

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



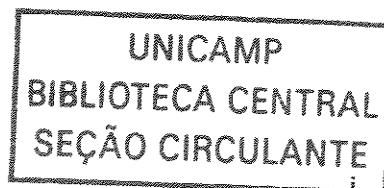
Marla Piumbini Rocha

ANÁLISES CITOGENÉTICAS EM ABELHAS DO GÊNERO *Melipona* (Hymenoptera, Meliponinae)

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Marla Piumbini Rocha
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

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



UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE	BC
1ª CHAMADA	UNICAMP
	R582a
/	EX
COMBO BC/	51213
PROC.	16-837-02
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	
Nº CPD	

CM00176263-B

3181D - 275756

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

R582a

Rocha, Marla Piumbini

Análises citogenéticas em abelhas do gênero *Melipona* (Hymenoptera, Meliponinae)/Marla Piumbini Rocha. --
Campinas, SP:[s.n.], 2002

Orientadora: Sílvia das Graças Pompolo

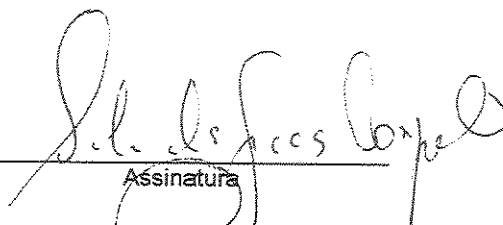
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia

1. Citogenética. 2. Evolução. I. Pompolo, Sílvia das Graças.
- II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
- III. Título.

Data da Defesa: 09/09/2002

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Silvia das Graças Pompolo (Orientadora)


Assinatura

Prof.Dr. Lucio Antonio de Oliveira Campos


Assinatura

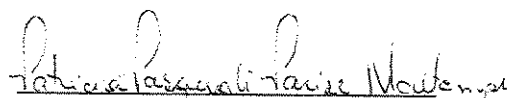
Prof.Dr. Jorge Abdala Dergam dos Santos


Assinatura

Profª Drª Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti


Assinatura

Profª Drª Patrícia Pasquali Parise Maltempi


Assinatura

Profª Drª Doralice Maria Cella


Assinatura

Profª Drª Shirlei Maria Recco Pimentel


Assinatura

2025 2224

À minha família

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Heloilson e Lélia, às minhas irmãs Márcia e Néia, ao meu sobrinho Matheus ao meu cunhado Mauro e minha prima Kelly, que são as maiores preciosidades da minha vida;

A Profa. Dra. Silvia, pelos oito anos de orientação e dedicação;

A todos professores que me apoiaram e ajudaram na minha formação profissional e pessoal, em especial ao Lucio e Jorge;

Aos professores doutores participantes da banca, Patrícia, Jorge, Lucio, Carmem, Shirlei e Doralice;

Às professoras doutoras Shirlei e Luciana e a Klélia pela ajuda na realização da FISH;

A todos que me ajudaram a obter as abelhas, os Professores Elder, Paulo e Ana Maria;

Ao grupo que trabalha com abelhas, pela ajuda em tantas questões, em especial Mariana, Gabriel e Fernando;

A todos companheiros de curso, Adelina, Uyrá, Laércio, Gustavo e outros

A Lílíam, pela atenção e dedicação;

A todos que estiveram no laboratório de citogenética de insetos, Estevão, Cléa, Davy, Cynthia, Lenira, Bruno, André, Fernando, Ricardo, Rute e especialmente ao Anderson, pela amizade e companheirismo nesses anos de aprendizado e ensinamentos;

A minha amiga Soninha, companheira de sonhos e lutas;

A minha amiga Lúcia, pelas orações e incentivos;

Aos meus amigos e irmão em Cristo, Paulo, Roberto (s), Mônica, Mariney, Chárbel, Lu (s), Rafael, Fernando, Elen, Raquel (s), Neto, Serginho, Onice, Cris, Helena, Madriti, Galvão, são muitos.....

Ao CNPq, CAPES e FAPEMIG, pela colaboração no desenvolvimento da pesquisa;

“A fé e a razão constituem como que as duas asas pelas quais o espírito humano se eleva para a contemplação da verdade. Foi Deus quem colocou no coração do homem o desejo de conhecer a verdade e, em última análise, de O conhecer, para que, conhecendo-O e amando-O, possa chegar também à verdade plena sobre si próprio”. Carta Encíclica - Fé e Razão – Papa João Paulo

RESUMO

O presente trabalho apresentou uma contribuição aos estudos citogenéticos do gênero *Melipona* (Hymenoptera, Meliponini) iniciados por KERR em 1948. O número cromossômico encontrado foi igual ($n=9$ e $2n=18$) para 11 espécies do gênero: *Melipona marginata*, *Melipona quadrifasciata*, *Melipona bicolor*, *Melipona compressipes*, *Melipona subnitida*, *Melipona scutellaris*, *Melipona asilvae*, *Melipona seminigra fuscopilosa*, *Melipona capixaba*, *Melipona crinita*, *Melipona mandacaia*. A única espécie que apresentou número cromossômico diferente foi *Melipona quinquefasciata*, devido à presença de cromossomos B. Estes variaram de 1 a 4 em fêmeas e de 0 a 4 em machos. Apesar dessa exceção, podemos considerar que o número cromossômico é um caráter estável no táxon. Algumas espécies apresentaram cromossomos com morfologias meta, submeteta e acrocêntricas e a heterocromatina esteve distribuída na região pericentromérica foram elas: *M. marginata*, *M. quadrifasciata*, *M. subnitida*, *M. bicolor*, *M. asilvae*, *M. mandacaia* e o complemento A de *M. quinquefasciata*. Em *M. crinita*, *M. compressipes*, *M. scutellaris*, *M. seminigra fuscopilosa* e *M. capixaba* a morfologia dos cromossomos foi de difícil definição e a heterocromatina esteve distribuída em quase toda a extensão dos cromossomos, com a eucromatina restrita às extremidades. Os cromossomos B de *M. quinquefasciata* também apresentaram esta morfologia. A análise de metáfases menos condensadas revelou a presença de diferentes tipos de cromossomos B: acrocêntricos, totalmente heterocromáticos, e submetacêntricos, com o braço menor heterocromático ou eucromático. A porcentagem de heterocromatina foi calculada para algumas espécies: *M. bicolor* (8%), *M. subnitida* (17%), *M. crinita* (54%), *M. compressipes* (61%) e *M. seminigra fuscopilosa* (73%). Nas espécies com heterocromatina distribuída por quase toda a extensão dos cromossomos, a porcentagem de heterocromatina foi sempre maior que 50%, enquanto nas demais espécies foi menor que 50%. Com base nos dados de porcentagem de heterocromatina e morfologia cromossômica, o gênero foi dividido em dois grupos. O Grupo I incluiu as espécies com baixa proporção de heterocromatina (menor que 50%) distribuída na região pericentromérica. O Grupo II incluiu as espécies com heterocromatina distribuída por quase toda a extensão dos cromossomos e com porcentagem maior que 50%. A Banda C, Banda NOR, coloração com fluorocromos, Enzimas de Restrição (ER) e FISH (hibridização in situ fluorescente) com sonda de rDNA foram utilizadas para diferenciar os cariótipos de espécies de um mesmo grupo. Nas espécies do Grupo I, a coloração

seqüencial com os fluorocromos QM/DA/CMA₃/DAPI permitiu identificar bandas heterocromáticas e eucromáticas, sendo a maioria delas ricas em AT. Já nas espécies do Grupo II, esta técnica não diferenciou os cromossomos, mas o padrão obtido com ER demonstrou a heterogeneidade da heterocromatina. Em *M. mandacaia*, o tratamento com as ER permitiu observar em todos os cromossomos regiões com diferentes intensidades de coloração, com áreas completamente clivadas e outras resistentes. A localização de algumas regiões resistentes à ER correspondeu à heterocromatina; outras resistentes, embora provavelmente também heterocromáticas, não foram evidenciadas com a banda C. Concluiu-se que a técnica de enzimas de restrição diferenciou dois tipos de heterocromatina. Em *M. mandacaia*, o tratamento com *HaeIII*/Giemsa, permitiu obter um padrão de diferenciação longitudinal semelhante à banda G. Em *M. quinquefasciata* as ER aparentemente não clivaram o DNA dos cromossomos Bs. Nas espécies do Grupo I, o primeiro par de cromossomos apresentou um bloco heterocromático heteromórfico. Este par foi Ag-NOR+ em *M. asilvae*, foi clivado pela enzima de restrição *HaeIII* (GC↓GC) em *M. mandacaia* e marcado com sonda de rDNA nas espécies *M. quinquefasciata*, *M. quadrifasciata*, *M. bicolor*. No Grupo II, só foi possível localizar este bloco de heterocromatina pela coloração com CMA₃ para todas espécies e pela FISH em *M. capixaba* e *M. compressipes*. Desta forma, o heteromorfismo do bloco heterocromático correspondeu à Região Organizadora de Nucléolo. Nas espécies do Grupo I, a NOR esteve localizada na região pericentromérica e no Grupo II no limite entre a eucromatina e heterocromatina. Porém em *M. capixaba* a NOR apresentou-se na extremidade eucromática. Baseados nos dados citogenéticos de *Melipona*, concluiu-se que o gênero diverge dos modelos propostos para a evolução cariotípica dos meliponíneos e que a mudança no conteúdo de heterocromatina entre as espécies envolveu mecanismos ainda desconhecidos. A polaridade do conteúdo heterocromático em *Melipona* foi proposta considerando *Leurotrigona muelleri* como grupo externo. A semelhança do conteúdo e distribuição da heterocromatina de *L. muelleri* com as espécies do Grupo I de *Melipona* foi considerado primitivo, permitindo caracterizar o Grupo II como um grupo natural dentro de *Melipona*. A origem dos cromossomos B de *Melipona* provavelmente ocorreram através de processos de amplificação da heterocromatina rica em AT com posteriores clivagens, ou uma origem interespecífica

ABSTRACT

This work is a contribution to the studies of the cytogenetics of the genus *Melipona* (Hymenoptera, Meliponini), which were initiated by KERR in 1948. The chromosome number is the same ($n=9$ e $2n=18$) for the 11 species of the genus: *Melipona marginata*, *Melipona quadrifasciata*, *Melipona bicolor*, *Melipona compressipes*, *Melipona subnitida*, *Melipona scutellaris*, *Melipona asilvae*, *Melipona seminigra fuscopilosa*, *Melipona capixaba*, *Melipona crinita*, *Melipona mandacaia*. The only species with a different number of chromosomes was *Melipona quinquefasciata*, due to the presence of B chromosomes. These chromosomes varied from 1 to 4 in females and from 0 to 4 in males. Despite exception, we can consider that the chromosome number is a stable character in the taxon. Some species presented chromosomes with meta, submetacentric and acrocentric morphologies and the heterochromatin was pericentromeric in the following species: *M. marginata*, *M. quadrifasciata*, *M. subnitida*, *M. bicolor*, *M. asilvae*, *M. mandacaia* and in the A complement of *M. quinquefasciata*. In *M. crinita*, *M. compressipes*, *M. scutellaris*, *M. seminigra fuscopilosa* and *M. capixaba*, the chromosome morphology was difficult to define and the heterochromatin was distributed along most of this the chromosomes, with the euchromatin restricted to the extremities.

The B chromosomes of *M. quinquefasciata* also showed three morphologies. The analysis of minus condensate metaphases showed the presence of different types of B chromosomes: acrocentric, totally heterochromatic and submetacentric, with the shorter arm heterochromatic or euchromatic. The percentage of heterochromatin was calculated for some species: *M. bicolor* (8%), *M. subnitida* (17%), *M. crinita* (54%), *M. compressipes* (61%) and *M. seminigra fuscopilosa* (73%). In the species in which the heterochromatin is distributed in the whole extension of the chromosomes, the percentage of heterochromatic was always higher than 50%, while in the other species it was less the 50%. Based in the percentage of heterochromatin and chromosomal morphology, the genus was divided in two groups. Group I included the species with a low percentage of the heterochromatin (less than 50%) and with pericentromeric distribution. Group II included species in which the heterochromatin was distributed in the whole extension of the chromosomes and with percentage more than 50%. C Band, NOR Band, fluorochrome, Restriction Enzymes (RE) and 'Fluorescent in Situ Hybridization' (FISH) were used to differentiate species karyotypes. In species of Group I, sequential coloration with the QM/DA/CMA₃/DAPI fluorochromes permitted the identification of heterochromatic and euchromatic bands, most

of them rich in AT. In species of Group II, this technique did not differentiate the chromosomes, but pattern with ER demonstrated the heterochromatin heterogeneity. In *M. mandacaia*, the treatment with ER permitted to observe in all the chromosomes, regions with different intensities of coloration, with areas completely cleaved and others resistant. Some regions resistant to ER corresponded to heterochromatin; other resistant areas, even though probably also heterochromatic, were not evidenced with C band. Thus, the technique of restriction enzymes differed two types of heterochromatin. In *M. mandacaia*, the treatment with *HaeIII*/Giemsa, permitted to obtain a pattern of longitudinal differentiation in the chromosomes similar to G Band. In *M. quinquefasciata*, the ER apparently did not cleave the DNA of B chromosomes. In species of Group I, the first pair of chromosomes presented a heterochromatic heteromorphic block. This pair was Ag-NOR+ in *M. asilvae*, was cleaved by the restriction enzyme *HaeIII* (GC↓GC) in *M. mandacaia* and marked with rDNA probes in *M. quinquefasciata*, *M. quadrifasciata*, *M. bicolor*. This species of Group II, *M. capixaba* and *M. compressipes*, it was possible to characterize this heterochromatin block with CMA₃ and FISH. The heteromorphism of the heterochromatic block corresponded to Nucleolus Organizer Region of the species. In species of Group I, NOR was located in pericentromeric region and in Group II in the limit of euchromatin and heterochromatin. Except for *M. capixaba*, that also showed another localization, in the euchromatic extremity. Based in cytogenetic data of *Melipona*, it is possible to conclude that the genus diverges from models proposed to explain the karyotype evolution in Meliponini and that the change in heterochromatin content among the species involved mechanisms still unknown. The polarity of the heterochromatic content in *Melipona* was proposed considering *Leurotrigona muelleri*, as an outgroup. The similarity of content and distribution of heterochromatin of *L. muelleri* with species of Group I of *Melipona* was considered primitive, permitting a characterization of Group II as a natural group in the genus *Melipona*. B chromosomes in *Melipona* probably originated from an amplification of heterochromatin rich in AT and posterior cleavages, or originated interspecific.

ÍNDICE

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Considerações gerais sobre citogenética.....	1
1.1.1. Técnicas citogenéticas	1
1.1.2. Heterocromatina	3
1.1.3. Cromossomos B	4
1.2. Tribo Meliponini	6
1.2.1. Citogenética.....	6
1.2.2. Evolução cariotípica.....	7
1.2.3. Gênero <i>Melipona</i>	8
2. OBJETIVOS	11
2.1. Justificativa	11
2.2. Objetivos Gerais	11
3. ARTIGOS	
3.1. DNA characterization and karyotypic evolution in the bee genus <i>Melipona</i> (Hymenoptera, Meliponini)	12
3.2. Cromossomos B em abelha neotropical <i>Melipona quinquefasciata</i> (Hymenoptera, Meliponini)	35
3.3. Diferenciação longitudinal dos cromossomos de <i>Melipona mandacaia</i> (Hymenoptera, Meliponini). (Hymenoptera: Apidae, Meliponini).....	51
3.4. Estudo da NOR no gênero <i>Melipona</i> (Hymenoptera, Meliponini)	63
4. CONCLUSÕES.....	75
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações gerais sobre a citogenética

Desde o início do século XX, a citologia e a genética passaram a sobrepor os conhecimentos em uma área comum, conhecida como citogenética. Essa ciência tem trazido uma grande contribuição ao entendimento de questões relacionadas às variações cromossômicas, ao papel da heterocromatina no genoma, ao estudo dos cromossomos B, além de aplicações no campo da medicina.

As variações cromossômicas são utilizadas no estudo da evolução e filogenia das espécies, isto se deve, principalmente, ao fato que os cromossomos representam a base física do sistema genético; portanto alterações destes podem ser significativas para o rumo evolutivo das espécies (WHITE 1973). A contribuição da citogenética à filogenia foi verificada em vespas do gênero *Microstigmus* e *Spilomena*, que apresentaram números de cromossomos haplóides variando de $n=3$ a $n=11$. Uma análise comparativa dos dados citogenéticos com a proposta filogenética para o grupo, obtida por meio de uma análise cladística de dados morfológicos e comportamentais, evidenciou que os números cromossômicos mais elevados ($n=7$ a 11) e números mais baixos ($n=3$ a 5) estão associados a clados distintos (COSTA *et al.* 2002). O estudo citogenético da Região Organizadora de Nucléolos também vem contribuindo de forma significativa para apoiar os dados filogenéticos e hipóteses sobre a evolução cariotípica de vários organismos: anfíbios (LOURENÇO *et al.* 1998, ODIERNA *et al.* 2001), mamíferos (BARDHAN e SHARMA 2000), peixes (FERNANDES-MATIOLI *et al.* 1997; MONTOVANI *et al.* 2000, PARDO *et al.* 2001) e insetos (PALOMEQUE *et al.*, 1988, HIRAI *et al.* 1994, 1996).

Os dados citogenéticos também são aplicados na taxonomia. Em formigas do complexo *Myrmecia pilosula*, a citogenética permitiu uma reformulação da classificação desse grupo, que é constituído por cinco espécies pouco distintas morfológicamente, mas muito diferentes cariotipicamente, com números cromossômicos variando de $2n=2$ a $2n=32$ (IMAI *et al.* 1988; 1994).

1.1.1. Técnicas citogenéticas

Os métodos empregados nos estudos dos cromossomos consideram principalmente três características: tamanho, forma e diferenciação linear. Para que a diferenciação seja precisa é necessário à aplicação de “técnicas de bandamentos”. Estas permitem analisar,

com uso de corantes ou outras substâncias, mudanças químicas e físicas ao longo dos cromossomos, que aparecem como bandas transversais (MACGREGOR 1993). Uma das técnicas mais conhecidas e utilizadas é a banda C (SUMNER 1972). Nesta técnica, utiliza-se o ácido clorídrico, que promove a depurinação do DNA, uma solução alcalina, que desnatura o DNA e uma solução salina, que em alta temperatura, não permite o reanelamento deste. Como resultado desses processos, o DNA é reduzido a pequenos fragmentos, que são facilmente liberados dos cromossomos. Por razões desconhecidas, um ou mais desses processos ocorrem mais rápido na eucromatina que na heterocromatina e, por isso, ela é evidenciada após algum tipo de coloração (OBE e BASLER 1987). A localização das regiões heterocromáticas nos cromossomos pode permitir a identificação dos cromossomos homólogos e detectar rearranjos que possam ter ocorrido ao longo da evolução.

Em 1968, Caspersson *et al.* inferiram que a 'não-homogeneidade' do DNA poderia ser detectada usando compostos que reagiriam especificamente com certas bases do DNA. Os fluorocromos foram aplicados, por apresentarem ligação específica nos pares de bases e fluoescerem quando excitados por luz de determinados comprimentos de ondas. Eles podem ser AT específicos: Quinacrina Mostarda (QM) e 4-6-DIAMIDINO-2-PHENYLINDOLE (DAPI) ou GC específicos: Cromomicina A₃ (CMA₃) e Mitramicina. A coloração com apenas um tipo de fluorocromo foi substituída pelo uso seqüencial de diferentes fluorocromos. Essa técnica, chamada de coloração seqüencial, melhorou a qualidade da informação obtida, aumentando o contraste das bandas observadas e gerando novos padrões, não obtidos quando os fluorocromos eram usados isoladamente (SUMNER 1990).

As enzimas de restrição (ER) têm sido utilizadas amplamente na citogenética, elas reconhecem seqüências de bases do DNA e clivam em sítios específicos, permitindo assim a remoção do DNA fragmentado. Após a coloração, essas regiões aparecem claras e as resistentes, escuras (GÓSSALVEZ *et al.* 1997). Porém, a presença da seqüência de reconhecimento não é o único determinante para a produção de um padrão de bandamento. Por exemplo, quando os fragmentos clivados forem maiores do que 1 kilobase pares (kbp), eles não serão removidos (VERMA e BABU 1995); o DNA também não será clivado quando estiver associado com certas estruturas resistentes a ER ('enzyme-resistant bodies'). As enzimas de restrição, assim como os outros bandamentos,

têm sido utilizados na tentativa de entender as relações evolutivas entre táxons, assim como aspectos estruturais e funcionais dos genomas (BABU e VERMA 1986).

Regiões de interesse nos cromossomos podem ser evidenciadas utilizando técnicas citogenéticas específicas. Uma região muito estudada é a Região Organizadora do Nucléolo (NOR), que contém os principais genes responsáveis pela síntese de rRNA (18S e 28S e 5,8S) e é responsável pela formação do nucléolo (SUMNER 1990). As técnicas mais comuns para se detectar NOR são a impregnação pela prata (banda NOR) e a FISH (hibridização fluorescente *in situ*) com sonda de rDNA. Embora a NOR seja definida pelas seqüências de DNA, a banda NOR não é baseada nas propriedades do DNA e sim nas proteínas ácidas produzidas durante a intérfase e acumuladas em volta da NOR (SCHWARZACHER *et al.* 1978).

1.1.2. Heterocromatina

A citogenética vem contribuindo de forma significativa para o entendimento de questões relacionadas ao papel da heterocromatina no genoma das espécies. Heitz em 1928 conceituou a heterocromatina como a cromatina que permanecia condensada durante a intérfase, retendo as propriedades de coloração intensa. Atualmente são reconhecidas outras características: replicação em tempo maior, grande repetição dos pares de base do DNA e ausência de atividade gênica. A constituição molecular da heterocromatina é muito discutida, apesar de ser constituída principalmente por DNA satélite, outros tipos de DNA já foram observados (*in* MELLO 1977, 1983).

A heterocromatina foi considerada inativa em termos transcritivos, porém alguns autores discutem sobre os seus efeitos e/ou funções no genoma. Há divergências entre autores sobre o que seriam efeitos e funções da heterocromatina. Em linhas gerais, pode-se dizer que efeitos se referem aos resultados da posição física da heterocromatina em uma dada região cromossômica, enquanto função refere-se a uma atividade específica dentro do genoma (SUMNER 1990).

Segundo JOHN (1988), a heterocromatina apresenta efeito de posição no padrão de variação, isto é, ocorre repressão da expressão de genes presentes em regiões eucromáticas por terem sido translocados para uma posição adjacente à heterocromatina. Em células germinativas a heterocromatina pode afetar o pareamento, a recombinação e a segregação dos cromossomos.

O arranjo ordenado dos cromossomos no núcleo interfásico tem sido proposto como um meio pelo qual a atividade genética é coordenada dentro do genoma. Vários autores, dentre eles Hilliker *et al.* (1980) e Manuelidis (1982), têm especulado que a heterocromatina pode ter importante papel na determinação da estrutura tridimensional do núcleo interfásico. Diante desse papel da heterocromatina, os autores consideraram que ela afeta a expressão gênica direta ou indiretamente. Em células germinativas, a heterocromatina afeta, basicamente, o pareamento, a recombinação e a segregação (JOHN 1988).

Uma das hipóteses formuladas na tentativa de explicar a função da heterocromatina no genoma das espécies foi a de IMAI (1991) e IMAI *et al.* (1986; 1988; 1994) baseados nos dados de mamíferos, formigas e vespas. Essa hipótese prediz que após eventos de fissão cêntrica, ocorreria à adição de heterocromatina na região quebrada, que corresponde à região telomérica, recuperando assim a estabilidade do telômero. Uma evidência que reforça esta hipótese é o acúmulo de heterocromatina encontrado preferencialmente em um dos braços nos cromossomos de diversas espécies de formigas que apresentam elevado número de cromossomos. O mesmo já foi verificado em outros grupos da ordem Hymenoptera: vespas (GOMES *et al.* 1995; ARAÚJO *et al.* 2000), abelhas (POMPOLO e CAMPOS 1995, HOSHIBA e IMAI 1993) e sínfitas (ROUSSELET *et al.* 1998).

No que se refere à função da heterocromatina, também se propõe que esta teria importante papel na proteção da eucromatina contra ataques de vírus, agentes mutagênicos e clastogênicos, agindo como um “guarda-costas”. Essa função se deve à posição da heterocromatina no núcleo, formando uma camada dispersa na face periférica deste, protegendo a eucromatina que fica no interior (HSU 1975).

1.1.3. Cromossomos B

O termo cromossomo B foi primeiramente utilizado por Randolph em 1928 para identificar cromossomos extras em milho. São chamados de ‘B’ porque se diferenciam dos cromossomos do complemento normal, denominados de ‘A’ (CLARK e WALL 1996). Os cromossomos B ou supranumerários são extras ao complemento normal do indivíduo. Suas características são as mesmas em quase todos os organismos: heterocromáticos, menores que os cromossomos do complemento A e com segregação não-mendeliana (CAMACHO *et al.* 2000).

São amplamente encontrados nos mais diferentes organismos (BEUKEBOOM *et al.* 1996; GORLOV e TSURUSAKI 2000; TANIC *et al.* 2000, MARTINS *et al.* 1996, SALVADOR e MOREIRA-FILHO 1992; JONES 1995, JAMILENA *et al.* 1995, HOUBEN *et al.* 1999). Em 1995 foi relatado por JONES que os cromossomos B ocorriam em 1372 espécies de plantas (12 coníferas e 1360 angiospermas), além de samambaias e fungos. Em 1996 Clark e Wall relataram a ocorrência em mais de 1000 espécies de plantas e 260 espécies de animais. Segundo CAMACHO *et al.* (2000), verifica-se que o número de espécies com cromossomos B aumenta à medida que novas espécies são estudadas citogeneticamente. Na ordem de insetos Hymenoptera, foi descrito em sete formigas, *Leptothorax spinosior* (IMAI 1974), *Aphaenogaster rudis* (CROZIER 1975), *Podomyrma adelaide* (IMAI *et al.* 1977), *Predolepis jerdoni* (IMAI *et al.* 1984), *Lasius niger* (PALOMEQUE *et al.* 1990), *Pheidole pallidula* (LORITE *et al.* 2000), *Camponotus* sp. (MARIANO *et al.* 2001), em duas vespas, *Nasonia vitripennis* (WERREN 1991) e *Trypoxylon albitarse* (ARAÚJO *et al.* 2000) e uma espécie de abelha, *Partamona helleri* (COSTA *et al.* 1992).

Foram identificados diversos tipos de variações em relação aos cromossomos B: interpopulacional (STEVENS e BOUGOURD 1994, VICENTE *et al.* 1996, BEUKEBOOM *et al.* 1998, TSURUSAKI 1993, BRITO *et al.* 1997, BLACKMAN 1988), intra-individual (PROENÇA *et al.* 1999, TSURUSAKI 1993, PAULS e BERTOLLO 1983), interespecífica (MARTINS *et al.* 1996, AMOS e DOVER 1981, BLACKMAN 1988), intersexual (MARYANSKA-NADACHOWSKA e WARCHALOWSKA-SLIWA 1991, MAFFEI *et al.* 2000, PROENÇA *et al.* 1999, MESTRINER *et al.* 2000, VICENTE *et al.* 1996, PAULS e BERTOLLO 1983, MARTINS *et al.* 1996), intertecidual (DAGNE 1995, IMAI 1974, PALOMEQUE *et al.* 1990), geográfica (TSURUSAKI 1993, BEUKEBOOM *et al.* 1998, VICENTE *et al.* 1996, HOUBEN *et al.* 1999, NÉO *et al.* 2000) e sazonal (GORLOV e TSURUSAKI 2000).

A maioria dos estudos sobre cromossomos B sugere que eles tiveram origem intra-específica, ou seja, a partir do complemento A (RAMACHANDRA e RANGANATH 1987; JAMILENA *et al.* 1995; PROENÇA *et al.* 1999; MESTRINER *et al.* 2000; BRINKMAN *et al.* 2000; ARAÚJO *et al.* 2000). Em alguns casos, existem evidências da origem a partir dos cromossomos sexuais (LÓPEZ-LEÓN *et al.* 1994). A hipótese de origem interespecífica foi baseada principalmente nos dados citogenéticos e moleculares da vespa *Nasonia vitripennis*. (McALLISTER e WERREN 1997). PERFECCTI e WERREN (2001),

confirmaram essa hipótese, pela observação da origem interespecífica de um fragmento cêntrico extra, a partir do cruzamento entre *Nasonia vitripennis* e *Nasonia giraulti*.

Tem-se sugerido que os cromossomos B são elementos inertes no genoma, contudo, fato contrário tem sido observado na espécie *Allium schoenoprasum*. Em condições de estresse, os indivíduos com cromossomos Bs apresentam um valor adaptativo superior aos indivíduos que não apresentam (PLOWMAN e BOUGOURD 1994). JONES (1995) relatou em plantas a presença de genes para rRNA (*Crepis capillaris*, *Brachycome dichromosomatica*, *Hepatica nobilis*) e de macho esterilidade (*Plantago coronopus*) em cromossomo B dessas espécies. Na vespa *Nasonia vitripennis*, a razão sexual da população que contém o cromossomo B (PSR= Paternal Ratio Sexual) é alterada drasticamente, pois eles convertem em machos portadores de PRS, os ovos que deveriam normalmente originar fêmeas (WERREN 1991).

1.2. Tribo Meliponini

As abelhas formam o maior grupo da ordem Hymenoptera. Elas têm grande importância em diversos ecossistemas, pois são essenciais na manutenção da diversidade das plantas que, por sua vez, têm papel na manutenção de comunidades animais (MICHENER 2000). Um terço da produção mundial agrícola depende da visita de animais às flores, sendo que as abelhas são responsáveis por 38% da polinização das plantas floríferas (KERR *et al.* 2001). HEARD (1999) identificou aproximadamente 90 espécies de plantas cultivadas que são polinizadas por abelhas da tribo Meliponini (Apidae, Apinae), também conhecidas como 'abelhas sem ferrão'.

Os meliponíneos estão distribuídos em regiões de clima tropical do planeta, sendo que a maior concentração e diversidade são nos trópicos americanos. Já foram descritos aproximadamente 50 gêneros de meliponíneos e mais de 300 espécies (MICHENER 2000).

1.2.1. Citogenética

Os estudos citogenéticos em Meliponini iniciaram-se com o trabalho de KERR (1948), quando foi determinado o número cromossômico de algumas espécies do gênero *Melipona*. Já foram estudados citogeneticamente 28 gêneros e 65 espécies, sendo que o número cromossômico haplóide variou de oito a dezoito cromossomos, onde $n=17$ foi o número predominante.

Os primeiros trabalhos citogenéticos de meliponíneos (KERR 1948; 1969; 1972; KERR e ARAÚJO 1957; KERR e SILVEIRA 1972, TARELHO 1973) aplicaram técnicas de esmagamento e consistiam basicamente na determinação do número cromossômico. Trabalhos mais recentes (COSTA *et al.* 1992; HOSHIBA e IMAI 1993; POMPOLO e CAMPOS 1995; BRITO *et al.* 1997; BRITO-RIBON *et al.* 1999; MAMPUMBU *et al.* 1999; CAIXEIRO e POMPOLO 1999; ROCHA e POMPOLO 1998) utilizaram um pré-tratamento do material (gônadas ou gânglio cerebral) em solução de colchicina e citrato de sódio, o que possibilitou um acúmulo de metáfases, posteriormente o material foi dissociado e fixado em soluções com diferentes concentrações de ácido acético/etanol/água. Essa metodologia foi desenvolvida por IMAI *et al.* (1988) e tem-se mostrado mais eficiente na diferenciação dos cromossomos; seus resultados foram diferentes dos encontrados anteriormente para alguns gêneros (COSTA *et al.* 1992; HOSHIBA e IMAI 1993; MAMPUMBU *et al.* 1999).

O uso de diferentes técnicas citogenéticas para os meliponíneos vem auxiliando no entendimento da localização e natureza da heterocromatina de *Friesella* (MAMPUMBU *et al.* 1999), *Leurotrigona* (POMPOLO e CAMPOS 1995), *Melipona* (ROCHA e POMPOLO 1998), *Nannotrigona* (HOSHIBA e IMAI 1993), *Partamona* (COSTA *et al.* 1992; BRITO-RIBON *et al.* 1999), *Plebeia* (CAIXEIRO e POMPOLO 1999) e *Trigona* (HOSHIBA e IMAI 1993). Também permitiu localizar a NOR em *Melipona marginata*, *Plebeia* sp (MAFFEI *et al.* 2001) e caracterizar os cromossomos B de *Partamona helleri* (BRITO-RIBON *et al.* 1999).

1.2.2. Evolução cariotípica

Para inferir sobre a evolução cariotípica, é necessário conhecer as variações que ocorreram nos cariótipos ao longo do tempo. Essas variações podem ser no número cromossômico (aneuploidia e euploidia) ou na estrutura (inversões, translocações, etc.). Na ordem Hymenoptera, foram apresentados dois mecanismos de variações cromossômicas para explicar a evolução cariotípica. KERR (1952; 1969; 1972) e KERR e SILVEIRA (1972) com base nos números cromossômicos de 52 espécies de abelhas, propuseram a poliploidia como o principal evento na evolução cariotípica. Segundo KERR e SILVEIRA (1972) a poliploidia teria surgido independentemente cinco vezes no grupo das abelhas: 1) de um ancestral de *Augochloropsis sparsilis* (n=8) para *Pseudaugochlora graminea* (n=16); 2) de um ancestral de *Leurotrigona muelleri* (n=8) para *Frieseomelitta* (n=15);

3) de um ancestral Trigonini ($n=9$) para *Plebeia* ($n=18$); 4) de um ancestral de *Melipona quadrifasciata*, *M. marginata* e outras espécies ($n=9$) para *M. quinquefasciata* ($n=18$); 5) de um ancestral de *Apis florea* ($n=8$) para *A. mellifera* e *A. cerana* ($n=16$).

O outro mecanismo proposto para explicar a evolução do cariótipo dos himenópteros foi à fissão cêntrica. A escolha desse mecanismo está apoiada na teoria da interação mínima, postulada por IMAI *et al.* (1986; 1988; 1994), que foi baseada principalmente em dados citogenéticos de mais de 500 espécies de formigas (IMAI e KUBOTA 1972; 1975; IMAI e TAYLOR 1989; IMAI *et al.* 1977; 1984). Segundo esta teoria, os cariótipos evoluíram no sentido de minimizar os riscos genéticos, devidos principalmente as translocações recíprocas. A fissão cêntrica reduziria esses riscos, por diminuir o tamanho dos cromossomos e conseqüentemente as interações entre si. Esse evento recorrente também tem como conseqüência o aumento do número de cromossomos e a geração de instabilidade na região quebrada, que passa a corresponder à região telomérica. Essa instabilidade seria recuperada pelo crescimento *em tandem* da heterocromatina, originando cromossomos com um dos seus braços heterocromáticos. Fusões cêntricas podem acontecer numa proporção menor, e teriam o papel de eliminar heterocromatina (IMAI *et al.* 2001). Os resultados das análises cariotípicas de *Leurotrigona* (POMPOLO e CAMPOS 1995), *Plebeia* (CAIXEIRO e POMPOLO 1999), *Tetragonisca* (MENEZES 1997) e *Frieseomelitta* (MOREIRA 1997) parecem indicar que a evolução cariotípica dos meliponíneos está de acordo com a teoria da 'interação mínima'.

1.2.3. Gênero *Melipona*

O gênero *Melipona* Illiger, 1806, faz parte da tribo Meliponini e apresenta distribuição na região Neotropical (MICHENER 2000). Como os demais gêneros da tribo, possui uma grande importância ecológica e econômicas devido à polinização de plantas nativas e cultivadas.

O número cromossômico do gênero *Melipona* foi igual ($n=9$ e $2n=18$) para 13 espécies. A única espécie que apresentou número cromossômico diferente foi *Melipona quinquefasciata* (KERR 1969, 1972; POMPOLO 1994). (Tab. 1).

ROCHA e POMPOLO (1998) observaram que o gênero *Melipona* apresentava espécies com diferenças no conteúdo e distribuição de heterocromatina. Com base nessas características dividiu o gênero em dois Grupos: I e II. No primeiro grupo incluíram as espécies que apresentaram cromossomos com morfologias meta, submeta e

acrocêntricas e com a heterocromatina distribuída na região pericentromérica ou no braço curto do acrocêntrico e com heteromorfismo de banda no primeiro par (*M. marginata*, *M. quadrifasciata*, *M. bicolor*, *M. asilvae*). No Grupo II foram incluídas as espécies que apresentaram heterocromatina distribuída em quase toda a extensão dos cromossomos, ficando a eucromatina restrita às extremidades. A morfologia foi de difícil definição, devido à intensidade da coloração da heterocromatina (*M. scutellaris*, *M. seminigra fuscopilosa*, *M. capixaba* e *M. captiosa*).

Os dados citogenéticos de *Melipona* não estão de acordo com a filogenia do gênero proposta por KERR *et al.* (1967), baseados em apenas dados morfológicos, eles propuseram a separação das espécies *M. marginata* e *M. quadrifasciata* (Grupo I) em diferentes grupos e a inclusão de *M. scutellaris*, (Grupo II) no grupo de *M. quadrifasciata* (Grupo I). A posição do gênero dentro da Tribo Meliponini também é controversa, MICHENER (2000) o considera como grupo irmão de todos meliponíneos enquanto CAMARGO e PEDRO (1992), como o grupo irmão dos meliponíneos apenas da região Neotropical.

Tabela 1 – Citogenética do gênero *Melipona*.

Nº	Espécie	Nº cromossômico	Referências
01	<i>Melipona marginata</i>	n=9, 2n=18	KERR 1948
		n=9, 2n=18	KERR 1952
		n=9, 2n=18	ROCHA e POMPOLO 1998
02	<i>M. bicolor</i>	n=9	KERR 1952
		n=9, 2n=18	ROCHA e POMPOLO 1998
03	<i>M. quadrifasciata</i>	n=9, 2n=18	KERR 1948
		n=9, 2n=18	KERR 1952
		n=9	KERR 1972
		n=9, 2n=18	TARELHO 1973
		n=9, 2n=18	ROCHA e POMPOLO 1998
04	<i>M. rufiventris</i>	n=9	KERR 1952
		2n=18	TARELHO 1973
05	<i>M. interrupta</i>	n=18	KERR 1952
06	<i>M. quinquefasciata</i>	n=18	KERR 1969
		n=9	KERR 1972

		2n=20	POMPOLO 1994
07	<i>M. compressipes</i>	n=9	KERR 1969
		n=9	KERR 1972
08	<i>M. subnitida</i>	n=9	KERR 1972
		n=9, 2n=18	TARELHO 1973
09	<i>M. favosa</i>	n=9, 2n=18	HOSHIBA 1988
		n=9, 2n=18	HOSHIBA e IMAI 1993
10	<i>M. asilvae</i>	n=9, 2n=18	ROCHA e POMPOLO 1998
11	<i>M. seminigra fuscopilosa</i>	n=9, 2n=18	ROCHA e POMPOLO 1998
12	<i>M. capixaba</i>	n=9, 2n=18	ROCHA e POMPOLO 1998
13	<i>M. captiosa</i>	n=9, 2n=18	ROCHA e POMPOLO 1998
14	<i>M. scutellaris</i>	n=9	ÁLMEIDA 1981
		n=9, 2n=18	ROCHA e POMPOLO 1998

2. OBJETIVOS

2.1. Justificativa

A citogenética gera conhecimentos básicos para a ciência, como, por exemplo, a detecção das alterações morfológicas, estruturais que ocorrem nos cromossomos ao longo do tempo. Esses dados são importantes ferramentas nos estudos da evolução e filogenia das espécies, por serem independentes de outros dados como os morfológicos e comportamentais. A vantagem da citogenética na elaboração da filogenia é devida principalmente ao fato dos seus caracteres serem discretos e facilmente reconhecíveis.

A maioria dos estudos citogenéticos do gênero *Melipona*, descreveu apenas o número cromossômico. Torna-se necessário ampliar o número de espécies estudadas citogeneticamente e aplicar técnicas que permitam um melhor entendimento da organização cariotípica. Esses dados poderão contribuir com o entendimento da evolução e da filogenia dessas abelhas.

2.2. Objetivos gerais

Considerando a grande importância do gênero *Melipona* no ecossistema neotropical e a grande diversidade no cariótipo deste gênero, com relação ao conteúdo e distribuição da heterocromatina, esse trabalho teve como objetivos: a ampliação do estudo citogenético do gênero *Melipona*; caracterizar mais detalhadamente a natureza da cromatina de diferentes espécies deste gênero com a aplicação de diferentes técnicas citogenéticas (banda C, banda NOR, coloração com fluorocromos, clivagem com enzimas de restrição); estudar a Região Organizadora do Nucléolo com a aplicação da FISH e poder comparar com os dados de NOR, fluorocromos e ER; estudar a ocorrência, natureza e frequência de cromossomos B no gênero.

Hereditas 136: 19-27 (2002)

**3.1 - DNA CHARACTERIZATION AND KARYOTYPIC EVOLUTION IN THE BEE GENUS
Melipona (HYMENOPTERA, MELIPONINI).**

MARLA PIUMBINI ROCHA¹⁻², SILVIA DAS GRAÇAS POMPOLO^{1*}, JORGE ABDALA
DERGAM³, ANDERSON FERNANDES¹, LUCIO ANTONIO DE OLIVEIRA CAMPOS¹.

¹Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, 36571-000 Viçosa,
MG, Brazil

²Departamento de Biologia Celular CP 6109, Universidade Estadual de Campinas
13083-970, Campinas-SP, Brazil

³Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal de Viçosa, 36571-000 Viçosa,
MG, Brazil

Abstract

We analyzed patterns of heterochromatic bands in the Neotropical stingless bee genus *Melipona* (Hymenoptera, Meliponini). Group I species (*Melipona bicolor bicolor*, *Melipona quadrifasciata*, *Melipona asilvae*, *Melipona marginata*, *Melipona subnitida*) were characterized by low heterochromatic content. Group II species (*Melipona capixaba*, *Melipona compressipes*, *Melipona crinita*, *Melipona seminigra fuscopilosa* e *Melipona scutellaris*) had high heterochromatic content. All species had $2n=18$ and $n=9$. In species of Group I heterochromatin was pericentromeric and located on the short arm of acrocentric chromosomes, while in Group II species heterochromatin was distributed along most of the chromosome length. The most effective sequential staining was quinacrine mustard (QM) / distamycin (DA)/ chromomycin A₃ (CMA₃)/ 4-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Heterochromatic and euchromatic bands varied extensively within Group I. In Group II species euchromatin was restricted to the chromosome tips and it was uniformly GC⁺. Patterns of restriction enzymes (*EcoRI*, *DraI*, *HindIII*) showed that heterochromatin was heterogeneous. In all species the first pair of homologues was of unequal size and showed heteromorphism of a GC⁺ pericentromeric heterochromatin. In *M. asilvae* (Group I) this pair bore NOR and in *M. compressipes* (Group II) it hybridized with an rDNA FISH probe. As for Group I species the second pair was AT⁺ in *M. subnitida* and neutral for AT and GC in the remaining species of this group. Outgroup comparison indicates that high levels of heterochromatin represent a derived condition within *Melipona*. The pattern of karyotypic evolution sets *Melipona* in an isolated position within the Meliponini.

Introduction

The genus *Melipona* Illiger, 1806, encompasses a group of stingless bees commonly known as 'indigenous bees'. They are widely distributed in the Neotropics. They are recognized as ecologically important pollinators of cultured (HEARD 1999) and wild plants (KERR et al. 1996).

So far, sixteen species have been analyzed cytogenetically. Fifteen of them are $2n=18$, and one is $2n=20$ (ALMEIDA 1981; HOSHIBA 1988; HOSHIBA and IMAI 1993; KERR 1948; 1952; 1972; KERR and SILVEIRA 1972; POMPOLO 1992, 1994; ROCHA and POMPOLO 1998; TAMBASCO et al. 1979).

ROCHA and POMPOLO (1998) applied C-banding on these bees. On the basis of the relative amount of heterochromatin of eight species of *Melipona*, they divided the species into two groups. Group I includes species characterized by low levels of heterochromatin such as *Melipona asilvae*, *Melipona bicolor bicolor*, *Melipona marginata*, and *Melipona quadrifasciata*. On the other hand, Group II includes species with high heterochromatin levels like *Melipona capixaba*, *Melipona captiosa*, *Melipona seminigra fuscopilosa*, and *Melipona scutellaris*. High heterochromatin contents have been reported for a few animal taxa such as Diplopoda (VITTURI et al. 1997), Coleoptera (BRUVO et al. 1995; JUAN and PETITPIERRE 1989; PLOHL et al. 1993), Hymenoptera (GOMES et al. 1998) and Amphibia (KING 1980; SCHMID et al. 1988).

Although the stingless bees have been considered to lack suitable cytogenetic markers that could be used to construct a phylogeny (MICHENER 1990), the patterns of distribution of heterochromatin in *Melipona* can contribute to the knowledge of the phylogeny of this genus (ROCHA and POMPOLO 1998). We shall here describe the heterochromatin/euchromatin ratio of species from both groups, define the nature of the heterochromatin by means of a combination of fluorochrome staining with different banding techniques, and propose a phylogeny for the tribe Meliponini.

Materials and Methods

Ten Brazilian *Melipona* species were cytogenetically studied (Table 1). We analyzed a mean of forty individuals per species, and five metaphases per specimen.

Mitotic metaphase spreads were obtained from cerebral ganglia of larvae in the final defecation stage (IMAI et al. 1988). Conventional Giemsa staining and C-banding were

carried out according to ROCHA and POMPOLO (1998), NOR banding followed HOWELL and BLACK (1980), with some modifications (MAFFEI et al. 2001).

Chromosome lengths were determined on four metaphase spreads of *M. bicolor bicolor* and *M. subnitida*, and values were compared to those of Group II species, *M. crinita*, *M. compressipes* and *M. seminigra fuscopilosa*. A mean value of linear length of euchromatic and heterochromatic regions was estimated with an ocular micrometer, and the euchromatin/heterochromatin ratio was calculated for each species.

Fluorochromes were applied sequentially as follows:

1. Distamycin/chromomycin A₃ (DA/CMA₃), according to SCHWEIZER (1980).
2. Distamycin/4-6-diamidino-2-phenylindole (DA/DAPI) according to SCHWEIZER (1980).
3. Distamycin / chromomycin A₃ / 4-6-diamidino-2-phenylindole (DA/CMA₃/DAPI) according to SCHWEIZER (1980). After DA/CMA₃ staining, slides were incubated in DAPI for 20 min, air dried and mounted on freshly filtered sucrose medium.
4. Quinacrine mustard/distamycin/chromomycin A₃/4-6-diamidino-2-phenylindole (QM/DA/CMA₃/DAPI). After staining with quinacrine mustard (SCHMID 1980), some slides were placed directly in McIlvaine's buffer (pH=7.0) for 20 min. Good quality metaphases were photographed, and the material was treated for DA/CMA₃/DAPI. For all sequential staining protocols, some slides were subjected to C-banding protocol (BS) (ROCHA and POMPOLO 1998) prior and after fluorochrome treatments.

Fluorescent in situ hybridization (FISH) followed VIEGAS-PÉQUIGNOT (1992) with a rDNA probe pDm 238. We also applied the following GIBCO-BRL restriction enzymes (RE): *EcoRI* (G↓AATTC), *DraI* (TTT↓AAA), *HindIII* (A↓AGGTT). We applied 30 µL of a solution containing 10 U (1 µL) of each enzyme dissolved in 9 µL of appropriate buffer and 90 µL of ultra pure water. The slide was covered with a coverslip and placed in a humid chamber for 12 h at 37°C, it was afterwards rinsed with tap water and stained with 3,3% Giemsa diluted in Sörensen buffer (0.06 M, pH 6.8).

Identification of homologues within species and putative homeologues among species of Group I was based on banding patterns and chromosome morphology, and band size was used as complementary criterion. Finally, we attempted to unveil the nature of chromatin by applying sequential fluorochrome staining.

Results and Discussion

Chromosome Number and Heterochromatin Content

All species had a chromosome number typical of the genus *Melipona*, with $2n=18$ and $n=9$ for females and males, respectively (Figs. 1, 2, 3, 4, 5). The chromosome number was determined for *M. compressipes* and *M. crinita* (Fig. 2). Typically, the diploid number of *Melipona* is highly conservative, except for *M. quinquefasciata*, which was reported to be $2n=20$ (POMPOLO 1994).

Variation of heterochromatin content was evident among these species, with heterochromatin/euchromatin percentage values ranging from 8% (*M. bicolor bicolor*) to 17% (*M. subnitida*) in the Group I species, a clear contrast with Group II species 54% (*M. crinita*), 61% (*M. compressipes*) and 73% (*M. seminigra fuscopilosa*). Based on these data, we define Group I as composed by species with less than 50% heterochromatin content, while Group II species have heterochromatin values typically higher than 50%. These latter heterochromatin/euchromatin ratios are higher than the ones reported for heterochromatin-rich karyotypes (BRUVO et al. 1995; PLOHL et al. 1993; VITTURI et al. 1997).

Furthermore, we observed that chromatin distribution also characterizes both groups; in Group I species the heterochromatin is pericentromeric and located on the short arm of acrocentric chromosomes (Fig. 1), while in Group II species the heterochromatin is distributed along most of the chromosome length, and the euchromatin is restricted to regions close to the telomeres (Figs. 2, 5).

Chromatin composition

For all species, the most effective staining sequence for heterochromatin characterization was QM/DA/CMA₃/DAPI. In Group I species, we were able to differentiate six kinds of heterochromatic bands (JOHN et al. 1985) (Table 2); B1 and B2 bands were complementary to each other, while B0, B3, B4 e B5 bands were less common than the former and were not complementary among themselves (Fig. 1, Table 3). We observed fluorochrome-stained euchromatic bands of B3 type in the seventh chromosome pair of *M. quadrifasciata* and the fifth pair of *M. subnitida* (Fig. 1, Table 3). Because B3 bands were detected with AT-specific fluorochromes, and they were neutral for GC-specific fluorochromes, we concluded that they are moderately AT-rich. JOHN et al. (1985) did not

find B3 and B4 bands in grasshoppers and they are characterized here for the first time in hymenopterans.

In *M. quadrifasciata*, BS-DA/CMA₃ and BS-DA/DAPI staining yielded a lower number of bands than slides not previously treated with BS-banding protocol, which may result from removal of euchromatin. The staining sequence BS-DA/CMA₃/DAPI provided similar results, e.g., a given heterochromatic region stained positive for CMA₃ and DAPI. This staining behavior may be explained also by the removal of DNA that stains positively for fluorochromes, or by an alteration of suitable conditions for fluorochrome staining. However, when applying the same sequential technique in Orthoptera, BELLA et al. (1993) obtained a complementary staining pattern. We concluded that our results might be more adequately explained by peculiar genomic characteristics of *Melipona*. Except for *M. asilvae*, we were unable to resolve the patterns of heterochromatic bands when BS-banding protocol was applied after fluorochrome staining.

The heterochromatin in chromosomes of Group I showed different staining intensity after C banding treatment (Fig. 1, Table 3). This behavior has also been reported for grasshoppers and may be explained by variations on the amount of heterochromatin among different regions (CAMACHO et al. 1984).

In Group I species, homologue pairing and homeologue identification among species were based on the presence of heterochromatic blocks in chromosomes. Thus, the GC-positive heterochromatic block in one pair of chromosomes of *M. subnitida* allowed us to identify as the homeologue of the first pair of chromosomes of the other species, despite the fact that it was not the largest of *M. subnitida*. This species was also karyotypically the most divergent, with interstitial heterochromatin and B3, B4 and B5 band types (Fig. 1, Table 3).

BS-banding patterns were similar for all Group I species. The application of different sequential staining protocols allowed determining the existence of a highly heterogeneous heterochromatin in *Melipona* (Figs. 1, 2, Table 3). Heterochromatin heterogeneity was first described in mouse (PARDUE and GALL 1970), and other organisms (BELLA et al. 1993; JOHN et al. 1985; MARTÍNEZ-LAGE et al. 1994; ROCCHI 1982).

In species of Group II sequential staining QM/DA/CMA₃/DAPI evidenced CMA₃ (GC⁺) euchromatic chromosome ends (Figs. 2c, 5d); QM and DAPI (both with AT affinity) stained heterochromatin uniformly (Figs. 2, 5). Staining patterns remained unaltered with either DA/CMA₃ or DA/CMA₃/DAPI sequential staining. Based on these data, we inferred

that both euchromatin and heterochromatin alike are moderately rich in GC and AT base pairs respectively.

Fluorochrome staining data were complemented with RE protocols. In Group II species, RE banding patterns allowed for accurate chromosome pairing and to characterize high levels of heterogeneity of heterochromatin in these species (data not shown).

The heterochromatic blocks of the first and second chromosome pairs of both species groups were heteromorphic. Because we did not observe all possible character state combinations, we did not consider it as an instance of band polymorphism as reported for other insects (PANZERA et al. 1992; SENTIS et al. 1986; WARCHALOWSKA-SLIWA and BUGROV 1997). In these bees, constant size differences suggest the existence of gene regulation between the homologues, possibly involving NORs, as reported in aphids (MANDRIOLI et al. 1999). For species of Group I, the heterochromatic block of the first chromosome pair was GC positive (Fig. 1). In *M. asilvae* this pair bore Ag-NOR (Fig. 3), as it was also the case for *M. marginata* (MAFFEI et al. 2001). A direct relationship between GC positive bands and NORs was reported in grasshoppers *Eyprepocnemis plorans* and *Locusta migratoria* (CAMACHO et al. 1991), the ant *Tapinoma nigerrimum* (LORITE et al. 1997), the bee *Tetragonisca angustula* (MENEZES 1997), and *Partamona helleri* (BRITO-RIBON et al. 1998). This region was also seen in the first chromosome pair of *M. compressipes* (a Group II species). Hybridization of this region with the rDNA probe provides further support its of NOR⁺ nature (Fig. 4) and its homology with the NOR of the first pair of chromosomes of Group I species. In these species, the second pair of homologues bore a block that was either GC⁺ or Ag-NOR⁺; this block was AT⁺ in *M. subnitida* and neutral in the other species (Fig. 1, Table 3).

Chromatin behavior

In species of Group II, we observed an unusual chromatin behavior. In most nuclei, the heterochromatic regions were located in the peripheral region of the nuclei, while euchromatin occupied the central region. Likewise, HSU (1975) reported that heterochromatin lines the interphasic nuclei in some species of mammals. Our data for species of Group II clearly indicate that this pattern of distribution of heterochromatin, as reported in interphasic nuclei is also extended to other stages of the cell cycle (Fig. 5).

Another striking behavior of the chromatin of Group II species was its strong tendency for euchromatic associations (Figs. 2, 5). As an apparent consequence of the spatial segregation of heterochromatin and euchromatin within the nucleus, we observed a close proximity among the euchromatic regions of the chromosomes in successive stages from late prophase to metaphase (Fig. 5). This association was observed either as an interchromosomal phenomenon when chromosomes were arranged as links of a chain or as an intrachromosomal event, which determined its "U" configuration (Figs. 2, 5b, 5c). Many hypotheses have been advanced to explain this chromosomal association, albeit involving heterochromatic regions (SUMNER 1990). In these species of *Melipona*, the nature of chromatin association seems related to euchromatic regions instead, and the conspicuous associations are provisionally explained by the rather restricted location of euchromatic regions isolated by vast extensions of heterochromatin.

Karyotypic evolution

Phylogenies based on morphologic data of *Melipona* are controversial. The genus has been considered either as the sister group of all Meliponini (MICHENER 2000) or alternatively, as the sister group of most Neotropical stingless bees (CAMARGO and PEDRO 1992). On a higher systematic level ROIG-ALSINA and MICHENER (1993) placed *Melipona* as the sister group of *Partamona* with *Apis* and *Bombus* as putative more inclusive sister groups. In *Apis* and *Partamona*, and in other genera of Meliponini, heterochromatin is predominantly located on one of the chromosome arms (ALVES and POMPOLO 1999; BRITO and POMPOLO 1997; BRITO et al. 1997; BRITO-RIBON et al. 1999a, b; CAIXEIRO et al. 1998; CAIXEIRO and POMPOLO 1999; HOSHIBA and IMAI 1993; MAMPUMBU et al. 1999; MENEZES 1997; MOREIRA and POMPOLO 1997; POMPOLO 1992;1994; POMPOLO and CAMPOS 1995) fitting IMAI'S minimum-interaction hypothesis (1986).

It has been postulated (KERR 1969) that Meliponini karyotypes evolved by alterations of ploidy levels. However, POMPOLO (1992, 1994) argued that the minimum interaction hypothesis (IMAI et al.1986) was necessary and sufficient as an explanatory model of karyotypic evolution for the Meliponini. Accordingly, one should expect that ancestral species showed low chromosome numbers, which would increase by recurrent fissions, with a later increase of heterochromatin in one of the arms of the chromosomes. Although this pattern is observed in most genera of Meliponini, *Melipona* does not fit this

model because it's low chromosome number, and the position of the heterochromatin (at least in Group I species), which is pericentromeric or it is present on the short arm of the chromosomes. On the other hand, in species of Group II the heterochromatin is present along most of the chromosome length and the euchromatin is restricted to the distal end of the chromosomes.

To determine character polarity of heterochromatin contents within the genus, we considered as outgroup the meliponine *Leurotrigona muelleri* (*Hypotrigona* sensu MICHENER 1990), $n=8$, $2n=16$ (POMPOLO and CAMPOS 1995). This species has a diploid number close to the species of *Melipona*, but its heterochromatin content and distribution resembles the ones observed in species of Group I and its chromatin does not show euchromatic associations. Based on these patterns of character distribution we hypothesized that high heterochromatin contents and unique chromatin (euchromatic) association, resulting in "U" or chain configuration are derived characters that characterize Group II species as a natural group or clade within *Melipona*. The increase in heterochromatin content may have evolved either via amplification of heterochromatic segments, or by heterochromatin addition. Within Meliponini, Group I does not display unique derived characters and it may be also evolutionarily more diverse, in contrast to the monophyletic Group II; mitochondrial DNA data also supports this hypothesis (Salomão unpubl.).

Acknowledgements

This work was supported by CNPq, CAPES and FAPEMIG (Proc. CBB 81090/97). We thank Dr. J.C.Pieczarka and Dr. C.R.Carvalho for helpful discussions, Dr. E.F.Moratto for providing some *Melipona* species and Mr. I.R.Stanciola for assistance in fieldwork. Dr S.M.Recco-Pimentel, K. A. Carvalho and Dr L.B. Lourenço for assistance in FISH.

References

- Almeida MG, (1981). Estudo sobre o número de cromossomos e contagem de espermatozoides na abelha *Melipona scutellaris*, Latreille, 1811. Ciênc. Cult. 33: 539-542.
- Alves VS, Pompolo SG, (1999). Análise citogenética comparativa de quatro gêneros de abelhas sem ferrão (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). Genet. Mol. Bio. 22: 28.

- Bella JL, Serrano L, Hewitt GM, Gonsálvez J, (1993). Heterochromatin heterogeneity and rapid divergence of the sex chromosomes in *Chorthippus parallelus parallelus* and *C. p. erythropus* (Orthoptera). *Genome* 36: 542-547.
- Brito RM, Pompolo SG, (1997). C; G patterns and fluorochromes staining with DAPI and CMA₃ in *Trigona spinipes* (Jurine, 1807) (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Rev. bras. Gen.* 20: 62
- Brito RM, Costa MA, Pompolo SG, (1997). Characterization and distribution of supernumerary chromosomes in 23 colonies of *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Braz. J. Gen.* 20: 185-188.
- Brito-Ribon RM, Pompolo SG, Martins MF, Barros EG, Sakamoto-Hojo ET, (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.
- Brito-Ribon RM, Miyazawa CS, Pompolo SG, (1999a). First karyotype characterization of four species of *Partamona* (Friese, 1980) (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) in Mato Grosso State, Brazil. *Cytobios* 100: 19-26.
- Brito-Ribon RM, França K, Miyazawa CS, (1999b). First cytogenetic data of eight stingless bee species (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) from cerrado areas of Mato Grosso State-Brazil. *Gen. Mol. Biol.* 22: 30.
- Bruvo B, Plohl M, Ugarkovic D, (1995). Uniform distribution of satellite DNA variants on the chromosomes of tenebrionid species *Alphitobius diaperinus* and *Tenebrio molitor*. *Hereditas* 123: 69-75.
- Caixeiro APA, Pompolo SG, (1999). Caracterização citogenética da heterocromatina constitutiva e sua implicação na evolução do cariótipo do gênero *Plebeia* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). *Gen. Mol. Biol.* 22: 31-32.
- Caixeiro APA, Brito-Ribon RM, Pompolo SG, (1998). Cytogenetic study of *Partamona peckolti* by C, GTC, NOR, DA/DAPI and DA/CMA₃ banding (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Gen. Mol. Biol.* 21: 48
- Camacho JPM, Viseras E, Navas J, Cabrero J, (1984). C-heterochromatin content of supernumerary chromosome segments of grasshoppers: detection of an euchromatic extra segment. *Heredity* 53: 167-175.

- Camacho JPM, Cabrero J, Viseras E, López-León MD, Navas-Castilho J, Alche JP, (1991). G banding in two species of grasshoppers and its relationship to C, N and fluorescence banding techniques. *Genome* 34: 638-643.
- Camargo JMF, Pedro SRM, (1992). Sistemática de Meliponinae (Hymenoptera, Apidae): sobre a polaridade e significado de alguns caracteres morfológicos. *Naturalia*, Ed. Esp.: 45-51.
- Gomes LF, Brito RM, Pompolo SG, Campos LAO, Peruquetti RC, (1998). Karyotype and C- and G-banding patterns of *Eufriesea violacea* (Hymenoptera, Apidae, Euglossinae). *Hereditas* 128: 73-76.
- Heard TA, (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 HT, (1993). Chromosome evolution of bees and wasps (Hymenoptera, Apocrita) on the basis of C-banding pattern analyses. *Jpn. J. Ent.* 61: 465-492.
- Howell WM, Black DA, (1980). Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36: 1014-1015.
- Hsu TC, (1975). A possible function of constitutive heterochromatin: the bodyguard hypothesis. *Genetics* 79: 137-150.
- Imai HT, Maruyama T, Gojobori T, Inoue Y, Crozier RH, (1986). Theoretical bases for karyotype evolution. The minimum-interaction hypothesis. *Amer. Nat.* 128: 900-920.
- Imai HT, Taylor RW, Crossland MWJ, Crozier RH, (1988). Modes of spontaneous chromosomal mutation and karyotype evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis. *Jpn. J. Genet.* 63: 159-185.
- John B, King M, Schweizer D, Mendelak M, (1985). Equilocality of heterochromatin distribution and heterochromatin heterogeneity in acridid grasshoppers. *Chromosoma* 91: 185-200.
- Juan C, Petitpierre E, (1989). C-banding and DNA content in seven species of Tenebrionidae (Coleoptera). *Genome* 32: 834-839.
- Kerr WE, (1948). Estudos sobre o gênero *Melipona*. *Anais da E. S. A. "Luiz de Queiroz"* 5: 182-276.
- Kerr WE, (1952). A variação do número de cromosomas na evolução dos Hymenoptera. *Sci. Genet.* 4: 182-190.

- Kerr WE, (1969). Some aspects of the evolution of the social bees. *Evol. Biol.* 3:119-175.
- Kerr WE, (1972). Numbers of chromosomes in some species of bees. *J. Kans. Entomol. Soc.* 45: 11-122.
- Kerr WE, Silveira ZW, (1972). Karyotype evolution of bees and corresponding taxonomic implications. *Evolution* 26: 197-202.
- Kerr WE, Carvalho GA, Nascimento VA, (1996). *Abelha Uruçu – Biologia, Manejo e Conservação*. Fundação Acangaú, Belo Horizonte.
- King M, (1980). C-banding studies on Australian hylid frogs: secondary constriction structure and the concept of euchromatin transformation. *Chromosoma* 80: 191-217.
- Lorite P, Aránega AE, Luque F, Palomeque T, (1997). Analysis of the nucleolar organizing regions in the ant *Tapinoma nigerrimum* (Hymenoptera, Formicidae). *Heredity* 78: 578-582.
- Maffei EMD, Pompolo SG, Silva-Junior JC, Caixeiro APA, Rocha MP, Dergam JA, (2001). Silver staining of nucleolar organizer regions (NORs) in some species of Hymenoptera (bees and parasitic wasp) and Coleoptera (lady-beetle). *Cytobios* 104: 119-125.
- Mampumbu AR, Aleixo LA, Maffei EMD, Pompolo SG, (1999). Análise da estrutura cariotípica de *Friesella schrottkyi* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini), da região de Viçosa Minas Gerais. *Gen. Mol. Biol.* 22: 29.
- Mandrioli M, Manicardi GC, Bizarro D, Bianchi U, (1999). NOR heteromorphism within a parthenogenetic lineage of the aphid *Megoura viciae*. *Chromos. Res.* 7: 157-162.
- Martínez-Lage A, González-Tizóz A, Méndez J, (1994). Characterization of different chromatin types in *Mytilus galloprovincialis* L. after C-banding, fluorochrome and restriction endonuclease treatments. *Heredity* 72: 242-249.
- Menezes MBF, (1997). Caracterização citogenética e análise da heterocromatina constitutiva em *Tetragonisca angustula angustula* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). Unpublished. Thesis for the degree of Magister os Science, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa. Brazil.
- Michener CD, (1990). Classification of the Apidae (Hymenoptera). *Univers. Kansas Scien. Bul.* 54: 75-164.
- Michener CD, (2000). *The bees of the world*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore and London.

- Moreira CMLC, Pompolo SG, (1997). Caracterização cariotípica de espécies do gênero *Frieseomelitta* Ihering, 1912 (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). Rev. Brasil. Gen. 20: 61.
- Panzer FCO, Alvarez F, Sanchez-Rufas J, Pérez R, Suja JA, Scvortzoff E, Dujardin JP, Estramil E, Salvatella R, (1992). C-heterochromatin polymorphism in holocentric chromosomes of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). Genome 35: 1068-1074.
- Pardue ML, Gall JG, (1970). Chromosomal localization of mouse satellite DNA. Science 168: 1356-1358.
- Plohl M, Lucijanac-Justic V, Ugarkovic D, (1993). Satellite DNA and heterochromatin of the flour beetle *Tribolium confusum*. Genome 36: 467-475.
- Pompolo SG, (1992). Estudos citogenéticos em Meliponinae. Naturalia Ed. Esp.: 62-66.
- Pompolo SG, (1994). Análise dos cariótipos de 19 gêneros de abelhas da subfamília Meliponinae. Anais do 1º Encontro sobre Abelhas 1: 143-146.
- Pompolo SG, Campos LAO, (1995). Karyotypes of two species of stingless bees, *Leurotrigona muelleri* and *Leurotrigona pusilla* (Hymenoptera, Meliponinae). Rev. Brasil. Genet. 18: 181-184
- Rocha MP, Pompolo SG, (1998). Karyotypes and heterochromatin variation (C-bands) in *Melipona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). Gen. Mol. Biol. 21: 41-45.
- Rocchi A, (1982). On the heterogeneity of heterochromatin. Caryologia 35:169-189.
- Roig-Alsina A, Michener CD (1993). Studies of the phylogeny and classification of long-tongued bees (Hymenoptera: Apoidea). Univers. Kansas Scien. Bul. 55: 123-173.
- Schmid M, (1980). Chromosome banding in Amphibia IV. Differentiation of GC- and AT-rich chromosome regions in Anura. Chromosoma 77: 83-103.
- Schmid M, Steinlein C, Feichtinger W, Almeida CG, Duellman WE, (1988). Chromosome banding in amphibia. XIII Sex chromosomes, heterochromatin and meiosis in marsupial frogs (Anura, Hylidae). Chromosoma 97: 33-42.
- 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.
- Sentis C, Santos J, Fernandez-Piqueras J, (1986). C-heterochromatin polymorphism in *Baetica ustulata*: intraindividual variation and fluorescence banding patterns. Chromosoma 94: 65-70.

- Sumner AT, (1990). Chromosome banding. Unwin Hyman, London.
- Tambasco AJ, Giannoni MA, Moreira LMA, (1979). Analyses of G-bands in chromosomes of the *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepeletier (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). Cytologia 44: 21-27.
- Viegas-Péquignot E, (1992). In situ hybridization to chromosomes with biotinylated probes. In: In situ hybridization: a practical approach. (ed D Wilkison) Oxford University Press, p. 137-158.
- Vitturi R, Colomba MS, Caputo V, Sparacio I, Barbieri R, (1997). High heterochromatin content in somatic chromosomes of two unrelated species of diplopoda (Myriapoda). Chromos. Res. 5: 407-412.
- Warchalowska-Sliwa E, Bugrov AG, (1997). C-heterochromatin variation in *Deracantha onos* (Pall.) (Deracanthini, Bradyporinae, Tettigoniidae, Orthoptera). Cytologia 62: 7-12.

Legends

Figure 1. Idiograms of the *M. bicolor bicolor* **A**, *M. quadrifasciata* **B**, *M. marginata* **C**, *M. asilvae* **D**, and *M. subnitida* **E** karyotypes, based on C-banding and sequential staining patterns. Dark blocks: B0. Checkered circles: B1. Gray blocks: B2. Vertical stripes: B3. Gray vertical stripes: B4. Black oblique stripes: B5. ★Band polymorphism.

Figure 2. Metaphases of females of *M. crinita* subject to C-Banding **a** and sequential staining with QM **b** /DA/CMA₃ **c**/DAPI **d** fluorochromes. Arrowheads indicate CMA₃⁺ regions; * indicates interphasic nucleus and arrows indicate euchromatic associations. Scale bar = 5 µm.

Figure 3. Ag-NOR metaphase of *M. asilvae*. Arrows indicate NOR sites. Scale bar = 5 µm.

Figure 4. Metaphase of *M. compressipes* after treatment with FISH rDNA probe. Arrowheads indicate hybridized regions, * indicates interphasic nucleus. Scale bar = 5 µm.

Figure 5. Mitotic cells of *Melipona* in different division stages. a - 1, 2 and 3, cells of males of *M. seminigra fuscopilosa* in successive division stages after C-banding protocol. DAPI-stained prometaphase cells of female of *M. seminigra fuscopilosa* (u indicates U-shaped chromosome) (b); metaphase of female *M. scutellaris* stained with DAPI (c); metaphase of male *M. capixaba* stained with CMA₃ (d). Arrowhead indicates CMA₃⁺ region, * indicates interphasic nucleus; arrows indicate euchromatic associations. Scale bar = 5 µm.

Table 1. Samples locales of *Melipona*

Species	Locals
<i>Melipona asilvae</i>	Pedra de Maria da Cruz – MG and Santana do Seridó – RN
<i>Melipona bicolor bicolor</i>	Caeté and Cunha – MG
<i>Melipona capixaba</i>	Venda Nova do Imigrante - ES
<i>Melipona compressipes</i>	São Luis – MA
<i>Melipona crinita</i>	Rio Branco – AC
<i>Melipona marginata</i>	Caeté – MG
<i>Melipona quadrifasciata</i>	Caeté and Viçosa – MG
<i>Melipona seminigra</i>	Rio Branco – AC
<i>fuscopilosa</i>	-
<i>Melipona scutellaris</i>	Lençóis – BA
<i>Melipona subnitida</i>	Santana do Seridó – RN

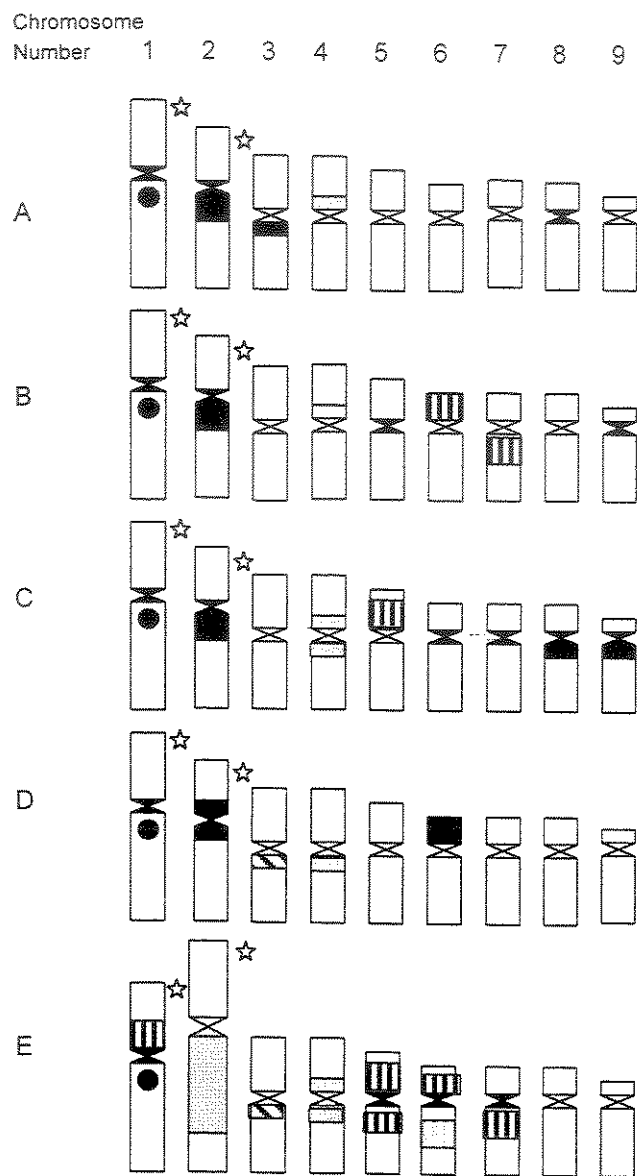
Table 2. Kinds of heterochromatic bands, based on fluorochrome affinities

Kind of band	GC specific (CMA ₃)	AT specific (DAPI and QM)
B0	Neutral	Neutral
B1	Positive	Negative
B2	Negative	Positive
B3	Neutral	Positive
B4	Neutral	Negative
B5	Positive	Positive

Table 3. Position and nature of bands of five species of *Melipona* bees.

Chromosome numbers	<i>M. bicolor</i>	<i>M. quadrifasciata</i>	<i>M. marginata</i>	<i>M. asilvae</i>	<i>M. subnitida</i>
1	P*(B1)	P*(B1)	P*(B1)	P*(B1)	P*(B3, B1)
2	PW*(B0)	P*(B0)	P*(B0)	P*(B0)	PI*(B2)
3	PW(B0)	A	A	PW(B5)	P(B5)
4	PW(B2)	P(B2)	P(B2)	P(B2)	PW(B2)
5	A	PW(B0)	PW(B3)	A	P(B3)-E(B3)
6	A	C(B0)	PW(B0)	C(B0)	P(P-B3,I-B4)
7	A	A-E(B3)	PW(B0)	A	PW(B3)
8	PW(B0)	A	PW(B0)	A	A
9	A	PW(B0)	P(B0)	A	A

A – absence of C banding; **E** - euchromatic band; **P** – pericentromeric C banding; **C** – C banding restricted to short arm; **I** – interstitial C banding; **W** – weakly stained C banding. Kinds of bands: **(B0)**, **(B1)**, **(B2)**, **(B3)**, **(B4)** and **(B5)**; * - occurrence of band heteromorphism.



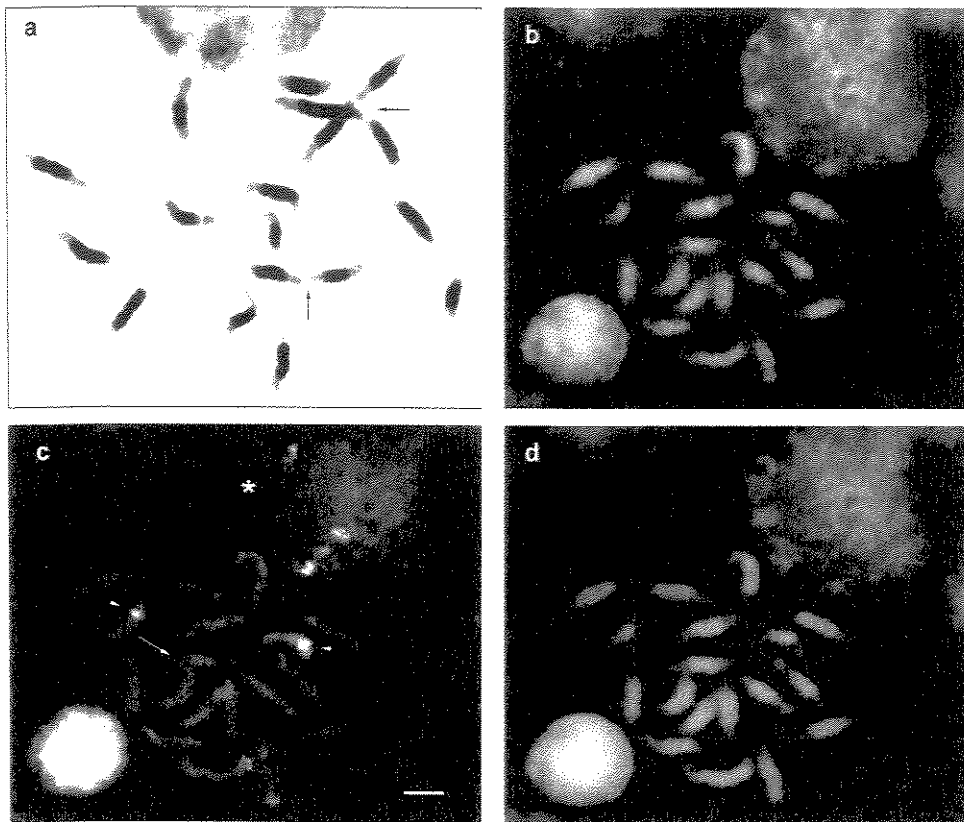


Figura 2

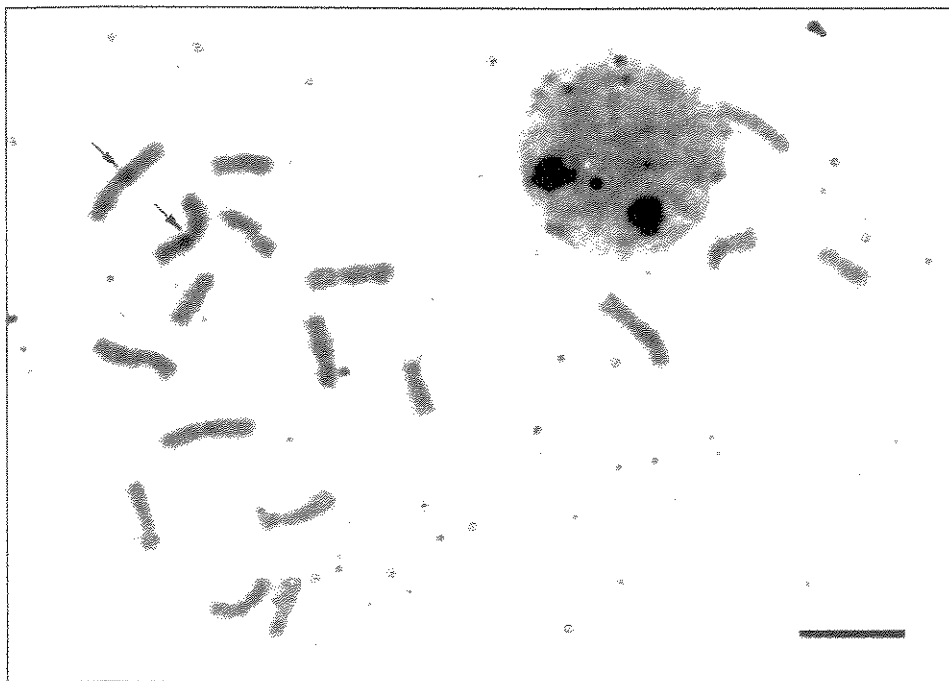


Figura 3

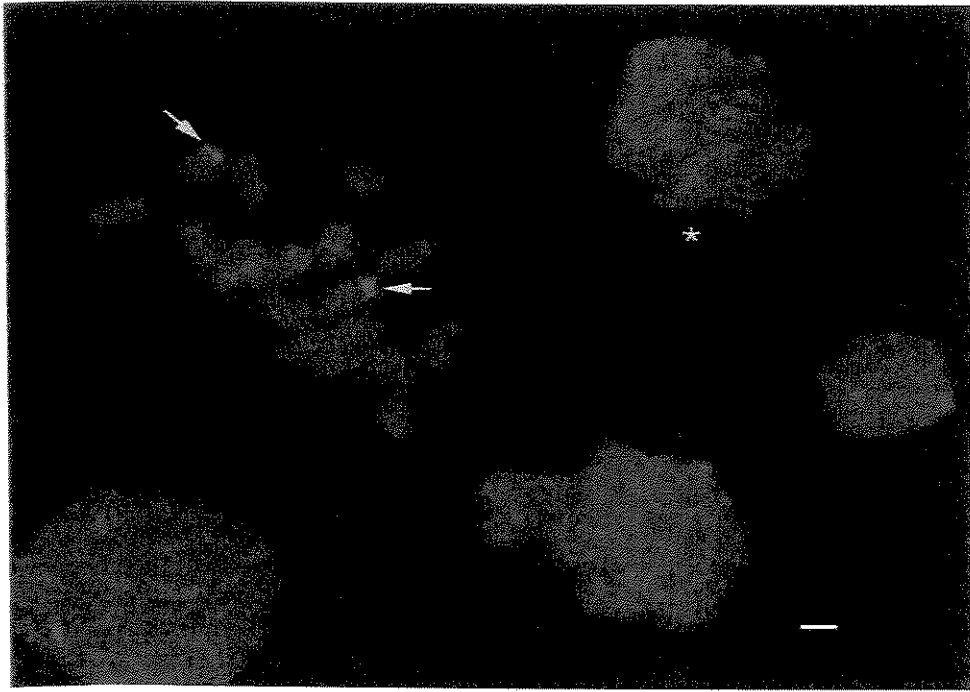


Figura 4

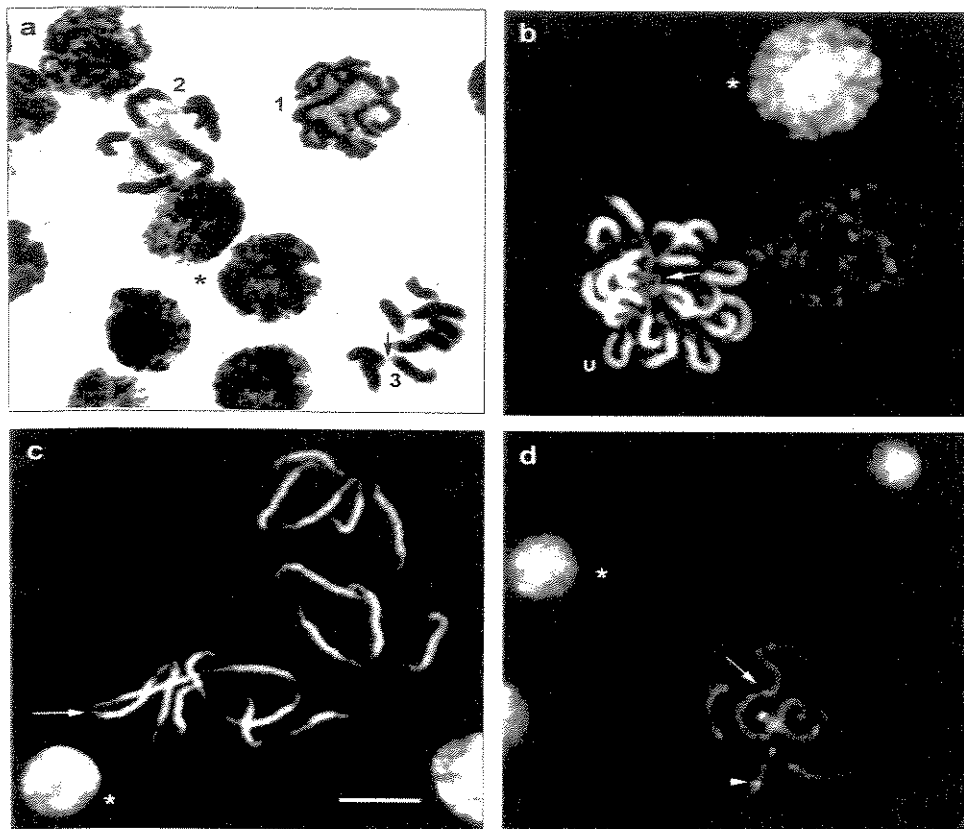


Figura 5

3.2 - CROMOSSOMOS B EM ABELHA NEOTROPICAL *Melipona quinquefasciata* (HYMENOPTERA, MELIPONINI).

ROCHA, M. P.^{1*}, FERNANDES, A.², ARAÚJO, S. M. R.³, POMPOLO, S. G.².

¹ – Universidade Estadual de Campinas, Deptº Biologia Celular, 13.084.580

² – Universidade Federal de Viçosa, Deptº Biologia Geral, 36.571.000

³ – Creighton University, Osteoporosis Research Center, Ohio - EUA

Cromossomo B em *Melipona quinquefasciata*

Palavras chaves: Cromossomo B, *Melipona*, Meliponini, enzimas de restrição, FISH, rDNA

* - Correspondência - Universidade do Estado do Mato Grosso, Deptº Biologia Geral, Tangará da Serra, MT – Brasil, 78.300.000. marlapi@yahoo.com.br

RESUMO

A citogenética do gênero *Melipona* iniciou-se em 1948, das 42 espécies descritas, 16 foram estudadas citogeneticamente e todas apresentaram $n=9$ e $2n=18$, exceto *Melipona quinquefasciata*. Este trabalho teve como objetivo diferenciar os cromossomos de *M. quinquefasciata* por meio de técnicas citogenéticas clássicas e moleculares como a FISH, clivagem com as enzimas de restrição (ER): *DraI* e *HaeIII* coloração seqüencial com os fluorocromos QuinacrinaMostarda/Distamicina/Cromomicina- A_3 /4-6-Diamidino-2-Phenylindole (QM/DA/CMA $_3$ /DAPI) e banda C. O número cromossômico variou de $2n=19$ a 22 (fêmeas) e de $n=9$ a 13 (machos). Os cromossomos 'extras' foram heterocromáticos, menores que os cromossomos do complemento A e apresentaram variação intra-individual. Essas características provaram a existência de um sistema de cromossomos B. Após a coloração com fluorocromos, eles foram corados com fluorocromos AT específicos e não foram clivados pelas enzimas de restrição. Foram semelhantes aos cromossomos das espécies com alto conteúdo heterocromático, que foram classificadas como Grupo II. Observou-se 3 tipos de cromossomos B: acrocêntrico totalmente heterocromático, e submetacêntricos com o braço menor heterocromático ou eucromático. Os cromossomos do complemento A apresentaram bandas AT $^+$ nos pares 1, 2, 4 e 7. A Região Organizadora de Nucléolos foi visualizada, na região pericentromérica do primeiro par após a marcação da FISH com sonda de rDNA A NOR, também foi corada com CMA $_3$ (GC $^+$) e clivada pela enzima *HaeIII*. A localização da NOR, conteúdo e distribuição da heterocromatina do complemento A de *M. quinquefasciata* foi muito semelhante aos dados das espécies do Grupo I de *Melipona* (baixo conteúdo heterocromático). Inferimos que os cromossomos B podem ter se originado a partir da amplificação da heterocromatina rica em pares AT, em cromossomos de uma espécie semelhante às espécies com baixo conteúdo heterocromático (Grupo I) ou por mecanismos de origem interespecífica.

Introdução

Os meliponíneos, também conhecidos como abelhas 'indígenas' ou 'sem ferrão', ocupam grande parte das regiões de clima tropical do planeta. São de grande interesse econômico, devido a sua importância como agentes polinizadores e produtores de mel (MICHENER 2000).

Melipona, o primeiro gênero de meliponíneos estudados em nível citogenético (KERR 1948), atualmente apresenta 16 espécies com cariótipo descrito. ROCHA e POMPOLO (1998) e ROCHA *et al.* (2002) demonstraram uma variação no conteúdo e distribuição de heterocromatina entre as espécies, o que permitiu dividir o gênero em dois Grupos, I e II. No primeiro grupo estão as espécies que apresentaram cromossomos com morfologias meta, submeta e acrocêntricas; e a heterocromatina distribuída na região pericentromérica ou no braço curto do acrocêntrico (*M. marginata*, *M. quadrifasciata*, *M. bicolor*, *M. asilvae*, *M. subnitida*). No Grupo II foram incluídas *M. scutellaris*, *M. seminigra fuscopilosa*, *M. capixaba*, *M. captiosa*, *M. crinita* e *M. compressipes*, que apresentaram heterocromatina distribuída em quase toda a extensão dos cromossomos, ficando a eucromatina restrita às extremidades. A morfologia foi de difícil definição, devido à sua natureza heterocromática.

De todas espécies estudadas, apenas *Melipona quinquefasciata* não apresentou o mesmo número cromossômico ($n=9$ e $2n=18$). Foram observados indivíduos com números cromossômicos de $2n= 20$ (POMPOLO 1994) e $n= 9, 10$ e 18 , que foi considerado macho diplóide (KERR 1972; TARELHO 1973).

Os cromossomos B ou supranumerários são extras ao complemento normal do indivíduo. Suas características são as mesmas em quase todos os organismos: heterocromáticos, menores que os cromossomos do complemento A e com segregação não-mendeliana (CAMACHO *et al.* 2000). Os cromossomos B são encontrados nos mais diferentes organismos (JAMILENA *et al.* 1995, SALVADOR e MOREIRA-FILHO 1992, BEUKEBOOM *et al.* 1996; MARTINS *et al.*, 1996, Houben *et al.* 1999, GORLOV e TSURUSAKI 2000; TANIC *et al.* 2000). Na ordem de insetos Hymenoptera, foi descrito em oito espécies de formigas, *Leptothorax spinosior* (IMAI 1974), *Aphaenogaster rudis* (CROZIER 1975), *Podomyrma adelaide* (IMAI *et al.* 1977), *Predolepis jerdoni* e *Pseudolacius* sp2 (IMAI *et al.* 1984), *Lasius niger* (PALOMEQUE *et al.* 1990), *Pheidole pallidula* (LORITE *et al.* 2000), *Camponotus* sp.(MARIANO *et al.* 2001), em duas vespas,

Nasonia vitripennis (WERREN 1991) e *Trypoxylon albitarse* (ARAÚJO *et al.* 2000) e uma espécie de abelha, *Partamona helleri* (COSTA *et al.* 1992).

Neste trabalho nós apresentamos os primeiros estudos de bandamentos cromossômicos em *Melipona quinquefasciata*, evidências a respeito da existência de um sistema de cromossomos B, como a possível origem e evolução desses cromossomos.

Materiais e Métodos

Espécimes de *M. quinquefasciata* foram coletadas nas cidades de Brasília - DF (15°46'LS, 47°55' LW) e Luziânia – GO (16°15'LS, 47°57' LW) nos anos de 1998 e 1999, respectivamente. Foi coletada uma colônia em cada localidade e um total de 69 larvas, sendo 10 indivíduos (fêmeas) de Brasília e 59 (46 fêmeas e 13 machos) de Luziânia (anexo 1).

Para obtenção de cromossomos metafásicos, utilizou-se a técnica de IMAI *et al.* (1988). A técnica para obtenção de banda C (BSG) foi realizada segundo ROCHA e POMPOLO (1998). A coloração seqüencial com fluorocromos Quinacrina Mostarda/Cromomicina A₃/4,6-Diaminofenilindole (QM/CMA₃/DAPI) foi segundo ROCHA *et al.* (2002). A FISH foi realizada segundo a técnica de VIEGAS-PÉQUIGNOT (1992), usando a sonda 45S de *Drosophila*, rDNA pDm 238 (ROIHA *et al.* 1981).

Utilizou-se as enzimas de restrição *Hae*III (GC↓GC) e *Dra*I (AAA↓TTT). As ER foram diluídas em tampão (1μL de enzima em 9μL do tampão) e posteriormente diluídas em 80 mL de água Milli-Q. Cada lâmina recebeu 30μL da solução final contendo 10U e foi incubada durante 12 horas em câmara úmida à 37°C. Após a lavagem em água corrente, as lâminas foram coradas com Giemsa ou Quinacrina Mostarda. A coloração com o fluorocromo Quinacrina Mostarda (QM) foi realizada de acordo com SCHMID (1980).

Resultados e Discussão

O número cromossômico de *M. quinquefasciata* varia de 2n=19 a 22 (fêmeas) e de n=9 a 13 (machos). Essa variação numérica foi encontrada em células de gânglio cerebral de um mesmo indivíduo e foi ocasionada pela presença de cromossomos B. O número de cromossomos do complemento A foi de 18 (fêmea) e 9 (macho) e o número de cromossomos B variou de 1 a 4 e de 0 a 4, respectivamente (Figs. 1, anexo 1). Verifica-se que o número de espécies que apresentam cromossomos B aumenta na medida que

novas espécies são estudadas citogeneticamente (CAMACHO *et al.* 2000). Dentre as abelhas sem ferrão, *Melipona* foi o segundo gênero com cromossomos B e das 18 espécies do gênero estudadas citogeneticamente, foi a única que apresentou esse tipo de cromossomo.

Os cromossomos do complemento A, apresentaram morfologias meta, submeta e acrocêntricas (Figs. 1A, 2). Pela técnica de banda C, a heterocromatina esteve evidente apenas no 1º par, com posição pericentromérica e apresentando um heteromorfismo de tamanho (Fig. 1B). Essa heterocromatina corresponde à Região Organizadora de Nucléolos, pois foi clivada pela *HaeIII* (Fig. 1C) evidenciada pela CMA₃ (Figs. 1G) e marcada com sonda de rDNA (Fig. 3). A coloração com os fluorocromos QM e DAPI evidenciou uma região rica em pares de bases AT * localizada adjacente a NOR. Essa banda também esteve presente nos pares 2, 4 e 7 (Figs. 1E, F) e não foram clivadas pela *ER* (Figs. 1C, D).

O complemento A de *M. quinquefasciata* apresentou-se semelhante ao cariótipo das espécies do Grupo I de *Melipona* (baixo conteúdo de heterocromatina) discutidos por ROCHA *et al.* (2002), em aspectos como a morfologia cromossômica, localização da NOR, conteúdo e distribuição da heterocromatina. Dentre as espécies estudadas por ROCHA *et al.* (2002), esta espécie apresentou maior semelhança com *Melipona subnitida*, considerada como a mais divergente do Grupo I.

Os cromossomos B de *M. quinquefasciata* possuem características comuns aos cromossomos B da maioria dos organismos por serem heterocromáticos e com segregação não-mendeliana (Figs. 1, 2). Esse tipo de segregação foi caracterizado pela variação intra-individual em células de gânglio cerebral de fêmeas e machos de *M. quinquefasciata*. Segundo PROENÇA *et al.* (1999), a existência de variação intra-individual sugere uma não-disjunção somática. Outros tipos de variações já foram identificados para outros organismos: interpopulacional (TSURUSAKI 1993, STEVENS e BOUGOURD 1994, VICENTE *et al.* 1996, BRITO *et al.* 1997, BEUKEBOOM *et al.* 1998, BLACKMAN 1988), interespecífica (AMOS e DOVER 1981, BLACKMAN 1988, MARTINS *et al.* 1996), intersexual (PAULS e BERTOLLO 1983, MARYANSKA-NADACHOWSKA e WARCHALOWSKA-SLIWA 1991, MARTINS *et al.* 1996, VICENTE *et al.* 1996, PROENÇA *et al.* 1999, MAFFEI *et al.* 2000, MESTRINER *et al.* 2000), intertecidual (DAGNE 1995, IMAI 1974, PALOMEQUE *et al.* 1990), geográfica (TSURUSAKI 1993, VICENTE *et al.*

1996, BEUKEBOOM *et al.* 1998, HOUBEN *et al.* 1999, NÉO *et al.* 2000, ARAÚJO *et al.* 2002) e sazonal (GORLOV e TSURUSAKI 2000).

A morfologia dos cromossomos B foi de difícil definição, devido a sua natureza heterocromática. Contudo, a análise de metáfases menos condensadas permitiu um estudo mais detalhado da sua morfologia e revelou a presença de diferentes tipos de cromossomos B. Observou-se cromossomos B acrocêntricos totalmente heterocromáticos (1) e submetacêntricos, com o braço menor heterocromático (2) ou eucromático (3) (Figs. 1, 2).

Verificou-se que os cromossomos B são ricos em pares de bases AT (Figs. 1E, F, G, 2) e aparentemente não foram clivados pelas ER (Figs. 1C, D). Os cromossomos B apresentam constituição molecular e a distribuição da heterocromatina semelhantes aos cromossomos das espécies do Grupo II (alto conteúdo heterocromático).

Baseados nos dados citogenéticos de *M. quinquefasciata*, sugerimos que, tanto para cromossomos B quanto para o alto conteúdo de heterocromatina, os mesmos mecanismos de evolução cariotípica estão envolvidos.

Uma hipótese sobre a origem dos cromossomos B em *M. quinquefasciata* seria por amplificação e posterior clivagem da heterocromatina rica em pares AT, em cromossomos de uma espécie semelhante às espécies do Grupo I. Esse processo poderia ter ocorrido em alguma espécie cariotipicamente semelhante a *Melipona subnitida* (ROCHA *et al.* 2002), pois esta abelha além de apresentar maior semelhança entre o seu cariótipo e o complemento A de *M. quinquefasciata*, ela possui um grande bloco heterocromático AT no segundo par, que diante das técnicas citogenéticas utilizadas se comportou semelhante ao cromossomo B (FERNANDES com. pessoal). A maioria dos estudos sobre cromossomos B sugere que eles tiveram origem intra-específica (JAMILENA *et al.* 1995; PROENÇA *et al.* 1999; ARAÚJO *et al.* 2000). A origem interespecífica seria possível através de uma transferência horizontal, ou seja, pelo cruzamento entre espécies dos Grupos I e II. Este tipo de origem envolveria um menor número de passo, ou seja, mais parcimonioso. Na literatura, este tipo de origem está baseado principalmente nos dados citogenéticos e moleculares da vespa *Nasonia vitripennis* (McALLISTER e WERREN 1997).

Referências

- 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., 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., SEIF, M., METTENMWYWE, T., PLOWMAN, A. B., MICHIELS, N. 1996. Paternal inheritance of B chromosomes in a parthenogenetic hermaphrodite. *Heredity* **77**: 646-654.
- BEUKEBOOM, L. W., SHARBEL, T. F., MICHIELS, N. K. 1998. Reproductive modes, ploidy distribution, and supernumerary chromosome frequencies of the flatworm *Pollicelis nigra* (Platyhelminthes: Tricladida). *Hydrobiologia* **383**: 277-285.
- BLACKMAN, R. L. 1988. Stability of a multiple X chromosome system and associated B chromosomes in birch aphids (*Euceraaphis* spp.; Homoptera: Aphididae). *Chromosoma* **96**: 318-324.
- 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). *Braz. J. Gen.* **20**: 185-188.
- CAMACHO, J. P. M., SHARBEL, T. F., BEUKEBOOM, L. W. 2000. B-chromosome evolution. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **355**: 163-178.
- 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.
- CROZIER, R. H. 1975 *Hymenoptera* (In: Animal cytogenetics, Insecta, 7 B. John ed. Gebruder Borntraeger, Berlin).
- DAGNE, K. 1995. Mitotic and meiotic behavior of B-chromosomes of *Guizotia scabra* (Vis.) Chio. ssp *scabra* (Compositae). *Caryologia* **48**: 35-45.
- GORLOV, I. P., TSURUSAKII, N. 2000. Analysis of the phenotypic effects of B chromosomes in a natural population of *Metagagrella tenuipes* (Arachnida: Opiliones). *Heredity* **84**: 209-217.

- HOUBEN, A., THOMPSON, N., AHNE, R., LEACH, C. R., VERLIN, D., TIMMIS, J. N. 1999. A monophyletic origin of the B chromosomes of *Brachycome dichromosomatica* (Asteraceae). *Plant Syst. Evol.* **219**: 127-135.
- IMAI, H. T. 1974. B-chromosomes in Myrmicine ant *Leptothorax spinosior*. *Chromosoma* **45**: 431-414.
- IMAI, H. T., CROZIER, R. H., TAYLOR, R. W. 1977. Karyotype evolution in Australian ants. *Chromosoma* **53**: 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 Malasya. *Ann. Rep. Natl. Inst. Genet.* **34**: 66-69.
- IMAI, H. T.; TAYLOR, R. W.; CROSSLAND, M. W. J., CROZIER, R. H. 1988. Modes of spontaneous evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis. *Jpn. J. Genet.* **63**: 159-185.
- JAMILENA, M., GARRIDO-RAMOS, M., RUÍZ-REJÓN, M., PARKER, J. S. 1995. Characterization of repeated sequences from microdissected B chromosomes of *Crepis capillaris*. *Chromosoma* **104**: 113-120.
- KERR, W. E. 1948. Estudos sobre o gênero *Melipona*. *Anais da E. S. A. "Luiz de Queiroz"* **5**: 182-276.
- KERR, W. E. 1972. Numbers of chromosomes in some species of bees. *J. Kans. Entomol. Soc.* **45**: 11-122.
- LORITE, P., CARRILLO, J. A., GARCÍA, M. F., PALOMEQUE, T. 2000. Chromosome numbers in Spanish Formicidae III. Subfamily Myrmicinae (Hymenoptera). *Sociobiology* **36**: 555-570.
- MAFFEI, E. M. D., GASPARINO, E., POMPOLO, S. G. 2000. Karyotypic characterization by mitosis, meiosis and C-banding of *Eriopis connexa* Mulsant (Coccinellidae: Coleoptera: Polyphaga), a predator of insect pest. *Hereditas* **132**: 79-85.
- MARIANO, C. S. F.; POMPOLO, S. G., DELABIE, J. H. C., CAMPOS, L. A. O. 2001. Estudos cariotípicos de algumas espécies neotropicais de *Camponotus* Mayr (Hymenoptera, Formicidae). *Rev. Brasil. Entomol.* **45**: 267-274.
- MARTINS, C., GIULIANA-CAETANO, L., DIAS, A. L. 1996. Occurrence of a B chromosome in *Cyphocharax modesta* (Pisces, Curimatidae). *Cytobios* **85**: 247-253.

- MARYANSKA-NADACHOWSKA, A., WARCHALOWSKA-SLIWA, E. 1991. The B-chromosome in the karyotype of *Tetrix tenuicornis* (Sahlb.) (Tetrigidae: Orthoptera). *Genetica* **83**: 125-129.
- MCALLISTER, B. F., WERREN, J. H. 1997. Hybrid origin of a B chromosome (PSR) in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. *Chromosoma* **106**: 243-253.
- MESTRINER, C. A., GALETTI, J. R. P. M., VALENTINI, S. R., RUIZ, I. R. G., ABEL, L. D. S., MOREIRA-FILHO, O., CAMACHO, J. P. M. 2000. Structural and functional evidence that a B chromosome in the characid fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. *Heredity* **85**: 1-9.
- MICHENER, C. D. 2000. The bees of the world. The Johns Hopkins University Press, USA.
- NÉO, D. M., MOREIRA-FILHO, O., CAMACHO, J. P. 2000. Altitudinal variation for B chromosome frequency in the characid fish *Astyanax scabripinnis*. *Heredity* **85**: 136-141.
- PALOMEQUE, T., CHICA, E., GUARDIA, R. D. 1990. Karyotype, C-banding, chromosomal location of active nucleolar organizing regions, and B-chromosomes in *Lasius niger* (Hymenoptera, Formicidae). *Genome* **33**: 267-272.
- PAULS, E., BERTOLLO, L. A. C. 1983. Evidence for a system of supernumerary chromosomes in *Prochilodus scrofa* steindachner, 1881 (Pisces, Prochilodontidae). *Caryologia* **36**: 307-314.
- POMPOLO, S. G. 1994. Análise dos cariótipos de 19 gêneros de abelhas da subfamília Meliponinae. *Anais do 1º Encontro sobre. Abelhas* **1**: 143-146.
- PROENÇA, S. J. R., COLLARES-PEREIRA, M. J., SERRANO, A. R. M. 1999. Karyological study of *Cicindelidia trifasciata* (Coleoptera, Cicindelidae) from Cuba: evidence of B chromosomes. *Genet. Mol. Biol.* **22**: 45-48.
- ROCHA, M. P., POMPOLO, S.G. 1998. Karyotypes and heterochromatin variation (C-bands) in *Melipona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Gen. 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 the bee genus *Melipona* (Hymenoptera, Meliponini). *Hereditas* **136**: 19-27.

- 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.
- SALVADOR, L. B., MOREIRA-FILHO, O. 1992. B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Heredity* **69**: 50-56.
- STEVENS, J. P., BOUGOURD, S. M. 1994. Unstable B-chromosomes in a European population of *Allium schoenoprasum* L. (Liliaceae). *Biol. J. Linnean Soc.* **52**: 357-363.
- SCHMID, M. 1980. Chromosome banding in Amphibian IV. Differentiation of GC- and AT-rich chromosome regions in Anura. *Chromosoma* **77**: 83-103.
- TANIC, N., DEDOVIC, N., VUJOSEVIC, M., DIMITRIJEVIC, B. 2000. DNA profiling of B chromosomes from the yellow-necked mouse *Apodemus flavicollis* (Rodentia, Mammalia). *Gen. Res.* **10**: 55-61.
- TARELHO, Z. V. S. 1973. Contribuição ao estudo citogenético dos Apoidea. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- TSURUSAKI, N. 1993. Geographic variation of the number of B-chromosome in *Metagagrella tenuipes* (Opiliones, Phalangidae, Gagrellinae). *Mem. Queensl. Mus.* **3**: 695-665
- VICENTE, V. E., MOREIRA-FILHO, O., CAMACHO, J. P. M. 1996. Sex-ratio distortion associated with the presence of a B chromosome in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae). *Cytogen. Cell Genet* **74**: 70-75.
- VIEGAS-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.
- WERREN, J. H. 1991. The paternal-sex-ratio chromosome of *Nasonia*. *Amer. Natur.* **142**: 224-241.

Legendas das Figuras

Figura 1 – Cariogramas de *Melipona quinquefasciata*. A - Coloração convencional ($2n = 18 + 2Bs$); B - Banda C ($2n = 18 + 2Bs$); C - Tratamento com *HaeIII*-Giemsa ($2n = 18 + 1B$). D - Tratamento com *DraI*-QM ($2n = 18 + 4B$), E, F, G - Coloração sequencial com fluorocromos: QM, DA/DAPI, /CMA₃, respectivamente ($2n = 18 + 3 Bs$). Barra: 5µm.

Figura 2 - Ideograma do complemento A e dos cromossomos B de *M. quinquefasciata*, baseado em banda C e coloração sequencial (QM/DA/CMA₃/DAPI e FISH). Círculo preto: NOR; Bloco cinza: regiões ricas em AT; Listras pretas: regiões moderadamente ricas em AT. * polimorfismo de banda.

Figura 3 – Metáfase de *Melipona quinquefasciata* com $2n: 18 + 2Bs$ pela técnica de FISH. Setas indicam NOR em 2 cromossomos. Barra: 5µm.

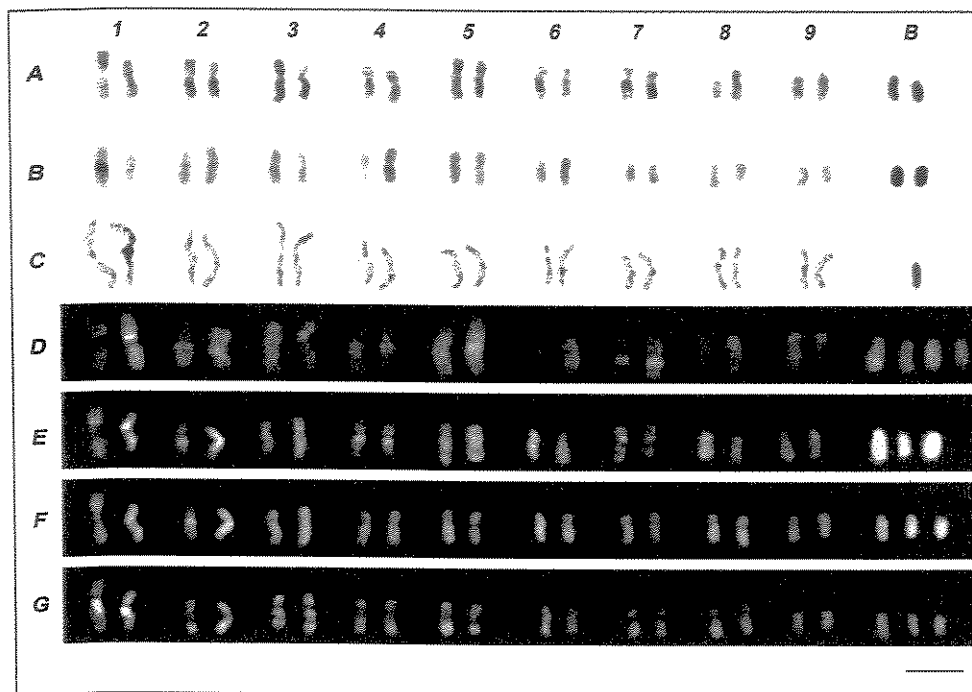


Figura 1

Cromossomo
 Numero 1 2 3 4 5 6 7 8 9 B

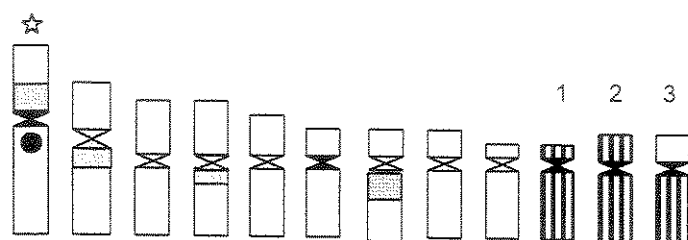


Figura 2

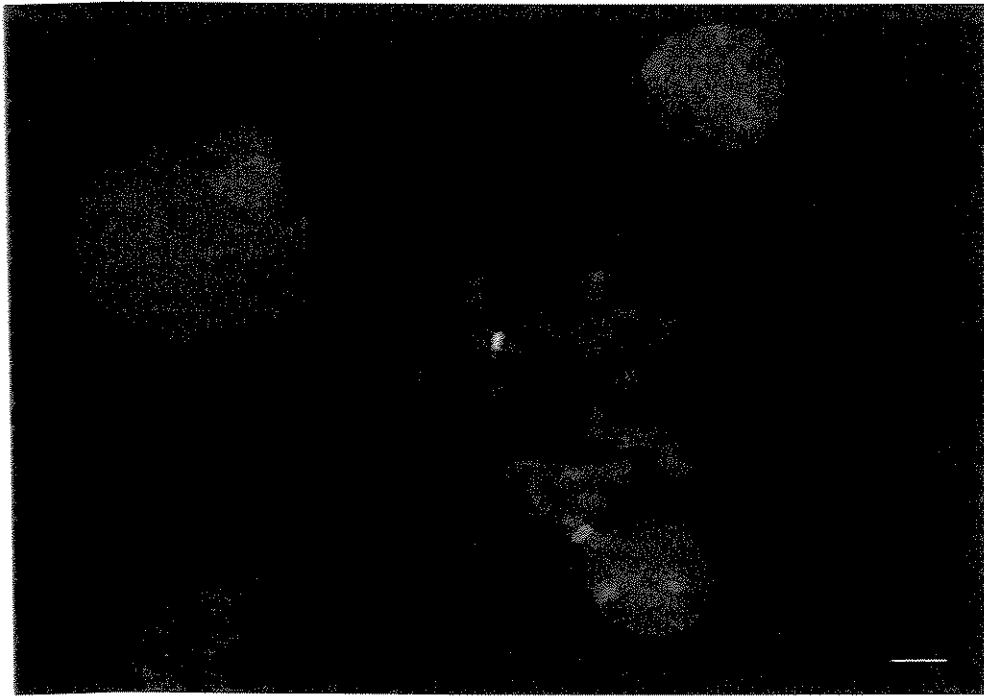


Figura 3

ANEXO 1

Tabela 1 – Relação das colônias, número de espécies estudadas, data de coleta, sexo, número cromossômico, presença e quantidade de número de Bs, total de metáfase analisadas e número máximo de B encontrado.

Colônias	Data da Coleta	Sexo	Número Cromossômico	0B	1B	2B	3B	4B	Total Met.	Número máx. B
Colônia 1B										
Indivíduo 1	27/02/98	F	2n= 20, 21	0	0o	1	6	0	7	3
Indivíduo 2	27/02/98	F	2n= 19, 21, 22	0	1	0	1	1	3	4
Indivíduo 3	27/02/98	F	2n= 21	0	0	0	1	0	1	3
Indivíduo 4	27/02/98	F	2n= 21	0	0	0	1	0	1	3
Indivíduo 5	27/02/98	F	2n= 20	0	0	1	0	0	1	2
Indivíduo 6	27/02/98	F	2n= 20, 22	0	0	1	0	2	3	4
Indivíduo 7	27/02/98	F	2n= 21	0	0	0	1	0	0	3
Indivíduo 8	27/02/98	F	2n= 21	0	0	0	2	0	2	3
Indivíduo 9	27/02/98	F	2n= 19	0	1	0	0	0	1	1
Indivíduo 10	27/02/98	F	2n= 20, 21, 22	0	0	1	2	4	7	4
Colônia T2L										
Indivíduo 1	22/08/99	F	2n= 21	0	0	0	1	0	1	3
Indivíduo 2	22/08/99	F	2n= 20, 22	0	0	3	0	1	4	4
Colônia T4L										
Indivíduo 1	22/08/99	F	2n= 20, 21, 22	0	0	9	17	0	26	3
Indivíduo 2	22/08/99	F	2n= 21	0	0	0	1	0	1	3
Indivíduo 3	22/08/99	F	2n= 21	0	0	0	2	0	2	3
Indivíduo 4	22/08/99	F	2n= 20, 21	0	0	4	21	0	25	3
Indivíduo 5	22/08/99	F	2n= 20, 21, 22	0	0	2	21	22	45	4
Colônia T7L										
Indivíduo 1	22/08/99	F	2n=19, 20	0	2	3	0	0	5	2
Indivíduo 2	22/08/99	F	2n= 20	0	0	1	0	0	1	2
Indivíduo 3	22/08/99	F	2n=20, 21	0	0	1	4	0	5	3
Indivíduo 4	22/08/99	F	2n=19, 20	0	2	5	0	0	7	2
Indivíduo 5	22/08/99	F	2n=20, 21	0	0	6	12	0	18	3

<u>Colônias</u>	<u>Data da Coleta</u>	<u>Sexo</u>	<u>Número Cromossômico</u>	<u>0B</u>	<u>1B</u>	<u>2B</u>	<u>3B</u>	<u>4B</u>	<u>Total Met.</u>	<u>Número máx. B</u>
Colônia T11L										
Indivíduo 1	22/08/99	F	2n= 21	0	0	0	1	0	1	3
Indivíduo 2	22/08/99	F	2n=20	0	0	1	0	0	1	2
Indivíduo 3	22/08/99	F	2n= 20, 21, 22	0	0	1	4	1	6	4
Indivíduo 4	22/08/99	F	2n= 20	0	0	1	0	0	1	2
Indivíduo 5	22/08/99	F	2n= 20, 21	0	0	1	1	0	2	3
Indivíduo 6	22/08/99	F	2n= 40	0	0	4	0	0	4	2
Indivíduo 7	22/08/99	F	2n= 10	0	1	0	0	0	1	1
Indivíduo 8	22/08/99	F	2n= 20, 21	0	0	1	9	0	10	3
Indivíduo 9	22/08/99	F	2n= 19, 20	0	4	4	0	0	8	2
Indivíduo 10	22/08/99	F	2n= 19	0	1	0	0	0	1	1
Indivíduo 11	22/08/99	F	2n= 19, 20	0	2	15	0	0	17	2
Indivíduo 12	22/08/99	F	2n=20	0	0	2	0	0	2	2
Indivíduo 13	22/08/99	F	2n= 19, 20	0	2	2	0	0	4	2
Indivíduo 14	22/08/99	F	2n= 21, 22	0	0	0	1	1	2	4
Indivíduo 15	22/08/99	F	2n= 20	0	0	1	0	0	1	2
Indivíduo 16	22/08/99	F	2n= 19	0	4	0	0	0	4	1
Indivíduo 17	22/08/99	F	2n= 20, 21, 22	0	0	2	2	1	5	4
Indivíduo 18	22/08/99	F	2n=20	0	0	1	0	0	1	2
Indivíduo 19	22/08/99	F	2n=19, 21	0	1	0	2	0	3	3
Indivíduo 20	22/08/99	F	2n=19, 20	0	4	11	0	0	15	2
Indivíduo 21	22/08/99	M	n= 12, 13	0					2	4
Indivíduo 22	22/08/99	M	n=9, 10, 11, 12	0					24	34
Indivíduo 23	22/08/99	M	n= 10	0	0	0	1	1	1	1
Indivíduo 24	22/08/99	M	n= 11	2	6	15	1	0	2	2
Indivíduo 25	22/08/99	M	n= 9, 10, 11	0	1	0	0	0	12	2
Indivíduo 26	22/08/99	M	n= 10, 11	0	0	0	2	0	2	2
Indivíduo 27	22/08/99	M	n=10	2	9	1	0	0	1	1
Indivíduo 28	22/08/99	M	n= 10, 11	0	7	1	0	0	8	2

3.3 - DIFERENCIAÇÃO LONGITUDINAL DOS CROMOSSOMOS DE *Melipona mandacaia* (HYMENOPTERA, MELIPONINI). ROCHA, M. P.¹, CRUZ, M. P.², FERNANDES, A.³, WALDSCHMDT, A. M.², SILVA-JUNIOR, J. C.², POMPOLO, S. G.³.

¹ – Universidade Estadual de Campinas, Deptº Biologia Celular, 13.084.580

² – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Deptº Ciências Biológicas, 45.200.000

³ – Universidade Federal de Viçosa, Deptº Biologia Geral, 36.571.000

Citogenética da abelha *Melipona mandacaia*

ROCHA, M., CRUZ, M., FERNANDES, A., WALDSCHMDT A., SILVA-JUNIOR, J., POMPOLO, S.

* - Correspondência - Universidade do Estado do Mato Grosso, Deptº Biologia, Tangará da Serra, MT – Brasil, 78.300.000. marlapi@yahoo.com.br

Resumo

As abelhas do gênero de *Melipona* apresentam grande importância econômica e ecológica. Uma delas é a *Melipona mandacaia*, que se encontra distribuída no nordeste brasileiro. Este trabalho teve como objetivo descrever citogeneticamente a *M. mandacaia* por meio da técnica de banda C, coloração com fluorocromos (QM, CMA₃ e DAPI) e tratamentos com enzimas de restrição (*HaeIII* e *DraI*). O cariótipo de *M. mandacaia* apresentou 2n=18 (14 submetacêntricos, 2 metacêntricos e 2 acrocêntricos). A heterocromatina foi evidenciada na região pericentromérica dos pares 1, 2 e 8 e nos demais, na forma de pequenos blocos. Pela coloração com fluorocromos base-específicos, essa heterocromatina foi AT⁺ (QM, DAPI), exceto a região correspondente a NOR que foi GC⁺ (CMA₃) e clivada pela enzima *HaeIII*. O tratamento *DraI*/Giemsa evidenciou um maior número de bandas que *DraI*/QM. Esse resultado pode ser devido à 'camuflagem' de pequenas bandas negativas ocasionada pela irradiação da fluorescência da QM. A pré-clivagem com a enzima *DraI* ocasionou um maior número de bandas após a coloração com a QM. Isso pode ter sido devido à remoção de complexos DNA-proteínas que impediam a associação do fluorocromo com o DNA rico em AT.

Palavras chaves: citogenética, enzimas de restrição, NOR, abelha, mandaçaia

Introdução

No Brasil, o principal grupo de abelhas sociais pertence à tribo Meliponini e possuem uma grande importância na polinização de plantas nativas e cultivadas (KERR *et al.* 1996, HEARD 1999). Os meliponíneos apresentam maior diversidade na região neotropical (MICHENER 2000). *Melipona mandacaia*, é uma abelha sem ferrão, conhecida popularmente como 'mandacaia' e com distribuição na região nordestina do Brasil.

A citogenética da tribo Meliponini iniciou-se com o trabalho de KERR (1948), quando determinou o número cromossômico de algumas espécies do gênero *Melipona*, este estudo foi ampliado para outros 27 gêneros. O número cromossômico haplóide variou entre oito a dezoito cromossomos, sendo $n=17$ o número predominante (KERR 1952, 1969, 1972; KERR e SILVEIRA 1972; TARELHO 1973; HOSHIBA 1988, POMPOLO 1994, BRITO-RIBON *et al.* 1999).

Das 42 espécies de *Melipona* descritas, 16 foram estudadas citogeneticamente. Todas apresentam $n=9$ (machos) e $2n=18$ (fêmeas), exceto a *Melipona quinquefasciata* que apresentou cromossomos B (ROCHA *et al.* 2002b). ROCHA e POMPOLO (1998) descreveram os cariótipos de oito espécies de abelhas do gênero *Melipona*, relacionando-os por meio do conteúdo e localização da heterocromatina. Observaram uma grande variação no conteúdo de heterocromatina entre seus cariótipos, o que permitiu dividir o gênero em dois grupos: Grupo I, constituído por espécies com baixo conteúdo de heterocromatina (*Melipona bicolor bicolor*, *M. quadrifasciata*, *M. marginata* e *M. asilvae*) e Grupo II com espécies de alto conteúdo de heterocromatina (*Melipona seminigra fuscopilosa*, *M. capixaba*, *M. scutellaris* e *M. captiosa*). ROCHA *et al.* (2002a) ampliaram o número de espécies estudadas e completaram as informações de ROCHA e POMPOLO (1998). Com base no conteúdo de heterocromatina; inferiram que o Grupo I é formado por espécies com o conteúdo de heterocromatina menor que 50% e o Grupo II acima de 50%. Nas espécies do Grupo I, a heterocromatina esteve presente próxima ao centrômero ou no braço curto dos acrocêntricos, enquanto nas espécies do Grupo II, esteve distribuída por toda extensão dos cromossomos, exceto nas extremidades. Outras técnicas citogenéticas (Banda NOR, FISH, coloração com fluorocromos, digestão com enzimas de restrição) foram aplicadas para estudar a composição molecular da cromatina, o que permitiu fazer inferências filogenéticas sobre a posição do gênero dentro da tribo Meliponini (ROCHA *et al.* 2002a).

As ER reconhecem seqüências de bases do DNA e clivam em sítios específicos, permitindo assim que o DNA fragmentado seja removido. Após a coloração, essas regiões aparecem claras e as resistentes, escuras (GÓSSALVEZ *et al.* 1997). Porém, a presença das seqüências de reconhecimento não é determinante. Por exemplo, quando os fragmentos clivados forem maiores de 1 kilobase pares (kbp), eles não serão removidos (VERMA e BABU 1995); e o DNA não será clivado quando estiver associado com certas estruturas resistentes a ER ('enzyme-resistant bodies') (BABU e VERMA 1986). As enzimas de restrição têm sido utilizadas na tentativa de entender as relações evolutivas entre táxons relacionados, assim como aspectos estruturais e funcionais no seu genoma (BABU e VERMA 1986).

O presente estudo teve como objetivos, caracterizar citogeneticamente a espécie *Melipona mandacaia*, discutir a aplicação de diferentes tratamentos com as enzimas de restrição (ER) *HaeIII* e *DraI*.

Materiais e Métodos

Para este estudo foram analisadas amostras de duas colônias de *M. mandacaia* oriundas e mantidas em Irecê – BA e uma colônia oriunda da Bahia e mantida em Luziânia - GO. Em média, foram analisados 40 indivíduos de cada colônia.

A técnica utilizada para a obtenção de cromossomos metafásicos foi de IMAI *et al.* (1988) a partir do gânglio cerebral de pré-pupas. A técnica de banda C (método BSG) seguiu os procedimentos de SUMNER (1972), com as adaptações de ROCHA e POMPOLO (1998). A coloração seqüencial com fluorocromos Cromomicina A₃/DAPI foi segundo ROCHA *et al.* (2002a).

Após a fixação, os cromossomos foram tratados com as ER *HaeIII* (GC↓GC) e *DraI* (AAA↓TTT). As ER foram diluídas em tampão (1μL de enzima em 9μL do tampão) e posteriormente diluídas em 80 mL de água Milli-Q. Cada lâmina recebeu 30 μL da solução final contendo 10U e foi incubada durante 12 horas em câmara úmida à 37°C. Após a lavagem em água corrente, as lâminas tratadas com *HaeIII* foram coradas com Giemsa e as tratadas com *DraI* foram coradas com Giemsa ou Quinacrina Mostarda. A coloração com o fluorocromo Quinacrina Mostarda (QM) foi realizada de acordo com SCHMID (1980).

Resultados e Discussão

O número cromossômico da espécie *M. mandacaia* foi $2n = 18$ para fêmeas e de $n = 9$ para machos, confirmando ser uma característica comum para a maioria das espécies estudadas do gênero *Melipona*. Os cromossomos dessa espécie apresentam a seguinte morfologia: 7 pares submetacêntricos, 1 metacêntrico e 1 acrocêntrico. (Figs. 1). A heterocromatina, visualizada pela técnica de banda C, mostrou-se restrita à região pericentromérica dos pares 1 e 2 e nos demais, ela se apresentou na forma de pequenos blocos (Figs. 1B, 2A). Em sua maioria, a heterocromatina foi AT⁺ (Figs. 1F, G, H e 2E). Esses dados foram semelhantes aos das espécies que constituem o Grupo I, descritos por ROCHA e POMPOLO (1998) e ROCHA *et al.* (2002a) e por comparação, foi mais semelhante à *M. subnitida*.

Com as ER observou-se em todos os cromossomos regiões com diferentes intensidades de coloração, sendo algumas áreas completamente clivadas (gaps) e outras resistentes à clivagem (Figs. 1C, D, E, 2B,C, D). Segundo LORITE *et al.* (1999), as regiões resistentes correspondem a regiões heterocromáticas. De fato, algumas corresponderam às regiões evidenciadas pela banda C e as demais regiões, embora provavelmente sejam heterocromáticas, não foram evidenciadas com a banda C. Segundo CAMACHO *et al.* (1984), a técnica de banda C não revela toda a heterocromatina do genoma de um organismo. Portanto a técnica de enzimas de restrição diferenciou dois tipos de heterocromatinas, que não foram distinguíveis pela tradicional técnica de banda C.

O tratamento *HaeIII*/Giemsa permitiu um pareamento acurado dos cromossomos, o padrão de bandas (Figs. 1C, 2B) foi semelhante ao padrão de banda G da espécie *M. quadrifasciata* descrito por TAMBASCO *et al.* (1979). Em outros organismos já havia sido relatada a correspondência entre o padrão de bandas da *HaeIII* e banda G (MILLER *et al.* 1983, BABU e VERMA 1986, LORITE *et al.* 1999).

Pela coloração com fluorocromos base-específicos, a região pericentromérica do primeiro par foi a única que apresentou predominância de pares GC⁺ (Fig. 1F, G e H, 2E). Essa região apresentou um heteromorfismo de banda e foi sensível à enzima *HaeIII* (Figs. 1C, 2B). A presença deste bloco heteromórfico foi verificada para seis espécies do mesmo gênero, sendo que em *Melipona asilvae* (ROCHA *et al.* 2002a) e *Melipona marginata* (MAFFEI *et al.* 2001) ele foi banda NOR positiva e em *Melipona quinquefasciata* foi marcado pela FISH com sonda para rDNA (ROCHA *et al.* 2002b).

Portanto, o bloco pericentromérico do 1º par de *M. mandacaia* contem os genes da região organizadora de nucléolo (NOR). Este trabalho permitiu relacionar *HaeIII*⁺ com CMA₃⁺, DAPI⁺ e QM⁺, que por sua vez foram relacionados com NOR⁺ e FISH⁺ por ROCHA *et al.* (2002a, b). Foi verificado em outros organismos que a *HaeIII* cliva regiões NOR positivas (GOSÁLVEZ 1987, JUAN *et al.* 1991, PADILHA *et al.* 1993, LORITE *et al.* 1999).

A melhor forma de coloração (QM ou Giemsa) após a clivagem com ER foi verificado, por comparação entre os padrões de bandamentos, após a aplicação de uma mesma enzima (*DraI*). O tratamento *DraI*/Giemsa (Figs. 1D, 2C) evidenciou um maior número de bandas que *DraI*/QM (Figs. 1E, 2D). Esse resultado pode ser devido à 'camuflagem' de pequenas bandas negativas ocasionada pela irradiação da fluorescência da QM.

A localização das regiões ricas em determinados pares de bases foi feita pela coloração com fluorocromos e pela QM após um tratamento com ER. Verificou-se que a QM evidenciou um maior número de bandas quando os cromossomos foram pré-tratados com a enzima *DraI*. Este tratamento evidenciou um bloco extra no par 1, que não foi evidenciado com a coloração exclusiva com os fluorocromos. Nas espécies *M. subnitida* (ROCHA *et al.* 2002a) e *M. quinquefasciata* (ROCHA *et al.* 2002b) foi evidenciado apenas um bloco no primeiro par. Provavelmente estas espécies também possuem o outro bloco, contudo ele só foi identificado em *M. mandacaia* após o tratamento com *DraI*. A evidência de um maior número de bandas após o tratamento com a *DraI* pode ter sido ocasionada pela retirada de DNA-proteínas, que impediam a associação dos fluorocromos com o DNA rico em AT.

Esperava-se que as regiões pericentroméricas AT⁺, fossem digeridas pela enzima *DraI*, que tem o seu sítio específico em regiões ricas em pares de bases dessa natureza (Figs. 1 D, E, 2C, D). A não-digestão dessas regiões pode ser devido ao tamanho do fragmento clivado, ou ser um sítio protegido ou simplesmente por não ter sítios para a enzima, mesmo sendo uma região rica em pares de bases AT.

Referências

- BABU, A., VERMA, R. S. 1986. Expression of heterochromatin by restriction endonuclease treatment and distamycin A/DAPI staining of Indian muntjac (*Muntiacus muntjak*) chromosomes. Cytogenet. Cell Genet. **41**: 96-100.

- 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, Brazil. *Cytobios* **100**: 19-26.
- CAMACHO, J. P. M., VISERAS, E., NAVAS, J., CABRERO, J. 1984. C-heterochromatin content of supranumerary chromosome segments of grasshoppers: detection of a euchromatic extra segment. *Heredity* **53**: 167-175.
- GOSÁLVEZ, J., BELLA, J. L., LÓPEZ-FERNANDEZ, C., MEZZANOTTE, R. 1987. Correlation between constitutive heterochromatin and restriction enzyme resistant chromatin in *Arcyptera tornosi* (Orthoptera). *Heredity* **59**: 173-180.
- 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.
- IMAI, H. T.; TAYLOR, R. W.; CROSSLAND, M. W. J., CROZIER, R. H. 1988. Modes of spontaneous evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis. *Jpn. J. Genet.* **63**: 159-185.
- JUAN, C., GOSÁLVEZ, J., MEZZANOTTE, R., PETITPIERRE, E. 1991. Cytological and biochemical characterization of the in situ endonuclease digestion of fixed *Tenebrio molitor* chromosomes. **100**: 432-438.
- KERR, W. E. 1948. Estudos sobre o gênero *Melipona*. *Anais da E. S. A. "Luiz de Queiroz"* **5**: 182-276.
- KERR, W. E. 1952. A variação do número de cromosomas na evolução dos hymenoptera. *Sci. Genet.* **4**: 182-190.
- KERR, W. E. 1969. Some aspects of the evolution of the social bees. *Evol. Biol.* **3**:119-175.
- KERR, W. E. 1972. Numbers of chromosomes in some species of bees. *J. Kans. Entomol. Soc.* **45**: 11-122.
- KERR, W. E., SILVEIRA, Z. V. 1972. Karyotypic evolution of bees and corresponding taxonomic implications. *Evolution* **26**: 197-202.
- KERR, W. E., CARVALHO, G. A., NASCIMENTO, V. A. 1996. Abelha Uruçu – Biologia, Manejo e Conservação. Fundação Acangaú, Belo Horizonte.

- LORITE, P., GARCIA, M. F., CARRILLO, J. A., PALOMEQUE, T. 1999. Restriction endonuclease chromosome banding in *Tapinoma nigerrimum* (Hymenoptera, Formicidae). *Hereditas* **131**: 197-201.
- MAFFEI, E. M. D., POMPOLO, S. G., SILVA-JUNIOR, J. C., CAIXEIRO, A. P. A., ROCHA, M. P., DERGAM, J. A. 2001. Silver staining of nucleolar organizer regions (NORs) in some species of Hymenoptera (bees and parasitic wasp) and Coleoptera (lady-beetle). *Cytobios* **104**: 119-125.
- MICHENER, C. D. 2000. The bees of the world. The Johns Hopkins University Press, USA.
- MILLER, D. A., GOSDEN, J. R., HASTIE, N. D., EVANS, H. J. 1983. Mechanism of endonuclease banding of chromosomes. *Exp. Cell Res.* **155**: 294- 298.
- PADILLA, J. A., FERNÁNDEZ-GARCIA, J. L., RABASCO, A., MARTÍNEZ-TRANCÓN, M., LEDESMA, R., PÉREZ-REGADERA, J. L. 1993. Characterization of the karyotype of the tench (*Tinca tinca* L.) and analysis of its chromosomal heterochromatic regions by C-banding, Ag-staining, and restriction endonuclease banding. *Cyt. Cell Genet.* **62**: 220-223.
- POMPOLO, S. G. 1994. Análise dos cariótipos de 19 gêneros de abelhas da subfamília Meliponinae. *Anais do 1º Encontro sobre. Abelhas* **1**: 143-146.
- ROCHA, M. P., POMPOLO, S.G. 1998. Karyotypes and heterochromatin variation (C-bands) in *Melipona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Gen. Mol. Biol.* **21**: 41-45.
- ROCHA, M. P., POMPOLO, S. G., DERGAM, J. A., FERNANDES, A., CAMPOS, L. A. O. 2002a. DNA characterization and karyotypic evolution in the bee genus *Melipona* (Hymenoptera, Meliponini). *Hereditas* **136**: 19-27.
- ROCHA, M. P., ARAÚJO, S. M. R., POMPOLO, S. G., CAMACHO, J. P. 2002b. Cromossomos B em abelha Neotropical *Melipona quinquefasciata* (Hymenoptera, Meliponini) em preparação.
- SCHMID, M. 1980. Chromosome banding in Amphibian IV. Differentiation of GC- and AT-rich chromosome regions in Anura. *Chromosoma* **77**: 83-103.
- SUMNER, A. T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell. Res.* **75**: 304-306.

- TAMBASCO, A. J., GIANNONI, M. A., MOREIRA, L. M. A. 1979. Analyses of G-bands in chromosomes of the *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepeletier (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Cytologia* **44**: 21-27.
- TARELHO, Z. V. S. 1973. Contribuição ao estudo citogenético dos Apoidea. Dissertação M. Sc. Thesis. - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- VERMA, R. S., BABU, A. 1995. Human Chromosomes: principles and techniques. McGraw-Hill, New York.

Legendas das Figuras

Figura 1 – Cariogramas de fêmeas (A, C, D, E, F, G) e macho (B) de *Melipona mandacaia*. **A** - Coloração convencional; **B** - Banda C; **C** - Tratamento com *HaeIII*-Giemsa; **D** - Tratamento com *DraI*-Giemsa; **E** – Tratamento com *DraI*-QM, **F** – Coloração com QM; **G** - Coloração seqüencial com fluorocromos DA/DAPI e **H** - /CMA₃. Barra: 5µm.

Figura 2 - Ideograma de *Melipona mandacaia*. **A** - Banda C; **B** - Tratamento com *HaeIII*-Giemsa; **C** - Tratamento com *DraI*-Giemsa; **D** – Tratamento com *DraI*-QM, **E** - Coloração com fluorocromos: QM, DA/DAPI/CMA₃.

■ Banda C⁺, ● Banda GC⁺, □ Banda AT⁺, ▤ Banda negativa, ▢ Banda positiva

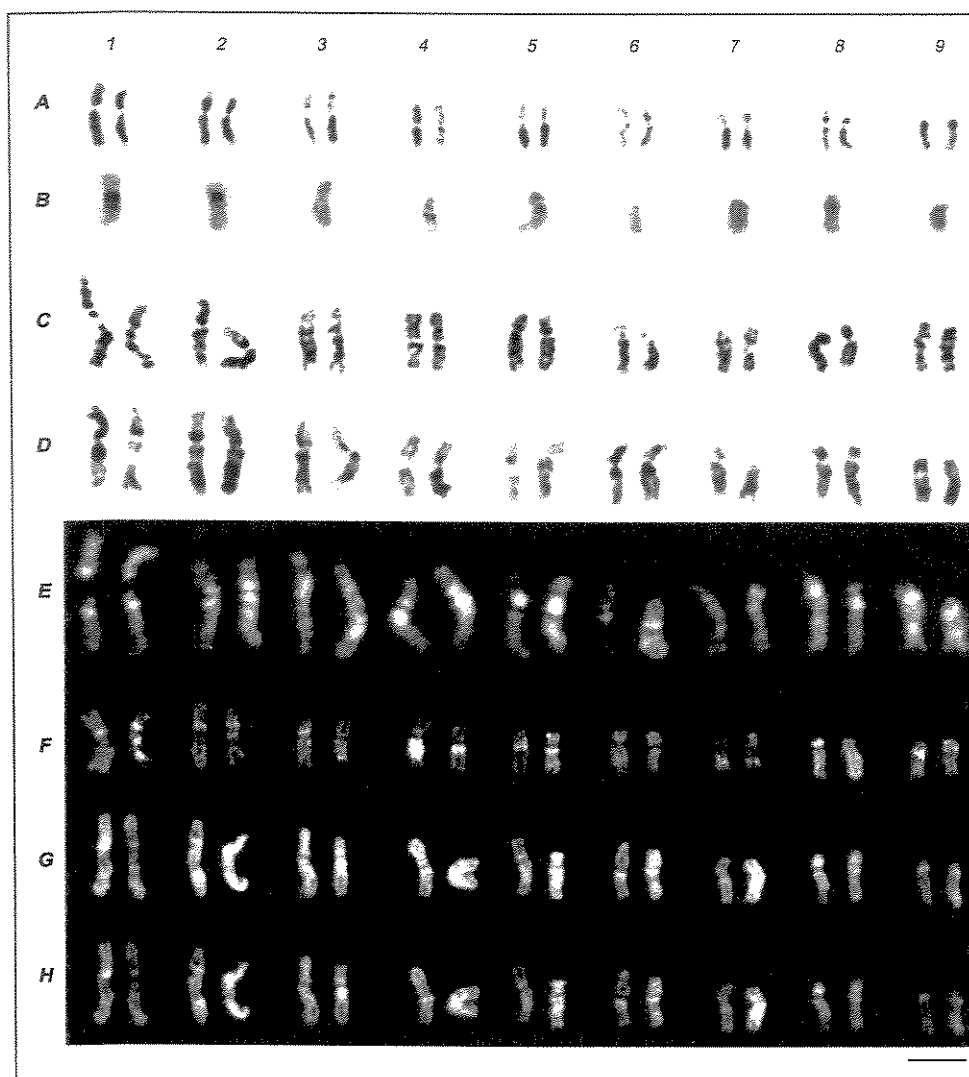


Figura 1

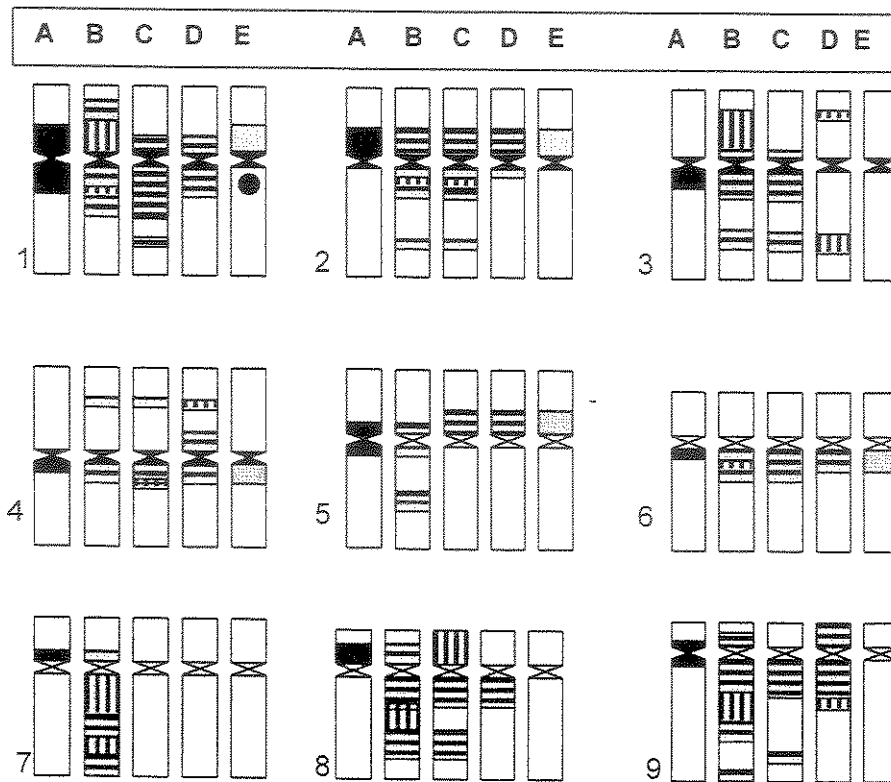


Figura 2

**3.4 - ESTUDO DA NOR NO GÊNERO *Melipona* (HYMENOPTERA, MELIPONINI).
ROCHA, M. P.^{1*}, FERNANDES, A.², POMPOLO, S. G.².**

¹ – Universidade Estadual de Campinas, Deptº Biologia Celular, 13.084.580

² – Universidade Federal de Viçosa, Deptº Biologia Geral, 36.571.000

Palavras chaves: *Melipona*, Meliponini, Banda NOR, FISH, rDNA, evolução

* - Correspondência - Universidade do Estado do Mato Grosso, Deptº Biologia,
Tangará da Serra, MT – Brasil, 78.300.000. marlapi@yahoo.com.br

Resumo

Este trabalho teve como objetivo estudar a localização da Região Organizadora de Nucléolos nos cromossomos de espécies de abelhas do gênero *Melipona* (Hymenoptera, Meliponini) utilizando as técnicas de coloração com fluorocromos, FISH e impregnação pela prata (banda NOR). Foram estudadas as espécies: *Melipona bicolor*, *Melipona quadrifasciata*, *Melipona capixaba* e *Melipona compressipes*. A NOR esteve presente em apenas um par cromossômico e sempre se localizou próxima ao centrômero nas espécies *M. bicolor* e *M. quadrifasciata* assim como as demais do Grupo I que apresentam baixo conteúdo de heterocromatina. Já no Grupo II, com alto conteúdo de heterocromatina, a NOR pode estar localizada em uma das extremidades de um par cromossômico, como na espécie *M. capixaba* ou em uma região intermediária da eucromatina e heterocromatina, como foi verificado para todas as outras espécies.

Introdução

A NOR é uma região do cromossomo que contém os genes responsáveis pela síntese dos principais tipos de rRNA. A análise dos rearranjos envolvendo esta região tem sido utilizada para o entendimento da evolução cromossômica e nos estudos filogenéticos em diferentes grupos de organismos (FERNANDES-MATIOLI *et al.* 1997; MONTOVANI *et al.* 2000, BARDHAN e SHARMA 2000, ODIERNA *et al.* 2001, HIRAI *et al.* 1996; PALOMEQUE *et al.* 1988). Também tem sido utilizada no estudo da determinação sexual, pois em alguns organismos, pois ela apresenta localização preferencial nos mesmos cromossomos que carregam os genes que determinam o sexo (JUAN e PETITPIERRE 1993, MARCHI e PILI 1994, WILHOEFT 1997, MANDRIOLI *et al.* 1999, REED e PHILLIPS 1997).

A NOR pode ser evidenciada pela impregnação pela prata (banda NOR) ou pela hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sonda de rDNA. Embora a NOR seja definida pela sequência de DNA, a banda NOR não é baseada nas propriedades do DNA e sim nas proteínas ácidas produzidas durante a interfase e acumuladas em volta da NOR (SCHWARZACHER *et al.* 1978).

Já foram estudados citogeneticamente 28 gêneros e 65 espécies de abelhas da tribo Meliponini, sendo que a maioria desses estudos descreveu apenas o número cromossômico. O gênero *Melipona* foi o primeiro a ser estudado (KERR 1948) e atualmente é mais estudado. Os trabalhos de ROCHA e POMPOLO (1998) com banda C permitiram dividir o gênero em dois grupos I (com baixo conteúdo de heterocromatina) e II (alto conteúdo); ROCHA *et al.* (2002a, b, c), completaram esses dados medindo o conteúdo de heterocromatina de algumas espécies e consideraram que no Grupo I estão as espécies com menos de 50% de heterocromatina e com localização pericentromérica e no Grupo II estão as espécies que apresentam mais de 50% e com a heterocromatina distribuída por toda a extensão dos cromossomos, exceto nas extremidades. Fazem parte do Grupo I (*Melipona bicolor*, *M. quadrifasciata*, *M. asilvae*, *M. marginata*, *M. subnitida*, *M. quinquefasciata*, *M. mandacaia*) e do Grupo II (*Melipona seminigra fuscopilosa*, *M. crinita*, *M. scutellaris*, *M. capixaba*, *M. compressipes*, *M. captiosa*). A heterocromatina foi preferencialmente AT⁺, exceto um bloco heteromórfico no primeiro par. Esse bloco, além de ser corado pela CMA₃ em todas as espécies, foi clivado pela *HaeIII* em *M. mandacaia* (ROCHA *et al.* 2002b), impregnado pela prata em *M. marginata* (MAFFEI *et*

al. 2001) e *M. asilvae* e marcado pela FISH em *M. compressipes* (ROCHA et al. 2002a) e *M. quinquefasciata* (ROCHA et al. 2002b).

Este trabalho teve como objetivo ampliar o estudo da NOR no gênero *Melipona* e assim fornecer dados para futuros estudos filogenéticos.

Materiais e Métodos

Foram estudadas duas espécies do grupo I: *M. quadrifasciata* (Viçosa-MG), *M. bicolor* (Viçosa-MG) e duas do grupo II: *M. capixaba* (Venda Nova do Imigrante-ES) e *M. compressipes* (São Luís-MA). Em média, foram analisados 10 indivíduos de cada espécie.

Para obtenção de cromossomos metafásicos, utilizou-se a técnica de IMAI et al. (1988). A coloração seqüencial com fluorocromos Quinacrina Mostarda/Distamicina/Cromomicina A₃/4,6-Diaminofenilindole (QM/DA/CMA₃/DAPI) foi segundo ROCHA et al. (2002a). A FISH foi realizada segundo a técnica de VIEGAS-PÉQUIGNOT (1992), usando a sonda 45S de *Drosophila* rDNA pDm 238 rDNA pDm 238 (ROIHA et al. 1981). Banda NOR foi segundo HOWELL e BLACK (1980).

Resultados e Discussão

As espécies do presente trabalho apresentam o mesmo número de cromossomos $n=9$ e $2n=18$ (ver ROCHA e POMPOLO 1998, ROCHA et al 2002 a, c). A coloração seqüencial QM/DA/CMA₃/DAPI em *M. capixaba* e *M. compressipes* mostrou que a região de heterocromatina foi preferencialmente AT (dados não mostrados) e as extremidades eucromáticas GC (Fig. 1). Estes resultados foram semelhantes aos encontrados para as outras espécies do Grupo II (*M. seminigra fuscopilosa*, *M. crinita* e *M. captiosa*) descritas por ROCHA et al. (2002 a).

A FISH marcou apenas um par de cromossomos em indivíduos diplóides e em um cromossomo em indivíduos haplóides. Foi possível observar para essa região, o mesmo heteromorfismo de tamanho que foi descrito para as demais espécies estudadas, um padrão considerado por ROCHA et al. (2002a) como um efeito de regulação gênica (Fig. 2).

A localização da NOR nos cromossomos diferiu em algumas espécies: em *M. capixaba* esteve nas extremidades (Fig. 2A), em *M. bicolor bicolor* (Fig. 2B) e *M. quadrifasciata* (Fig. 2C) na região pericentromérica e em *M. compressipes* na região

intersticial (Fig. 2D). Entretanto, ROCHA *et al.* (2002a) demonstraram que tanto em *M. capixaba* quanto nas demais espécies do Grupo II, a NOR esteve localizada na região intersticial, na junção entre a heterocromatina e eucromatina, e não na extremidade de um par cromossômico como demonstrado no presente trabalho. Vários mecanismos envolvendo mudanças da NOR foram propostos para outros organismos: transposição (BARDHAN e SHARMA 2000, CASTRO *et al.* 2001), translocação (LOURENÇO *et al.* 1998, PALOMEQUE 1988), fissão cêntrica e translocação recíproca (HIRAI *et al.* 1996). Em *M. capixaba* não ocorreu um aumento de genes da NOR, mas somente na posição do cromossomo, portanto sugerimos que pode ter ocorrido um rearranjo cromossômico do tipo inversão envolvendo a NOR ou uma transposição da mesma.

Ainda na espécie *M. capixaba* houve correspondência entre CMA₃ e NOR nos núcleos interfásicos (Fig. 3) e entre as regiões CMA₃ (Fig. 1) e marcadas pela FISH (Fig. 2A) nos cromossomos metafásicos. Esta mesma correlação foi evidenciada em vários organismos (MARTÍNEZ-EXPÓSITO *et al.* 1997; LOURENÇO *et al.* 1998; WOZNICKI *et al.* 2000).

Os dados do presente trabalho permitiram relacionar a CMA₃⁺, com a FISH e a NOR⁺. Portanto para o gênero *Melipona*, a coloração utilizando o fluorocromo CMA₃ parece ser um excelente substituto para a rDNA-FISH, que é uma técnica mais demorada e com custos mais elevados. Também pode substituir a banda NOR, que em cromossomos metafásicos nem sempre se consegue obter bons resultados.

Referências

- BARDHAN, A., SHARMA, T. 2000. Dynamic of nucleolus organizer regions and karyotype evolution in indian pygmy field mice. *Cytog. Cell Genet.* **91**: 47-51.
- CASTRO, J., RODRÍGUES, S., PARDO, B. G., SÁNCHEZ, L., MARTÍNEZ, P. 2001. Population analysis of an unusual NOR-site polymorphism in brown trout (*Salmo trutta* L.). *Heredity* **86**: 291-302.
- FERNANDES-MATIOLI, F. M. C., ALMEIDA-TOLEDO, L. F., TOLEDO-FILHO, S. A. 1997. Extensive nucleolus organizer region polymorphism in *Gymnotus carapo* (Gymnotoidei, Gymnotidae). *Cytog. Cell. Genet.* **78**: 236-239.
- 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.

- 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.
- IMAI, H. T.; TAYLOR, R. W.; CROSSLAND, M. W. J., CROZIER, R. H. 1988. Modes of spontaneous evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis. *Jpn. J. Genet.* **63**: 159-185.
- JUAN, C., PONS, J. PETITPIERRE, E. 1993. Localization of tandemly repeated DNA sequences in beetle chromosomes by fluorescent *in situ* hybridization. *Chrom. Res.* **1**: 167-174.
- KERR, W. E. 1948. Estudos sobre o gênero *Melipona*. *Anais da E. S. A. "Luiz de Queiroz"* **5**: 182-276.
- 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. M. D., POMPOLO, S. G., SILVA-JUNIOR, J. C., CAIXEIRO, A. P. A., ROCHA, M. P., DERGAM, J. A. 2001. Silver staining of nucleolar organizer regions (NORs) in some species of Hymenoptera (bees and parasitic wasp) and Coleoptera (lady-beetle). *Cytobios* **104**: 119-125.
- MANDRIOLI, M., MANICARDI, G. C., BIZARRO, D., BIANCHI, U. 1999. NOR heteromorphism within a parthenogenetic lineage of the aphid *Megoura viciae*. *Chromos. Res.* **7**: 157-162.
- MARCHI, A., PILI, E. 1994. Ribosomal RNA genes in mosquitoes: localization by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Heredity* **72**: 599-605.
- 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.
- MONTOVANI, M., ABEL, L. D. S., MESTRINER, C. A., MOREIRA-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.

- ODIERNA, G., VENCES, M., APREA, G., LÖTTERS, S., ANDREONE, F. 2001. Chromosome data for malagasy poison frogs (Amphibia Ranidae: *Mantella*) and their bearing on taxonomy and phylogenet. Zool. Science **18**: 505-514.
- PALOMEQUE, T., CHICA, E., CANO, M. A. 1988. Karyotypes, C-banding, and chromosomal location of active nucleolar organizing regions in *Tapinoma* (Hymenoptera, Formicidae). Genome **30**: 277-280.
- REED, K. M., PHILLIPS, R. B. 1997. Polymorphism of the nucleolus organizer region (NOR on the putative Sex chromosomes of Arctic char (*Salvelinus alpinus*) is not sex related. Chrom. Res. **5**: 221-227.
- ROCHA, M. P., POMPOLO, S.G. 1998. Karyotypes and heterochromatin variation (C-bands) in *Melipona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). Gen. 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 the bee genus *Melipona* (Hymenoptera, Meliponini). Hereditas **136**: 19-27.
- ROCHA, M. P., ARAÚJO, S. M. R., POMPOLO, S. G., CAMACHO, J. P. 2002b. Cromossomos B em abelha Neotropical *Melipona quinquefasciata* (Hymenoptera, Meliponini) em preparação.
- ROCHA, M. P., CRUZ, M. P., FERNANDES, A., WALDSCHMDT, A. M., SILVA-JUNIOR, J. C., POMPOLO, S. G. 2002c. diferenciação longitudinal dos cromossomos de *Melipona mandacaia* (Hymenoptera, Meliponini). Em preparação.
- 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.
- SCHWARZACHER, H. G., MIKELSAAR, V., SCHNEDL, W. 1978. The nature of the Ag-staining of nucleolus organizer regions. Cytogenet. Cell. Genet. **20**: 24-39.
- VIEGAS-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.
- WILHOEFT, U. 1997. Fluorescence in situ hybridization of ribosomal DNA to mitotic chromosomes of tsetse (Diptera: Glossinidae: *Glossina*). Cromo. Res. **5**: 262-267.

WOZNICKI, P., SANCHEZ, L., MARTINEZ, P., PARDO, B. G., JANKUN, M. 2000. A population analysis of the structure and variability of NOR in *Salmo trutta* by Ag, CMA₃ and ISH. *Genetica* **108**: 113-118.

Legendas das Figuras

Figura 1 – Metáfase de *Melipona capixaba* corada com CMA₃ após a coloração seqüencial QM/DA/CMA₃/DAPI. Setas indicam regiões GC positivas. Barra= 5µm

Figura 2 – Metáfases de *Melipona capixaba* (A), *M. bicolor* (B), *M. quadrifasciata* (C) e *M. scutellaris* (D) após a FISH com sonda de rDNA. Barra= 5µm

Figura 3 – Núcleos interfásicos de *M. capixaba* após coloração com CMA₃ seguida de impregnação pela prata (Banda NOR). Barra= 5µm

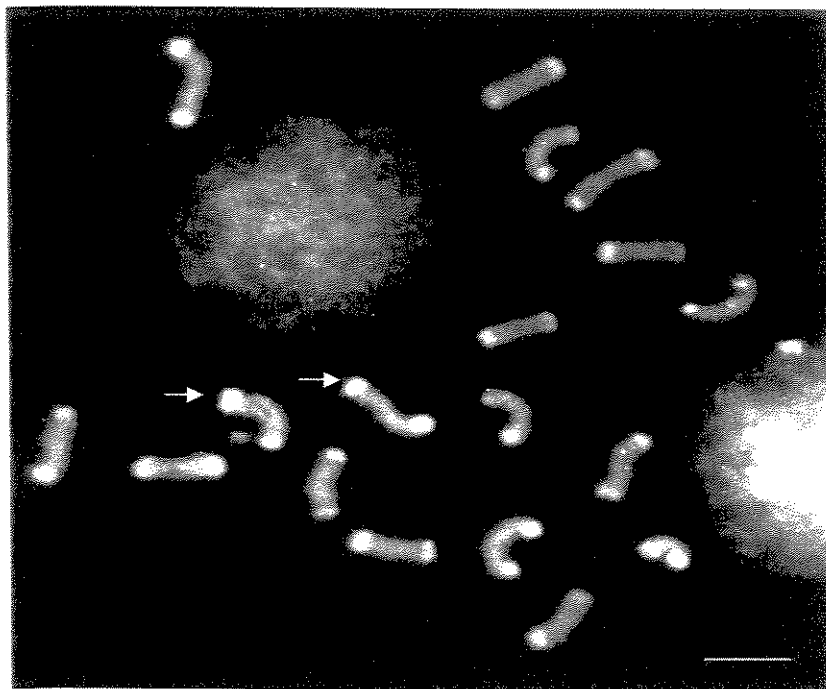


Figura 1

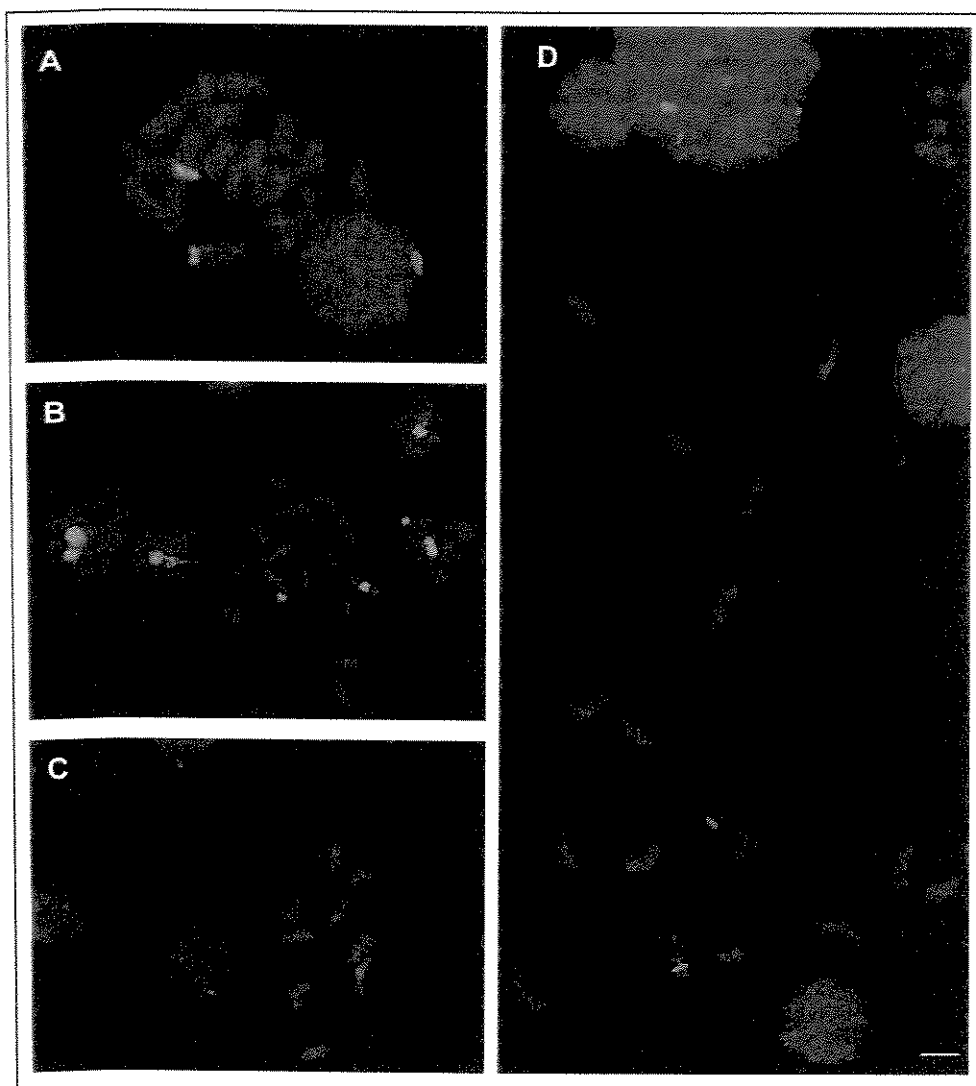


Figura 2

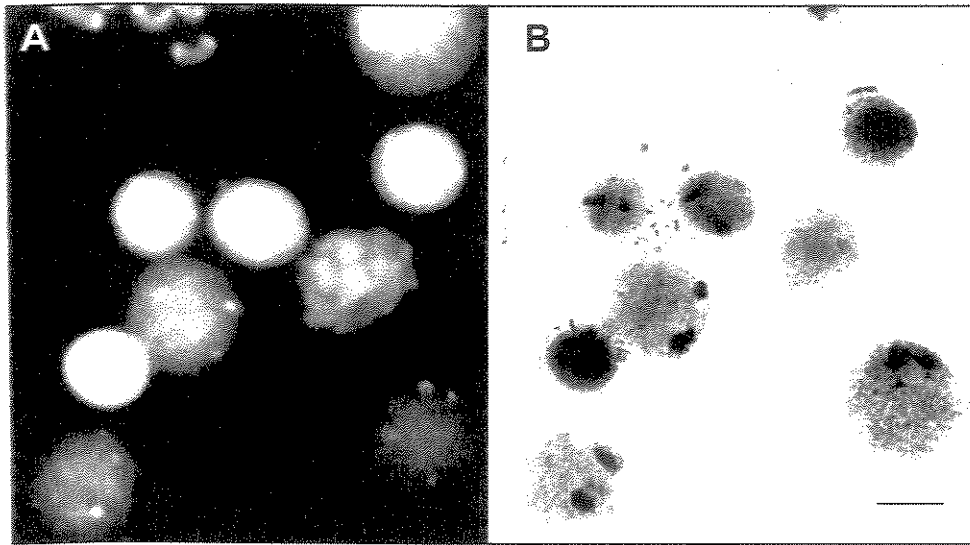


Figura 3

4. CONCLUSÕES

A citogenética realizada em 12 espécies de abelhas sem ferrão do gênero *Melipona* (Hymenoptera, Meliponini) permitiu concluir que:

- O número cromossômico foi constante $2n=18$ (fêmea) e $n=9$ (macho), exceto para *M. quinquefasciata* devido à presença de cromossomos Bs.

- Os cromossomos das espécies: *Melipona bicolor*, *M. quadrifasciata*, *M. asilvae*, *M. marginata*, *M. subnitida*, *M. quinquefasciata* e *M. mandacaia* apresentaram a mesma morfologia (7 pares submetacêntricos, 1 metacêntrico e 1 acrocêntrico). Já nas espécies *Melipona seminigra fuscopilosa*, *M. crinita*, *M. scutellaris*, *M. capixaba*, *M. compressipes*, *M. captiosa*, a morfologia foi de difícil definição devido à distribuição da heterocromatina por toda extensão dos cromossomos, exceto as extremidades.

- Os cromossomos Bs apresentaram 3 morfologias: acrocêntrico totalmente heterocromáticos e submetacêntricos, com o braço menor heterocromático ou eucromático. O número variou de 1 a 4 e de 0 a 4, respectivamente.

- Houve diferença no conteúdo e distribuição de heterocromatina entre as espécies, o que permitiu separar o gênero em dois grupos. Grupo I ficaram as espécies com menos de 50% de heterocromatina e com localização pericentromérica e no Grupo II, as espécies que apresentam mais de 50% e com a heterocromatina distribuída por toda a extensão dos cromossomos, exceto nas extremidades. Fazem parte do Grupo I (*Melipona bicolor*, *M. quadrifasciata*, *M. asilvae*, *M. marginata*, *M. subnitida*, *M. quinquefasciata*, *M. mandacaia*) e do Grupo II (*Melipona seminigra fuscopilosa*, *M. crinita*, *M. scutellaris*, *M. capixaba*, *M. compressipes*, *M. captiosa*).

- O tratamento com as ER em *M. mandacaia* permitiu uma melhor diferenciação dos cromossomos. O padrão de bandas após a clivagem com *HaeIII*/Giemsa foi semelhante ao padrão de banda G.

► A melhor forma de coloração após a clivagem com ER foi com Giemsa, pois a QM parece 'camuflar' pequenas bandas negativas devido à irradiação da fluorescência. Verificou-se que o tratamento prévio com ER evidenciou um maior número de bandas após a coloração com QM, isso pode ter sido ocasionada pela retirada de DNA-proteínas que impediam a associação dos fluorocromos com o DNA rico em AT.

► Provavelmente o tamanho dos fragmentos obtidos após o tratamento com a enzima influenciou no padrão de bandamento.

► As enzimas de restrição diferenciaram dois tipos de heterocromatinas, uma sensível ao tratamento de banda C e outra não.

► Houve correspondência entre CMA₃ e NOR nos núcleos interfásicos e entre as regiões CMA₃ e FISH nos cromossomos metafásicos. O que permitiu relacionar a CMA₃⁺ com a FISH e NOR⁺. Portanto para o gênero *Melipona*, a coloração utilizando o fluorocromo CMA₃ parece ser um excelente substituto para a rDNA-FISH e a banda NOR.

► A NOR foi encontrada em um par de cromossomos em indivíduos diplóides e em um cromossomo em indivíduos haplóides. Ela apresentou a mesma localização pericentromérica nas espécies do Grupo I, enquanto que no Grupo II ela apresentou diferenças quanto à localização. Foi sugerida a ocorrência de um rearranjo cromossômico do tipo inversão envolvendo a NOR ou uma transposição da mesma.

► Inferiu-se que os cromossomos B em *M. quinquefasciata* podem ter origem intra ou interespecífica.

► O gênero não segue nenhum dos modelos propostos para a evolução cariotípica dos meliponíneos.

► Inferiu-se que alto conteúdo de heterocromatina caracteriza o Grupo II como um grupo natural ou clado dentro de *Melipona*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, M. G. 1981. Estudo sobre o número de cromossomos e contagem de espermatozóides na abelha *Melipona scutellaris*, Latreille, 1811. Ciênc. Cult. **33**: 539-542.
- 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., 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.
- BABU, A., VERMA, R. S. 1986. Expression of heterochromatin by restriction endonuclease treatment and distamycin A/DAPI staining of Indian muntjac (*Muntiacus muntjak*) chromosomes. Cytogenet. Cell Genet. **41**: 96-100.
- BARDHAN, A., SHARMA, T. 2000. Dynamic of nucleolus organizer regions and karyotype evolution in Indian pygmy field mice. Cytog. Cell Genet **91**: 47-51.
- BARNES, R. D. 1990. Zoologia dos Invertebrados. Roca, São Paulo.
- BEUKEBOOM, L. W., SEIF, M., METTENMWYWE, T., PLOWMAN, A. B., MICHIELS, N. 1996. Paternal inheritance of B chromosomes in a parthenogenetic hermaphrodite. Heredity **77**:646-654.
- BEUKEBOOM, L. W., SHARBEL, T. F., MICHIELS, N. K. 1998. Reproductive modes, ploidy distribution, and supernumerary chromosome frequencies of the flatworm *Policelis nigra* (Platyhelminthes: Tricladida). Hydrobiologia **383**: 277-285.
- BLACKMAN, R. L. 1988. Stability of a multiple X chromosome system and associated B chromosomes in birch aphids (*Euceraaphis* spp ;Homoptera: Aphididae). Chromosoma **96**: 318-324.
- BRINKMAN, J. N., SESSIONS, S. K., HOUBEN, A., GREEN, D. M. 2000. Structure and evolution of supernumerary chromosome in the pacific giant salamander, *Dicamptodon tenebrosus*. Chrom. Res. **8**: 477-485.
- 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). Braz. J. Gen. **20**: 185-188.

- BRITO-RIBON, R. M., MIYAZAWA, C. S., POMPOLO, S. G. 1999. First karyotype characterization of four species of *Partamona* (Fries, 1980) (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) in Mato Grosso State, Brazil. *Cytobios* **100**: 19-26.
- CAMARGO, J. M. F., PEDRO, S. R. M. 1992. Sistemática de Meliponinae (Hymenoptera, Apidae): sobre a polaridade e significado de alguns caracteres morfológicos. *Naturalia, Ed. Esp.*: 45-51.
- CAIXEIRO, A. P. A., POMPOLO, S.G. 1999. Caracterização citogenética da heterocromatina constitutiva e sua implicação na evolução do cariótipo do gênero *Plebeia* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). *Gen. Mol. Biol.* **22**: 31-32.
- CAMACHO, J. P. M., SHARBEL, T. F., BEUKEBOOM, L. W. 2000. B-chromosome evolution *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **355**: 163-178.
- CLARK, M. S., WALL, W. J. 1996. Chromosomes – The complex code. Chapman & Hall, London.
- 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.
- COSTA, M. A., MELO, G. A. R., POMPOLO, S. G., CAMPOS, L. A. O. 2002. O que a filogenia revela sobre a evolução do cariótipo em vespas do gênero *Microstigmus* (Hymenoptera, Apoidea, Crabronidae)? *Anais do 19º Congresso de Entomologia*: (resumo aceito).
- CROZIER, R. H. 1975 *Hymenoptera* (In: Animal cytogenetics, Insecta, 7 B. Jhon ed. Gebruder Borntraeger, Berlin).
- DAGNE, K. 1995. Mitotic and meiotic behavior of B-chromosomes of *Guizotia scabra* (Vis.) *Chio. ssp scabra* (Compositae). *Caryologia* **48**: 35-45
- FERNANDES-MATIOLI, F. M. C., ALMEIDA-TOLEDO, L. F., TOLEDO-FILHO, S. A. 1997. Extensive nucleolus organizer region polymorphism in *Gymnotus carapo* (Gymnotoidei, Gymnotidae). *Cytog. Cell. Genet.* **78**: 236-239.
- GORLOV, I. P., TSURUSAKII, N. 2000. Analysis of the phenotypic effects of B chromosomes in a natural population of *Metagagrella tenuipes* (Arachnida: Opiliones). *Heredity* **84**: 209-217.
- GOMES, L. F., POMPOLO, S. G., CAMPOS, L. A. O. 1995. Cytogenetic analysis of three species of *Trypoxylon* (*Trypoxylon*) (Hymenoptera, Sphecidae, Larrinae). *Rev. Brasil. Genet.* **18**: 173-176.

- GOSÁLVEZ, J., LÓPEZ-FERNÁNDEZ, GOYANES, V., MEZZANOTTE, R. 1997. *Chromosome differentiation using nucleases: an overview* (In: Chromosomes Today. Chapman & Hall, London).
- HEARD, T. A. 1999. The role of stingless bees in crop pollination. *Annu. Rev. Entomol.* **44**:183-206.
- 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 the basis of C-banding pattern analyses. *Jpn. J. Ent.* **61**: 465-492.
- HOUBEN, A., THOMPSON, N., AHNE, R., LEACH, C. R., VERLIN, D., TIMMIS, J. N. 1999. A monophyletic origin of the B chromosomes of *Brachycome dichromosomatica* (Asteraceae). *Plant Syst. Evol.* **219**: 127-135.
- IMAI, H. T. 1974. B-chromosomes in Myrmicine ant *Leptothorax spinosior*. *Chromosoma* **45**: 431-414.
- 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., KUBOTA, M. 1972. Karyological studies of Japanese ants (Hymenoptera, Formicidae). *Chromosoma* **37**: 193-200.
- IMAI, H. T., KUBOTA, M. 1975. Chromosome polymorphism in the ant, *Pheidole nodus*. *Chromosoma* **51**: 391-399.
- IMAI, H. T., CROZIER, R. H., TAYLOR, R. W. 1977. Karyotype evolution in Australian ants. *Chromosoma* **53**: 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.

- IMAI, H. T., MARUYAMA, T., GOJOBORI, T., INOUE, Y., CROZIER, R. H. 1986. Theoretical bases for karyotype evolution. The minimum-interaction hypothesis. *Amer. Nat.* **128**: 900-920.
- IMAI, H. T.; TAYLOR, R. W.; CROSSLAND, M. W. J., CROZIER, R. H. 1988. Modes of spontaneous evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis. *Jpn. J. Genet.* **63**: 159-185.
- IMAI, H. T., TAYLOR, R. W. 1989. Chromosomal polymorphism involving telomere fusion, centromeric inactivation and centromere shift in the ant *Myrmecia (pilosula)* n=1 *Chromosoma* **98**: 456-460.
- IMAI, H. T., TAYLOR, R. W., CROZIER, R. H. 1994. Experimental bases for the minimum interaction theory. Chromosome evolution in ants of the *Myrmecia pilosula* species complex (Hymenoptera: Formicidae: Myrmeciinae). *Jpn. J. Genetic.* **69**: 137-182.
- IMAI, H. T., SATTA, Y., TAKAHATA, N. 2001. Integrative study on chromosome evolution of mammals, ants and wasps based on the minimum interaction theory. *J. theor. Biol.* **210**: 475-497.
- JAMILENA, M., GARRIDO-RAMOS, M., REJÓN, M. R., PARKER, J. S. 1995. Characterization of repeated sequences from microdissected B chromosomes of *Crepis capillaris*. *Chromosoma* **104**: 113-120.
- JOHN, B. 1988. *Heterochromatin: molecular and structural aspects*. (In: The biology of heterochromatin. Cambridge University Press, New York).
- JONES, R. N. 1995. B chromosomes in plants. *New Phytol* **131**: 411-434.
- KERR, W. E. 1948. Estudos sobre o gênero *Melipona*. *Anais da E. S. A. "Luiz de Queiroz"* **5**: 182-276.
- KERR, W. E. 1952. A variação do número de cromosomas na evolução dos himenópteros. *Sci. Genet.* **4**: 182-190.
- KERR, W. E. 1969. Some aspects of the evolution of the social bees. *Evol. Biol.* **3**: 119-175.
- KERR, W. E. 1972. Numbers of chromosomes in some species of bees. *J. Kans. Entomol. Soc.* **45**: 11-122.
- KERR, W. E., ARAÚJO, V.P. 1957. Contribuição ao estudo citológico dos Apoidea. *Garcia da Orta.* **5**: 431-433.

- KERR, W. E., PISANI, J. F., AILY, D. 1967. Aplicações de princípios modernos à sistemática do gênero *Melipona* Illiger com a divisão em dois subgêneros (Hymenoptera, Apoidea). Papeis Avul. Zool. **20**: 135-145.
- KERR, W. E., SILVEIRA, Z. V. 1972. Karyotypic evolution of bees and corresponding taxonomic implications. *Evolution* **26**: 197-202.
- KERR, W. E., CARVALHO, G. A., SILVA, A. C., ASSIS, M. G. P. 2001. Aspectos pouco mencionados da biodiversidade amazônica. *Parc. Estrat.* **12**: 20-41.
- LÓPEZ-LEÓN, M. D., NEVES, N., SCHWARZACHER, T., HESLOP-HARRISON, J. 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.
- 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.
- LORITE, P., CARRILLO, J. A., GARCIA, M. F., PALOMEQUE, T. 2000. Chromosome numbers in spanish Formicidae III. Subfamily Myrmicinae (Hymenoptera). *Sociobiology* **36**: 555-570.
- MAcGREGOR, H. C. 1993. An introduction to Animal Cytogenetics. Chapman & Hall, London.
- MAFFEI, E. M. D., GASPARINO, E., POMPOLO, S. G. 2000. Karyotypic characterization by mitosis, meiosis and C-banding of *Eriopis connexa* Mulsant (Coccinellidae: Coleoptera: Polyphaga), a predator of insect pest. *Hereditas* **132**: 79-85.
- MAFFEI, E. M. D., POMPOLO, S. G., SILVA-JUNIOR, J. C., CAIXEIRO, A. P. A., ROCHA, M. P., DERGAM, J. A. 2001. Silver staining of nucleolar organizer regions (NORs) in some species of Hymenoptera (bees and parasitic wasp) and Coleoptera (lady-beetle). *Cytobios* **104**: 119-125.
- MAMPUMBU, A. R., POMPOLO, S. G. 1999. Análise da estrutura cariotípica de *Friesella schrottkyi* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini), da região de Viçosa. *Gen. Mol. Biol.* **22**: 24.
- MARIANO, C. S. F.; POMPOLO, S. G., DELABIE, J. H. C., CAMPOS, L. A. O. 2001. Estudos cariotípicos de algumas espécies neotropicais de *Camponotus* Mayr (Hymenoptera, Formicidae). *Rev. Brasil. Entomol.* **45**: 267-274.

- MARTINS, C., GIULIANA-CAETANO, L., DIAS, A. L. 1996. Occurrence of a B chromosome in *Cyphocharax modesta* (Pisces, Curimatidae). *Cytobios* **85**: 247-253.
- MARYANSKA-NADACHOWSKA, A., WARCHALOWSKA-SLIWA, E. 1991. The B-chromosome in the karyotype of *Tetrix tenuicornis* (Sahlb.) (Tetrigidae: Orthoptera). *Genetica* **83**: 125-129.
- McALLISTER, B. F., WERREN, J. H. 1997. Hybrid origin of a B chromosome (PSR) in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. *Chromosoma* **106**: 243-253.
- MELLO, M. L. S. 1977. Patterns of labiality towards acid hydrolysis in heterochromatins and euchromatins of *Triatoma infestans* Klug. *Cel. Mol. Biol.* **24**: 1-16.
- MELLO, M. L. S. 1983. Cytochemical properties of euchromatin and heterochromatin. *Hist. J.* **15**: 739-751.
- 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. Viçosa. Brazil.
- MESTRINER, C. A., GALETTI, J. R. P. M., VALENTINI, S. R., RUIZ, I. R. G., ABEL, L. D. S., MOREIRA-FILHO, O., CAMACHO, J. P. M. 2000. Structural and functional evidence that a B chromosome in the characid fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. *Heredity* **85**: 1-9.
- MICHENER, C. D. 1990. Classification of the Apidae (Hymenoptera). *Univers. Kansas Scien. Bul.* **54**: 75-164.
- MICHENER, C. D. 2000. The bees of the world. The Johns Hopkins University Press, USA.
- MONTOVANI, M., ABEL, L. D. S., MESTRINER, C. A., MOREIRA-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.
- MOREIRA, C. M. L. C., POMPOLO, S. G. 1997. Caracterização cariotípica de espécies do gênero *Frieseomelitta* Ihering, 1912 (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Rev. Brasil. Gen.* **20**: 61.
- NÉO, D. M., MOREIRA-FILHO, O., CAMACHO, J. P. 2000. Altitudinal variation for B chromosome frequency in the characid fish *Astyanax scabripinnis*. *Heredity* **85**: 136-141.

- OBE, G., BASLER, A. 1987. Cytogenetics basic and applied aspects. Springer-Verlag, Berlin.
- ODIERNA, G., VENCES, M., APREA, G., LÖTTERS, S., ANDREONE, F. 2001. Chromosome data for Malagasy poison frogs (Amphibia Ranidae: *Mantella*) and their bearing on taxonomy and phylogenet. Zool. Science **18**: 505-514.
- PALOMEQUE, T., CHICA, E., CANO, M. A. 1988. Karyotypes, C-banding, and chromosomal location of active nucleolar organizing regions in *Tapinoma* (Hymenoptera, Formicidae). Genome **30**: 277-280.
- PALOMEQUE, T., CHICA, E., GUARDIA, R. D. 1990. Karyotype, C-banding, chromosomal location of active nucleolar organizing regions, and B-chromosomes in *Lasius niger* (Hymenoptera, Formicidae). Genome **33**: 267-272.
- PARDO, B. G., BOUZA, C., CASTRO, J., MARTÍNEZ, P., SÁNCHEZ, L. 2001. Localization of ribosomal genes in Pleuronectiformes using Ag-CMA₃-banding and *in situ* hybridization. Heredity **86**: 531-536.
- PAULS, E., BERTOLLO, L. A. C. 1983. Evidence for a system of supernumerary chromosomes in *Prochilodus scrofa* steindachner, 1881 (Pisces, Prochilodontidae). Caryologia **36**: 307-314.
- PERFECTTI, F., WERREN, J. H. 2001. The interspecific origin of B chromosomes: experimental evidence. Evolution **55**: 1069-1073.
- PLOWMAN, A. B., BOUGOURD, M. 1994. Selectively advantageous effects of B chromosomes on germination behavior in *Allium schoenoprasum* L. Heredity **72**: 587-593.
- POMPOLO, S. G. 1994. Análise dos cariótipos de 19 gêneros de abelhas da subfamília Meliponinae. Anais do 1º Encontro sobre. Abelhas **1**: 143-146.
- 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.
- PROENÇA, S. J. R., COLLARES-PEREIRA, M. J., SERRANO, A. R. M. 1999. Karyological study of *Cicindelidia trifasciata* (Coleoptera, Cicindelidae) from Cuba: evidence of B chromosomes. Genet. Mol. Biol. **22**: 45-48.
- RAMACHANDRA, N. B., RANGANATH, H.A. 1987. Characterization of heterochromatin in the B chromosomes of *Drosophila nasuta albomicana*. Chromosoma **95**: 223-226.

- ROCHA, M. P., POMPOLO, S.G. 1998. Karyotypes and heterochromatin variation (C-bands) in *Melipona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Gen. Mol. Biol.* **21**: 41-45.
- ROUSSELET, J., GERI, C., HEWITT, G. M. LEMEUNIER, F. 1998. The chromosomes of *Diprion pini* and *D. similis* (Hymenoptera: Diprionidae): implications for karyotype evolution. *Heredity* **81**: 573-578.
- SALVADOR, L. B., MOREIRA-FILHO, O. 1992. B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Heredity* **69**: 50-56.
- STEVENS, J. P., BOUGOURD, S. M. 1994. Unstable B-chromosomes in a European population of *Allium schoenoprasum* L. (Liliaceae). *Biol. J. Linnean Soc.* **52**: 357-363.
- SCHWARZACHER, H. G., MIKELSAAR, V., SCHNEDL, W. 1978. The nature of the Ag-staining of nucleolus organizer regions. *Cytogenet. Cell. Genet.* **20**: 24-39.
- SUMNER, A. T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell. Res.* **75**: 304-306.
- SUMNER, A. T. 1990. Chromosome banding. London Unwin Hyman, London.
- TANIC, N., DEDOVIC, N., VUJOSEVIC, M., DIMITRIJEVIC, B. 2000. DNA profiling of B chromosomes from the yellow-necked mouse *Apodemus flavicollis* (Rodentia, Mammalia). *Gen. Res.* **10**: 55-61.
- TARELHO, Z. V. S. 1973. Contribuição ao estudo citogenético dos Apoidea. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- TSURUSAKI, N. 1993. Geographic variation of the number of B-chromosome in *Metagagrella tenuipes* (Opiliones, Phalangidae, Gagrellinae). *Mem. Queensl. Mus.* **3**: 695-665
- VERMA, R. S., BABU, A. 1995. Human Chromosomes: principles and techniques. McGraw-Hill, New York.
- VICENTE, V. E., MOREIRA-FILHO, O., CAMACHO, J. P. M. 1996. Sex-ratio distortion associated with the presence of a B chromosome in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae). *Cytogen. Cell Genet* **74**: 70-75.
- WERREN, J. H. 1991. The paternal-Sex-ratio chromosome of *Nasonia*. *The Amer. Natur.* **137**: 392-402.
- WHITE, M. J. D. 1973. Animal cytology and evolution. Cambridge University Press, London.