

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

ANA PAULA ROCHA MORAES

**CITOGENÉTICA CLÁSSICA E MOLECULAR DE DUAS ESPÉCIES DE *Scaura*
Schwarz, 1938 (APIDAE: APINAE: MELIPONINI) REVELAM DIFERENÇAS
CROMOSSÔMICAS NO GÊNERO**

VIÇOSA - MINAS GERAIS

2025

ANA PAULA ROCHA MORAES

**CITOGENÉTICA CLÁSSICA E MOLECULAR DE DUAS ESPÉCIES DE *Scaura*
Schwarz, 1938 (APIDAE: APINAE: MELIPONINI) REVELAM DIFERENÇAS
CROMOSSÔMICAS NO GÊNERO**

Monografia, apresentada ao Curso de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de Viçosa
como requisito para obtenção do título de
bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Denilce Meneses Lopes

VIÇOSA - MINAS GERAIS

2025


ANA PAULA ROCHA MORAES

**CITOGENÉTICA CLÁSSICA E MOLECULAR DE DUAS ESPÉCIES DE *Scaura*
Schwarz, 1938 (APIDAE: APINAE: MELIPONINI) REVELAM DIFERENÇAS
CROMOSSÔMICAS NO GÊNERO**


Monografia, apresentada ao Curso de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de Viçosa
como requisito para obtenção do título de
bacharel em Ciências Biológicas.

APROVADA: 26 de junho de 2025.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 ANA PAULA ROCHA MORAES
Data: 05/07/2025 21:19:38-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Ana Paula Rocha Moraes
(Autor)

Documento assinado digitalmente
 DENILCE MENESES LOPES
Data: 07/07/2025 17:33:02-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Denilce Meneses Lopes
(Orientadora)
Departamento de Biologia Geral - UFV

RESUMO

Scaura é um gênero de abelhas sem ferrão pertencente à tribo Meliponini. Atualmente, há sete espécies descritas para o gênero, incluindo *Scaura tenuis* e *Scaura amazonica*. Vários estudos destacam problemas a respeito da taxonomia no gênero como a possibilidade de *S. tenuis* e *Scaura latitarsis* serem sinônimos e, também, a existência de um complexo de espécies dentro de *S. latitarsis* que pode incluir no mínimo quatro espécies. A citogenética tem mostrado ser de grande importância para a identificação de complexo de espécies, destacando variações cromossômicas interespecíficas bem com variações intraespecíficas entre colônias de diferentes regiões. No entanto, informações citogenéticas para o gênero são escassas. Esse estudo visa expandir o conhecimento citogenético pela descrição do cariótipo, localização dos sítios de rDNA e mapeamento cromossômico do microssatélite (GA)_n em *S. tenuis* e *S. amazonica* para identificar possíveis padrões cromossômicos espécie-específicos. Ambas espécies apresentaram o mesmo número cromossômico $2n=34$, no entanto, constatou-se fórmulas cariotípicas distintas, sendo elas $2n=10m+8sm+16st$ e $2n=2m+12sm+20st$ para *S. amazonica* e *S. tenuis*, respectivamente. O mapeamento do rDNA foi localizado em apenas um par cromossômico nas espécies do estudo, seguindo o padrão putativo ancestral de Hymenoptera, porém com variações na localização nos cromossomos de cada espécie. *Scaura tenuis* mostrou os clusters de rDNA no braço curto do segundo par submetacêntrico enquanto em *S. amazonica* estava localizado no braço longo do primeiro par metacêntrico. O microssatélite (GA)_n foi detectado nos braços longos eucromáticos de ambas espécies, porém o microssatélite foi localizado nos braços curtos nos dois pares cromossômicos maiores de *S. tenuis*, podendo ser um indício de amplificação de heterocromatina na espécie. Portanto, esse trabalho expandiu o conhecimento citogenético do gênero *Scaura* e mostra que a citogenética pode auxiliar na separação das espécies.

Palavras-chave: Hymenoptera, cromossomos, FISH, rDNA 18S.

ABSTRACT

Scaura is a genus of stingless bees belonging to the tribe Meliponini. Currently, there are seven species described for the genus, including *Scaura tenuis* and *Scaura amazonica*. Several studies highlight problems regarding the taxonomy of the genus, such as the possibility of *S. tenuis* and *Scaura latitarsis* being synonyms and also the existence of a species complex within *S. latitarsis* that may include at least four species. Cytogenetics has shown to be of great importance for the identification of species complexes, highlighting interspecific chromosomal variations as well as intraspecific variations between colonies from different regions. However, cytogenetic information for the genus is scarce. This study aims to expand cytogenetic knowledge by describing the karyotype, localizing rDNA sites and mapping the microsatellite (GA)_n chromosome in *S. tenuis* and *S. amazonica* to identify possible species-specific chromosomal patterns. Both species presented the same chromosome number $2n=34$; however, distinct karyotypic formulas were observed, being $2n=10m+8sm+16st$ and $2n=2m+12sm+20st$ for *S. amazonica* and *S. tenuis*, respectively. The rDNA mapping was localized in only one chromosome pair in the studied species, following the putative ancestral pattern of Hymenoptera, but with variations in the location in the chromosomes of each species. *Scaura tenuis* showed the rDNA clusters in the short arm of the second submetacentric pair, while in *S. amazonica* it was located in the long arm of the first metacentric pair. The microsatellite (GA)_n was detected in the euchromatic long arms of both species, but the microsatellite was located in the short arms of the two largest chromosome pairs of *S. tenuis*, which may be an indication of heterochromatin amplification in the species. Therefore, this work expanded the cytogenetic knowledge of the genus *Scaura* and shows that cytogenetics can aid in the separation of the species.

Keywords: Hymenoptera, chromosomes, FISH, 18S rDNA.

SUMÁRIO

RESUMO.....	4
ABSTRACT.....	5
SUMÁRIO.....	6
LISTA DE FIGURAS.....	7
1. INTRODUÇÃO.....	8
2. OBJETIVOS.....	10
2.1. Objetivos específicos.....	10
3. METODOLOGIA.....	10
3.1. Obtenção do material biológico.....	10
3.2. Descrição do cariótipo.....	11
3.3. Mapeamento físico de sequências repetitivas.....	11
4. RESULTADOS.....	12
5. DISCUSSÃO.....	13
6. CONCLUSÃO.....	16
7. REFERÊNCIAS.....	20

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1: Cariótipo de *Scaura amazonica* com $2n=34$ cromossomos, corados com Giemsa (a); FISH com diferentes sondas de DNA repetitivo (regiões vermelhas): 18S rDNA (b) e GA_{15} (c). Cromossomos foram classificados como metacêntrico (m), submetacêntrico (sm) e subtelocêntrico (st). Barras = $5\mu\text{m}$17
- FIGURA 2: Cariótipo de *Scaura tenuis* com $2n=34$ cromossomos, corados com Giemsa (a); FISH com diferentes sondas de DNA repetitivo (regiões vermelhas): 18S rDNA (b) e GA_{15} (c). Cromossomos foram classificados como metacêntrico (m), submetacêntrico (sm) e subtelocêntrico (st). Barras = $5\mu\text{m}$18
- FIGURA 3: Metáfase de *Scaura tenuis* corados com DAPI. Setas apontam os pares cromossômicos maiores: par 2 (seta amarela) e par 8 (seta vermelha). Região do braço longo corada fortemente com DAPI, indicando região rica em AT e possivelmente heterocromatina. Barra = $5\mu\text{m}$19

1. INTRODUÇÃO

A Tribo Meliponini (Apidae), popularmente conhecida como "abelhas sem ferrão", é um grupo monofilético e abriga abelhas altamente eussociais, com uma grande variedade de comportamentos e características morfológicas (Rasmussen & Cameron, 2010; Camargo & Pedro, 2013). Este grupo é composto por 34 gêneros e mais de 500 espécies descritas (Camargo et al., 2023). *Scaura* é um desses gêneros e engloba abelhas pequenas, com tamanhos variando entre 4 e 5,5 mm, de coloração escura, e está amplamente distribuída pela região Neotropical, desde o México até regiões tropicais e subtropicais da América do Sul (Moure et al., 2007). O gênero é identificado pela forma do basitarsos posterior, sendo ele tão largo quanto ou mais largo que a tíbia, diferindo de outros Meliponini (Laroca & Lauer, 1973; Michener, 2007).

Há sete espécies descritas para o gênero, dentre as quais cinco são encontradas no Brasil: *Scaura atlantica*, *Scaura amazonica*, *Scaura latitarsis*, *Scaura longula*, e *Scaura tenuis* (Camargo et al. 2023). A taxonomia do gênero *Scaura* vêm sendo constantemente discutida em diferentes estudos. Por meio de análises morfológicas foi proposto que *Scaura* seria um subgênero de *Plebeia* (Michener, 2007), porém dados moleculares sugeriram distância genética entre esses dois grupos, mantendo a classificação como gêneros distintos (Costa et al., 2003). Além disso, existem discussões sobre a existência de um complexo de espécies dentro de *S. latitarsis* (Friese, 1900) (Melo & Costa, 2004), podendo englobar pelo menos quatro espécies (Moure et al., 2007). Há ainda estudos que levantam a possibilidade de sinonimização *S. tenuis* e *S. latitarsis*. A proposição de Melo & Costa (2004) restringe a aplicação do nome *latitarsis* à população encontrada ao longo do rio Paraná, no sudeste do Brasil. Porém as espécies de *Scaura* depositadas em ZMB (Berlim, Alemanha) não correspondem morfológicamente ao que é originalmente interpretado como *S. latitarsis*, incluindo o lectótipo utilizado por Melo & Costa (2004), e o que era interpretado como *S. tenuis* corresponderia a *S. latitarsis* (Nogueira et al., 2017). Assim, o uso de diferentes ferramentas é importante para tentar esclarecer as relações filogenéticas e taxonômicas do grupo.

A citogenética clássica e molecular mostra-se de fundamental importância para realizar comparações entre espécies, analisar variações intraespecíficas e realizar inferências citogenéticas. Com isso, é possível caracterizar novas espécies, comparar populações e

espécies simpátricas e auxiliar na separação de espécies crípticas (Imai et al., 1994; Guerra, 1988; Loisel et al., 1990; Mariano et al., 2012).

Estudos citogenéticos em Meliponini Neotropical mostram que $2n=34$ é o número cromossômico mais comum para o grupo (Cunha et al., 2021). Contudo, os dados cromossômicos para o gênero *Scaura* ainda são escassos, contando com apenas dois táxons estudados por meio de citogenética clássica: *S. latitarsis* de Ribeirão Preto, São Paulo, apresentando $2n=34$ cromossomos e fórmula cariotípica $2K=14A+20AM$ (Rocha et al., 2003a), e *Scaura* sp. com número cromossômico de $2n=34$ (Pereira & Lopes, 2023).

Técnicas citogenéticas moleculares, como o uso da hibridização *in situ* fluorescente (FISH), têm contribuído para um entendimento mais aprofundado da organização dos cromossomos (Andrade-Souza et al., 2018; Piccoli et al., 2018; Travenzoli et al., 2019a, b; Cunha et al. 2024), por meio do mapeamento físico de diferentes genes ou sequências de DNA repetitivo, como a localização dos genes ribossomais.

O gene rDNA 45S do ribossomo de eucariotos é constituído por uma subunidade grande 28S, uma subunidade pequena 18S e o gene 5.8S. O DNA ribossomal 18S é frequentemente usado em estudos filogenéticos, por apresentarem as frequências de evolução mais lentas encontradas em todos os seres vivos (Hillis & Dixon, 1991; Anne, 2006). Pelas taxas de evolução dessas sequências serem muito diferentes entre as espécies, os genes ribossomais se mostram de grande utilidade para análises filogenéticas, permitindo a reconstrução da história evolutiva dos organismos (Kocher et al., 1989; Meyer et al., 2010; Cunha et al., 2023).

O mapeamento físico do rDNA em Hymenoptera mostra que sua localização em apenas um par de cromossomos é observada na maioria das espécies estudadas até o momento e parece ser o padrão ancestral putativo nos insetos dessa ordem (Menezes et al., 2021; Teixeira et al., 2021; Cunha et al. 2024). Os genes ribossomais em Hymenoptera podem ser localizados em regiões terminais, pericentroméricas, ou intersticiais de um ou mais pares cromossômicos (Lopes et al. 2020; Pereira et al., 2021a, b; Barboza & Costa, 2021; Elizeu et al., 2021).

Outro tipo de sequência mapeada por FISH são os microssatélites (SSRs), sendo repetições curtas *in tandem*, com menos de 9 nucleotídeos, distribuídas nos cromossomos e com altas taxas de variação dentro dos genomas das espécies. O polimorfismo dessas

sequências é uma das principais características para o seu uso como marcadores citogenéticos (Cuadrado & Jouve, 2007; Lopez-Florez & Garrido-Ramos, 2012; Schemberger et al., 2014; Abad et al., 2014). Dessa forma, o emprego dos microssatélites têm demonstrado que diferentes espécies de Meliponini possuem, geralmente, tipos específicos de sequências repetitivas em regiões eucromáticas de seus cromossomos (Lopes et al., 2014; Cunha et al., 2020; Pereira et al., 2020, 2021), exibindo variações inter e intraespecíficas em relação ao número e localização dessas sequências (Piccoli et al., 2018; Travenzoli et al. 2019a; Barboza & Costa, 2021; Elizeu et al., 2021; Cunha et al. 2023).

Com isso, nesse estudo, utilizamos técnicas da citogenética clássica e molecular para caracterizar o cariótipo, mapear fisicamente os sítios de sequências repetitivas de rDNA e do microssatélite (GA)_n para as espécies *Scaura amazonica* e *Scaura tenuis*. Esses dados agregarão novos conhecimentos citogenéticos acerca do gênero *Scaura* com implicações taxonômicas e sobre a evolução cromossômica das espécies de Meliponini.

2. OBJETIVOS

Entender a evolução cromossômica no gênero *Scaura* e obter informações citogenéticas sobre o gênero que auxiliem na resolução de problemas taxonômicos.

2.1. Objetivos específicos

- Investigar padrões citogenéticos de *S. amazonica* e *S. tenuis*;
- Comparar os cariótipos de *S. amazonica* e *S. tenuis* com os resultados já existentes de outras espécies do gênero;
- Compreender melhor a organização de sequências repetitivas nos cromossomos das espécies do estudo.

3. METODOLOGIA

3.1. Obtenção do material biológico

Cerca de 20 larvas de cada espécie, *S. amazonica* e *S. tenuis*, foram coletadas em colônias provenientes do município de Presidente Figueiredo, Amazonas, Brasil. O material foi identificado por Hugo de Azevedo Werneck, seguindo a identificação proposta por Melo & Costa (2004), e depositado na coleção do Apiário da Universidade Federal de Viçosa.

3.2. Descrição do cariótipo

Os cromossomos metafásicos foram obtidos a partir de gânglios cerebrais de larvas pós-defecantes utilizando metodologia descrita por Imai et al. (1988), conforme descrito abaixo. Utilizando um estereomicroscópio, a larva foi dissecada para a retirada do órgão em solução hipotônica-colchicina 0,005% (0,5 mL de solução colchicina 0,1% diluída em 9,5 mL de solução de citrato de sódio a 1%) e os gânglios cerebrais foram imersos por aproximadamente uma hora na mesma solução; transferiu-se o órgão para uma lâmina histológica limpa, com auxílio de uma pipeta Pasteur ou de uma seringa de insulina; com a lâmina inclinada, retirou-se a solução hipotônica-colchicina e foram pingadas múltiplas gotas do fixador I (água destilada:etanol:ácido acético, 4:3:3) para maceração do órgão; transferiu-se a lâmina para um estereomicroscópio, e duas gotas do fixador II (etanol:ácido acético, 1:1) e duas gotas do fixador III (100% ácido acético) foram pingadas, respectivamente. Para a retirada do excesso de cada fixador, pedaços de papel-filtro foram utilizados, posicionados nas bordas das lâminas. Por fim, as lâminas foram acondicionadas em caixas porta-lâmina e conservadas a -20°C para posterior utilização na técnica de hibridização in situ fluorescente. Os cromossomos foram corados com Giemsa 4% para análises numéricas e de morfologia cromossômica. Os cromossomos foram classificados de acordo com Levan et al. (1964), que considera a razão dos braços cromossômicos (braço longo/braço curto), em m = metacêntricos, sm = submetacêntricos e st = subtelocêntricos.

3.3. Mapeamento físico de sequências repetitivas

Para a detecção de clusters de rDNA, o FISH foi realizado usando o método proposto por Pinkel et al. (1986), que consiste em: Preparar as lâminas. Adicionar 100 microlitros de RNase na lâmina, cobrir com lamínula e incubar em câmara úmida 37 °C por 1 hora. Preparar o MIX por lâmina: 2 microlitros 18S + 18 microlitros HybMix. Retirar as lamínulas e lavar em 2xSSC por 5 minutos a temperatura ambiente (Shaker). Adicionar 50 microlitros de pepsina 0,005%, cobrir com lamínula por 10 minutos a temperatura ambiente. Incubar em 1xPBS por 5 min temperatura ambiente (Shaker). Incubar em solução de formaldeído 1% por 10 min temperatura ambiente (100mL1xPBS + 1 mL formaldeído). Incubar em 1xPBS por 5 min temperatura ambiente (Shaker). Desidratar em série alcoólica: 50%, 70% e 100% por 2 min cada. Adicionar 100 microlitros de formamida 70%, cobrir com lamínula e colocar na placa aquecedora 72 °C por 2 minutos e 30 segundos. Desidratar em série alcoólica: 50% (álcool gelado), 70% e 100% por 2 minutos cada. Desnaturalizar o MIX em termociclador (10 min 85 °C e 2 min 4 °C). Adicionar 20 microlitros do MIX por lâmina, cobrir com lamínula e

deixar overnight em câmara úmida 37 °C. Incubar em 2xSSC por 5 minutos temperatura ambiente (Shaker). Incubar em 1xSSC por 5 minutos temperatura ambiente (Shaker). **Para marcação indireta:** Incubar 10 min em 3% NFDM 4xSSC (preparar na hora: 80 mL água destilada + 20 mL 20xSSC + 3g leite em pó MOLICO). Retirar uma alíquota (1 mL) para etapa futura. Lavar em 2xSSC rapidamente. Aplicar 100 microlitros de solução de detecção em cada lâmina, cobrir com lamínula e incubar por 1h em câmara úmida 37 °C (preparar na hora: 990 microlitros de NFDM + 10 microlitros de antidigoxigeninarodamina). **Para marcação direta e indireta:** Incubar em 5 minutos em 4xSSCTween temperatura ambiente (Shaker) Lavar rapidamente em 1xPBS. Desidratar em série alcoólica: 50%, 70% e 100% por 2 minutos cada. Adicionar 2 gotas de solução DAPI e cobrir com lamínulas e conservar na geladeira (e no escuro) até tirar as fotos.

A sonda de rDNA foi amplificada via PCR usando os primers F (5'-TCATATGCTTGTCTCAAAGA-3') e R(3'-TCTAATTTTTCAAAGTAAAC-5') e foi marcada pelo método indireto usando digoxigenina-11-dUTP (Roche, Mannheim, Alemanha). Os sinais de FISH foram detectados indiretamente com antidigoxigenina-rodamina (Roche Applied Science). O microssatélite (GA)₁₅ foi diretamente marcado com Cyanine-3 (Cy3) na região terminal 5' durante síntese pela Sigma (St. Louis, MO, USA). A contracoloração foi obtida com DAPI (DAPI Fluoroshield, Sigma Aldrich).

Para as análises da hibridização *in situ* fluorescente (FISH), as metáfases foram fotografadas com o auxílio de um microscópio Olympus BX53, acoplado a uma câmera monocromática digital XM10, e utilizados filtros de detecção da fluorescência WU (330-385 nm) para DAPI e WG (501-550 nm) para rodamina. Sete indivíduos de cada espécie foram analisados, contabilizando 30 metáfases para cada indivíduo de *S. tenuis* e *S. amazonica* foram analisadas para obter os resultados de FISH descritos.

4. RESULTADOS

Ambas espécies *S. amazonica* e *S. tenuis* apresentaram número cromossômico diploide de $2n=34$. As espécies *S. amazonica* e *S. tenuis* apresentaram fórmulas cariotípicas diplóides $2n=10m+8sm+16st$ (Figura 1a) e $2n=2m+12sm+20st$ (Figura 2b), respectivamente. Esses dados evidenciam uma variação na morfologia cromossômica entre as duas espécies. Ademais, em *S. tenuis* é possível observar dois pares cromossômicos muito maiores (pares 2 e 8) (Figura 1a) em relação aos demais, o que não foi observado em *S. amazonica* (Figura 2a).

Análises citogenéticas feitas utilizando sondas de rDNA 18S mostraram que esses genes ribossomais estão localizados em apenas um par cromossômico (Figura 1b e Figura 2b).

Entretanto, os clusters apresentaram variações em relação ao par cromossômico em que foram mapeados nessas espécies. Em *S. tenuis*, os cistrons foram observados no braço curto do segundo par submetacêntrico (par 3) (Figura 2b), enquanto em *S. amazonica* ocorreram no braço longo do primeiro par metacêntrico (par 1) (Figura 1b).

O microssatélite (GA)_n teve localização variada nos cromossomos das espécies de *Scaura* deste estudo. Em *S. amazonica*, marcações de (GA)_n foram localizadas exclusivamente nos braços longos dos cromossomos (Figura 1c). Já em *S. tenuis*, o mapeamento desse microssatélite foi observado nos braços longos dos cromossomos menores e somente nos braços curtos dos cromossomos maiores (pares 2 e 8) (Figura 2c).

O DAPI corou fortemente a região dos braços longos cromossômicos dos pares 2 e 8 de *Scaura tenuis* (Figura 3).

5. DISCUSSÃO

O número cromossômico diploide obtido para ambas espécies, *S. amazonica* e *S. tenuis*, foi $2n=34$, sendo o mesmo número observado nas outras espécies do gênero previamente estudadas (Rocha et al. 2003; Pereira & Lopes, 2023). A tribo Meliponini é dividida filogeneticamente em três clados, sendo o número cromossômico bem conservado dentro de cada clado (Rasmussen & Cameron, 2010). O número cromossômico encontrado em *Scaura* é similar ao de outras espécies pertencentes ao mesmo clado, corroborando os dados obtidos para outras espécies de Meliponini, sendo proposto que este seja o padrão ancestral para Meliponini neotropicais (Travenzoli et al., 2019a; Cunha et al., 2021). Além disso, a conservação do número cromossômico para as espécies do mesmo gênero segue um traço citogenético comum para abelhas sem ferrão (Tavares et al. 2017; Travenzoli et al. 2019a; Cunha et al. 2021a).

Apesar da semelhança no número de cromossomos, houve variação morfológica cromossômica entre as espécies de *Scaura* do presente estudo. De forma similar, nos gêneros *Plebeia* e *Trigona* também há variações: *Plebeia droryana* ($2n = 24 m + 8 sm + 2st$), *P. cf. mosquito* ($2n = 24 m + 2sm + 8st$), *Plebeia aff. flavocincta* ($2n = 10 m + 18sm + 6st$) (Campos et al., 2024), *Trigona pallens* ($2n = 26 m+6sm+2st$), *Trigona truculenta* ($18 m+14sm+2st$). Isso pode ser resultante de rearranjos cromossômicos, como inversões e translocações (Barth et al., 2011; Cunha et al., 2018, Kerr e Silveira, 1972; Rocha et al., 2003b). No caso dos dois pares cromossômicos em *S. tenuis*, uma possível explicação para esse polimorfismo morfológico seria a ocorrência de amplificação de heterocromatina. A fórmula cariotípica obtida de *S. tenuis* e da espécie *S. latitarsis* de trabalhos anteriores diferem

fortemente, mesmo utilizando outra metodologia de classificação dos cromossomos. Em *S. latitarsis* não há a presença de dois pares cromossômicos bem maiores que o restante dos outros, como é visto em *S. tenuis* do presente estudo (Rocha et al., 2023). Isso mostra que a sinonimização dessas duas espécies não se aplica, sendo então espécies distintas.

Estudos de mapeamento do rDNA 18S, mostram que sua localização em apenas um par de cromossomos é considerado como padrão ancestral putativo em Hymenoptera, em geral. Além disso, na maior parte das espécies de Hymenoptera analisadas, a localização dos genes ribossomais foi nas regiões pericentroméricas ou terminais (Menezes et al., 2021; Teixeira et al., 2021; Cunha et al., 2024). Em abelhas, especificamente, essas marcações são mais frequentes nas regiões intersticiais ou terminais (Menezes et al., 2021). As marcações obtidas no presente estudo estão na região terminal de apenas um par cromossômico, com clusters variando em relação ao par cromossômico em que foi mapeado (Figura 1b e Figura 2b). Os resultados obtidos para *S. amazonica* (Figura 1b) e *S. tenuis* (Figura 2b) seguem o padrão ancestral descrito anteriormente de distribuição do gene ribossomal 18S, assim como é visto em várias espécies de Meliponini, como *Leurotrigona muelleri*, *Melipona quinquefasciata*, *Melipona fasciculata*, *Melipona fulva*, *Melipona lateralis*, *Duckeola ghiliani* e *Lestremelitta limao*. Em outras espécies, como *Tetragonisca fiebrigi*, *Schwarziana quadripunctata* e em *Frieseomelitta trichocerata*, há marcações de 18S em mais de um par de cromossomos, sendo um padrão apomórfico (Cunha et al., 2023; Andrade et al., 2024), diferentemente dos resultados obtidos para as espécies neste estudo.

Apesar de estarem em apenas um par de cromossomos, as marcações de rDNA 18S, podem apresentar diferenças no tamanho, como é visto em *M. fulva* e *S. quadripunctata* (Cunha et al., 2021, 2023). Quanto à localização nos pares cromossômicos, os cistrons de rDNA 18S estão localizados no braço longo do segundo par submetacêntrico (par 3) em *S. tenuis* (Figura 2b) e no braço curto do primeiro par metacêntrico (par 1) em *S. amazonica* (Figura 1b). Com isso, foi detectada uma variação intraespecífica da localização dos clusters de rDNA nas espécies estudadas, assim como nas vespas *Synoeca cyanea* e *Synoeca ilheensis* (Menezes et al., 2019). Em *Plebeia*, também há marcações de 18S rDNA em diferentes pares cromossômicos para cada espécie, como em *P. droryana* com o par 4 marcado no braço curto e em *P. poecilochroa* com o par 10 marcado no braço curto (Andrade et al., 2024). Em *Plebeia lucii* e em *D. ghiliani*, o rDNA está na região terminal do braço curto do primeiro par de cromossomos metacêntricos (Cunha et al., 2023), similar ao que é observado em *S. tenuis* (Figura 2b) e diferentemente de *S. amazonica* (Figura 1b).

Em geral, os cromossomos caracterizam-se por apresentar uma grande quantidade de DNA repetitivo em regiões de heterocromatina (Milani et al., 2014), porém estudos de mapeamento de microssatélites em Meliponini demonstraram que essas sondas geralmente tem hibridização preferencial na região eucromática (Cunha et al., 2024), semelhante ao observado nas abelhas do presente estudo.

O mapeamento do microssatélite (GA)₁₅ foi observado nos braços longos dos cromossomos em *S. amazonica* de forma exclusiva (Figura 1c). Diferentemente, em *S. tenuis* o microssatélite foi localizado nos braços longos dos cromossomos, com exceção dos cromossomos maiores (pares 2 e 8), cuja marcação foi observada nos braços cromossômicos curtos (Figura 2c). Os resultados obtidos vão de acordo com a possível condição ancestral de ocorrência de microssatélite restrita a apenas um braço nos cromossomos em espécies com 2n=34 cromossomos (Cunha et al., 2023). Com a coloração com Giemsa (Figura 1a e Figura 2a), é possível perceber regiões heterocromáticas e eucromáticas de acordo com o padrão de coloração em regiões mais escuras ou mais claras, respectivamente. Com isso, é possível notar que os dois pares maiores de *S. tenuis* possuem braços longos heterocromáticos, enquanto que os braços curtos, com coloração mais clara por Giemsa, indicam a região eucromática dos cromossomos. Geralmente, o (GA)₁₅ é observado nas regiões eucromáticas dos cromossomos de abelhas Meliponini (Lopes et al., 2014; Cunha et al., 2020., 2023; Andrade et al., 2024). Dessa forma, o resultado obtido vai de acordo com esse padrão, já que o microssatélite não foi detectado nos braços longos de *S. tenuis* e sim nos braços curtos dos pares 2 e 8 (Figura 2c), e *S. amazonica* apresentou marcações restritas aos braços longos dos cromossomos (Figura 1c). Como o (GA)₁₅ não foi detectado nos braços longos dos pares 2 e 8 em *S. tenuis* (Figura 2c), essa região aparenta ser heterocromática, sendo indício de ampliação da heterocromatina. Essa ampliação parece estar diretamente relacionada com o deslocamento dos sítios de rDNA para a região terminal cromossômica (Cunha et al., 2020; Pereira et al., 2021), como é observado em *Melipona (Melikerria) fasciculata* (Pereira et al., 2019). Dessa forma, essa hipótese de ampliação de heterocromatina também explicaria o polimorfismo morfológico cromossômico entre as duas espécies de *Scaura* estudadas. Ademais, a marcação de (GA)₁₅ em *S. amazonica* abrange a localização do rDNA 18S, diferentemente do que ocorre em *S. tenuis*.

O DAPI hibridiza em regiões ricas em AT, sendo equivalentes às regiões heterocromáticas dos cromossomos. Em *S. tenuis*, o (GA)₁₅ não hibridizou no braço longo (Figura 2c) e o DAPI está fortemente marcado nesse braço (Figura 3). Assim, a possibilidade

de que o braço longo seja heterocromático e a hipótese de amplificação de heterocromatina nos pares 2 e 8 são sustentadas.

6. CONCLUSÃO

O número cromossômico diplóide obtido para ambas espécies de $2n=34$ é o mesmo número observado nas outras espécies do gênero, seguindo o proposto padrão ancestral de Meliponini neotropicais. O polimorfismo morfológico observado entre as duas espécies de *Scaura* pode ser resultante de rearranjos cromossômicos, como inversões e translocações. Em específico, *S. tenuis* pode ter sofrido ampliação da heterocromatina em dois pares cromossômicos, como foi evidenciado pelo microssatélite (GA)₁₅. Os resultados obtidos do mapeamento do gene ribossomal 18S seguem o padrão ancestral para Meliponini neotropicais, com apenas um par de cromossomos marcados. Ainda sim, foi possível observar variação entre as espécies do gênero quanto a localização desses cistrons que já sugere rearranjos cromossômicos envolvendo essas regiões gênicas. Cariótipos contrastantes foram observados entre as espécies desse estudo e de *S. latitarsis* previamente estudada mostrando que a citogenética pode ser uma ferramenta auxiliar na delimitação de espécies de *Scaura*.

Com isso, esse trabalho expandiu o conhecimento citogenético do gênero *Scaura*, caracterizando o cariótipo e mapeando pela primeira vez regiões repetitivas do DNA. Estudos futuros em outras espécies do gênero integrando abordagens citogenômicas para caracterização da composição da heterocromatina poderão trazer informações importantes para o entendimento da evolução cromossômica do grupo e do possível complexo de espécies em *S. latitarsis*.

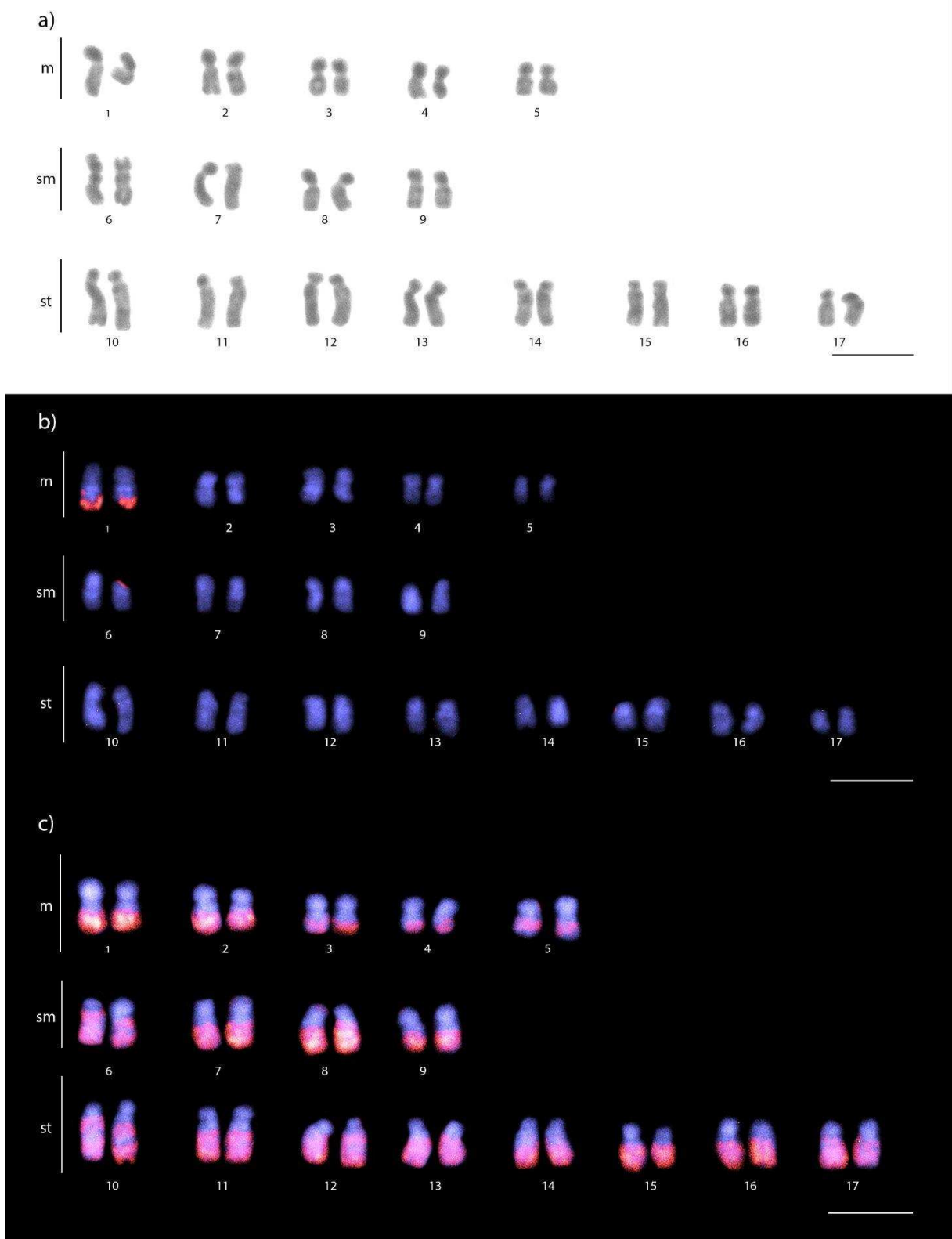


Figura 1: Cariótipo de *Scaura amazonica* com $2n=34$ cromossomos, corados com Giemsa (a); FISH com diferentes sondas de DNA repetitivo (regiões vermelhas): 18S rDNA (b) e GA₁₅ (c). Cromossomos foram classificados como metacêntrico (m), submetacêntrico (sm) e subtelocêntrico (st). Barras = 5 μ m

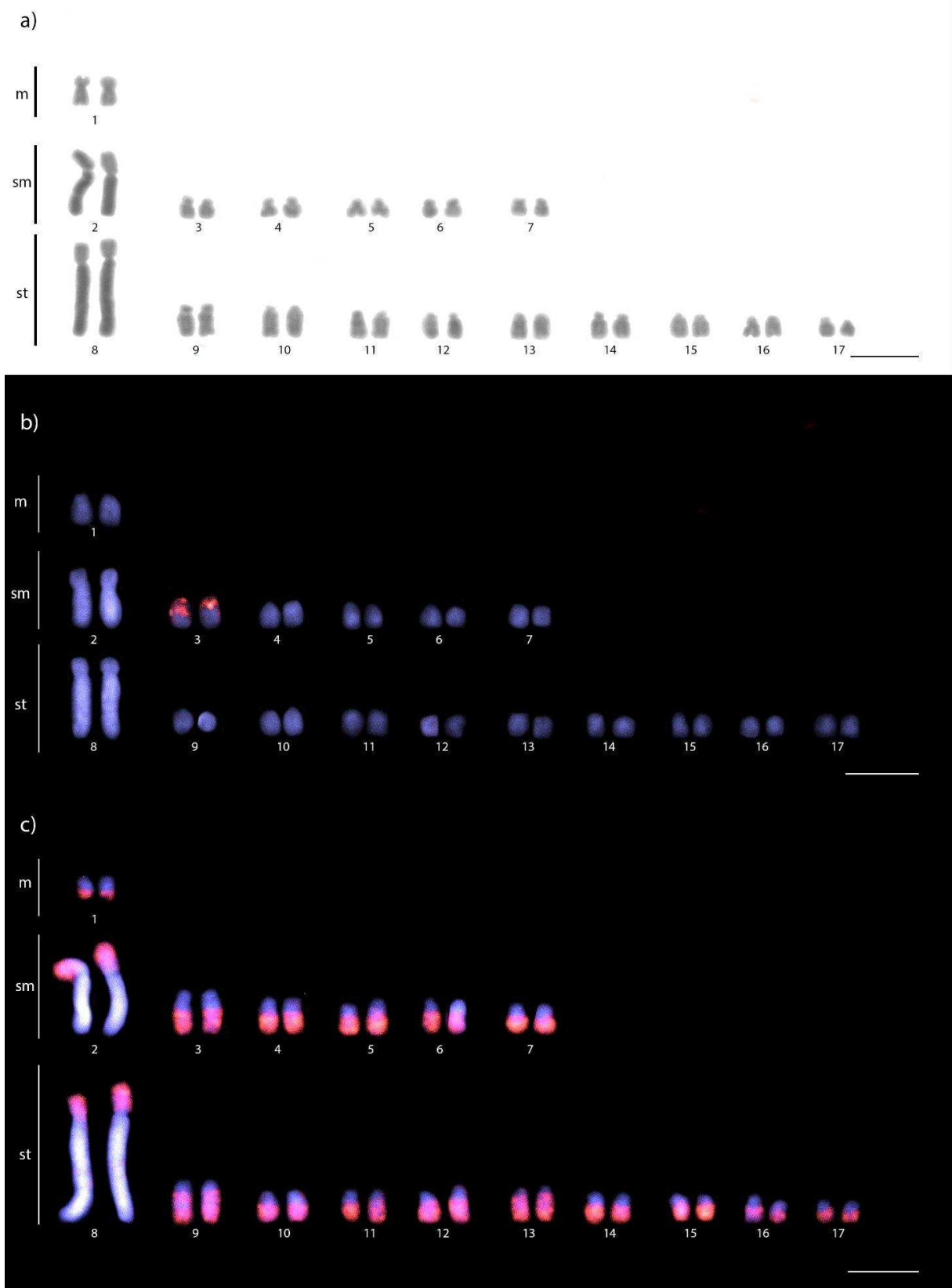


Figura 2: Cariótipo de *Scaura tenuis* com $2n=34$ cromossomos, corados com Giemsa (a); FISH com diferentes sondas de DNA repetitivo (regiões vermelhas): 18S rDNA (b) e GA₁₅ (c). Cromossomos foram classificados como metacêntrico (m), submetacêntrico (sm) e subtelocêntrico (st). Barras = 5 μm.

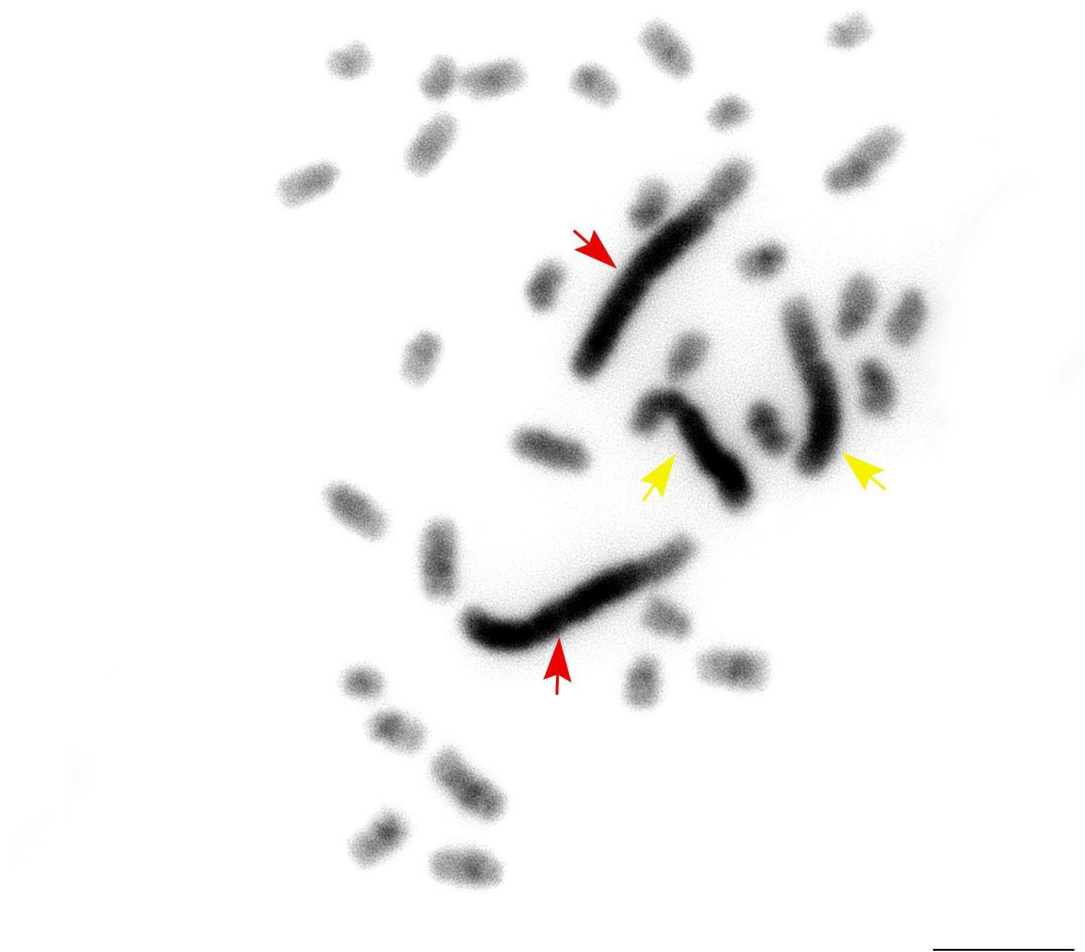


Figura 3: Metáfase de *Scaura tenuis* ($2n=34$) corada com DAPI. Setas apontam os pares cromossômicos maiores: par 2 (setas amarelas) e par 8 (setas vermelhas). Região do braço longo corada fortemente com DAPI, indicando região rica em AT e possivelmente heterocromatina. Barra = $5\mu\text{m}$.

7. REFERÊNCIAS

ABAD, A.C.A., DE ARAÚJO LOPES, F., JUNIOR, J.W.P., & MOTA, R.A. Marcadores moleculares e suas aplicações nas pesquisas com animais. **Acta Veterinaria Brasilica**, 8:10-18, 2024.

ANDRADE, B.L.F., LOPES, A.N.G., TEIXEIRA, G.A., TAVARES, M.G. Karyotypes and chromosomal mapping of some repetitive DNAs in two stingless bee species (Apidae: Meliponini), with the description of a B chromosome in *Plebeia* genus. **Cytogenet Genome Res.**, 164:267–275, 2024. <https://doi.org/10.1159/000542295>

ANDRADE-SOUZA, V., DUARTE, O.M.P., MARTINS, C.C.C., SANTOS, I.S., COSTA, M.G.C., COSTA, M.A. Comparative molecular cytogenetics in *Melipona* Illiger species (Hymenoptera, Apidae). **Sociobiology**, 65(4):696–705, 2018. <https://doi.org/10.13102/sociobiology.v65i4.3480>

ANNE, C. Choosing the right molecular genetic markers for studying biodiversity: from molecular evolution to practical aspects. **Genetica**, 127: 101- 120, 2006.

BARROS, L.A.C., CHAUL, J.C.M., ORIVEL, J., AGUIAR, H.J.A.C. Cytogenetics of *Strumigenys louisianae* Roger, 1863 (Formicidae: Myrmicinae) from North-eastern Amazonia shed light on a difficult species complex. **Zoologischer Anzeiger**, 294, 100-105, 2021.

BARBOZA, V.P., COSTA, M.A. Cytogenetic analysis in *Trigona spinipes* Fabricius (Hymenoptera, Meliponina) reveals intraspecific variation. **Neotrop Entomol**, 50(5):846–9, 2021. <https://doi.org/10.1007/s13744-021-00853-7>

BARTH, A., FERNANDES, A., POMPOLO, S.G., COSTA, M.A. Occurrence of B chromosomes in *Tetragonisca* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): A new contribution to the cytotaxonomy of the genus. **Gen. Mol Biol**, 34, 7–79, 2011.

CAMARGO, J.M.F., PEDRO, S.R.M. & MELO, G.A.R., 2023. Meliponini Lepeletier, 1836. In Moure JS, Urban D & Melo GAR (Orgs). **Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region - online version**. Available at <https://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Acesso em: 04 de maio de 2025.

CAMPOS, C.L., TEIXEIRA, G.A., LOPES, D.M., BITENCOURT, J.A., BEZERRA, D.D., ALVES, R.M.O. New patterns of polymorphism in the karyotypic analysis of the genus *Plebeia* (Hymenoptera, Apidae). **Apidologie**, 55(4):45–12, 2024. <https://doi.org/10.1007/s13592-024-01090-8>

COSTA, M.A., DEL LAMA, M.A., MELO, G.A.R., SHEPPARD, W.S. Molecular phylogeny of stingless bees (Apidae, Apinae, Meliponini) inferred mitochondrial 16S rDNA sequences. **Apidologie**, 34:73-84, 2003.

CUADRADO, A., JOUVE, N. Evolutionary trends of different repetitive DNA sequences during speciation in genus *Secale*. **Journal Heredity**, 93: 339-345, 2002.

CUNHA, M. S., CAMPOS, L. A. O., & LOPES, D. M. Insights into the heterochromatin evolution in the genus *Melipona* (Apidae: Meliponini). **Insectes Sociaux**, 67, 391–398, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00040-020-00773-6>

CUNHA, M.S., CARDOSO, D.C., CRISTIANO, M.P., CAMPOS, L.A.O., LOPES, D.M. The bee chromosome database (Hymenoptera: Apidae). **Apidologie**, 52, 493-502, 2021.

CUNHA, M.S., NOVAES, C.M., PEREIRA, J.A., CAPOCO, M.C., FERNANDES-SALOMÃO, T.M., LOPES, D.M. Supernumerary B chromosomes of *Tetragonisca fiebrigi* share repeat content with standard chromosome set of both *T. fiebrigi* and *T. angustula* (Apidae: Meliponini). **Cytogenet Genome Res**, 163(1–2):52–8. 2023. <https://doi.org/10.1159/000533431>

CUNHA, M. S., TRAVENZOLI, N. M., FERREIRA, R. D. P., CASSINELA, E. K., SILVA, H. B. D., OLIVEIRA, F. P. M., SALOMÃO, T. M. F., & LOPES, D. M. Comparative cytogenetics in three *Melipona* species (Hymenoptera: Apidae) with two divergent heterochromatic patterns. **Genetics and Molecular Biology**, 41(4), 806–813, 2018. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2017-0330>

DOMINGUES, A.M.T. Relações filogenéticas do gênero *Scaura* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) e filogeografia de *Scaura latitarsis*. Tese, **Universidade de São Paulo**, 200pp, 2010.

ELIZEU, A.M., TRAVENZOLI, N.M., FERREIRA, R.P., LOPES, D.M., TAVARES, M.G. Comparative study on the physical mapping of ribosomal genes and repetitive sequences in *Friesella schrottkyi* (Fries 1900) (Hymenoptera: Apidae, Meliponini). **Zoo Anz**, 292:225–30, 2021.

FRANCINI, I. B., GROSS, M. C., NUNES-SILVA, C. G., & CARVALHO ZILSE, G. A. Cytogenetic analysis of the Amazon stingless bee *Melipona seminigra merrillae* reveals different chromosome number for the genus. **Scientia Agricola**, 68, 592–593, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162011000500012>

GUERRA, MS. **Introdução à Citogenética Geral**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara. 132 p. 1988.

HILLIS, D. M.; DIXON, M. T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. **The Quarterly review of biology**, 66: 411-453, 1991.

IMAI, H.T., TAYLOR, R.W., CROZIER, R.H. Modes of spontaneous chromosomal mutation and karyotype evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis. **Japan J Gen.**, 63:159–85, 1988.

IMAI, H. T.; URBANI, C. B.; KUBOTA, M.; SHARMA, G. P.; NARASIMHANNA, M. N.; DAS, B.C.; RAJASEKARASETTY, M. R. Karyological survey of Indian ants. **Japan J Gen.**, 1984. 59: 1-32.

KERR, W.E., SILVEIRA, Z.V. Karyotypic evolution of bees and corresponding taxonomic implications. **Evol Int J org Evol**, 1972. 26, 197–202.

KOCHER, T. D.; THOMAS, W. K.; MEYER, A.; EDWARDS, S. V.; PÄÄBO, S.; VILLABLANCA, F. X.; WILSON, A. C. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 86: 6196-6200, 1989.

LAROCA, S., LAUER, S. Adaptação comportamental de *Scaura latitarsis* para a coleta de pólen (Hymenoptera, Apoidea). **Acta Biológica Paranaense**, 2, 147-152, 1973.

LEVAN, A., FREDGA, K., SANDBERG, A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, 52, 201-220, 1964.

LOISELLE, R.; FRANCOEUR, A.; FISCHER, K.; BUSCHINGER, A. Variations and taxonomic significance of the chromosome numbers in the Nearctic species of the genus *Leptothorax* (s.s.) (Formicidae: Hymenoptera). **Caryologia** 43:321-334, 1990.

LOPES, D.M., TRAVENZOLI, N.M., FERNANDES, A., CAMPOS, L.A.O. Different levels of chromatin condensation in *Partamona chapadicola* and *Partamona nhambiquara* (Hymenoptera, Apidae). **Cytogenet Genome Res.**, 160(4): 206–13, 2020. <https://doi.org/10.1159/000507835>

LOPES, D. M. et al. Similarity of heterochromatic regions in the stingless bees (Hymenoptera: Meliponini) revealed by chromosome painting. **Caryologia**, v. 67, n. 3, p. 222–226, 3 jul. 2014.

LÓPEZ-FLORES, I., & GARRIDO-RAMOS, M. A. The repetitive DNA content of eukaryotic genomes. **Repetitive DNA**, 7:1-28, 2012.

MARIANO, C. S. F.; BARROS, L. A. C.; VELASCO, Y. M.; GUIMARÃES. (2019) IN: POMPOLO S.G.; DELABIE JHC. Citogenética de hormigas de la región neotropical. In: Fernández F, Guerrero R, Delsinne T (Eds) Hormigas de Colombia. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 131-157, 2019.

MELO, G.A.R, COSTA, M.A. A new stingless bee species of the genus *Scaura* (Hymenoptera, Apidae) from the Brazilian Atlantic forest, with notes on *S. latitarsis* (Friese). *Zootaxa*, 544, 1-10, 2004.

MENEZES, R. S., CABRAL-DE-MELLO, D. C., MILANI, D., BARDELLA, V. B., & ALMEIDA, E. A. The relevance of chromosome fissions for major ribosomal DNA dispersion in hymenopteran insects. *Journal of Evolutionary Biology*, 34, 1466–1476, 2021. <https://doi.org/10.1111/jeb.13909>

MENEZES, R. S., GAZONI, T., & COSTA, M. A. Cytogenetics of warrior wasps (Vespidae: *Synoeca*) reveals intense evolutionary dynamics of ribosomal DNA clusters and an unprecedented number of microchromosomes in Hymenoptera. *Biological Journal of the Linnean Society*, 126, 925–935, 2019. <https://doi.org/10.1093/biolinnean/bly210>

MEYER, A., TODT, C., MIKKELSEN, N. T., LIEB, B. Fast evolving 18S rRNA sequences from Solenogastres (Mollusca) resist standard PCR amplification and give new insights into mollusk substitution rate heterogeneity. *BMC evolutionary biology*, 10: 1-12, 2010.

MICHENER, C.D. The Bees of the World, 2nd ed. **Johns Hopkins University Press**, Baltimore, 992 pp, 2007.

MILANI, D., CABRAL-DE-MELLO, D.C. Microsatellite organization in the grasshopper *Abracris flavolineata* (Orthoptera: Acrididae) revealed by FISH mapping: remarkable spreading in the A and B chromosomes. *PLoS ONE* 9(5): e97956, 2014.

MOURE, J.S., URBAN, D., MELO, G.A.R. Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the neotropical region, **Sociedade Brasileira de Entomologia**, 1058pp, 2007.

PEREIRA, J.A., CABRAL-DE-MELLO, D.C., LOPES, D.M. The satellite DNAs populating the genome of *Trigona hyalinata* and the sharing of a highly abundant satDNA in *Trigona* genus. *Genes*, 14(2): 418, 2023.

PEREIRA, J.A., MILANI, D., FERRETTI, A.B.S.M., BARDELLA, V.B., CABRAL-DE-MELLO, D.C., LOPES, D.M. The extensive amplification of heterochromatin in *Melipona* bees revealed by high throughput genomic and chromosomal analysis. *Chromosoma*, 130(4):251–62, 2021b;. <https://doi.org/10.1007/s00412-021-00764-x>

PEREIRA, J.A., SALOMÃO, T.M.F., LOPES, D.M. Different repetitive DNA sequences make up heterochromatin in Meliponini. **Apidologie**, 51(5):855–60, 2020. <https://doi.org/10.1007/s13592-020-00766-1>

PEREIRA, J.A., TRAVENZOLI, N.M., OLIVEIRA, M.P., WERNECK, H.A., SALOMÃO, T.M.F., & LOPES, D.M. Molecular cytogenetics in the study of repetitive sequences help in understanding the evolution of heterochromatin in *Melipona* (Hymenoptera, Meliponini). **Genetica**, 149(1), 55–62, 2021a. <https://doi.org/10.1007/s10709-020-00111-5>

PICCOLI, M.C.A., BARDELLA, V.B., CABRAL-DE-MELLO, D.C. Repetitive DNAs in *Melipona scutellaris* (Hymenoptera: Apidae: Meliponidae): chromosomal distribution and test of multiple heterochromatin amplification in the genus. **Apidologie**. 49(4):497-504, 2018. <https://doi.org/10.1007/s13592-018-0577-z>

RASMUSSEN, C., CAMERON, S.A. Global stingless bee phylogeny supports ancient divergence, vicariance, and long distance dispersal. **Biol. J. Linn. Soc.**, 99, 206-232, 2010.

ROCHA, M.P., POMPOLO, S.G., CAMPOS, L.A.O. Citogenética da tribo Meliponini (Hymenoptera, Apidae). In: MELO, G.A.R., SANTOS, I.A. (eds) **Apoidea Neotropicalia**. Homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure, 311–320, 2003a.

ROCHA, M.P., CRUZ, M.P., FERNANDES, A., WALDSCHMIDT, A.M., SILVA-JUNIOR J.C., POMPOLO, S.G. Longitudinal differentiation in *Melipona mandacaia* (Hymenoptera, Meliponini) chromosomes. **Hereditas**, 138, 133–137, 2003b.

SCHEMBERGER, M. O., OLIVEIRA, J. I. N., NOGAROTO, V., ALMEIDA, M. C., ARTONI, R. F., CESTARI, M. M., VICARI, M. R. Construction and characterization of a 59 repetitive DNA library in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes): A genomic and evolutionary approach to the degeneration of the W sex chromosome. **Zebrafish**, 11: 517-527, 2014.

SILVEIRA, F.A., MELO, G.A.R., ALMEIDA, E.A.B. **Abelhas Brasileiras: Sistemática e Identificação**. 1ª Edição, 253 pp, 2002

TAVARES, M.G., CARVALHO, C.R., SOARES, F.A.F., CAMPOS, L.A.O. Genome size diversity in stingless bees (Hymenoptera: Apidae, Meliponini). **Apidologie**, 43, 731–736, 2012.

TAVARES, M.G., LOPES, D.M., CAMPOS, L.A.O. An overview of cytogenetics of the tribe Meliponini (Hymenoptera: Apidae). **Genetica**, 145, 241–258, 2017.

TEIXEIRA, G. A., AGUIAR, H. J. A. C., PETITCLERC, F., ORIVEL, J., LOPES, D. M., & BARROS, L. A. C. Evolutionary insights into the genomic organization of major ribosomal DNA in ant chromosomes. **Insect Molecular Biology**, 30, 340–354, 2021. <https://doi.org/10.1111/imb.12699>

TEIXEIRA, G.A., JACINTHO, G.F., AGUIAR, H.J.A.C., LOPES, D.M., BARROS, L.A.C. Cytogenetic Analysis of the Fungus-Farming Ant *Cyphomyrmex rimosus* (Spinola, 1851) (Formicidae: Myrmicinae: Attini) Highlights Karyotypic Variation. **Cytogenet Genome Res**, 162, 10, 579–586, 2022.

TRAVENZOLI, N. M., BARBOSA, I. C. DE O., CARVALHO-ZILSE, G. A., SALOMÃO, T. M. F., & LOPES, D. M. Karyotypic description and repetitive DNA chromosome mapping of *Melipona interrupta* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Meliponini). **Caryologia**, 72(2), 91–95, 2019. <https://doi.org/10.13128/cayologia-239>

TRAVENZOLI NM, CARDOSO DC, WERNECK HA, FERNANDES-SALOMÃO TM, TAVARES MG, LOPES DM. The evolution of haploid chromosome numbers in Meliponini. *PLoS One*, 14(10):e0224463, 2019b. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224463>

TRAVENZOLI, N.M., CUNHA, M.S., TEIXEIRA, L.V. Cytogenetic characterization of *Austroplebeia australis*: evolutionary hints from a stingless bee outside the Neotropical region. **Apidologie** 53, 64, 2022. <https://doi.org/10.1007/s13592-022-00969-8>

TRAVENZOLI, N.M., LIMA, B.A., CARDOSO, D.C., DERGAM, J.A., FERNANDES-SALOMÃO, T.M., LOPES, D.M. Cytogenetic analysis and chromosomal mapping of repetitive DNA in *Melipona* species (Hymenoptera, Meliponini). **Cytogenet Genome Res**, 158(4):213–24, 2019a. <https://doi.org/10.1159/000501754>