CROZIER, R. H. (1986). Theoretical bases for karyotype evolution. 1 The minimum-interaction hypothesis. *Am. Nat.*, 128: 900-920.
- 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., TAYLOR, R. W. & CROZIER, R. H. (1988). Modes of spontaneous chromosomal mutation and karyotype evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis. *Jpn. J. Genet.*, 63: 159-155.
- IMAI, H. T., TAYLOR, R. W. & CROZIER, R. H. (1994). Experimental bases for the minimum interaction theory. I. Chromosome evolution in ants of the *Myrmecia pilosula* species complex (Hymenoptera: Formicidae: Myrmecinae). *Jpn. J. Genet.*, 69: 137-182.
- INSUA, A. & THIRIOT-QUIÉVREUX, C. (1991). The characterization of *Ostrea denselamellosa* (Mollusca, Bivalvia) chromosomes: karyotype, constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions. *Aquaculture*, 9: 317-325.
- JANKUN, M., OCALEWICZ, K. & WOZNICKI, P. (1998). Replication, C- and fluorescent chromosome banding patterns in European whitefish, *Coregonus lavaretus* L. *Hereditas*, 128: 195-199.
- KERR, W. E. (1948). Estudos sobre o gênero *Melipona*. *Ann. Esc. Agr. "Luiz de Queiroz"* 5: 181-276.
- KERR, W. E. (1952). A variação do número de cromossomos na evolução dos Hymenoptera. *Sci. Genet.*, 4: 182-190.
- KERR, W. E. (1969). Some aspects of the evolution of social bees (Apidae). *Evol. Biol.*, 3: 119-175.

- KERR, W. E. (1972). Numbers of chromosomes in some species of bees. *J. Kans. Entomol. Soc.*, 45: 111-122.
- KERR, W. E. & SILVEIRA, Z. V. (1972). Karyotypic evolution and corresponding taxonomic implications. *Evolution*, 26: 197-212.
- KING, M., CONTRERAS, N. & HONEYCUTT, R. L. (1990). Variation within and between nucleolar organizer regions in Australian hylid frogs (Anura) shown by 18S+28S *in situ* hybridization. *Genetica*, 80: 17-29.
- KOEHLER, M. R., DEHM, D., GUTTENBACH, M., NANDA, I., HAAF, T., MOLINA, W. F., GALETTI Jr, P. M. & SCHMID, M. (1997). Cytogenetics of genus *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). 1. Karyotype analysis, heterochromatin distribution and sex chromosomes. *Chrom. Res.*, 5: 12-22.
- 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.
- LOURENÇO, L. B.; GARCIA, P. C. A. & RECCO-PIMENTEL, S. M. (2000). Cytogenetics of two species of *Paratelmatobius* (Anura, Leptodactylidae), with phylogenetic comments. *Hereditas*, 133: 201-209.
- LOURENÇO, L. B., RECCO-PIMENTEL, S. M. & CARDOSO, A. J. (1998). Polymorphism of the nucleolus organizer regions (NORs) in *Physalaemus petersi* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) detected by silver staining and fluorescence *in situ* hybridization. *Chrom. Res.*, 6: 621-628.
- MAFFEI, E. D., POMPOLO, S. G., SILVA-JUNIOR, J. C., CAXEIRO, A. P. A., 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: 119-125.
- MANDRIOLI, M., MANICARDI, G. C., BIZZARO, D. & BIANCHI, U. (1999). NOR heteromorphism within a parthenogenetic lineage of the aphid *Megoura viciae*. *Chrom. Res.*, 7: 157-162.
- MANTOVANI, M., ABEL, L. D., MESTRINER, C. A. & MORREIRA-FILHO, O. (2000). Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): tools for understanding karyotypic evolution. *Genetica*, 109: 161-168.

- MARIANO, C. S. F. (2000). Avaliação de dados citogenéticos como ferramentas para o estudo das relações filogenéticas entre grupos de *Camponotus* Mayr (Hymenoptera; Formicidae; Formicinae) (Mestrado em Entomologia) Universidade Federal de Viçosa.
- MARTINS, C. & GALETTI Jr., P. M. (1998). Karyotype similarity between two sympatric *Schizodon* fish species (Anostomidae, Characiformes) from the Paraguay River basin. *Genet. Mol. Biol.*, 21: 355-360.
- MARTINS, C. & GALETTI JR, P. M. (1999). Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chrom. Res.*, 7: 363-367.
- MARTÍNEZ-EXPÓSITO, M. J; MÉNDEZ, J. & PASANTES, J.J. (1997). Analysis of NORs and NOR-associated heterochromatin in the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *Chrom. Res.*, 5: 268-273.
- MARTÍNEZ-LAGE, A., GONZÁLEZ-TIZÓN, A. & MÉDEZ, J. (1994) Characterization of different chromatin types in *Mytilus galloprovincialis* L. after C-banding, fluorochrome and restriction endonuclease treatments. *Heredity*, 72: 242-249.
- MENEZES, M. B. F. (1997). Caracterização citogenética e análise da heterocromatina constitutiva em *Tetragonisca angustula angustula* (Hymenoptera, Meliponinae) Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) Universidade Federal de Viçosa.
- MESTRINER, C. A., BERTOLLO, L. A. C. & GALETTI JR., P. M. (1995). Chromosome banding and synaptonemal complexes in *Leporinus lacustris* (Pisces, Anostomidae): analyses of a sex system. *Chrom. Res.*, 3: 440-443.
- 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.
- MOREIRA, C. M. L. C. (1997). Caracterização cariotípica de três espécies do gênero *Friesomelitta* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) Universidade Federal de Viçosa.
- POMPOLO, S. G. & CAMPOS, L. A. O. (1995). Karyotypes of two species of stingless bees, *Leurotrigona muelleri* and *Leurotrigona pusilla* (Hymenoptera, Meliponinae). *Rev. Brasil. Genet.*, 18: 181-184.
- POMPOLO, S. G. & TAKAHASHI, C. S. (1990). Chromosome numbers and C-banding in two wasps species of the genus *Polistes* (Hymenoptera, Polistinae, Polistini). *Insec. Sociaux*, 37: 251-257.

- POMPOLO, S. G. (1992). Estudos citogenéticos em Meliponinae. *Naturalia* (Edição especial): 62-66.
- POMPOLO, S. G. (1994). Análise dos cariótipos de 19 gêneros de abelhas da subfamília Meliponinae. In: Encontro Sobre Abelhas. 1. Ribeirão Preto. *Anais...Ribeirão Preto. Legis Summa*: 143-146.
- ROCHA, M. P. (2000). Análise cariotípica de dez espécies do gênero *Melipona* Illiger, 1806 (Hymenoptera, Apidae), baseada em padrões de heterocromatina. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) Universidade Federal de Viçosa.
- ROCHA, M. P. & POMPOLO, S. G. (1998). Karyotypes and heterochromatin variation (C-bands) in *Melipona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Genet. Mol. Biol.*, 21: 41-45.
- ROCHA, M. P., POMPOLO, S. G., DERGAM, J. A. FERNANDES, A. & CAMPOS, L. A. O. (2002). DNA characterization and karyotypic evolution in bees genus *Melipona* (Hymenoptera, Meliponini). *Hereditas*. Vol. 136 (Aceite).
- ROIG-ALSINA, A. & MICHENER, C. D. (1993). Studies of the phylogeny and classification of long-tongued bees (Hymenoptera:Apoidea). *Univers. Kansas Scien. Bul.*, 55: 123-173.
- ROIHA, H., MILLER, J. R., WOODS, L. C. & GLOVER, D. (1981). Arrangements and rearrangements of sequences flanking the two types of rDNA insertion in *D. melanogaster*. *Nature*, 290: 749-753.
- ROSSI, A. R.; GORNUNG, E. & CROSETTI, D. (1996). Cytogenetic analysis of *Liza ramada* (Pisces, Perciformes) by different staining techniques and fluorescent *in situ* hybridization. *Heredity*, 79: 83-87.
- SANTOS, N. & SOUZA, M. J. (1998b). Use of fluorochromes chromomycin A₃ and DAPI to study constitutive heterochromatin and NORs in four species of bats (Phyllostomidae). *Caryologia*, 51: 265-278.
- SCHER, R. (1996). Diversidade cariotípica em uma população de *Trypoxilon* (*Trypargilum*) *nitydum* (Hymenoptera, Sphecidae) do Parque Florestal Estadual do Rio Doce (MG). Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) Universidade Federal de Viçosa.
- SCHMID, M. (1978a). Chromosome banding in Amphibia. I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. *Chromosoma*, 66: 361-188.

- SCHMID, M. (1978b). Chromosome banding in Amphibia. II. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in Ranidae, Microhylidae and Rhacophoridae. *Chromosoma*, 68: 131-148.
- SCHMID, M. (1980). Chromosome banding in Amphibia. IV. Differentiation of GC- and Rich chromosome regions in Anura. *Chromosoma*, 77: 83-103.
- SCHMID, M. (1982). Chromosome banding in Amphibia. VII. Analysis of structure and variability of NORs in Anura. *Chromosoma*, 87: 327-344.
- SCHMID, M. & GUTTENBACH, M. (1988). Evolutionary diversity of reverse (R) fluorescent chromosome bands in vertebrates. *Chromosoma*, 97: 101- 104.
- SCHWARZACHER, H. G. & WACHTLER, F. (1983). Nucleolus organizer regions and nucleoli. *Hum. Genet.*, 63: 89-99.
- SCHWEIZER, D. (1980). Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA/DAPI-bands) in human chromosomes. *Cytogenet. Cell Genet.*, 27: 190-193.
- SUMNER, A. T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res.*, 75: 304-306.
- SUMNER, A. T. (1990). *Chromosome Banding*. Unwin Hyman, London.
- TAKAI, A. & OJIMA, Y. (1992). Chromosomal distribution of nucleolus organizer region in Japanese cyprinid fish. *Cytobios*, 71: 7-17.
- TARELHO, Z. V. S. (1973). Contribuição ao estudo citogenético dos Apoidea. Dissertação (Mestre em Ciências) USP, Riberão Preto.
- UEDA, T., IRIE, S., & KATO, Y. (1987). Longitudinal differentiation of metaphase chromosomes of Indian muntjac as studied by restriction enzyme digestion, *in situ* hybridization with cloned DNA probes and distamycin A plus DAPI fluorescence staining. *Chromosoma*, 95: 251- 257.
- VIÉGAS-PÉQUIGNOT, E. (1992). *In situ* hybridization to chromosomes with biotinylated probes. In: *In Situ Hybridization: A Practical Approach* (Willernson, D. ed), Oxford University Press, IRL press. pp-137-158.
- WASKO, A. P & GALETTI JR., P. M. (2000). Mapping 18S ribosomal genes in fish of the genus *Brycon* (Characidae) by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Genet. Mol. Biol.*, 23: 135-138.

- WOYKE, J & KROL-PALUCH, W. (1985). Changes in tissue polyploidization during development of worker, queen, haploid and diploid drone honeybees. *J. Apic. Res.* 24: 214-224.
- ZOLDOS, V., PAPES, D., CERBAH, M., PANAUD, O., BESENDRFER, V. & SILJAK-YAKOVLEV, V. (1999). Molecular-cytogenetic studies of ribosomal genes and heterochromatin reveal conserved genome organization among 11 *Quercus* species. *Theor Appl Genet.*, 99: 969-977.

6- CONCLUSÕES

Friesella schrottkyi é uma abelha indígena da tribo Meliponini. A análise citogenética realizada em 10 colônias provenientes do Estado de Minas Gerais e Espírito Santo permitiu concluir que:

1. O número cromossômico encontrado foi $2n=34$, para fêmeas, e $n=17$, para machos. A fórmula cariotípica foi $2K=18A^M+ 16A$. A técnica de banda C localizou a heterocromatina no braço curto dos acrocêntricos e em um dos braços dos pseudo-acrocêntricos. Foi encontrado heteromorfismo de banda C no quinto par (pseudo-acrocêntrico). Os tipos morfológicos observados parecem seguir a evolução cromossômica da teoria de interação mínima de IMAI *et al.* (1988, 1994). Os cromossomos pseudo-acrocêntricos e acrocêntricos teriam surgido de cromossomos metacêntricos, que sofreram fissões cêntricas seguidas de crescimento "em tandem" da heterocromatina.

2. Os padrões obtidos com a utilização dos fluorocromos base-específicos (DA/DAPI/CMA₃), demonstraram que na heterocromatina predominaram os pares de bases AT (DAPI⁺), com exceção do quinto par cromossômico, que apresentou pares de base GC (CMA₃⁺), na região intersticial à telomérica. Foram observadas três variantes cromossômicas do quinto par o que permitiu separar as colônias em dois grupos de acordo as médias do par heteromórfico.

3. Os genes de rDNA (18S, 5.8S e 28S) detectados pela técnica de FISH, foram localizados somente no quinto par cromossômico, e o fluorocromo CMA₃ mostrou-se também indicador de genes de rDNA, pela correlação entre bandas CMA₃⁺ e FISH⁺. Foi possível confirmar pela banda NOR que estes cromossomos, estavam envolvidos com a região organizadora de nucléolo. Em *F. schrottkyi*, a localização dos genes para rDNA (18S, 5.8S, 28S) na região intersticial à telomérica em um par de cromossomos (morfologia pseudo-acrocêntrico) por conjunto diplóide e a presença de heterocromatina adjacente, indicam que esse cromossomo portador sofreu rearranjos do tipo fissão e que portanto está de acordo com a teoria da interação mínima proposta por IMAI *et al.* (1986, 1988, 1994).

4. Encontrou-se uma variação de 1 à 4 nucléolos nos núcleos interfásicos. A variação em número de nucléolos observada foi considerada resultado de células com níveis de ploidias diferentes do gânglio cerebral. O tamanho dos núcleos e nucléolos não

difere entre os grupos. Isto sugere que o grau de atividade nucleolar é similar em ambos os grupos, conseqüentemente, há um controle na quantidade de rRNA transcritos, independente do número de “clusters” de rDNA.

7- ANEXO

Anexo 1. Técnicas citogenéticas utilizadas em cada colônia *Friesella schrottkyi*. (sinal + representa a técnica utilizada na colônia, sinal - representa a técnica não utilizada na colônia).

Colônia	Convencional	Banda-C	DA/CMA ₃ /DAPI	BC/DA/CMA ₃ /DAPI	Banda NOR	FISH
366	—	—	+	+	—	—
480	—	—	+	+	—	—
561	+	+	+	+	+	+
582	+	+	+	+	+	+
583	+	+	+	+	+	+
604	+	+	+	—	+	+
605	+	+	+	—	—	+
607	+	+	+	+	+	—
617	+	+	+	+	—	—
658	+	+	+	+	+	+