

CAMILA MOURA NOVAES

**ANÁLISES MOLECULAR, CARIOTÍPICA E MORFOMÉTRICA DE  
ABELHAS SEM FERRÃO DO GÊNERO *Partamona* Schwarz, 1939**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para  
obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2019

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da  
Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

N935a  
2019 Novaes, Camila Moura, 1984-  
Análises molecular, cariotípica e morfométrica de abelhas sem  
ferrão do gênero *Partamona* Schwarz, 1939 / Camila Moura Novaes. -  
Viçosa, MG, 2019.  
xv, 82 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Texto em português e inglês

Orientador: Tânia Maria Fernandes Salomão.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Meliponini. 2. Filogenia. 3. Cariótipos. I. Universidade Federal  
de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-  
Graduação em Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

CDD 22. ed. 595.799

CAMILA MOURA NOVAES

**ANÁLISES MOLECULAR, CARIOTÍPICA E MORFOMÉTRICA DE  
ABELHAS SEM FERRÃO DO GÊNERO *Partamona* Schwarz, 1939**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título do *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 15 de fevereiro de 2019.

---

Maykon Passos Cristiano

---

Danon Clemes Cardoso

---

Jorge Abdala Dergam  
dos Santos

---

Pedro Seyferth Ribeiro Romano

---

Denilce Meneses Lopes  
(Presidente)

*Se antes de empreender uma longa viagem, alguém pedisse minha opinião, minha resposta dependeria inteiramente do gosto do viajante por esta ou por aquela ciência, e das vantagens que poderia obter de acordo com o ponto de vista de seus estudos. [...] É preciso, pois, que se tenha um objetivo, que esse objetivo seja um estudo a ser completado, uma verdade a ser descoberta; em resumo, que esse objetivo o sustente e o encoraje.”*

*Charles Darwin, Diário de Pesquisas, 1845.*

*Dedico este trabalho à minha mãe Neuza, ao meu  
Pai José, ao meu irmão Guilherme e ao Clodoaldo.*

## AGRADECIMENTOS

A minha gratidão a todas as agências de fomento que tornaram esse trabalho possível;  
À UFV e ao programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e a todos os seus funcionários e professores;  
A todos que me ajudaram a obter as “abelhas boca de sapo”;  
À Denilce e Tânia pela orientação;  
Ao professor Lúcio pelos ensinamentos;  
Ao professor Vander pela ajuda nas coletas de campo;  
Ao professor Wellington pela ajuda na citometria de imagem  
Aos professores Jorge, Pedro, Danon e Maykon por participarem da banca.  
Às companheiras de laboratório, Marina, Priscila, Jaqueline e Gisele pela ajuda com os trabalhos e pelas experiências trocadas;  
Ao Clodoaldo pela ajuda nas coletas;  
À Nena pelas terapias.  
E a todos que me ajudaram nesses quatro anos, seja na área acadêmica, na área pessoal ou na espiritual.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>x</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>xii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xiv</b>
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>1</b>
Referências bibliográficas .....	6
<b>2. ARTIGO I – CHROMOSOME AND MOLECULAR DATA REVEAL A DIFFERENT EVOLUTIONARY HISTORY FOR THE GENUS <i>Partamona</i> (SCHWARZ, 1939).....</b>	<b>09</b>
Abstract .....	09
Introduction .....	10
Materials and methods .....	11
Results .....	14
Discussion .....	15
References .....	18
<b>3. ARTIGO II – VARIABILIDADE MORFOMETRICA DE ESPÉCIES DE ABELHAS SEM FERRÃO DO GÊNERO <i>Partamona</i> SCHWARZ, 1939.....</b>	<b>31</b>
Resumo .....	31
Introdução .....	32
Materiais e métodos .....	33
Resultados .....	35
Discussão .....	36
Referências bibliográficas.....	38
<b>4. ARTIGO III – DIVERSIDADE MORFOLÓGICA E CARIOTÍPICA ENTRE POPULAÇÕES DE <i>Partamona helleri</i> (FRIESE, 1900): CROMOSSOMOS B E IMPLICAÇÕES PARA EVOLUÇÃO DA ESPÉCIE.....</b>	<b>45</b>
Resumo .....	45
Introdução .....	46
Materiais e métodos .....	48

Resultados .....	52
Discussão .....	55
Referências bibliográficas .....	60
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>82</b>

## LISTA DE FIGURAS

### Artigo I

**Figure 1:** Karyotypes of the *Partamona* species, based on Giemsa staining. Females:  $2n=34$ . Male:  $n=17$ . a and b: females and males of *P. gregaria*, respectively. c: *P. auripennis*. d: *P. rustica*. and: *Partamona* sp. 10  $\mu$ m bar.....23

**Figure 2:** Metaphase of the *Partamona* species. a: Heterochromatin distribution in the centromeric and pericentromeric regions, and regions of less intense coloration along the chromosomal arm of *Partamona rustica*. b: in the centromeric and pericentromeric regions of *P. gregaria*, c: and along the chromosomal arm of P. d: DAPI of *P. rustica*; e: *P. gregaria*; f: *P. auripennis*; k: and *Partamona* sp. g:  $CMA_3^+$  in *P. rustica*; h: *P. gregaria*; i: *P. auripennis*; I: and *Partamona* sp. j: 18S rDNA sites on six chromosomes of the species *P. rustica*. 10  $\mu$ m bar.....24

**Figure 3:** a: Concatenated Bayesian phylogeny of the COI and CytB genes showing the division of the species into two clades (clades A and B). b: Ideogram representative of the distribution pattern of heterochromatin and  $CMA_3^+$  for the species of the genus included in the molecular analyses.....25

**Figure S1:** Concatenated Bayesian phylogeny of the COI and CytB genes, including the out groups.....29

### Artigo II

**Figura 1:** Asa anterior direita de operárias adultas de abelhas do gênero *Partamona*. Os círculos brancos representam os pontos anatômicos utilizados nas análises morfométrica e os números indicam a ordem que os pontos anatômicos foram marcados.....41

**Figura 2:** Figura 2: Gráfico dos escores das variáveis canônicas CV1 e CV2 da asa anterior direita de *P. helleri*. Os outlines em azul escuro representam as deformações encontradas nas extremidades dos eixos CV1 (à direita) e CV2 (à esquerda), já os outlines em azul claro representam a deformação média. Os valores abaixo dos outlines indicam os extremos das variações positiva e negativa para cada CV.....42

### Artigo III

**Figura 1:** Asa anterior direita de operárias adultas de *Partamona helleri*. Os círculos brancos representam os pontos anatômicos e os números indicam a ordem que os pontos anatômicos foram marcados.....65

**Figura 2:** Gráfico dos escores das variáveis canônicas CV1 e CV2 da asa anterior direita de *P. helleri*. Os outlines em azul escuro representam as deformações das asas encontradas nas extremidades dos eixos CV1 (abaixo) e CV2 (na esquerda), já os outlines em azul claro representam a deformação média. Os valores abaixo dos outlines indicam os extremos das variações positiva e negativa para cada CV.....65

**Figura 3:** Cromossomos de *P. helleri* de acordo com as localidades de coleta. As setas indicam os cromossomos B. Barra: 5µm.....70

**Figura 3 continuação:** Cromossomos de *P. helleri* de acordo com as localidades de coleta. As setas indicam os cromossomos B. Barra: 5µm.....71

**Figura 4:** a) Cariótipo de *P. helleri* submetido a banda C. b-h) Fluorocromos DAPI em azul e CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> em verde. Os asteriscos indicam os sinais positivos.....72

**Figura 4 continuação:** Cariótipo de *P. helleri* de acordo com as localidades de coleta. Fluorocromos DAPI em azul e CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> em verde. Os asteriscos indicam os sinais positivos.....73

**Figura 5:** Distribuição do rDNA 18S em *P. helleri*. Setas indicam os cromossomos B. a) Cataguases-MG; b) Viçosa-MG; c) Linhares-ES; d) Governador Lindemberg-ES; e) Itarana-ES; f) Santa Teresa-ES; g) Natividade-RJ; h) Carangola-MG; i) Porciúncula-RJ; j) Antônio Prado de Minas-MG; k) Ponte Nova-MG; l) Jaguaráçu-MG; m,n) Macarani-BA. (m) Macho, os demais cariótipos são referentes às fêmeas.....74

**Figura 6:** Cariogramas de *P. helleri* com sinais positivos do microssatélite GA<sub>(15)</sub>. Em azul os cromossomos corados com DAPI e em vermelho as marcações do microssatélite

GA<sub>(15)</sub>. (a, f) Machos, (b, c, d, e, g, h, i, j, k, l, m, n) fêmeas. Os asteriscos indicam as variações encontradas.....75

**Figura 7:** Cariogramas de *P. helleri* com sinais positivos do microssatélite TTAGG<sub>(6)</sub>. Em azul os cromossomos corados com DAPI e em vermelho as marcações do microssatélite TTAGG<sub>(6)</sub>. (d e n) Machos, (a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m) fêmeas.....76

**Figura 8:** Figura 6: Cariogramas de *P. helleri*. Os cromossomos estão estequiometricamente corados e possuem as porções teloméricas e centroméricas bem definidas, pré-requisitos para o mensuramento dos valores de área, DO e DOI. Barra=20  $\mu\text{m}$ .....77

**Figura 9:** Mapa com distribuição dos citótipos encontrados em *P. helleri* de acordo com a localidade geográfica e distribuição dos cromossomos B.....81

## LISTA DE TABELAS

### Artigo I

**Table 1:** Species of the genus *Partamona* used in the molecular analyses and their respective sampling locations and geographic coordinates.....26

**Table 2:** Cytogenetic data (diploid number, localization of heterochromatin, and CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> and 18S rDNA sites) for the genus *Partamona*, separated into the groups defined by Pedro e Camargo (2003)..... 27

**Table S1 2:** Modifications of the C Banding Protocol of the cytogenetically analyzed species.....30

### Artigo II

**Tabela 1:** Espécies de *Partamona* utilizadas nas análises morfométricas e suas respectivas localidades.....41

**Tabela 2:** Distâncias de Procrustes entre as espécies e seu p-valor para teste de permutação de 1000 réplicas. Resultado do CVA da asa anterior direita.....43

**Tabela 3:** Distâncias de Mahalanobis entre as espécies e seu p-valor para teste de permutação de 1000 réplicas. Resultado do CVA da asa anterior direita.....44

### Artigo III

**Tabela 1:** Populações de *Partamona helleri* utilizadas nas análises morfológicas e suas respectivas localidades.....64

**Tabela 2:** Distâncias de Mahalanobis entre as espécies e seu p-valor para teste de permutação de 1000 réplicas. Resultado do CVA da asa anterior direita.....66

**Tabela 3:** Distâncias de Procrustes entre as espécies e seu p-valor para teste de permutação de 1000 réplicas. Resultado do CVA da asa anterior direita .....68

**Tabela 4:** Localidades amostradas, número de cromossomos B por localidade e dados cariotípicos de *P. helleri*.....78

**Tabela 5:** Densidade óptica integrada (DOI) dos cromossomos metafásicos A e B de *P. helleri*.....80

## RESUMO

NOVAES, Camila Moura, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2019. **Análises molecular, cariotípica e morfométrica de abelhas sem ferrão do gênero *Partamona* (Schwarz, 1939)**. Orientadora: Tânia Maria Fernandes Salomão. Coorientadora: Denilce Meneses Lopes.

*Partamona* é um gênero de abelhas sem ferrão pertencente à tribo Meliponini que possui 33 espécies muito similares em sua morfologia. Considerando a uniformidade fenotípica de *Partamona* estudos utilizando outras ferramentas como a citogenética, filogenia molecular e morfometria geométrica podem ajudar por meio da identificação de marcadores, a sistemática e a taxonomia do grupo. Assim, o objetivo desse trabalho foi analisar espécies de *Partamona* utilizando essas três ferramentas. As espécies *P. rustica*, *P. gregaria*, *P. auripennis*, *Partamona* sp1 apresentaram  $2n=34$  confirmando a estabilidade numérica dos cariótipos do gênero. Com base em sequências parciais dos genes mitocondriais *COI* e *CytB* foi confirmado o monofileticismo do gênero e também a divisão das espécies de *Partamona* nos dois grupos previamente definidos pela citogenética. *P. cupira* e *P. ailyae* foram discriminadas pela morfometria geométrica sendo separadas entre si das demais espécies. *P. chapadicola*, *P. gregaria*, *P. helleri*, *P. rustica* e *P. auripennis* não apresentaram uma discriminação completa entre si em relação à forma das asas, porém observou-se uma ligeira separação dessas espécies em dois grupos que corroboraram a divisão das espécies nos grupos baseados em marcadores citogenéticos e moleculares. A análise populacional de *P. helleri* indicou uma variabilidade da forma das asas da espécie, porém não indicou nenhuma estruturação de acordo com a localidade geográfica. Foi registrada a presença de cromossomos B em colônias de localidades que não haviam sido amostradas, ampliando o registro desses cromossomos para a espécie. A coloração com fluorocromo (CMA<sub>3</sub>) e o rDNA18S indicaram a ocorrência de 11 citótipos em *P. helleri*. O microssatélite GA<sub>(15)</sub> se acumulou-se na região eucromática de todos os cromossomos do complemento A e não acumulou nos cromossomos B. O microssatélite TTAGG<sub>(6)</sub> revelou sinais positivos nas duas porções teloméricas dos dois braços cromossômicos com variação de intensidade de sinais. A citometria de imagem resolveu as diferenças entre os cromossomos B de *P. helleri* e sugerem fortemente uma diversidade desses cromossomos na espécie. Esses marcadores

citogenéticos revelam uma diversidade cariotípica em *P. helleri* representando rearranjos que podem ter papel na evolução e divergência da espécie.

## ABSTRACT

NOVAES, Camila Moura, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2019. **Molecular, karyotypic and morphometric analyzes of stingless bees of the genus *Partamona* (Schwarz, 1939)**. Adviser: Tânia Maria Fernandes Salomão. Co-Adviser: Denilce Meneses Lopes.

*Partamona* is a genus of stingless bees belonging to the Meliponini tribe that has 33 species very similar in their morphology. Considering the phenotypic uniformity of *Partamona*, studies using other tools such as cytogenetics, molecular phylogeny and geometric morphometry may help by identifying the markers, systematics and taxonomy of the group. Thus, the objective of this work was to analyze *Partamona* species using these three tools. The species *P. rustica*, *P. gregaria*, *P. auripennis*, *Partamona* sp1 presented  $2n=34$  confirming the numerical stability of the karyotypes of the genus. Based on the partial sequences of the mitochondrial genes *COI* and *CytB*, it was confirmed the monophyleticism of the genus and also the division of the *Partamona* species into the two groups previously defined by cytogenetics. *P. cupira* and *P. ailyae* were discriminated by geometric morphometry and were separated from each other. *P. chapadicola*, *P. gregaria*, *P. helleri*, *P. rustica* and *P. auripennis* did not present complete discrimination in relation to the shape of the wings, but a slight separation of these species was observed in two groups that corroborated the division of the species in groups based on cytogenetic and molecular markers. Population analysis of *P. helleri* indicated a variability of the wing shape of the species, but did not indicate any structuring according to the geographical location. It was recorded the presence of B chromosomes in colonies of locations that had not been sampled, increasing the registration of these chromosomes for the species. Fluorochrome staining (CMA<sub>3</sub>) and rDNA18S indicated the occurrence of 11 cytotypes in *P. helleri*. The GA<sub>(15)</sub> microsatellite accumulated in the euchromatic region of all complement A chromosomes and did not accumulate in the B chromosomes. The TTAGG<sub>(6)</sub> microsatellite revealed positive signals in the two telomeric portions of the two chromosomal arms with varying signal intensity. The image cytometry solved the differences between the B chromosomes of *P. helleri* and strongly suggest a diversity of these chromosomes in the species. These cytogenetic markers reveal a karyotypic diversity in *P. helleri* representing rearrangements that may play a role in the evolution and divergence of the species.



## 1.INTRODUÇÃO GERAL

O gênero *Partamona* pertence a tribo Meliponini que é composta por abelhas que possuem o ferrão atrofiado, e por isso são conhecidas como abelhas “sem ferrão”. As abelhas desse gênero são restritas ao continente sul-americano, com distribuição geográfica do sul do México até o sul do Brasil. Além disso, habitam vários biomas como Mata Atlântica, Cerrado, Caatinga e Amazônia, utilizando os mais variados substratos para construção de seus ninhos, que podem ser encontrados tanto em ambientes de florestas quanto em ambientes urbanos (Pedro e Camargo, 2003; Camargo e Pedro, 2003).

*Partamona* é um gênero composto por 33 espécies divididas em quatro grupos com base em características morfológicas e de nidificação. Esses grupos são denominados epiphytophila/bilineata, musarum, nigrior e cupira e foram definidos por Pedro e Camargo (2003) que fizeram a descrição de 17, das 33 espécies conhecidas. Estes autores também descreveram os hábitos de nidificação dessas abelhas, que é praticamente peculiar de cada espécie. Associando os dados morfológicos e de nidificação, esses mesmos autores propuseram uma hipótese filogenética para *Partamona*. A filogenia proposta indicou o monofilétismo do gênero que foi confirmado, posteriormente, por Rasmussem e Cameron (2010) com base em marcadores moleculares para as abelhas da tribo Meliponini. Embora monofilético, as relações de parentesco entre as espécies propostas na hipótese filogenética de Rasmussem e Cameron (2010) não concordaram com as propostas na filogenia de Camargo e Pedro (2003).

Diversos estudos com *Partamona* utilizando ferramentas moleculares foram relatados. Esses estudos resultaram em abordagens filogeográficas para as espécies *P. rustica* (Miranda *et al.*, 2016) e *P. seridoenses* (Miranda *et al.*, 2017), estimativas de diversidade genética de populações de *P. helleri* (Borges *et al.*, 2010; Brito e Arias, 2010)

e *P. seridoenses* (Fernandes *et al.*, 2012), caracterização do DNA mitocondrial das espécies *P. helleri* e *P. mulata* (Brito e Arias, 2005) e quantificação do conteúdo de DNA de *P. helleri*, *P. rustica* e *P. chapadicola* (Tavares *et al.*, 2012). No entanto, um único estudo de filogenia do gênero *Partamona* foi relatado e apenas sete espécies de *Partamona* foram analisadas (Rasmussem e Cameron, 2010).

Também em relação aos aspectos morfológicos e de nidificação, o gênero *Partamona* tem sido pouco investigado. Nenhum estudo de revisão relacionado a descrição de espécies e de ninhos foi documentado após o realizado por Pedro e Camargo, (2003). As abelhas *Partamona* são muito semelhantes quanto à morfologia dificultando a correta classificação desses insetos. Para o reconhecimento das espécies são utilizadas combinações de alguns caracteres como a forma dos dentes da mandíbula, variações de coloração do integumento, cor da pilosidade e asas, e comprimento de cerdas do escapo sendo, muitas vezes, necessárias, também, informações adicionais como procedência das abelhas e o substrato de nidificação (Pedro e Camargo, 2003). Os problemas taxonômicos em *Partamona* são evidentes sendo a dificuldade de se estabelecer caracteres morfológicos de importância taxonômica, somada à ausência de informações sobre nidificação de algumas espécies, um dos fatores, possivelmente, associados a dificuldade na elucidação de questões taxonômicas no gênero.

Uma das ferramentas utilizadas no reconhecimento de espécies consideradas muito similares, ou até mesmo crípticas, é a morfometria geométrica (Francoy *et al.*, 2009; Francoy e Fonseca, 2010; Francoy *et al.*, 2012). Tal análise é considerado mais eficaz do que a morfologia tradicional na determinação de táxons pois captura a forma geométrica, que inclui a forma e o tamanho do órgão ou estrutura analisados. Porém, não foram encontrados, até o momento, nenhum registro de estudos envolvendo morfometria

geométrica de *Partamona*, estudos esses, possivelmente úteis para o esclarecimento da taxonomia dessas abelhas e melhor definição das espécies do gênero.

Além dos problemas taxonômicos, o gênero *Partamona* apresenta pouco conhecimento sobre o cariótipo de suas espécies. Apenas *P. testacea*, *P. cupira*, *P. vicina*, *P. peckolti*, *P. seridoenses*, *P. ailyae*, *P. mulata*, *P. nhambiquara*, *P. chapadicola* e *P. helleri* possuem descrição do número diploide, sendo  $n=34$  para todas as espécies (Kerr, 1969; Costa *et al.*, 1992; Brito *et al.*, 1997; Brito-Ribon *et al.*, 1999; Brito *et al.*, 2003; Martins *et al.*, 2009; Marthe *et al.*, 2010; Martins *et al.*, 2013, 2014; Miranda, 2012). Mais da metade das espécies do gênero ainda não possui seu cariótipo conhecido e nenhuma delas possui mapeamento cromossômico de sequências repetitivas, evidenciando a necessidade de ampliação de estudos que permitam a identificação de marcadores citogenéticos que podem auxiliar na taxonomia de *Partamona*.

Embora o número diploide ( $2n=34$ ) seja constante nos cariótipos das espécies de *Partamona* estudadas, há uma diferença numérica devido à presença de cromossomos supranumerários, também, conhecidos como cromossomo B. Essas diferenças foram relatadas para *P. cupira* que apresentou um único cromossomo B (Marthe *et al.*, 2010), e *P. helleri* que tem apresentado uma variação de número e morfologia desses cromossomos extras (Costa *et al.*, 1992; Brito *et al.*, 1997; Tosta *et al.*, 2004, 2007). Foram detectados em *P. helleri* indivíduos portando até sete cromossomos B, porém, a origem desses cromossomos ainda não é bem definida, embora essa espécie tenha sido muito estudada citogeneticamente (Tosta *et al.*, 2004, 2007; Martins *et al.*, 2009, 2014).

Tosta *et al.* (2004) identificaram e sequenciaram um marcador RAPD associado a um cromossomo B de *P. helleri*. Posteriormente, foi desenvolvido um marcador SCAR (região amplificada caracterizada por sequência) a partir de sequência parcial desse marcador RAPD, obtendo-se um marcador mais fidedigno para identificação dos

cromossomos B, uma vez que os marcadores RAPD apresentam inespecificidade e baixa repetibilidade (Tosta *et al.*, 2007). Análise de hibridização com o marcador SCAR resultou na identificação de sequência específica do cromossomo B em indivíduos adultos de outras espécies de *Partamona* como em *P. rustica* e *P. criptica* (Tosta *et al.*, 2014), *P. seridoensis* (Correia *et al.*, 2014), *P. chapadicola* e *P. gregaria* (Machado *et al.*, 2016). Com base na identificação dessa sequência nessas espécies de *Partamona* foram sugeridas duas hipóteses de origem desses cromossomos no gênero. A primeira hipótese é de que o cromossomo B estava presente em um ancestral comum a estas espécies. A segunda hipótese baseia-se na hibridação interespecífica, por meio da qual esses cromossomos foram transferidos horizontalmente entre as espécies (Tosta *et al.*, 2014).

Uma primeira hipótese de origem do cromossomo B em *P. helleri* foi proposta por Costa e colaboradores (1992). Esses mesmos autores sugeriram que os cromossomos B teriam se originado de rearranjos estruturais dos cromossomos autossomos. Entretanto, uma microdissecção realizada no cromossomo B dessa espécie permitiu a obtenção de uma sonda específica desse cromossomo. Por meio da hibridização por fluorescência *in situ*, essa sonda hibridizou apenas com o próprio cromossomo B, não hibridizando com nenhum outro cromossomo do complemento normal. Então, devido à falta de uma homologia entre o cromossomo B e os cromossomos do complemento normal foi sugerido que o cromossomo B microdissectado não seria o produto de alterações estruturais do cariótipo regular e por isso a hipótese de origem intraespecífica não tem sido usada para explicar a presença desses cromossomos (Martins *et al.*, 2013).

Embora a presença de cromossomos B em *P. helleri* tenha sido amplamente registrada, a constituição desses cromossomos ainda é pouco conhecida. Alguns cromossomos apresentaram regiões CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> e outros apresentaram regiões organizadoras de nucléolo (Martins *et al.*, 2014). Porém, nenhum estudo com sequências de DNA

repetitivo foi conduzido nesses cromossomos. Não foram realizados, também, trabalhos populacionais analisando colônias provenientes de diferentes estados dentro da distribuição geográfica de *P. helleri*, que vai do sul da Bahia até o norte de Santa Catarina (Camargo e Pedro, 2003). Geralmente, os estudos dos cariótipos dessa espécie, bem como dos cromossomos B identificados, foram realizados com indivíduos de colônias de localidades próximas, dentro de um mesmo estado. Assim, há necessidade de uma análise populacional de *P. helleri* que contemple várias localidades, compreendendo estados diferentes, para atualizar o conhecimento sobre a dinâmica populacional dos cariótipos dessa espécie bem como entender a dinâmica populacional e possíveis origens dos cromossomos B.

Diante do exposto, a presente tese teve como objetivo estudar a história evolutiva e as relações filogenéticas em *Partamona*. A tese foi dividida em três capítulos que foram escritos no formato de artigo científico. No primeiro artigo é apresentada uma filogenia parcial do gênero, bem como descrições cariotípicas de *P. rustica*, *P. chapadicola*, *P. gregaria*, *P. auripennis* e *Partamona* sp1. Esse artigo foi submetido à revista *Genetics and Molecular Biology*. No segundo artigo a asa anterior direita de operárias adultas de *P. rustica*, *P. chapadicola*, *P. gregaria*, *P. auripennis*, *P. ailyae*, *P. helleri*, e *P. cupira* foram analisadas por meio da morfometria geométrica. No terceiro artigo foi realizado um estudo populacional de *P. helleri* com base em análise de citogenética e morfometria geométrica das asas.

### **Referências Bibliográficas**

Borges, A. A.; Campos, L. A. O.; Salomão, T. M. F. & Tavares, M. G. 2010. Genetic variability in five populations of *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae) from Minas Gerais State, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, 33: 781-784.

- 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). *Brazilian Journal of Genetic*, 20:185-188.
- Brito-Ribon, R. M.; Miyazawa, C. S. & Pompolo, S. G. 1999. First Karyotype Characterization of four Species of *Partamona* (Friese, 1980) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) in Mato Grosso State - Brazil. *Cytobios*, 100:19-26.
- Brito, R. M.; Caixeiro, A. P. A.; Pompolo, S. G. & Giselle Garcia Azevedo, G. G. 2003. Cytogenetic data of *Partamona peckolti* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) by C banding and fluorochrome staining with DA/CMA3 and DA/DAPI. *Genetics and Molecular Biology*, 26: 53-57.
- Brito, R. M. & Arias, M. C. 2005. Mitochondrial DNA characterization of two *Partamona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) by PCR+RFLP and sequencing. *Apidologie*, 36: 431-437.
- Brito, R. M.; Pompolo, S. G.; Magalhães, M. F.M.; Barros, E.G. & Sakamoto-Hojo, E.T. 2005. Cytogenetic characterization of two *Partamona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) by fluorochrome staining and localization of 18S rDNA clusters by FISH. *Cytologia*, 70: 373-380.
- Brito, R. M. & Arias, M. C. 2010. Genetic structure of *Partamona helleri* (Apidae, Meliponini) from Neotropical Atlantic rainforest. *Insectes Sociaux*, 57: 413-419.
- Camargo, J. M. F. & Pedro, S. R. M. 2003. Meliponini neotropicais: o gênero *Partamona* Schwarz, 1939 (Hymenoptera, Apidae, Apinae) - bionomia e biogeografia. *Revista Brasileira de Entomologia*, 47: 311-372.
- Correia, A. M.; Fernandes, A.; Campos, L. A. O. & Lopes, D. M. 2014. Análise da presença do marcador SCAR associado ao cromossomo B em espécies de abelha sem ferrão do gênero *Partamona*. *Revista Brasileira de Biociências*, 4: 196-200.
- Costa, M. A.; Pompolo, S. G. & Campos, L. A. O. 1992. Supernumerary chromosomes in *Partamona cupira* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Revista Brasileira de Genética*, 15:801-806.
- Fernandes, C. R. M.; Martins, C. F.; Ferreira, K. F. & Del Lama, M. A. 2012. Gene Variation, Population Differentiation, and Sociogenetic Structure of Nests of *Partamona seridoensis* (Hymenoptera: Apidae, Meliponini). *Biochemical Genetics*, 50: 325-335.

- Francoy, T. M.; Wittmann, D.; Steinhage, V.; Drauschke, M.; Müller, S.; Cunha, D. R.; Nascimento, A. M.; Figueiredo, V. L. C.; Simões, Z. L. P.; Jong, D. D.; Arias, M. C. & Gonçalves, L.S. 2009. Morphometric and genetic changes in a population of *Apis mellifera* after 34 years of Africanization. *Genetics and Molecular Research*, 8: 709-717.
- Francoy, T. M. & Fonseca, V. L. I. 2010. A morfometria geométrica de asas e a identificação automática de espécies de abelhas. *Oecologia Australis*, 14: 317-321.
- Francoy, T. M.; Franco, F. F. & Roubik, D. W. 2012. Integrated landmark and outline-based morphometric methods efficiently distinguish species of *Euglossa* (Hymenoptera, Apidae, Euglossini). *Apidologie*, 43: 609-617.
- Machado, D. P.; Miranda, E. A.; Dessi, M. C.; Sabadini, C. P. & Del Lama, M. A. 2016. Occurrence and origin of supernumerary chromosomes in *Partamona* (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Cytogenetic and Genome Research*, 1-8.
- Marthe, J. B.; Pompolo, S. G.; Campos, L. A. O.; Salomão, T. M. F. & Tavares, M. G. 2010. Cytogenetic characterization of *Partamona cupira* (Hymenoptera, Apidae) by fluorochromes. *Genetics and Molecular Biology*, 33: 253–255.
- Martins, C. C. C.; Duarte, O. M. P.; Waldschmidt, A.M.; Alves, R. M. O. & Costa, M. A. 2009. New occurrence of B chromosomes in *Partamona helleri* (Friese, 1900) (Hymenoptera, Meliponini). *Genetic and Molecular Biology*, 32:782–785.
- Martins, C. C. C.; Diniz, D.; Sobrinho-Scudeler, P. E.; Foresti, F.; Campos, L. A. O. & Costa, M. A. 2013. Investigation of *Partamona helleri* (Apidae, Meliponini) B chromosome origin. An approach by microdissection and whole chromosome painting. *Apidologie*, 44:75–81
- Martins, C. C. C.; Waldschmidt, A. M. & Costa, M. A. 2014. Unprecedented record of ten novel B chromosomes in the stingless bee *Partamona helleri* (Apidae, Meliponini). *Apidologie*, 45:431–439.
- Miranda, A. F. 2012. Estudos citogenéticos e moleculares do gênero *Partamona*: filogenia e cromossomos B. Tese, Universidade Federal de Viçosa.
- Miranda, E. A.; Batalha-Filho, H.; Congrains, C.; Carvalho, A. F.; Ferreira, K. M. & Marco Antonio Del Lama. 2016. Phylogeography of *Partamona rustica* (Hymenoptera, Apidae), na Endemic Stingless Bee from the Neotropical Dry Forest Diagonal. *Plos One*,

- Miranda, E. A.; Ferreira, K. M.; Carvalho, A. T.; Martins, C. F.; Carlo Rivero Fernandes, C. R. & Del Lama, M. A. 2016. Pleistocene climate changes shaped the population structure of *Partamona seridoensis* (Apidae, Meliponini), an endemic stingless bee from the Neotropical dry forest. Plos One,
- Pedro, S. R. M. & Camargo, J. M. F. 2003. Meliponini neotropicais: o gênero *Partamona* Schwarz, 1939 (Hymenoptera, Apidae). Revista Brasileira de Entomologia, 47: 1-117.
- Rasmunsem, C. & Cameron, S. A. 2010. Global stingless bee phylogeny supports ancient divergence, vicariance, and long distance dispersal. Biological Journal of the Linnean Society, 99: 206-232.
- Tavares, M. G.; Carvalho, C. R.; Soares, F. A. F. & Campos, L. A. O. 2012. Genome size diversity in stingless bees (Hymenoptera: Apidae, Meliponini). Apidologie, 43: 731-736.
- Tosta, V. C.; Fernandes-Salomão, T. M.; Tavares, M. G.; Pompolo, S. G.; Barros, E. G. & Campos, L. A. O. 2004. A RAPD marker associated with B chromosomes in *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae). Cytogenetic and Genome Research, 106: 279–283.
- Tosta, V.C.; Tavares, M.G.; Fernandes-Salomão, T. M.; Barros, E. G.; Campos, L. A.O. & Camacho, J. P.M. 2007. Development of a SCAR marker for the analysis of B chromosome presence in *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae). Cytogenetic and Genome Research, 116: 127–129.
- Tosta, V. C.; Marthe, J. B.; Tavares, M. G.; Fernandes-Salomão, T. M; Pompolo, S. G.; Recco-Pimentel, S. M.; Perfectti, F.; Campos, L. A. O. & Camacho, J. P. M. 2014. Possible Introgression of B Chromosomes between Bee Species (Genus *Partamona*). Cytogenetic and Genome Research, 144: 217–223

## 2.ARTIGO I

# **CHROMOSOME AND MOLECULAR DATA REVEAL A DIFFERENT EVOLUTIONARY HISTORY FOR THE GENUS *Partamona* (SCHWARZ, 1939)**

## **Abstract**

The genus *Partamona* comprises 33 species with very similar morphologies and the phylogeny proposed based on this characteristic presents inconsistencies. Of the 33 species only 10 species had the described karyotype. Here, we used partial sequence data from the mitochondrial genes (*COI* and *CytB*) of 11 species of *Partamona* for phylogenetic inferences. The karyotypes of *P. auripennis*, *P. gregaria*, *P. rustica*, and *Partamona* sp1. were described and a comparative analysis was performed between the karyotypes described in this study and those available in the literature. Females of all of the species presented as  $2n=34$  and the males as  $n=17$ . Although the diploid number was constant within the genus, the heterochromatin regions and  $CMA_3^+$  regions presented variations, which allowed us to separate the species into two groups (A and B), suggesting that the repetitive DNA of these species followed different evolutionary paths. Phylogenetic reconstruction corroborated the monophyly of the genus and supported the separation of the species into groups A and B. Neither analysis could confirm the morphological groups of *Partamona*, suggesting that they are not natural and that these cytogenetic markers are potential sources of phylogenetic information for these bees.

**Key-words: Meliponini, stingless bee, phylogeny, karyotype, ideogram.**

## **Introduction**

*Partamona* (Schwarz, 1939) is a genus of stingless bees that are found in forest environments, as well as in urban environments, between southern Mexico and southern

Brazil (Pedro and Camargo, 2003). These bees show uniformity in terms of their morphological characteristics, and because of this homogeneity, the species has been identified by a combination of characteristics, such as the shape of the teeth in the mandible, integument coloring, and the color of the hair and wings (Pedro and Camargo, 2003). The attributes of the nest entrance and nesting substrate have also been used to identify species of this group of bees (Camargo and Pedro, 2003).

Based on an analysis of the morphological characteristics, 33 *Partamona* species were separated into four groups called ephiphytophila/bilineata, musarum, nigrior, and cupira (Pedro and Camargo, 2003). The nest characteristics were coded and combined with the morphological and biogeographic data; this information was then used to construct a phylogenetic hypothesis using cladistic methodology (Camargo and Pedro, 2003). However, the phylogeny proposed thus far is inconsistent, and the difficulty of coding and the polarization of the characteristics used are the factors likely associated with this inconsistency (Camargo and Pedro, 2003).

The homogeneity reported for the *Partamona* species is not restricted to morphological and behavioral characteristics, as the genus has been frequently described as a group of bees with a preserved karyotype. The same diploid number ( $2n=34$ ) has been determined for *P. helleri*, *P. vicina*, *P. mulata*, *P. aylae*, *P. peckolti*, *P. cupira*, *P. testacea*, *P. seridoenses*, *P. nhambiquara*, and *P. chapadicola* (Brito *et al.*, 1997; Brito-Ribon *et al.*, 1999; Brito *et al.*, 2003; Martins *et al.*, 2009; Marthe *et al.*, 2010; Martins *et al.*, 2013; Tavares *et al.*, 2017). Numerical changes in the karyotype have only been reported for *P. helleri* and *P. cupira* (Costa *et al.*, 1992; Brito *et al.*, 1997; Marthe *et al.*, 2010; Martins *et al.*, 2013, 2014), due to the presence of supernumerary chromosomes.

Despite the numerical karyotype homogeneity, differences in the heterochromatin distribution and cluster number of the 18S rDNA were observed when the *P. helleri* and

*P. seridoensis* (Brito *et al.*, 2005). Differences in the distribution of heterochromatin and number of rDNA sites have also been detected among species of other groups of insects with the same diploid number (Grzywacz *et al.*, 2015), as well as in amphibians (Kasahara *et al.*, 2003), fish (Vicari *et al.*, 2008), plants (Hasterock *et al.*, 2006), and mammals (Labaroni *et al.*, 2014).

Chromosome analysis data, combined with DNA sequence information, have resulted in the establishment of patterns of chromosome evolution, as well as phylogenetic hypotheses, within some taxonomic groups, such in as ants (Cardoso *et al.*, 2014). However, no study registry, aiming to hypothesize an evolutionary scenario for *Partamona* based on cytogenetics, has been documented to date. The only report is that of Rasmussem and Cameron (2010), which used molecular data, and only a few species were analyzed.

In the present study, partial sequence data from the mitochondrial genes (COI and CytB) of 11 species of *Partamona* were used for phylogenetic inferences. The karyotypes of *P. auripennis*, *P. gregaria*, *P. rustica*, and *Partamona* sp. were described using conventional and molecular cytogenetic methods, and, finally, a comparative analysis was performed between the karyotypes described in this study and those registered in the literature for *Partamona*.

## **Material and Methods**

### **Sampling**

Larvae of *Partamona auripennis*, *P. rustica*, *P. gregaria*, and *Partamona* sp. were used in the cytogenetic analyses. Adult workers from 11 *Partamona* species (Table 1) were studied using molecular analyses. *Paratrigona*, *Geotrigona*, *Trigona*, and *Melipona* represented the outgroup. (Supplementary Material 1). Samples from the adult individuals

were stored in absolute ethanol in a freezer at  $-20^{\circ}\text{C}$  and deposited in the Laboratory of Molecular Biology of Insects of the Universidade Federal of Viçosa.

### ***Cytogenetic analyses***

The metaphase chromosomes were obtained from the brain ganglion of larvae in the last instar according to the procedure developed by Imai *et al.* (1988). After staining with Giemsa, the chromosome number of each individual was characterized, and the morphology of the chromosomes was determined according to the ratio of arms (Levan *et al.*, 1964). The characterization of the heterochromatin distribution (C Banding) was performed according to the method of Sumner (1972) with modifications (Supplementary Material 2). The metaphases were photographed under an OLYMPUS BX-60 microscope, coupled to a Q-Color3 camera. The chromosomes were measured, and the metaphases were assembled using the image-editing program.

Staining with cromomycin A3/ distamycin A/4'-6-diamidino-2-phenylindole (CMA3/DA/DAPI) was conducted by following the protocol from Schweizer (1980). The *in situ* fluorescence hybridization (FISH) technique was performed according to Pinkel *et al.* (1986). The probes were obtained by PCR amplification using 18S F (5'-GTCATATGCTTGTCTCAAAGA-3') and 18S R (3'-TCTAATTTTTCAAAGTAAACGC-5') rDNA primers and labeled using digoxigenin-11-dUTP (Roche, Applied Science) and the signal was detected with anti-digoxigeninerhodamine (Roche Applied Science). The metaphases were photographed with an OLYMPUS BX-53 epifluorescence photomicroscope coupled to an OLYMPUS XM10 camera and mounted with the help of the image-editing program.

The karyotypic descriptions of *P. rustica*, *P. gregaria*, *P. auripennis*, and *Partamona* sp. and the karyotypes described in the literature for the species listed in Table

2 were used to construct an ideogram with the chromosome number, heterochromatin distribution patterns, and CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> markers.

### ***Molecular analyses***

Total DNA was extracted according to Waldschmidt *et al.* (1997). Partial sequences of the cytochrome oxidase subunit 1 (*COI*) and cytochrome B (*CytB*) genes were amplified using the COIdegF (TAAACTTCWGGATGWCCAAAAAATCA) and COIdegR (TATCWACHAATCATAAAAAATMTTGG) primer pairs and encoded using the CytbF (TCGTTTAATTCAYATAAATGGAGC) and CytbR (ATTACWCCTCCTAATTTATTWGAAT) primers (Batalha-Filho *et al.*, 2010).

Consensus sequences from the forward and reverse strands of each sample were assembled with the CodonCode Aligner package v.5 (Copyright 2002-2015 CodonCode Corporation). The sequences of each gene fragment were separately aligned in the program Mega v6.06 (Tamura *et al.*, 2013) using the MUSCLE method, and the data were concatenated into a single matrix in the SequenceMatrix program (Vaidya *et al.*, 2011).

Bayesian inference was performed online using the CIPRES Science Gateway server (Miller *et al.*, 2010) with the program MrBayes v.3.2.1 (Ronquist *et al.*, 2012). Two independent runs were used, each with four Monte Carlo Markov Chain (MCMC) replications. For this, the mixed model was implemented (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) with an invariant ratio and Gamma correction for the two gene fragments. For the tree generated from the concatenated data, 12,000,000 generations of the MCMC were used, with trees sampled every 1,000 generations. The convergence of the Markov chains was verified in the program Tracer v.1.5 (Rambaut and Drummond, 2009). Twenty-five percent of the initial MCMC generations were excluded, and the remainder was used to calculate a consensus tree. The frequency of each branch in the majority consensus

represented the value of the posterior probability (PP = posterior probability) of the Bayesian formula. The tree resulting from the analysis was edited in FigTree v. 1.3.1 (Rambaut, 2009).

## Results

### *Karyotypic analyses*

The diploid number described for the four analyzed species was  $2n = 34$ . Male subjects ( $n = 17$ ) were only observed for *P. gregaria*. As shown in Figure 1, the karyotypic formulas were determined for *P. gregaria* ( $2K=30M+4SM$  females and  $K=15M+2SM$  males), *P. auripennis* ( $2K=20M+10SM+4ST$ ), *P. rustica* ( $2K=26M+8SM$ ), and *Partamona* sp1. ( $2K=28M+6SM$ ). In *P. gregaria* and *Partamona* sp1., the heterochromatin was restricted to the centromeric and pericentromeric regions, while in *P. auripennis*, it was observed along the short arm of all of the chromosomes. *P. rustica* had heterochromatin markers in the centromeric and pericentromeric regions, as well as along the chromosome arm, although with less intense staining (Figure 2).

The  $CMA_3^+$ , C-band,  $DAPI^+$ , and 18S rDNA sites are shown in Figure 2.  $CMA_3^+$  markings were identified in different number of chromosomes depending on the species analyzed: six in *P. gregaria*, four in *Partamona* sp., and two in *P. auripennis*, and in *P. rustica*. Except for *Partamona* sp.,  $DAPI^+$  coincided with the heterochromatin regions. In addition, 18S rDNA sites were observed in six chromosomes of the *P. gregaria* (Figure 2), six chromosomes of the *P. rustica*, and two chromosomes of the *P. auripennis* chromosomes (data not shown). The analysis of the  $CMA_3^+$  and C-band marking patterns resulted in the separation of the species into two groups (groups A and B). The species in group A shared some characteristics, like heterochromatin along one arm and the presence of  $CMA_3^+$  in only two chromosomes.  $CMA_3^+$  markings on four to six chromosomes and

restriction of the heterochromatin to the centromeric and pericentromeric regions were the karyotypic characteristics shared by the species of group B. The karyotypic descriptions of the species analyzed in the present study and the karyotypes described in the literature for the species listed in Table 2 are shown in Figure 3b. This information was used to construct an ideogram with the chromosome number, heterochromatin distribution patterns, and CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>.

### ***Molecular analyses***

The mean partial sequence sizes of the *COI* and *CytB* genes were 593 and 598 base pairs, respectively. Phylogenetic reconstruction, based on the *COI* and *CytB* sequences, confirmed the monophyly of the *Partamona* species that were distributed into two clades (clades A and B). Clade A was formed by the species *P. ailyae*, *P. rustica*, *P. mulata*, *P. testacea*, and *P. vicina*, and clade B included the species *P. chapadicola*, *P. seridoensis*, *P. cupira*, *P. helleri*, *P. gregaria*, and *P. nhambiquara* (Figure 3a).

### **Discussion**

This is the first karyotypic description of *P. rustica*, *P. gregaria*, *P. auripennis*, and *Partamona* sp. The diploid number ( $2n = 34$ ) of these species was similar to those that have been reported for other species of the genus (Costa *et al.*, 1992; Brito *et al.*, 1997; Brito-Ribon *et al.*, 1999; Brito *et al.*, 2003; Martins *et al.*, 2009; Marthe *et al.*, 2010; Lopes *et al.*, 2011), confirming the numerical stability of chromosomes in this group of bees. This conserved diploid number pattern has also been found in another genus of stingless bees from the Meliponini tribe as in *Melipona*, *Tetragonisca*, *Trigona*, *Plebeia* (Rocha *et al.*, 2003; Domingues *et al.*, 2005; Barthe *et al.*, 2011; Godoy *et al.*, 2013). Despite the preservation of the diploid number in *Partamona*, variations in the

morphology of the chromosomes can be observed. This pattern of variation may be related to rearrangements as paracentric and pericentric inversions, likewise proposed for species of the genera *Trigona*, *Scaptotrigona*, and *Nanotrigona* (Rocha *et al.*, 2003).

In Hymenoptera (bees, wasps, and ants), the Minimum Interaction Theory (TIM) has been proposed to explain karyotype evolution within the order (Imai *et al.*, 1984; 1988). According to this theory, chromosomes pass through fission events to thus increase the number of chromosomes with smaller sizes, which would lead to a decrease in deleterious interactions during the cell cycle. Considering that the species of the genus *Partamona*, as well as those of other genera of the Meliponini tribe, do not show diploid number variation, fission events and consequently, increases in the number of chromosomes would not be the main method of karyotype evolution in *Partamona*, as predicted by the TIM. In these bees, the karyotypic variations found are related to the chromosome morphology, amount and distribution of heterochromatin, and repetitive DNA composition, and these variations do not promote an increase or decrease in the diploid number.

The CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> and C-band marking patterns revealed other differences in the karyotypes of the *Partamona* species, showing that they are not homogeneous in their composition. These differences, which allowed the separation of the species into two groups A and B, suggest that the repetitive DNA of these species may undergone different evolutionary paths. The division of the species into these two groups based on the CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> and C-band markers is corroborated by the molecular phylogeny. However, these results do not confirm the division of *Partamona* into the groups musarum, cupira, nigrior, and epiphytophila/bilineata, suggesting that these groups are not natural (Pedro and Camargo, 2003).

Phylogenetic reconstructions based on the COI and CytB sequences confirmed the monophyly of the genus *Partamona*, as reported by Camargo and Pedro (2003), who used morphological and nesting data, and as observed by Rasmussen and Cameron (2010), based on the molecular phylogeny of the Meliponini tribe. However, the phylogenetic relationships inferred by molecular data differs from those reported by Pedro and Camargo (2003). The combined molecular and cytogenetic analyses revealed a phylogeny that conflicted with the morphology. Thus, we suggest that the genus *Partamona* needs taxonomic revision and a revision of the morphological characteristics used to identify its species.

As discussed by Pedro and Camargo (2003), the genus *Partamona* presents species with very similar morphologies, such that the morphological characteristics provide little information for phylogenetic inferences. Rasmussen and Cameron (2010) proposed a time of divergence of 4 million years ago for this genus, with this homogeneity as a consequence of a recent process of divergence. However, Camargo and Pedro (2003) reported that although the morphological and structural characteristics of the nests are used to identify *Partamona* species, information on the nesting habits is still incomplete or non-existent for many species. This makes it difficult to carry out phylogenetic studies based on these parameters, and it is not possible to trace an evolutionary history based only on the morphological and nesting characteristics (Camargo and Pedro, 2003). Unlike the morphological and behavioral characteristics that are not very informative for *Partamona*, the cytogenetic data are congruent with the molecular information, thus proving to be potential sources of phylogenetic information for this group of bees.

## **Acknowledgments**

The authors wish to thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) financial support.

## References

- Barth A, Fernandes A, Pompolo SG and Costa MA (2011) Occurrence of B chromosomes in *Tetragonisca* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): A new contribution to the cytotaxonomy of the genus. *Genetics and Molecular Biology* 34: 77-79.
- Batalha-Filho H, Waldschmidt AM, Campos LAO, Tavares MG and Fernandes-Salomão TM (2010) Phylogeography and historical demography of the neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae): Incongruence between morphology and mitochondrial DNA. *Apidologie* 41:534-547.
- Brito RM, Costa MA and Pompolo SG (1997) Characterization and distribution of supernumerary chromosomes in 23 colonies of *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Brazil Journal of Genetics* 20:185-188.
- Brito-Ribon RM, Miyazawa CS and Pompolo SG (1999) First Karyotype Characterization of four Species of *Partamona* (Friese, 1980) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) in Mato Grosso State - Brazil. *Cytobios* 100:19-26.
- Brito RM, Caixeiro APA, Pompolo SG And Azevedo GG (2003) Cytogenetic data of *Partamona peckolti* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) by C banding and fluorochrome staining with DA/CMA3 and DA/DAPI. *Genetics and Molecular Biology* 26: 53-57.
- Brito RM, Pompolo SG, Magalhães MFM, Barros EG and Hojo ETS (2005) Cytogenetic characterization of two *Partamona* species (Hymenoptera, Apinae, Meliponini) by fluorochrome staining and localization of 18S rDNA clusters by FISH. *Cytologia* 70: 373–380.
- Camargo JMF and Pedro SRM (2003) Meliponini neotropicais: o gênero *Partamona* Schwarz, 1939 (Hymenoptera, Apidae, Apinae) - bionomia e biogeografia. *Revista Brasileira de Entomologia* 47: 311-372.
- Costa MA, Pompolo SG and Campos LAO (1992) Supernumerary chromosomes in *Partamona cupira* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Revista Brasileira de Genética* 15: 801–806.

- Domingues AMT, Waldschmidt AM, Andrade SE, Souza VA, Alvez RMO, Junior JCS and Costa MA (2005) Karyotype characterization of *Trigona fulviventris* Guérin, 1835 (Hymenoptera, Meliponini) by C banding and fluorochrome staining: Report of a new chromosome number in the genus. *Genetics and Molecular Biology* 28: 390-393.
- Godoy DC, Ferreira RP and Lopes DM (2013) Chromosomal variation and cytogenetics of *Plebeia lucii* and *P. phryhostoma* (Hymenoptera: Apidae). *Florida Entomologist* 96: 1559-1566.
- Hasterok R, Wolny E, Hosiawa M, Kowalczyk M, Kulak-Ksiazczyk S, Ksiazczyk T, Heneen WK and Maluszynska J (2006) Comparative analysis of rDNA distribution in chromosomes of various species of Brassicaceae. *Annals of Botany* 97: 205–216.
- Imai HT, Brown WLJ, Kubota M, Yong HS and Tho YP (1984) Chromosome observations on tropical ants from western Malaysia. *Annual Report of National Institute of Genetics*, 34.
- Imai HT, Taylor RW, Crosland MW and Crozier RH (1988) Modes of spontaneous chromosomal mutation and karyotype evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis. *Japanese Journal of Genetic* 63: 159–185.
- Kasahara S, Zampieri Silva AP, Gruber SL and Haddad CFB (2003) Comparative cytogenetic analysis on four tree frog species (Anura, Hylidae, Hylinae) from Brazil. *Cytogenetics Genome Research* 103:155–162.
- Labaroni CA, Malleret MM, Novillo A, Ojeda A, Rodriguez D, Cuello P, Ojeda R, Martí D, and Cecilia Lanzone C (2014) Karyotypic variation in the Andean rodent *Phyllotis xanthopygus* (Waterhouse, 1837) (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae) *Comparative Cytogenetics* 8: 369–381.
- Levan A, Fredga K and Sandberg AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.
- Lopes DM, Fernandes A, Campos LAO (2011a) Descrição cariotípica de *Partamona nhambiquara* e *Partamona chapadicola* (Hymenoptera, Meliponini) por técnicas convencionais e moleculares. In: *Anais da 2ª Reunião Brasileira de Citogenética*. Águas de Lindoia, São Paulo, CA049
- Marthe JB, Pompolo SG, Campos LAO, Salomão TMF and Tavares MG (2010) Cytogenetic characterization of *Partamona cupira* (Hymenoptera, Apidae) by fluorochromes. *Genetics and Molecular Biology* 33: 253–255.

- Martins CCC, Duarte OMP, Waldschmidt AM, Alves RMO and Costa MA (2009) New occurrence of B chromosomes in *Partamona helleri* (Friese, 1900) (Hymenoptera, Meliponini). *Genetics and Molecular Biology* 32: 782-785.
- Martins CCC, Diniz D, Sobrinho-Scudeler PE, Foresti F, Campos LAO and Costa MA (2013) Investigation of *Partamona helleri* (Apidae, Meliponini) B chromosome origin. An approach by microdissection and whole chromosome painting. *Apidologie* 44:75–81.
- Martins CCC, Waldschmidt AM and Costa MA (2014) Unprecedented record of ten novel B chromosomes in the stingless bee *Partamona helleri* (Apidae, Meliponini). *Apidologie* 45: 431–439.
- Miller MA, Pfeiffer W and Schwartz T (2010) "Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees" in Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE), New Orleans, LA pp 1-8.
- Pedro SRM and Camargo JMF (2003) Meliponini neotropicais: o gênero *Partamona* Schwarz, 1939 (Hymenoptera, Apidae). *Revista Brasileira de Entomologia* 47: 1-117.
- Pinkel D, Straume T and Gray JW (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83: 2934-2938.
- Rambaut A. (2009) Tree Figure Drawing Tool, Version 1.3.1. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, UK.
- Rambaut A and Drummond A (2009) Tracer, Version 1.5.
- <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/> (acesso em 02.02.2017).
- Rasmunsem C and Cameron SA (2010) Global stingless bee phylogeny supports ancient divergence, vicariance, and long distance dispersal. *Biological Journal of the Linnean Society* 99: 206-232.
- Rocha MP, Pompolo SG and Campos LAO (2003) Citogenética da tribo Meliponini (Hymenoptera, Apidae). *Apoidea Neotropica: Homenagem aos 90 Anos de Jesus Santiago Moure*. Editora Unesc, Criciúma.
- Ronquist F and Huelsenbeck JP (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.

- Ronquist F, Klopfstein S, Vilhelmsen L, Schulmeister S, Murray DL and Rasnitsyn AP (2012) A total-evidence approach to dating with fossils, applied to the early radiation of the Hymenoptera. *Systematic Biology* 61: 973-999.
- Schweizer D (1980) Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA-DAPI bands) in human chromosomes. *Cytogenetics Cell Genet* 27: 190–193.
- Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research* 75: 304–306.
- Tamura Y, Harada Y, Nishikawa SI, Yamano K, Kamiya M, Shiota T, Kuroda T, Kuge O, Sesaki H, Imai K, Tomii K and Endo T (2013) Tam41 Is a CDP-Diacylglycerol Synthase Required for Cardiolipin Biosynthesis in Mitochondria. *Cell Metabolism* 17: 709-18.
- Tavares MG, Lopes DM and Campos LAO (2017) An overview of cytogenetics of the tribe Meliponini (Hymenoptera: Apidae). *Genetica* 145: 241-258.
- Vaidya G, Lohman DJ and Meier R (2011) Sequence Matrix: concatenation software for the fast assembly of multigene datasets with character set and codon information. *Cladistics* 27: 171-180.
- Vicari MR, Noleto RB, Artoni RF, Moreira-Filho O and Bertollo LAC (2008) Comparative cytogenetics among species of the *Astyanax scabripinnis* complex. Evolutionary and biogeographical inferences. *Genetics and Molecular Biology* 31: 173-179.
- Waldschmidt AM, Fernandes-Salomão TM, Barros EG and Campos LAO (1997) Extraction of genomic DNA from *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponae). *Brazilian Journal of Genetics* 20: 421-423.

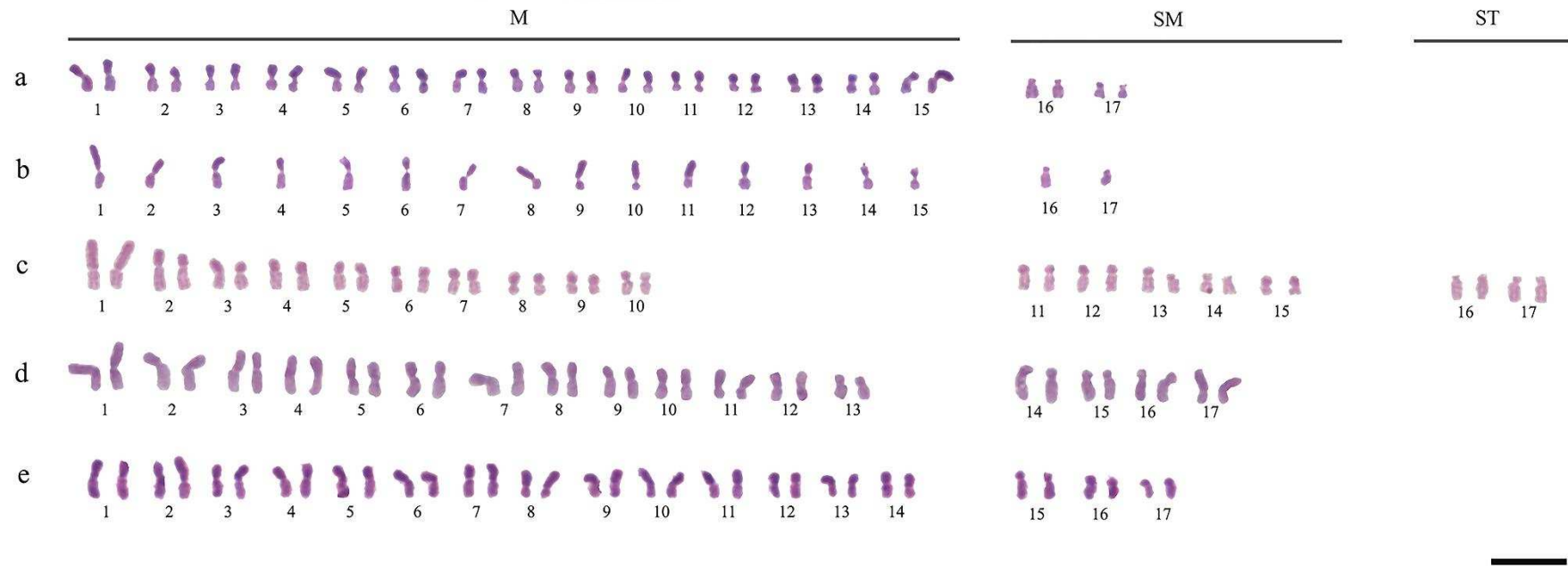


Figure 1: Karyotypes of the *Partamona* species, based on Giemsa staining. Females:  $2n=34$ . Male:  $n=17$ . a and b: females and males of *P. gregarious*, respectively. c: *P. auripennis*. d: *P. rustica*. and: *Partamona* sp1. 10 µm bar.

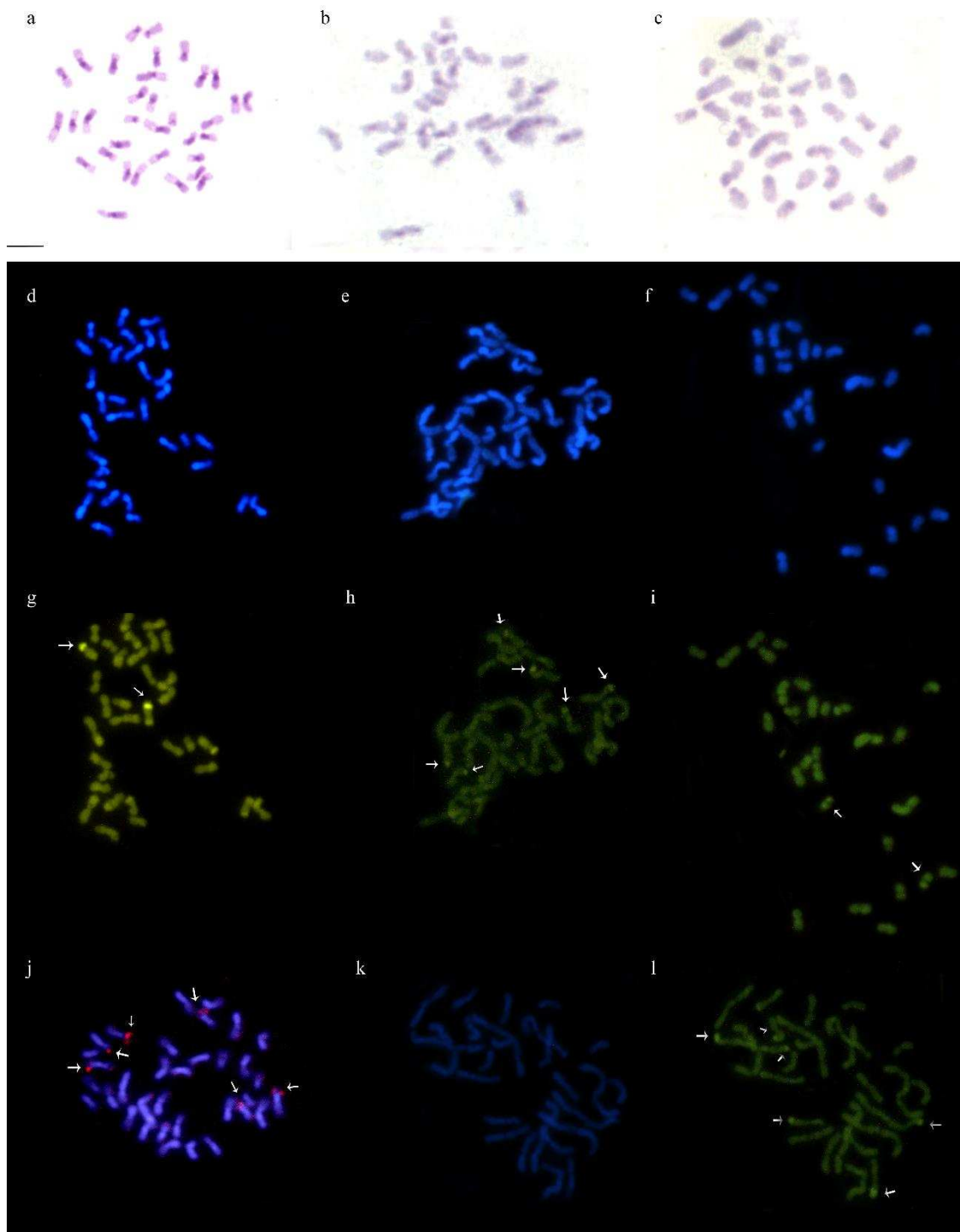


Figure 2: Metaphase of the *Partamona* species. a: C-band with markings in the centromeric and pericentromeric regions, and regions of less intense coloration along the chromosomal arm of *Partamona rustica*. b: in the centromeric and pericentromeric regions of *P. gregaria*, c: and along the chromosomal arm of *P. auripennis* d: DAPI of *P. rustica*; e: *P. gregaria*; f: *P. auripennis*; k: and *Partamona* sp1. g: CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> in *P. rustica*; h: *P. gregaria*; i: *P. auripennis*; l: and *Partamona* sp1. j: 18S rDNA sites on six chromosomes of the species *P. rustica*. 10 µm bar.

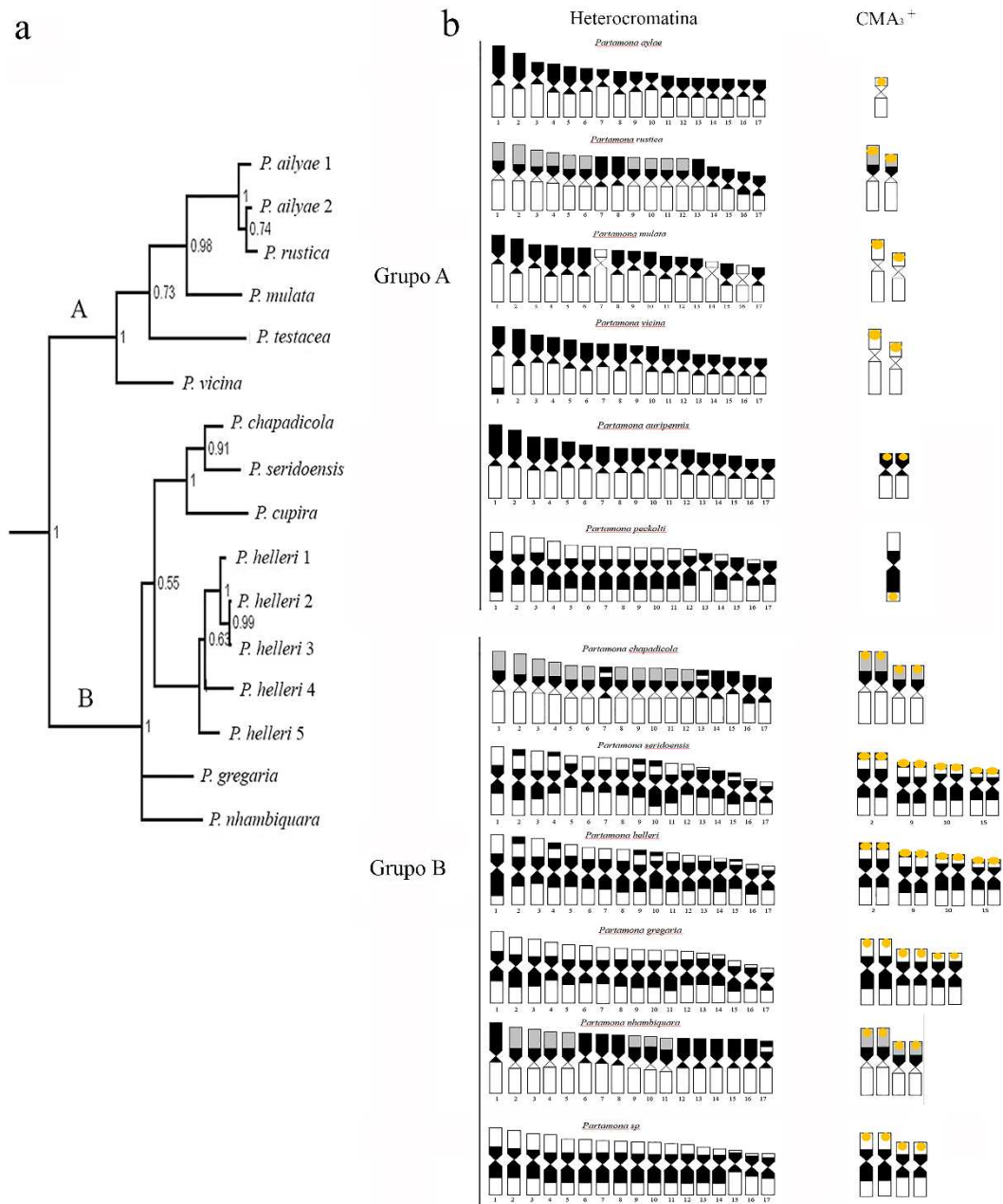


Figure 3: a: Concatenated Bayesian phylogeny of the COI and CytB genes showing the division of the species into two clades (clades A and B). b: Ideogram representative of the distribution pattern of heterochromatin and CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> for the species of the *Partamona*.

Table 1: Species of the genus *Partamona* used in the molecular analyses and their respective sampling locations and geographic coordinates.

Scientific name	City / State	Geographical coordinates
<i>Partamona ailyae</i> 1	Redenção/PA	7°57'2.32"S 50°15'44.84"W
<i>Partamona ailyae</i> 2	Nova Xavantina/MT	14°38'14.93"S 52°24'59.91"W
<i>Partamona rustica</i>	Lontra/MG	15°52'4.27"S 44°17'22.05"W
<i>Partamona mulata</i>	Cuiabá/MT	15°35'53.51"S 56° 2'16.14"W
<i>Partamona testacea</i>	Novo Progresso/PA	6°55'52.95"S 55°45'54.81"W
<i>Partamona vicina</i>	Nova Xavantina/MT	14°39'10.06"S 52°23'12.96"W
<i>Partamona chapadicola</i>	Urbano Santo/MA	3°16'22.06"S 43°23'14.45"W
<i>Partamona seridoensis</i>	Mirador/MA	6°33'1.02"S 45° 3'39.59"W
<i>Partamona cupira</i>	Guimarânia/MG	18°49'6.54"S 46°43'29.76"W
<i>Partamona helleri</i> 1	Paraopeba/MG	19°16'16.72"S 44°24'5.65"W
<i>Partamona helleri</i> 2	Governador Lindenberg/ES	19° 9'31.43"S 40°30'8.55"W
<i>Partamona helleri</i> 3	Nova Venécia/ES	18°46'31.96"S 40°35'51.79"W
<i>Partamona helleri</i> 4	Viçosa/MG	20°45'20.15"S 42°51'45.50"W
<i>Partamona helleri</i> 5	Silva Jardim/RJ	22°40'48.92"S 42°24'11.75"W
<i>Partamona gregaria</i>	Novo Progresso/PA	7°50'21.75"S 55°44'30.95"W
<i>Partamona nhambiquara</i>	Tangará da Serra/MT	14°43'26.50"S 57°41'26.49"W

1 Table 2. Cytogenetic data (diploid number, localization of heterochromatin, and CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> and 18S rDNA sites) for the genus *Partamona*, separated  
 2 into the groups defined by Pedro and Camargo (2003).

<b>Group cupira</b>					
<b>Species</b>	<b>2n</b>	<b>Heterochromatin</b>	<b>CMA<sub>3</sub><sup>+</sup></b>	<b>18S</b>	<b>References</b>
<i>Partamona helleri</i>	34	Centromeric and pericentromeric region. A heterochromatic block in the first pair	5 to 7 markings	It ranged from six to eight markings between colonies	Brito <i>et al.</i> , 1997, Brito <i>et al.</i> , 2005, Martins <i>et al.</i> , 2009, Martins <i>et al.</i> , 2013, Martins <i>et al.</i> , 2014
<i>P. ailyae</i>	34	Heterochromatic blocks along a chromosomal arm	1 marking	-	Brito-Ribon <i>et al.</i> , 1999
<i>P. mulata</i>	34	Heterochromatic blocks along a chromosomal arm	2 markings	-	Brito-Ribon <i>et al.</i> , 1999
<i>P. rustica</i>	34	Centromeric region, with chromosomes and three color tones	2 markings	6 markings	In this study
<i>P. cupira</i>	34	-	3 markings	-	Marthe <i>et al.</i> , 2010, Pompolo, 1992, Pompolo, 1994; Costa <i>et al.</i> , 1992
<b>Group nigrior</b>					
<i>P. chapadicola</i>	34	Eucromatic and heterochromatic arms with chromosomes showing three color tones	4 markings	7 markings	Fernandes, 2012
<i>P. auripennis</i>	34	Along one arm of all chromosomes	2 markings	2 markings	In this study
<i>P. seridoensis</i>	34	Blocks in the pericentromeric region. Pairs 2, 4, 9, 10 and 15 have terminal heterochromatic blocks	8 markings	7 markings	Brito <i>et al.</i> , 2005
<b>Group bilineata/epiphytophila</b>					
<i>P. peckolti</i>	34	Pericentromeric region of all chromosomes, a heterochromatic block in the first pair	1 marking	-	Brito <i>et al.</i> , 2003

<i>P. nhambiquara</i>	34	Eucromatic and heterochromatic arms with chromosomes showing three color tones	4 markings	6 markings	Brito-Ribom <i>et al.</i> , 1999, Fernandes, 2012
-----------------------	----	--	------------	------------	---

**Group musarum**

<i>P. vicina</i>	34	Along a chromosomal arm and a band at the terminal region in one of the homologues of the largest pair	2 markings	-	Brito-Ribon <i>et al.</i> , 1999
<i>P. gregaria</i>	34	Centromeric and pericentromeric regions	6 markings	6 markings	In this study
<i>P. testacea</i>	n=18	-	-	-	Kerr, 1969
<i>P. pearsoni</i>	n=17	-	-	-	Tarelho, 1973
<i>Partamona sp</i>	34	Centromeric and pericentromeric regions	4 markings	-	In this study

1



Table S1: Modifications of the C Banding Protocol of the cytogenetically analyzed species.

	Sumner, 1972	<i>Partamona auripennis</i>	<i>Partamona rusica</i>	<i>Partamona gregaria</i>	<i>Partamona</i> sp
HCl	1 hour	7 minutes	4 minutes	2 minutes	2 minutes
H <sub>2</sub> O	Quick wash	Quick wash	Quick wash	Quick wash	Quick wash
Bário	5-15 minutes	13 minutes	10 minutes	8 minutes	8 minutes
HCl	-	1 minutes	30 seconds	30 seconds	30 seconds
H <sub>2</sub> O	Quick wash	Quick wash	Quick wash	Quick wash	Quick wash
2XSSC	1 hour	11 minutes	10 minutes	8 minutes	8 minutes

#### 4. Artigo II

### VARIABILIDADE MORFOMETRICA DE ESPÉCIES DE ABELHAS SEM FERRÃO DO GÊNERO *Partamona* SCHWARZ, 1939

#### Resumo

*Partamona* é um gênero de abelhas sem ferrão que apresenta espécies com morfologias muito semelhantes que tornam complexa a taxonomia do gênero e dificultam a identificação correta das espécies. O objetivo desse estudo foi investigar a variabilidade morfométrica das asas anteriores de operárias adultas das espécies *P. cupira*, *P. ailyae*, *P. gregaria*, *P. chapadicola*, *P. rustica*, *P. auripennis* e *P. helleri* utilizando morfometria geométrica. A análise de variáveis canônicas separou as espécies *P. cupira* e *P. ailyae* em duas nuvens de pontos não sobrepostas a nenhuma outra espécie no morfoespaço. As espécies *P. gregaria*, *P. chapadicola*, *P. rustica*, *P. auripennis* e *P. helleri* não apresentaram uma discriminação completa entre as espécies em relação à forma das asas, porém observou-se uma ligeira separação dessas espécies em dois grupos. As espécies *P. gregaria* e *P. auripennis* apresentaram p-valor 0,0006 para o teste de permutação sobre as distâncias de Procrustes. Todas as outras combinações de espécies apresentaram o p-valor significativo nas distâncias de Procrustes e Mahalanobis. A distinção das espécies *P. cupira* e *P. ailyae* indicou que a morfologia das asas dessas espécies contém informações significativas que podem ser utilizadas na correta identificação das mesmas. Além disso, a morfologia das asas indicou tendências evolutivas das espécies de *Partamona*, separando-as em dois grupos que são corroborados por marcadores citogenéticos e moleculares.

**Palavras-chave:** Meliponini, morfometria geométrica, citogenética, filogenia.

## **Introdução**

A taxonomia e a correta identificação das espécies são de extrema importância para as diferentes áreas da biologia básica e aplicada (Moraes, 1987). No contexto da biologia da conservação, os esforços precisam ser direcionados a partir de uma base taxonômica sólida, pois a ausência dessa base pode dificultar a execução de medidas apropriadas para uma ação conservacionista (Dubois, 2003).

Apesar da importância da taxonomia, muitos grupos de organismos apresentam problemas nessa área devido à dificuldade de se estabelecer padrões para separação entre as espécies. Este é o caso, por exemplo, de muitas espécies de abelhas sem ferrão que desempenham papel importante na manutenção dos ecossistemas através da polinização (Roubik, 1989; Ker 1997). Dentre essas abelhas encontra-se o gênero *Partamona* que compreende 33 espécies descritas distribuídas na região neotropical (Pedro e Camargo, 2003). Essas abelhas apresentam muitas similaridades morfológicas e para a correta classificação das espécies, muitas vezes é necessária uma combinação de vários caracteres, dentre eles, a forma dos dentes da mandíbula, coloração do integumento, cor da pilosidade e asas (Pedro e Camargo, 2003). Além disso, informações adicionais, como substrato de nidificação e localização geográfica, também são utilizadas (Camargo e Pedro, 2003).

Após a descrição das espécies de *Partamona*, utilizando dados de morfologia tradicional, não há registros, até o momento, de revisão das características morfológicas que possam estabelecer, com mais precisão, as características que definem as espécies do gênero. Utilizando características morfológicas e hábitos de nidificação, Pedro e Camargo (2003) propuseram uma divisão do gênero em quatro grupos, sendo eles *bilineata/epiphytophila*, *musarum*, *nigrior* e *cupira*. Porém, esses grupos parecem não ser

naturais e a taxonomia do gênero ainda é considerada complexa devido à dificuldade de se estabelecer caracteres de importância taxonômica (Pedro e Camargo, 2003).

A morfometria geométrica tem sido considerada mais eficaz do que a morfologia tradicional na determinação de táxons porque captura a forma geométrica, que inclui a forma e o tamanho do órgão analisado (Bookstein, 1991). Em abelhas, asas dos indivíduos adultos são comumente utilizadas nas análises de morfometria geométrica (Aytekin *et al.* 2007; Mendes *et al.*, 2007). O fato dessas estruturas serem planas facilita a mensuração do tamanho e da forma das mesmas (Nunes *et al.*, 2007, 2008; Francoy *et al.*, 2009). Dessa forma, muitos estudos, com diferentes abordagens, têm sido conduzidos utilizando a morfometria geométrica nesse grupo de insetos (Aytekin *et al.* 2007; Mendes *et al.*, 2007; Nunes *et al.*, 2007, 2008, 2012; Villemant *et al.* 2007; Francoy *et al.*, 2009, 2012; Francoy e Fonseca, 2010).

Contudo, nenhum trabalho utilizando a morfometria geométrica foi realizado em *Partamona* para auxiliar na taxonomia das espécies e assim confirmar o número de unidades taxonômicas do gênero. Assim, objetivo do presente estudo foi avaliar a variação morfométrica das asas anteriores direita de operárias adultas das espécies *P. cupira*, *P. ailyae*, *P. gregaria*, *P. chapadicola*, *P. rustica*, *P. auripennis* e *P. helleri* por meio da morfometria geométrica.

## **Material e Métodos**

Foram utilizadas operárias adultas de *P. cupira*, *P. ailyae*, *P. auripennis*, *P. chapadicola*, *P. gregaria*, *P. rustica* e *P. helleri*. O número de colônias de cada espécie e a procedência de cada colônia estão disponíveis na Tabela 1. As abelhas foram identificadas por Sílvia Pedro e armazenadas em tubos contendo álcool etílico 100% em freezer a uma temperatura de -20°. Os indivíduos analisados foram provenientes de

material depositado no Laboratório de Biologia Molecular de Insetos do Departamento de Biologia Geral na Universidade Federal de Viçosa-MG.

Utilizamos a asa anterior direita de sete a dez operárias por colônia. As asas foram retiradas, dispostas entre duas lâminas histológicas e fotografadas em um estereomicroscópio binocular Olympus (Carl Zeiss) acoplado a uma câmera AxionCam Erc 5S (10MB), utilizando o programa Axion Vision. Todas as fotos foram tiradas no mesmo aumento da lente para manter as fotos na mesma escala.

Após a digitalização das imagens, foram criados arquivos do tipo TPS utilizando o programa tpsUtil versão 1.72 (Rohlf, 2015). Usando o software tpsDig2 (Rohlf, 2015) os marcos anatômicos foram digitalizados sempre na mesma ordem em cada imagem. Onze marcos anatômicos foram desenhados manualmente nas interseções das nervuras de cada asa (Figura 1). Para o teste de erro de digitação foram criados dois conjuntos de fotos e os marcos anatômicos foram digitados em todas as fotos desses dois conjuntos. Foi realizada uma análise dos componentes principais (PCA) dessas fotos, utilizando a matriz de variância-covariância dos resíduos da sobreposição de Procrustes. Depois disso, a distribuição normal dos dados multivariados foi testada no programa PAST 3.0.

Após os testes preliminares, as configurações foram analisadas usando o software MorphoJ versão 1.03 (Klingenberg, 2011) através do qual foi feito o alinhamento de Procrustes, que exclui diferenças de posição, tamanho e orientação, para identificar os pontos de variação da forma. A técnica de variável canônica (CVA) foi utilizada para maximizar o valor explicativo de cada variável canônica em relação às diferenças morfológicas entre as espécies estudadas e testar se as médias das espécies foi significativamente diferente. Para facilitar a interpretação geométrica, as semelhanças entre as espécies foram identificados em gráfico de dispersão bidimensional. São apresentadas as distâncias de Procrustes e as distâncias de Mahalanobis entre todos os

pares de espécies avaliadas, para quantificar as distâncias na forma média entre as espécies comparadas.

## Resultados

As três primeiras variáveis canônicas explicaram 78,58% da variância (CV1=39,50%; CV2=23,17%; CV3=15,91%). A análise de variáveis canônicas separou as espécies *P. cupira* e *P. ailyae* em duas nuvens de pontos não sobrepostas a nenhuma outra espécie no morfoespaço. Essa análise (CVA) amplifica as diferenças entre os grupos, porém as espécies *P. gregaria*, *P. chapadicola*, *P. rustica*, *P. auripennis* e *P. helleri* não apresentaram uma discriminação completa entre as espécies em relação à forma das asas (Figura 2). No entanto, o resultado das medidas de distância de Procrustes e de Mahalanobis apontam uma separação entre as espécies, sendo na maior parte das vezes sustentada por um p-valor significativo. As premissas foram negligenciadas, dessa forma impossibilitando que os CVAs não possuam uma verdade estatística, todavia a estruturação dos dados são mais facilmente visualizados no CVA e por isso esse teste foi apresentado. Foi possível observar uma ligeira separação das espécies em dois grupos (*P. chapadicola* + *P. gregaria*; *P. helleri* + *P. auripennis* + *P. rustica*).

*P. auripennis* e *P. gregaria* são as mais próximas na Distância de Procrustes enquanto que as espécies *P. chapadicola* e *P. gregaria* são as mais próximas na Distância de Mahalanobis. Já as mais distantes, segundo a distância de Procrustes e de Mahalanobis são *P. cupira* e *P. rustica*. As espécies *P. gregaria* e *P. auripennis* apresentaram p-valor 0,0006 para o teste de permutação sobre as distâncias de Procrustes. Todas as outras combinações de espécies apresentaram o p-valor significativo em ambas distâncias (Tabela 2 e 3).

## Discussão

As espécies *P. ailyae* e *P. cupira* pertencem ao mesmo grupo cupira definido por Pedro e Camargo (2003). As espécies desse grupo apresentam similaridades morfológicas como a forma dos dentes da mandíbula e ainda possuem hábitos de nidificar em termiteiros (Pedro e Camargo, 2003; Camargo e Pedro, 2003). Embora pertençam ao mesmo grupo, tendo similaridades morfológicas e de nidificação, observa-se uma correta classificação das espécies *P. ailyae* e *P. cupira* utilizando a morfologia da asa anterior direita. Assim, a morfometria geométrica é uma ferramenta alternativa eficiente para a identificação dessas duas espécies. Em outros gêneros que possuem espécies crípticas, como em *Bombus* (Aytekin *et al.* 2007) e *Eubazus* (Villemant *et al.* 2007), a morfometria geométrica também tem ajudado no reconhecimento das espécies, mesmo sendo as espécies morfológicamente semelhantes.

Com exceção das espécies *P. cupira* e *P. ailyae* que foram totalmente distinguíveis pela morfologia das asas, foi possível observar uma ligeira separação das espécies em dois grupos. Esses dois grupos ficariam assim definidos: *P. helleri*, *P. rustica* e *P. auripennis* nos scores positivos da CV2 e *P. gregaria* e *P. chapadicola* nos scores positivos da CV1 e negativo da CV2. Essa separação não concorda com a os grupos definidos por Pedro e Camargo (2003) onde *P. helleri*, *P. rustica*, *P. cupira* e *P. ailyae* pertencem ao grupo curpira, *P. gregaria* ao grupo musarum e *P. chapadicola* ao grupo nigrior. Assim, a morfometria geométrica das asas anteriores direita de operárias adultas indicam que esses grupos previamente definidos para *Partamona* não sejam naturais.

Os organismos podem apresentar similaridades morfogenéticas por compartilharem um mesmo caminho evolucionário (Klingenberg, 2008). De acordo com marcadores moleculares e citogenéticos, 12 espécies de *Partamona* também foram divididas em dois grupos (Artigo 1) distintos dos grupos previamente definidos para o gênero (Pedro e Camargo, 2003). Esses dois grupos (A e B) corroboram as similaridades

morfológicas encontradas nesse estudo, sendo as espécies *P. rustica* e *P. auripennis* alocadas no grupo A e *P. gregaria* e *P. chapadicola* no grupo B. Essa divisão reforça a hipótese de que os grupos definidos com base em características morfológica e de nidificação (Pedro e Camargo, 2003) não sejam naturais e que os grupos definidos pelos marcadores citogenéticos, moleculares (Artigo 1) e morfométricos possam estar definindo melhor a divisão das espécies do gênero.

As diferenças na morfologia das asas das espécies de *Partamona* têm sido observadas pela mudança dos contornos das células dessa estrutura. Esses contornos também conhecidos como padrão de venação da asa tem mostrado resultados significativos na discriminação das espécies tais como as dos gêneros *Apis* (Francoy *et al.*, 2006) e *Euglossa* (Francoy *et al.*, 2012). O padrão de venação pode estar relacionado com a estabilidade das asas durante o vôo, uma vez que a ausência dessas veias levaria à redução da rigidez da asa, comprometendo, assim, a locomoção do indivíduo (Combes e Daniel, 2003). Em *P. cupira* observa-se uma expansão das células do 2º cubital e 1º medial e também da parte final da asa (CV18+), enquanto que *P. ailyae* apresenta mais expansão da parte final da asa (CV28+). Ambas expansões podem estar relacionadas a estabilidade no vôo como relatadas para outras abelhas.

Não detectamos diferenças na morfologia da asa de *P. helleri* e *P. rustica*. Essas duas espécies, assim como *P. cupira* e *P. ailyae*, também apresentam semelhanças morfológicas e de nidificação e além disso, são simpátricas em sua distribuição, que vai do norte de Minas Gerais ao estado da Bahia (Pedro e Camargo, 2003). Uma possível explicação para a ausência de diferenciação morfológica das asas de *P. helleri* e *P. rustica* pode ser associada ao recente processo de especiação, que pode não ter ainda permitido uma diferenciação dos caracteres morfológicos dessas duas espécies.

Embora a morfologia tradicional tenha sido a base utilizada para a classificação e divisão das espécies de *Partamona*, as similaridades morfológicas entre as espécies tornam o gênero complexo em sua taxonomia. A distinção das espécies *P. cupira* e *P. ailyae* indicou que a morfologia das asas dessas espécies contém variações significativas que podem ser utilizadas na correta identificação das mesmas. Além disso, essas estruturas morfológicas também indicaram tendências evolutivas na morfologia dessas abelhas, separando-as em dois grupos que são corroborados por marcadores citogenéticos e moleculares.

### Referências Bibliográficas

- Aytekin, A. M.; Terzo, M.; Rasmont, P. & Çagatay, N. 2006. Landmark based geometric morphometric analysis of wing shape in *Sibiricobombus* Vogt (Hymenoptera: Apidae: *Bombus* Latreille). *Annales de la Société Entomologique de France* 43: 95-102.
- Bonatti, V.; Simões, Z. L. P.; Franco, F. F. & Francoy, T. M. 2014. Evidence of at least two evolutionary lineages in *Melipona subnitida* (Apidae, Meliponini) suggested by mtDNA variability and geometric morphometrics of forewings. *Naturwissenschaften*, 101:17–24.
- Camargo, J. M. F. & Pedro, S. R. M. 2003. Meliponini neotropicais: o gênero *Partamona* Schwarz, 1939 (Hymenoptera, Apidae, Apinae) - bionomia e biogeografia. *Revista Brasileira de Entomologia*, 47: 311-372.
- Combes, S. A. & Daniel, T. L. 2003. Flexural stiffness in insect wings. I. Scaling and the influence of wing venation. *Journal of Experimental Biology*, 206: 2979-2987.
- DeBach P. 1974 *Biological Control by Natural Enemies*. Cambridge Univ. Press. U.K.
- DeBach, P., & Rosen, D. 1991. *Biological control by natural enemies*. CUP Archive.
- Dubois, A. 1998. Mapping European amphibians and reptiles: collective inquiry and scientific methodology. *Alytes*, 15: 176-204.
- Dubois, A. 2003. The relationships between taxonomy and conservation biology in the century of extinctions. *Comptes Rendus Biologies*, 326: 9-21.

- Francoy, T. M.; Prado, P. R. R.; Gonçalves, L. S. Costa, L. S. & Jong, D. 2006. Morphometric differences in a single wing cell can discriminate *Apis mellifera* racial types. *Apidologie*, 37: 91-97.
- Francoy, T. M.; Wittmann, D.; Steinhage, V.; Drauschke, M.; Müller, S.; Cunha, D. R.; Nascimento, A. M; Figueiredo, V. L. C.; Simões, Z. L. P.; Jong, D. D.; Arias, M. C. & Gonçalves, L.S. 2009. Morphometric and genetic changes in a population of *Apis mellifera* after 34 years of Africanization. *Genetics and Molecular Research*, 8: 709-717.
- Francoy, T. M. & Fonseca, V. L. I. 2010. A morfometria geométrica e a identificação automática de espécies de abelhas. *Oecologia Australis*, 14: 317-321.
- Francoy, T. M.; Franco, F. F. & Roubik, D. W. 2012. Integrated landmark and outline-based morphometric methods efficiently distinguish species of *Euglossa* (Hymenoptera, Apidae, Euglossini). *Apidologie*, 43: 609–617.
- Kerr, W. E. 1997. A importância da meliponicultura para o país. *Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* 1: 42-44.
- Klingenberg, C. P. 2008. Morphological integration and developmental modularity. *Annu. Rev. Ecol. Evol S.* 39:115–132.
- Klingenberg, C. P. 2011. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources*, 11: 353-357.
- Mendes, M. D.; Francoy, T. M.; Sunes-Silva, P.; Menezes, C. & Imperatriz-Fonseca, V. L. 2007. Intra-populacional variability of *Nannotrigona testaceicornis* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera, Meliponini) using relative warp analysis. *Bioscience Journal*, 23: 147-152.
- Mitteroecker, P. & Bookstein. 2011. Linear discrimination, ordination, and the visualization of selection gradients in modern morphometric. *Evolutionary Biology*, 38: 100-114.
- Moraes, G. J. 1987. Importance of taxonomy in biological control. *Insect Science and its Application*. 4: 841-844.
- Nunes, L. A.; Pinto, M. F. F. C.; Carneiro, P.; Pereira, D. G. & Waldschmidt, A. M. 2007. Divergência genética em *Melipona scutellaris* Latreille (Hymenoptera: Apidae) com base em caracteres morfológicos. *Bioscience Journal*, 23: 1-9.
- Nunes, L. A.; Araújo, E. D.; Carvalho, C. A. L.; Waldschmidt, A. M. 2008 Population Divergence of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera: Apidae)

- Endemic to the Semi-arid Region of the State of Bahia, Brazil. *Sociobiology*, 1: 81-93.
- Nunes, L. A.; Passos, G. B.; Carvalho, C. A.L.; Araújo, E. D. 2012 Size and shape in *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera; Meliponini). *Brazilian Journal of Biology*, 4: 887-893.
- Pavlinov, I. Y. 2001. Geometric morphometrics, a new analytical approach to comparison of digitized images, p. 41-90 in: *Information Technology in Biodiversity Research. Abstracts of the 2nd. International Symposium*, St. Petersburg.
- Pedro, S. R. M. & Camargo, J. M. F. 2003. Meliponini neotropicais: o gênero *Partamona* Schwarz, 1939 (Hymenoptera, Apidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, 47: 1-117.
- Rohlf F.J. (2005) tpsDig, version 2.04, Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook.
- Roubik, D. W. 1989. *Ecology and natural history of tropical bees*. New York, Cambridge University Press.
- Villemant, C.; Kenis, M. & Simbolotti, G. 2007. Discrimination of *Eubazus* (Hymenoptera, Braconidae) sibling species using geometric morphometrics analysis of wing venation. *Systematic Entomology*, 32: 625:634.
- Viscosi, V. & Cardini, A. 2011. Leaf Morphology, Taxonomy and Geometric Morphometrics: A Simplified Protocol for Beginners. *PLoS ONE* 6(10).

Tabela 1: Espécies de *Partamona* utilizadas nas análises morfométricas e suas respectivas localidades

Nome científico	Localidade/Estado	Número de espécimes analisados
<i>Partamona cupira</i>	Bom Despacho/MG	10
<i>Partamona cupira</i>	Guimarânia/MG	10
<i>Partamona gregaria</i>	Novo Progresso/PA	20
<i>Partamona rustica</i>	Bocaiúva/MG	8
<i>Partamona rustica</i>	Lontra/MG	8
<i>Partamona ailyae</i>	Catalão/Goias	10
<i>Partamona ailyae</i>	Novo Progresso/PA	10
<i>Partamona auripennis</i>	Novo Progresso/PA	10
<i>Partamona chapadicola</i>	Urbano Santos/MA	20
<i>Partamona helleri</i>	Santa Teresa/ES	10
<i>Partamona helleri</i>	Paraopeba/MG	10

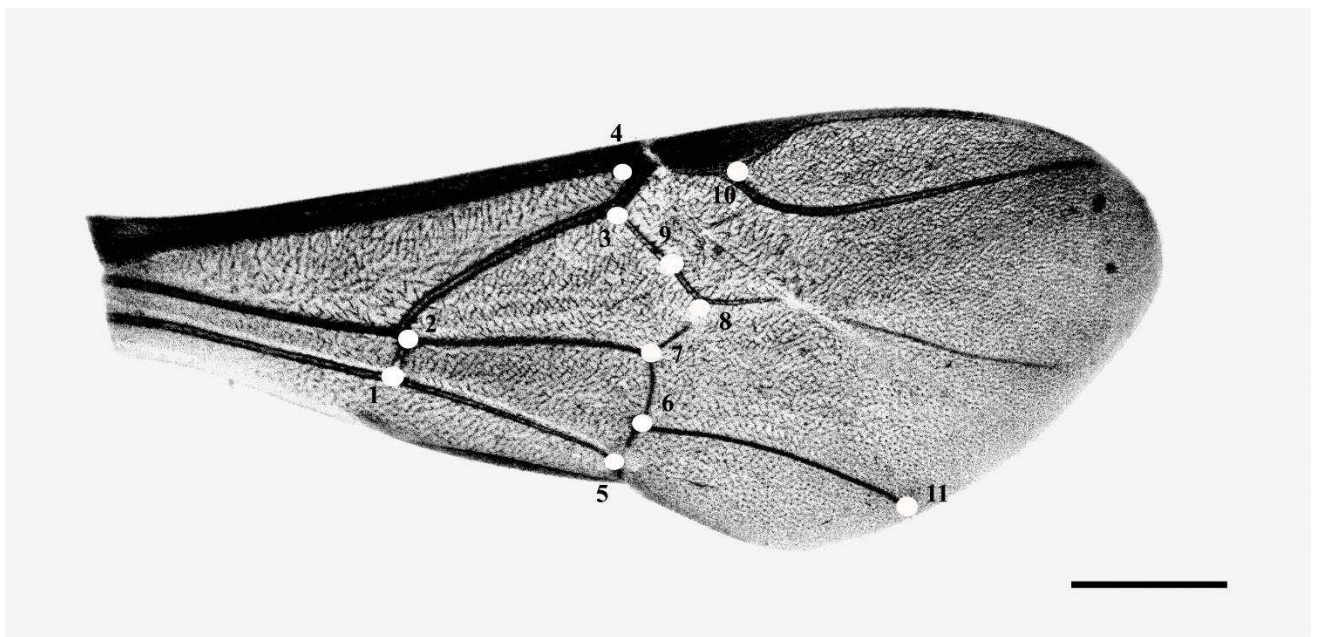


Figura 1: Asa anterior direita de operárias adultas de abelhas do gênero *Partamona*. Os círculos brancos representam os pontos anatômicos utilizados nas análises morfométrica e os números indicam a ordem que os pontos anatômicos foram marcados. Barra: 1 mm.

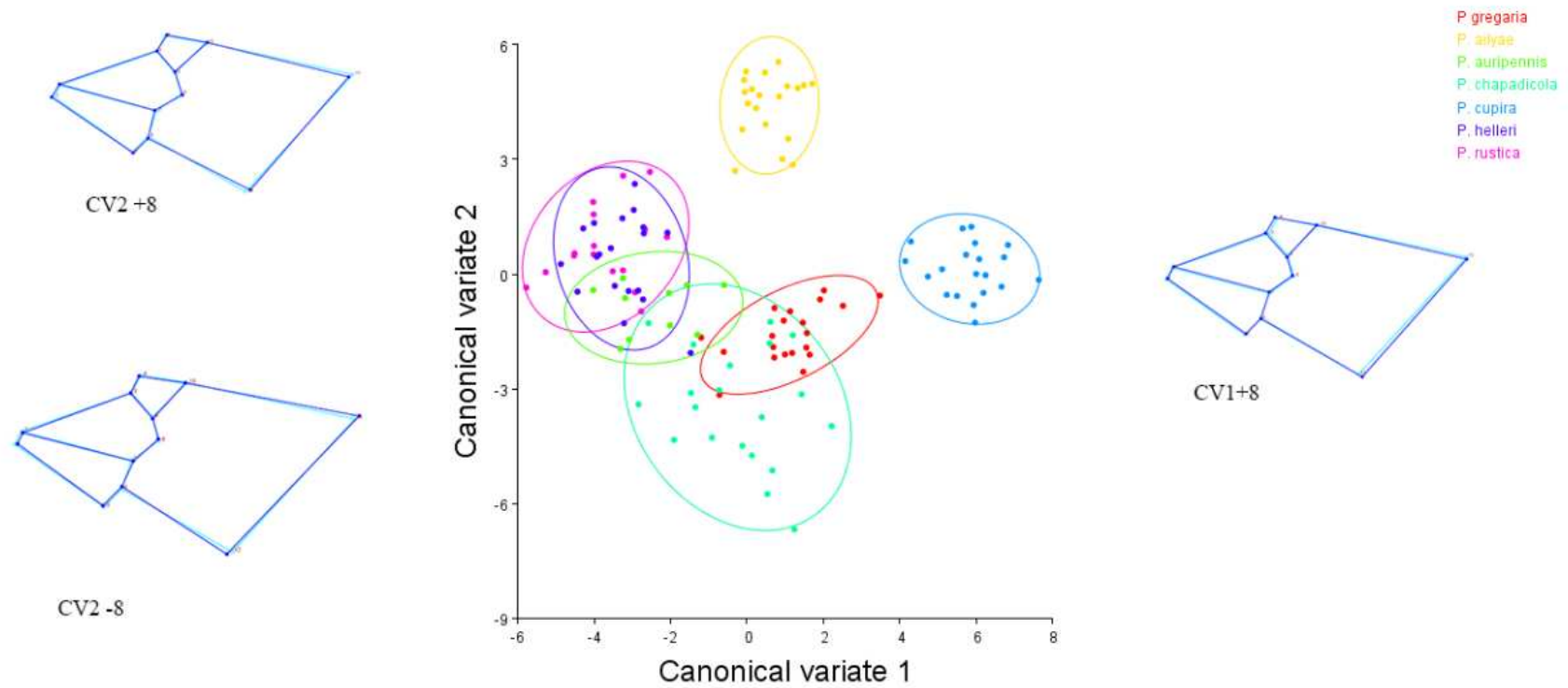


Figura 2: Gráfico dos escores das variáveis canônicas CV1 e CV2 da asa anterior direita de *P. helleri*. Os outlines em azul escuro representam as deformações encontradas nas extremidades dos eixos CV1 (à direita) e CV2 (à esquerda), já os outlines em azul claro representam a deformação média. Os valores abaixo dos outlines indicam os extremos das variações positiva e negativa para cada CV.

Tabela 2: Distâncias de Procrustes entre as espécies e seu p-valor para teste de permutação de 1000 réplicas. Resultado do CVA da da asa anterior direita.

Distância de Procrustes						
	<i>P. gregaria</i>	<i>P. ailyae</i>	<i>P. auripennis</i>	<i>P. chapadicola</i>	<i>P. cupira</i>	<i>P. helleri</i>
<i>P. ailyae</i>	0,0245					
<i>P. auripennis</i>	0,0142	0,0219				
<i>P. chapadicola</i>	0,0156	0,0316	0,0218			
<i>P. cupira</i>	0,0195	0,0298	0,0293	0,0255		
<i>P. helleri</i>	0,0181	0,0300	0,0179	0,0168	0,0309	
<i>P. rustica</i>	0,0208	0,0264	0,0176	0,0235	0,0343	0,0176

Valor-p para teste de permutação de 1000 réplicas						
	<i>P. gregaria</i>	<i>P. ailyae</i>	<i>P. auripennis</i>	<i>P. chapadicola</i>	<i>P. cupira</i>	<i>P. helleri</i>
<i>P. ailyae</i>	<.0001					
<i>P. auripennis</i>	0,0006	<.0001				
<i>P. chapadicola</i>	<.0001	<.0001	<.0001			
<i>P. cupira</i>	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001		
<i>P. helleri</i>	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	
<i>P. rustica</i>	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001

Tabela 3: Distâncias de Mahalanobis entre as espécies e seu p-valor para teste de permutação de 1000 réplicas. Resultado do CVA da asa anterior direita.

Distância de Mahalanobis						
	<i>P. gregaria</i>	<i>P. ailyae</i>	<i>P. auripennis</i>	<i>P. chapadicola</i>	<i>P. cupira</i>	<i>P. helleri</i>
<i>P. ailyae</i>	6,7938					
<i>P. auripennis</i>	6,0448	7,7185				
<i>P. chapadicola</i>	5,0159	8,1041	6,7583			
<i>P. cupira</i>	6,4455	7,6565	9,7707	7,8588		
<i>P. helleri</i>	7,5313	7,5168	6,8689	6,8770	9,6980	
<i>P. rustica</i>	6,7881	7,3554	6,9878	7,2809	10,3292	6,9928
Valor-p para teste de permutação de 1000 réplicas						
	<i>P. gregaria</i>	<i>P. ailyae</i>	<i>P. auripennis</i>	<i>P. chapadicola</i>	<i>P. cupira</i>	<i>P. helleri</i>
<i>P. ailyae</i>	<.0001					
<i>P. auripennis</i>	<.0001	<.0001				
<i>P. chapadicola</i>	<.0001	<.0001	<.0001			
<i>P. cupira</i>	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001		
<i>P. helleri</i>	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	
<i>P. rustica</i>	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001

### Artigo III

## DIVERSIDADE MORFOLÓGICA E CARIOTÍPICA ENTRE POPULAÇÕES DE *Partamona helleri* (FRIESE, 1900): CROMOSSOMOS B E IMPLICAÇÕES PARA EVOLUÇÃO DA ESPÉCIE

### Resumo

*Partamona helleri* é uma abelha sem ferrão pertencente a tribo Meliponini que apresenta variação morfológica. Embora possua número monomórfico de cromossomos do complemento A, variações cromossômicas numéricas são encontradas em virtude da presença de cromossomos B. Aqui, nós avaliamos a diversidade morfológica e cariotípica entre populações de *P. helleri* localizadas no bioma Mata. As populações da da espécie apresentaram variação morfométrica das asas anteriores direita das operárias adultas. O número cromossômico encontrado foi  $2n=34$  (femêas) e  $n=17$  (machos). Adicionalmente aos cromossomos do complemento A, até quatro cromossomos B foram encontrados. O rDNA 18S e o fluorocromo CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> indicaram a ocorrência de 11 citótipos para a espécie. O microssatélites GA<sub>(15)</sub> hibridizou nas regiões eucromáticas do braço longo de todos os cromossomos do complemento A e não se acumulou nos cromossomos B. O microssatélite TTAGG<sub>(6)</sub> revelou sinais positivos nas duas porções teloméricas dos cromossomos do complemento A e B com variações de intensidade de sinais entre os braços cromossômicos. A citometria de imagem indicou variações de densidade óptica integrada entre os cromossomos do complemento A (0,672 para o cromossomo 1 a 0,388 para o cromossomo 17), e entre os cromossomos B (0,01 a 0,33) e resolveu diferenças entre os cromossomos B, mostrando a diversidade desses cromossomos em *P. helleri*. A aplicação da citometria de imagem juntamente com as análises citogenéticas foram

importantes para revelar variações cromossômicas e as diferenças na composição da cromatina podem ser um mecanismo comum de divergência intraespecífica.

**Palavras-chave: Cromossomo B, abelhas sem ferrão, citometria de imagem, citótipos, DNA repetitivo, Meliponini, morfometria geométrica.**

## **Introdução**

*Partamona helleri* (Friese, 1900) é uma abelha sem ferrão com distribuição no leste do território brasileiro (Camargo e Pedro, 2003). É uma abelha pequena, de coloração escura e de comportamento agressivo a qual tem sido incluída no grupo cupira devido as semelhanças morfológicas com as espécies desse grupo (Pedro e Camargo, 2003). Entretanto, *P. helleri* é a única espécie pertencente ao grupo cupira que não nidifica em associação com termiteiros (Camargo e Pedro, 2003). Seus ninhos geralmente são livres ou semi-expostos e são comumente encontrados em ninhos abandonados de aves como o *Phacellodomus rufifrons* (“João graveto”) bem como em ambientes antropizados (Camargo e Pedro, 2003). Embora não seja comum, foi relatada, para algumas populações, a utilização de cupinzeiros como substratos de nidificação em *P. helleri* (Pedro e Camargo, 2003). Essas populações precisam ser melhor analisadas para a elucidação de questões taxonômicas da espécie.

Em abelhas, a morfometria geométrica tem sido uma ferramenta eficaz no estudo de variação morfológica intraespecífica (Francisco *et al.*, 2008; Francoy *et al.*, 2011; Francoy *et al.*, 2016). Essa ferramenta descreve, representa e compara a geometria das formas estudadas. Além disso, a morfometria geométrica é capaz de descrever e identificar mais nitidamente as regiões de mudanças na forma e, principalmente, reconstituir graficamente estas diferenças (Bookstein, 1991). Contudo, *P. helleri* não foi,

até o momento, estudada por meio dessa ferramenta de análise visando avaliar as variações morfológicas de suas populações.

Além das diferenças morfológicas, *P. helleri* apresenta também variações em seu cariótipo devidas à presença de cromossomos extras ao complemento A – os cromossomos supranumerários ou cromossomos B (Brito *et al.*, 1997; Tosta *et al.*, 2004; Brito *et al.*, 2005; Martins *et al.*, 2009, 2013). Esses cromossomos apresentaram uma variedade de número (1 a 7) e morfologia (submetacêntricos e acrocêntrico) na espécie (Brito *et al.*, 1997; Tosta *et al.*, 2007; Martins *et al.*, 2009, 2013, 2014). As duas hipóteses mais prováveis para explicação da presença de cromossomo B no cariótipo são: (1) resultados de alterações estruturais nos cromossomos do complemento A (Camacho *et al.*, 2000), e (2) resultados de hibridação entre espécies (McAllister and Werren, 1997; Tosta *et al.*, 2004, 2014).

Além das alterações numéricas ocasionadas pela presença de cromossomos B, outras variações cariotípicas, como heteromorfismo de cromossomos do complemento A, são encontradas em *P. helleri* A (Brito *et al.*, 1997; Brito *et al.*, 2005). Essas variações foram indicadas como resultado de rearranjos estruturais, que por sua vez podem ter originado os cromossomos B na espécie (Brito *et al.*, 1997; Brito *et al.*, 2005). Porém, a sonda gerada a partir da microdissecção de um cromossomo B indicou ausência de homologia entre esse cromossomo B e os cromossomos do complemento A e não confirmou a hipótese de uma origem intraespecífica (Martins *et al.*, 2013).

Tosta *et al.* (2007) isolaram e clonaram um marcador RAPD associado a um dos cromossomos B de *P. helleri*, que foi então convertido em marcador SCAR (região amplificada caracterizada por sequência). Com esse marcador foi possível identificar indivíduos adultos que portavam o cromossomo B, uma vez que só era possível detectar citologicamente a presença/ausência desses cromossomos no estágio larval (Tosta *et al.*,

2007). O marcador SCAR foi também utilizado para investigar a presença de cromossomos B em outras espécies do gênero *Partamona*, sendo encontrados nas espécies *P. cupira*, *P. rustica*, *P. criptica* (Tosta *et al.*, 2014), *P. seridoensis* (Correia *et al.*, 2014), *P. chapadicola* e *P. gregaria* (Machado *et al.*, 2016). Com isso foram sugeridas duas hipóteses de origem dos cromossomos B no gênero, sendo a primeira hipótese de que este cromossomo estava presente em um ancestral comum a estas espécies e a segunda hipótese de que estes cromossomos B foram transferidos de uma espécie para outra por meio de hibridação interespecífica (Tosta *et al.*, 2014; Machado *et al.*, 2016).

Embora o cariótipo de *P. helleri* já tenha sido estudado, principalmente com foco na origem dos cromossomos B, pouco se conhece sobre a organização e estrutura dos cromossomos do complemento A e B. Também são escassos os estudos que busquem elucidar questões taxonômicas da espécie diante das variações morfológicas encontradas. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a diversidade morfológica e cariotípica de *P. helleri* e a diversidade e dinâmica do cromossomo B de diferentes populações.

## **Material e métodos**

### ***Morfometria geométrica***

Utilizamos abelhas operárias adultas de 38 colônias naturais da espécie *P. helleri* distribuídas em 14 localidades compreendendo os estados de Minas Gerais (MG), Espírito Santo (ES) e Rio de Janeiro (RJ). Os locais de procedência das abelhas e o número de indivíduos analisados estão descritos na Tabela 1. As abelhas foram capturadas na entrada das colônias com o auxílio de armadilha de interceptação de vôo, autorizadas pela Licença SISBIO-ICMBio 52690-1. Após a captura, as abelhas foram transferidas para tubos contendo etanol absoluto e foram mantidas em freezer a uma temperatura de -20°. Os

espécimes foram devidamente identificados e os exemplares foram depositados no Museu de Entomologia do Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa-MG.

As asas anteriores direita de 10 operárias por colônia foram retiradas, dispostas entre duas lâminas histológicas e fotografadas na mesma orientação e aumento da lente para manter as fotos na mesma escala. Utilizamos um estereomicroscópio binocular Olympus (Carl Zeiss) acoplado a uma câmera AxionCam Erc 5S (10MB) e o programa Axion Vision para captura das imagens.

Após a digitalização das imagens foram criados arquivos do tipo TPS utilizando o programa tpsUtil versão 1,72. Utilizamos o programa tpsDig versão 2.10 (Rohlf, 2006) para digitalizar os 11 marcos anatômicos nas interseções das nervuras de cada asa (Figura 1). Feito isso, criamos dois conjuntos iguais de fotos e digitamos os marcos anatômicos nas imagens desses dois conjuntos para realizamos um teste de erro de digitação, que foi avaliado pela análise dos componentes principais (PCA), utilizando a matriz de variância-covariância dos resíduos da sobreposição de Procrustes. Após esse teste, avaliamos a distribuição normal dos dados multivariados no programa PAST 3.0.

As imagens foram analisadas usando o software MorphoJ versão 1.06 (Klingenberg, 2011) através do qual foi feito o alinhamento de Procrustes, exclui os fatores de posição, tamanho e orientação, para identificar os pontos de variação da forma. A técnica de variável canônica (CVA) foi utilizada para maximizar o valor explicativo de cada variável canônica em relação às diferenças morfológicas entre as populações estudadas e testar se as médias das populações foi significativamente diferente. Para facilitar a interpretação geométrica, as semelhanças entre as espécies foram identificadas em um gráfico de dispersão bidimensional. A CVA também apresenta as distâncias de Procrustes e as distâncias de Mahalanobis entre as populações avaliadas.

### ***Análises citogenéticas***

Amostras de 21 colônias naturais foram coletadas da espécie *P. helleri*, compreendendo 14 localidades distribuídas no bioma Mata Atlântica dos estados de Minas Gerais (MG), Espírito Santo (ES), Rio de Janeiro (RJ) e Bahia (BA) (Tabela 2).

O gânglio cerebral das larvas em último instar foi coletado para obtenção dos cromossomos metafásicos, conforme protocolo estabelecido por Imai *et al.*, (1988). Após coloração com Giemsa, o número cromossômico de cada indivíduo foi determinado, assim como a presença/ausência de cromossomos B. Pelo menos 10 indivíduos de cada colônia foram analisados. Em cada indivíduo foram analisadas 10 metáfases que foram fotografadas para determinação do número cromossômico. Quando a lâmina, representando cada indivíduo, não continha 10 metáfases, foram analisadas o número total de metáfases presentes na lâmina.

A caracterização da distribuição da heterocromatina por meio do Bandeamento C foi realizada de acordo com o método de Sumner (1972), com modificações. As metáfases foram fotografadas em microscópio OLYMPUS BX-60 acoplado a uma câmera Q-Color3 OLYMPUS e os kariogramas foram montados com auxílio do programa de edição de imagens.

A coloração DA/DAPI/CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> (distamicina A/4'-6-diamidino-2-phenylindole /cromomicina A3) foi feita segundo protocolo de Schweizer (1980). A técnica de hibridização por fluorescência *in situ* (FISH) foi realizada segundo Cioffi *et al.* (2010a). Os microssatélites utilizados como sondas de DNA repetitivo foram GA<sub>(15)</sub> e TTAGG<sub>(6)</sub> marcados diretamente na sua extremidade 5' com Cy3 (Sigma-Aldrich, MO,USA). Para a sonda específica do rDNA 18S, o protocolo seguido foi de Pinkel *et al.*(1986). Essa sonda foi marcada utilizando digoxigenina-11-dUTP (Roche, Mannheim, Germany). As metáfases foram fotografadas em um fotomicroscópio de epifluorescência OLYMPUS

BX-53 acoplado a uma câmera XM10 OLYMPUS e montadas com auxílio do programa de edição de imagens.

### ***Citometria de imagem***

Os cromossomos mitóticos obtidos nas análises citogenéticas foram utilizados na citometria de imagem. Os procedimentos da reação de Feulgen foram realizados de acordo com Carvalho *et al.* (2011), com poucas modificações. Após a fixação, as lâminas foram lavadas em água destilada, secas ao ar e hidrolisadas em HCl 5 M (Merck) por 16 – 22 min a 25°C. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada, coradas com o reativo de Schiff durante 12 h a 4°C. Depois disso, as lâminas foram lavadas três vezes (durante 2 min de cada vez) em 0,5% de água sulfurosa.

Imagens das metáfases foram capturadas com uma câmera de vídeo CCD monocromática de 12 bits, Photometrics CoolSNAP Pro (Roper Scientific, Tucson, AZ, EUA) em um microscópio Olympus™ BX-60 (Olympus, Tóquio, Japão). O microscópio foi equipado com uma fonte de luz estabilizada, com uma objetiva PlanApo de 100x e abertura numérica de 1.4, um condensador de aplanat achromat com abertura de 1.4, um filtro de densidade neutra (ND6) e outro de cor verde de interferência (IF550). O alinhamento Köhler foi verificado antes de cada sessão de captura para ajustar o caminho óptico ideal e, conseqüentemente, reduzir a luz difusa.

As imagens foram digitalizadas empregando o Kit CoolSNAP Pro (MD, EUA), e a análise por citometria de imagem foi realizada utilizando o sistema de análise Image Pro-Plus 6.1 (Media Cybernetics, MD, EUA). A calibração e avaliação do sistema de análise de imagens foi conduzida por meio de três testes: estabilidade, linearidade e uniformidade (Carvalho *et al.*, 2011). A luz do microscópio estabilizou após 12 min, e o software do sistema de análise de imagens calculou automaticamente um  $R^2 = 0,9978$

para o teste de linearidade e um coeficiente de variação = 0,68% para o teste de uniformidade.

A digitalização e o mensuramento da densidade óptica (DO) das imagens foram feitas usando o sistema Image Pro Plus 6.1 Media Cybernetics. As imagens foram selecionadas e segmentadas para montar o cariograma. Com o mesmo programa, os cromossomos foram segmentados e os valores referentes à área e à DO foram gerados pelo software. Com base nos valores de área e DO de cada cromossomo, os valores de DOI foram calculados.

## **Resultados**

### ***Morfometria geométrica***

As três primeiras variáveis canônicas (CV) explicaram 100% da variância (CV1 47,98%; CV2 28,18%; CV3 23,83%). A CVA amplifica as diferenças entre os grupos, porém não houve uma discriminação completa entre as populações (Figura 2). No entanto, o resultado das medidas de distância de Mahalanobis (Tabela 2) e de Procrustes (Tabela 3) apontam uma separação entre as populações, sendo na maior parte das vezes sustentada por um p-valor significativo. É necessário reforçar que as premissas foram negligenciadas, dessa forma impossibilitando que os CVAs não possuam uma verdade estatística, todavia a estruturação dos dados, que são mais facilmente visualizados no CVA e por isso apresentamos este teste.

É possível observar a projeção de indivíduos nos escores positivos e negativos de cada variável canônica (CV1 e CV2). A projeção individual da população de Paraopeba-Mg é bastante sobreposta às demais populações, com a maior parte dos indivíduos nos escores positivos da CV1 (Figura 2).

### ***Análises citogenéticas***

O cariótipo de *P. helleri* foi  $2n=34$  cromossomos para as fêmeas e  $n=17$  para machos. Não foi encontrada variação numérica entre as populações estudadas em relação aos cromossomos do complemento A, nem mesmo entre as populações mais distantes geograficamente como Macarani (BA) e Cataguases (MG). Interessantemente, cromossomos B foram encontrados em 17, das 21 colônias amostradas. Metáfases com cromossomos B e metáfases sem cromossomos B foram identificadas num mesmo indivíduo. Além disso, uma variação numérica intraindividual de um a cinco cromossomos B foi constatada. Cromossomos B de tamanho e morfologia diferentes foram observados num mesmo indivíduo (Figura 3 e Tabela 2).

Os cromossomos do complemento A apresentaram heterocromatina nas regiões centromérica e pericentromérica não apresentando variação interpopulacional. As marcações positivas para fluorocromo DAPI coincidiram com as regiões de heterocromatina, mostrando que a heterocromatina é rica em pares de bases AT (Figura 4).

A coloração sequencial com fluorocromo revelou blocos positivos em CG ( $CMA_3^+$ ) na região eucromática dos cromossomos do complemento A. Além disso, os blocos  $CMA_3^+$  mostraram a ocorrência de distintos citótipos, com variação de intensidade e de número de cromossomos com regiões ricas em CG (Figura 2). O rDNA 18S também indicou a ocorrência de citótipos com sinais positivos do gene ribossomal presente em quatro, cinco, seis, sete e nove cromossomos (Figura 5 e 8).

O microssatélite  $GA_{(15)}$  apresentou sinais positivos nas regiões eucromáticas no braço longo em todos os cromossomos. Esse microssatélite gerou sinais homogêneos na maioria dos cariótipos, sendo que a variação da intensidade de sinal foi observada em

alguns cariótipos. O microssatélite GA<sub>(15)</sub> não apresentou sinais positivos nos cromossomos B (Figura 6).

O microssatélite TTAGG<sub>(6)</sub> resultou sinais positivos nos telômeros dos cromossomos, contudo o tamanho e intensidade dos sinais variaram entre as porções teloméricas terminais dos cromossomos. Os cromossomos B apresentaram sinais positivos desse microssatélite. Não foram detectados sinais teloméricos intersticiais (Figura 7).

### *Citometria de imagem*

Cromossomos estequiometricamente corados foram obtidos nas lâminas hidrolisadas com solução 5 M de HCl por 18 min a 25°C e coradas com reativo de Schiff durante 12 h a 4°C (Figura 6). Os cromossomos apresentaram as porções teloméricas e centroméricas bem definidas, pré-requisitos para caracterização morfométrica e mensuramento dos valores de área, DO e, conseqüentemente, de DOI.

Todos os kariogramas mostraram 2n=34 cromossomos e até cinco cromossomos B foram detectados. Valores médios de DOI (Tabela 2) dos cromossomos do complemento A variaram de 0,672 (cromossomo 1) a 0,388 (cromossomo 17). O valor médio de DOI do cromossomo 4 (0,548) foi menor do que os valores médios dos cromossomos 5 e 6 (0,453 e 0,484), assim como do cromossomo 8 (0,432) foi menor em relação ao do cromossomo 9 (0,452). O cromossomo 15 mostrou um valor médio da DOI (0,419) maior comparado os cromossomos 14 (0,392).

Quatro cromossomos B foram detectados em Carangola (MG) e os valores médios de DOI para estes cromossomos variaram de 0,28 a 0,11. cromossomos com DOI de 0,22, 0,18 e 0,16 foram encontrados em mais de uma metáfase nessa população. As metáfases obtidas dos indivíduos da população de Viçosa apresentaram um cromossomo B. Para

todos os cromossomos, os valores de DOI variaram de 0,28 a 0,01, evidenciando diferenças entre os cromossomos B. A variação de DOI dos cromossomos B de Linhares (ES) foi de 0,33 a 0,14 e de Santa Teresa (ES) foi de 0,08 a 0,15. Um cromossomo B com DOI de 0,28 esteve presente no cariótipo das três populações (Carangola-MG, Viçosa-MG, Santa Teresa-ES) (Tabela 3).

Baseado nos dados morfométricos e na citometria de imagem, o cariótipo de *P. helleri* foi recém delineado e os cariogramas puderam ser reunidos (Figura 8).

## **Discussão**

### ***Variação morfológica***

*Partamona helleri* apresenta polimorfismo das asas anteriores direita das operárias adultas que pode ser explicada pela projeção de indivíduos nos scores positivo e negativo dos eixos das variáveis canônicas. Essas diferenças de projeções individuais indicam variabilidade morfométrica da asa de *P. helleri*, porém não houve uma discriminação completa entre as populações. Uma possível explicação para a ausência de variação morfológica de acordo com a localidade geográfica pode ser associada a fatores ecológicos/ambientais, uma vez que não foram encontradas alterações das condições ambientais que pudessem representar pressões seletivas determinantes da variabilidade fenotípica. Embora não tenha sido encontrada variação ambiental que pudesse modular o polimorfismo na asa de *P. helleri*, uma modulação da dinâmica populacional, possivelmente influenciada por diferenças ambientais, têm sido relatadas para outras abelhas sem ferrão, como *Melipona beecheii* (Francoy *et al.*, 2011), *Tetragonula iridipenis* (Francoy *et al.*, 2016) e *Plebeia remota* (Francisco *et al.*, 2008). Em outros insetos, como mosquitos, o desmatamento e a urbanização também têm provocado variação na forma das asas (Wilk-da-Silva *et al.*, 2018; Multini *et al.*, 2019).

Não observamos estruturação morfológica dos indivíduos da população de Paraopeba-MG que foram relatados como tendo hábitos de nidificação diferentes do considerado comum da espécie (Camargo e Pedro, 2003). Assim, sugerimos que a escolha de um substrato diferente para construção dos ninhos possa estar relacionada à disponibilidade de recursos ambientais e não esteja relacionado a uma possível espécie nova ou classificação incorreta de *P. helleri*. Até o momento, este trabalho é o primeiro estudo populacional de *P. helleri* utilizando marcadores morfológicos.

### ***Diversidade cariotípica***

Este foi o primeiro estudo de citogenética populacional de *P. helleri* e as populações amostradas, inclusive as geograficamente distintas, têm número cromossômico idêntico ( $2n=34$  para fêmeas e  $n=17$  para machos), evidenciando uma estabilidade numérica do cromossomo no cariótipo da espécie referente ao complemento A. Entretanto, como relatado por Brito *et al.* (2005), existe variação interpopulacional em relação à estrutura e organização dos cromossomos, com destaque as regiões ricas em pares de bases CG e ao rDNA18S.

A coloração sequencial com fluorocromo ( $CMA_3^+$ ) e o rDNA 18S indicaram a ocorrência de 11 citótipos distintos em *P. helleri*. Esses citótipos foram peculiares de cada localidade geográfica amostrada, exceto para os citótipos 1 e 5 que foram encontrados em duas localidades (Cataguases-MG e Santa Teresa; Itarana e Macarani, respectivamente). Os citótipos 10 e 11 revelaram o mesmo número de cromossomos com blocos  $CMA_3^+$  e sinais do rDNA 18S (6 e 9 cromossomos, respectivamente). A coincidência de blocos  $CMA_3^+$  com rDNA 18S em *P. helleri* também foi relatada por Brito *et al.* (2005). Contudo, os citótipos descritos por esses mesmos autores revelaram a coincidência de 8 cromossomos com essas duas marcações ( $CMA_3^+$  e rDNA18S), o que difere dos

resultados apresentados nesse estudo. As variações encontradas nesse estudo foram resultado de uma caracterização mais sistemática do cariótipo de *P. helleri*, abrangendo localidades distintas de sua distribuição geográfica. Assim, reforçamos a importância de uma abordagem mais ampla para uma compreensão mais conclusiva da evolução dos cromossomos da espécie.

Brito *et al.* (2005) encontraram uma variação interpopulacional de seis e oito cromossomos carreando o rDNA 18S, enquanto nós encontramos de quatro a nove cromossomos com sinais positivos dessa sequência repetitiva. A variação numérica de cromossomos com rDNA em uma espécie pode ser atribuída ao crossing-over desigual (Eickbush & Eickbush, 2007) ou à inserção de elementos transponíveis dentro dos genes de rRNA (Zhang *et al.*, 2008; Cioffi *et al.*, 2010b).

A FISH foi utilizada para detectar sequências repetitivas de DNA, como as GA<sub>(15)</sub> e TTAGG<sub>(6)</sub>, no cariótipo de *P. helleri*. A diferença de tamanho dos sinais do microssatélite GA<sub>(15)</sub> nos cariótipos encontrados em Cataguases, Santa Teresa, Antônio Prado de Minas e Macarani sugere uma trajetória distinta de expansão e acumulação dessa sequência nesses cariótipos. A ausência do microssatélite GA<sub>(15)</sub> nos cromossomos B indica que essa sequência repetitiva não tem desempenhado função na diferenciação desses cromossomos em *P. helleri*. No gafanhoto *Abracris flavolineata* porém, o microssatélite GA<sub>(15)</sub> apresentou sinais positivos no cromossomo B, e o acúmulo desse microssatélite no cromossomo B pode estar envolvido no processo de diferenciação desses cromossomos na espécie (Milani e Cabral-de-Melo, 2014).

O microssatélite TTAGG<sub>(6)</sub> hibridizou nas porções terminais dos cromossomos de *P. helleri* revelando a composição das porções teloméricas dos cromossomos dessa espécie. Esse microssatélite também hibridizou nas porções teloméricas dos cromossomos B. As variações de intensidade e sinais desse microssatélite nos

cromossomos de *P. helleri* são similares às encontradas por Pereira *et al.* (2018) na formiga *Acromyrmex striatus*. Segundo esses mesmos autores, essas diferenças podem indicar dois processos, sendo eles a diferença no número de repetições teloméricas que compreendem os cromossomos e/ou o comprometimento da hibridização da sonda como resultado das limitações do protocolo. Em *P. helleri* as variações do microsatélite TTAGG<sub>(6)</sub> podem ser consequência do número de repetições dessa sequência nas porções teloméricas dos cromossomos.

Os cromossomos classificados como 6 e 15 apresentaram valores médios de DOI maiores que os cromossomo 5 e 14, respectivamente. Essa diferença pode estar relacionada às regiões heterocromáticas, evidenciadas pela Banca C e pela coloração DAPI nos cromossomos 6 e 15. Os cromossomos que possuem uma maior proporção de heterocromatina atingem níveis de compactação maiores do que os outros e apresentam mais DNA em relação aos cromossomos com maior proporção de regiões eucromáticas (Silva *et al.*, 2018).

Diferentes valores de DOI foram mensurados para os cromossomos B de *P. helleri*, indicando que esses cromossomos são distintos em relação ao conteúdo de DNA. Houve variação de DOI dos cromossomos B entre populações, entre indivíduos e entre metáfases relevando diferenciação desses cromossomos na espécie. Assim, os dados obtidos por meio da citometria de imagem ampliam e corroboram com os resultados evidenciados pela citogenética clássica e molecular. Diferentes cromossomos B também foram encontrados por Martins *et al.* (2014) que caracterizaram os cromossomos de acordo com a variação numérica (7 cromossomos B por indivíduo), tamanho e estrutura (banda C e composição molecular da heterocromatina). Entretanto, nesse estudo a diversidade de cromossomos B foi revelada pela citometria de imagem, em virtude da

ocorrência de cromossomos pequenos, morfologicamente similares e difíceis de serem distinguidos por essas características (tamanho e morfologia).

Dois cromossomos B foram observados no cariótipo do citótipo 2 (Viçosa-MG), com tamanho e morfologia semelhantes a outros dois cromossomos B (B1 e B2) caracterizados previamente nos cariótipos dessa mesma localidade (Costa *et al.*, 1992). As semelhanças dos cromossomos B, encontrados nesse estudo, com os cromossomos B (B1 e B2) já relatados para *P. helleri* podem sugerir uma fixação desses dois cromossomos nesta população.

O número máximo de cromossomos B encontrados foi de cinco cromossomos por metáfase e por indivíduo. Esse número máximo foi observado em colônias de Santa Teresa, as quais haviam sido relatadas com até dois cromossomos B (Martins *et al.*, 2014). Existe um modelo de equilíbrio para explicar a presença de mecanismos de acumulação dos cromossomos B e seus possíveis efeitos sobre o fitness do hospedeiro – o modelo parasitário. Esse modelo propõe que o equilíbrio é alcançado pela interação entre os mecanismos de acumulação e os efeitos prejudiciais nos indivíduos portadores do cromossomo B (Nur, 1966). Sendo assim, a diferença do número de cromossomos B encontrados nos cariótipos da localidade de Santa Teresa (ES) pode sugerir que esses cromossomos não têm um efeito deletério para a população e para a espécie, e por isso o número deles esteja aumentando.

Nossa abordagem cariotípica forneceu novos dados valiosos sobre a organização de sequências repetitivas em genomas de abelhas, incluindo o complemento A e os cromossomos B. Esses marcadores citogenéticos revelam uma diversidade cariotípica em *P. helleri* representando rearranjos que podem ter papel na evolução e divergência da espécie. Assim, a caracterização da composição da cromatina dos cromossomos da espécie é importante em análises sistemáticas e evolutivas.

## Referências Bibliográficas

- Beukeboom, L. W. 1994. Bewildering Bs: an impression of the 1st B-Chromosome Conference. *Heredity*, 73: 328-336.
- Brito, R. M.; Costa, M. A. and Pompolo, S. G. 1997. Characterization and distribution of supernumerary chromosomes in 23 colonies of *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Brazilian Journal of Genetic*, 20:185-188.
- Brito, R. M.; Pompolo, S. G.; Magalhães, M. F.M.; Barros, E.G. and Sakamoto-Hojo, E.T. 2005. Cytogenetic characterization of two *Partamona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) by fluorochrome staining and localization of 18 S rDNA clusters by FISH. *Cytologia*, 70: 373-380.
- Camacho, J. P.; Sharbel, T. F. & Beukeboom, L. W. 2000. B-chromosome Evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society London*, 355: 163-178
- Camargo, J. M. F. & Pedro, S. R. M. 2003. Meliponini neotropicais: o gênero *Partamona* Schwarz, 1939 (Hymenoptera, Apidae, Apinae) - bionomia e biogeografia. *Revista Brasileira de Entomologia*, 47: 311-372.
- Carvalho, C. R.; Clarindo, W. R. & Abreu, I.S. 2011. Image cytometry: nuclear and chromosomal DNA quantification. In: Chiarini-Garcia H, Melo RCN, editors. *Light microscopy: methods and protocols*. New York: Humana Pres;., pp. 51–68.
- Cioffi, M. B., Kejnovsky, E. & Bertollo, L. A. C. 2010a. The Chromosomal Distribution of Microsatellite Repeats in the Genome of the Wolf Fish *Hoplias malabaricus*, Focusing on the Sex Chromosomes. *Cytogenetic and Genome Research*: 132: 289-296.
- Cioffi, M. B.; Martins, C. & Bertollo, L. A. C. 2010b. Chromosome spreading of associated transposable elements and ribosomal DNA in the fish *Erythrinus erythrinus*. Implications for genome change and karyoevolution in fish. *BMC Evolutionary Biology*, 10: 271.
- Costa, M. A.; Pompolo, S. G. and Campos, L. A. O. 1992. Supernumerary chromosomes in *Partamona cupira* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Revista Brasileira de Genética*, 15:801-806.

- Correia, A. M.; Fernandes, A.; Campos, L. A. O. & Lopes, D. M. 2014. Análise da presença do marcador SCAR associado ao cromossomo B em espécies de abelha sem ferrão do gênero *Partamona*. *Revista Brasileira de Biociências*, 4: 196-200.
- Francisco, F. O.; Nunes-Silva, P.; Franco, T. M.; Wittmann, D.; Imperatriz-Fonseca, V. L. Arias, M. C. & Morgan, E. D. 2008. Morphometrical, biochemical and molecular tools for assessing biodiversity. An example in *Plebeia remota* (Holmberg, 1903) (Apidae, Meliponini). *Insectes Sociaux*, 55: 231-237.
- Franco, T. M.; Grassi, M. L.; Imperatriz-Fonseca, V. L.; MAY-ITZÁ, W. J. & QUEZADA-EUÁN, J. J. G. 2011. Geometric morphometrics of the wing as a tool for assigning genetic lineages and geographic origin to *Melipona beecheii* (Hymenoptera: Meliponini). *Apidologie*, 42: 499–507.
- Franco, T. M.; Bonatti, V.; Viraktamath, S. & Rajankar, B. R. 2016. Wing morphometrics indicates the existence of two distinct phenotypic clusters within population of *Tetragonula iridipennis* (Apidae: Meliponini) from India. *Insectes Sociaux*, 63: 109-115.
- Imai, H. T.; Taylor, R. W.; Crosland, M. W. & Crozier, R. H. 1988. Modes of spontaneous chromosomal mutation and karyotype evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis. *Japanese Journal of Genetic* 63: 159–185.
- Jackson, R. C. & Newmark, P. 1960. Effects of supernumerary chromosomes on production of pigment in *Haplopappus gracilis*. *Science*, 132: 1316-1317.
- Klingenberg, C. P. 2011. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources*, 11: 353-357.
- Machado, D. P.; Miranda, E. A.; Dessi, M. C.; Sabadini, C. P. & Del Lama, M. A. 2016. Occurrence and origin of supernumerary chromosomes in *Partamona* (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Cytogenetic and Genome Research*, 1-8.
- Martins, C. C. C.; Duarte, O. M. P.; Waldschmidt, A.M.; Alves, R. M. O. and Costa, M. A. 2009. New occurrence of B chromosomes in *Partamona helleri* (Friese, 1900) (Hymenoptera, Meliponini). *Genetic and Molecular Biology*, 32:782–785.
- Martins, C. C. C.; Diniz, D.; Sobrinho-Scudeler, P. E.; Foresti, F.; Campos, L. A. O. and Costa, M. A. 2013. Investigation of *Partamona helleri* (Apidae, Meliponini) B chromosome origin. An approach by microdissection and whole chromosome painting. *Apidologie*, 44:75–81

- Martins, C. C. C.; Waldschmidt, A. M. and Costa, M. A. 2014. Unprecedented record of ten novel B chromosomes in the stingless bee *Partamona helleri* (Apidae, Meliponini). *Apidologie*, 45:431–439.
- McAllister, B. F. & Werren, J. H. 1997. Hybrid origin of a B chromosome (PSR) in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. *Chromosoma*, 106: 243–253.
- Milani, D. & Cabral-de-Melo, D. C. 2014. Microsatellite Organization in the Grasshopper *Abracris flavolineata* (Orthoptera: Acrididae) Revealed by FISH Mapping: Remarkable Spreading in the A and B Chromosomes. *Plos One*, 9: 1-6.
- Mitteroecker, P. & Bookstein. 2011. Linear discrimination, ordination, and the visualization of selection gradients in modern morphometric. *Evolutionary Biology*, 38: 100-114.
- Multini, L. C.; Wilke, A. B. & Marrelli, M. T. 2019. Urbanization as a driver for temporal wing-shape variation in *Anopheles cruzii* (Diptera: Culicidae). *Acta Tropica*, 190: 30-36.
- Nur, U. 1966. Harmful B chromosomes in a mealy bug population. *Genetics* 54: 1225-1238.
- Pedro, S. R. M. & Camargo, J. M. F. 2003. Meliponini neotropicais: o gênero *Partamona* Schwarz, 1939 (Hymenoptera, Apidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, 47: 1-117.
- Pereira, T. T. P.; Reis, A. C. C. C.; Cardoso, D. C.; Cristiano, M. P. 2018. Molecular phylogenetic reconstruction and localization of the (TTAGG)<sub>n</sub> telomeric repeats in the chromosomes of *Acromyrmex striatus* (Roger, 1863) suggests a lower ancestral karyotype for leafcutter ants (Hymenoptera). *Comparative Cytogenetics*, 12: 13-21.
- Pinkel, D.; Straume, T. & Gray, J. W. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83: 2934-2938.
- Rohlf F.J. (2006) tpsDig, version 2.10, Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook.
- Schweizer, D. 1980. Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA-DAPI bands) in human chromosomes. *Cytogenetics Cell Genet*, 27: 190–193.
- Silva, J. C.; Carvalho, C. R. & Clarindo, W. R. 2018. Updating the maize karyotype by chromosome DNA sizing. *Plos One*: 1-13.

- Sumner, A. T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*, 75: 304–306.
- Tarelho ZVS (1973) Contribuição ao estudo citogenético dos Apoidea. Dissertation, Universidade de São Paulo.
- Tavares, M. G.; Lopes, D. M. & Campos, L. A. O. 2017. An overview of cytogenetics of the tribe Meliponini (Hymenoptera: Apidae). *Genetica*, 145: 241-258.
- Tosta, V. C.; Fernandes-Salomão, T. M.; Tavares, M. G.; Pompolo, S. G.; Barros, E. G. and Campos, L. A. O. 2004. A RAPD marker associated with B chromosomes in *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae). *Cytogenetic and Genome Research*, 106: 279-283.
- Tosta, V.C.; Tavares, M.G.; Fernandes-Salomão, T. M.; Barros, E. G.; Campos, L. A.O. and Camacho, J. P.M. 2007. Development of a SCAR marker for the analysis of B chromosome presence in *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae). *Cytogenetic and Genome Research*, 116:127–129.
- Tosta, V. C.; Marthe, J. B.; Tavares, M. G.; Fernandes-Salomão, T. M; Pompolo, S. G.; Recco-Pimentel, S. M.; Perfectti, F.; Campos, L. A. O. and Camacho, J. P. M. 2014. Possible Introgression of B Chromosomes between Bee Species (Genus *Partamona*). *Cytogenetic and Genome Research*, 144:217–223.
- Viscosi, V. & Cardini, A. 2011. Leaf Morphology, Taxonomy and Geometric Morphometrics: A Simplified Protocol for Beginners. *PLoS ONE* 6(10).
- Wilk-da-Silva, R.; Diniz, M. M. C. S. L. & Marrelli, M. T. 2018. Wing morphometric variability in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from different urban built environment. *Parasites & Vectors*, 1-9.

Tabela 01: Populações de *Partamona helleri* utilizadas nas análises morfológicas e suas respectivas localidades.

Cidade	Coordenadas	Número de indivíduos analisados
Antônio Prado de Minas-MG	20°58'55.12" 42°09'47.49"	10

Bom Despacho-MG	19° 44' 11" 45° 15' 08"	10
Carangola-MG	20°39'59.71" 42°1'12.33"	20
Cataguases-MG	21°14'36.12" 42°43'57.40"	10
Governador Lindenberg-ES	19°17'18.5 040°30'08.4"	120
Itarana-ES	19°50'54.4" 040°53'13.5"	20
Linhares-ES	19°24'58.0" 040°04'31.8"	20
Natividade-RJ	21°2'32.65" 41°58'16.94"	10
Paraopeba-MG	19° 16' 28" 44° 24' 15"	20
Ponte Nova	20° 24' 59" 42° 54' 31"	10
Porciúncula-RJ	20°59'16.45' 42°6'8.23"	10
Santa Teresa-ES	19°57'13.0" 040°36'18.2"	80
Viçosa-MG	21°14'36.12" 42°43'57.40"	50

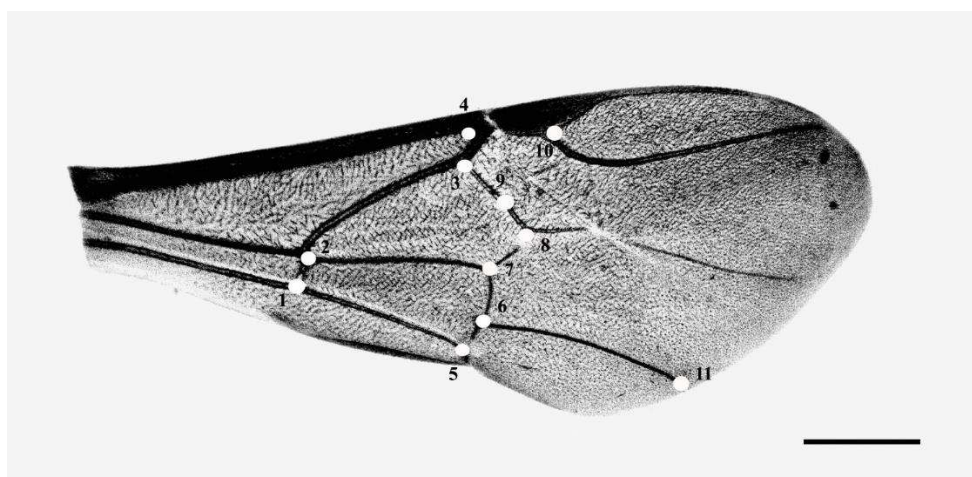


Figura 1: Asa anterior direita de operárias adultas de *Partamona helleri*. Os círculos brancos representam os pontos anatômicos e os números indicam a ordem que os pontos anatômicos foram marcados. Barra: 1 mm.

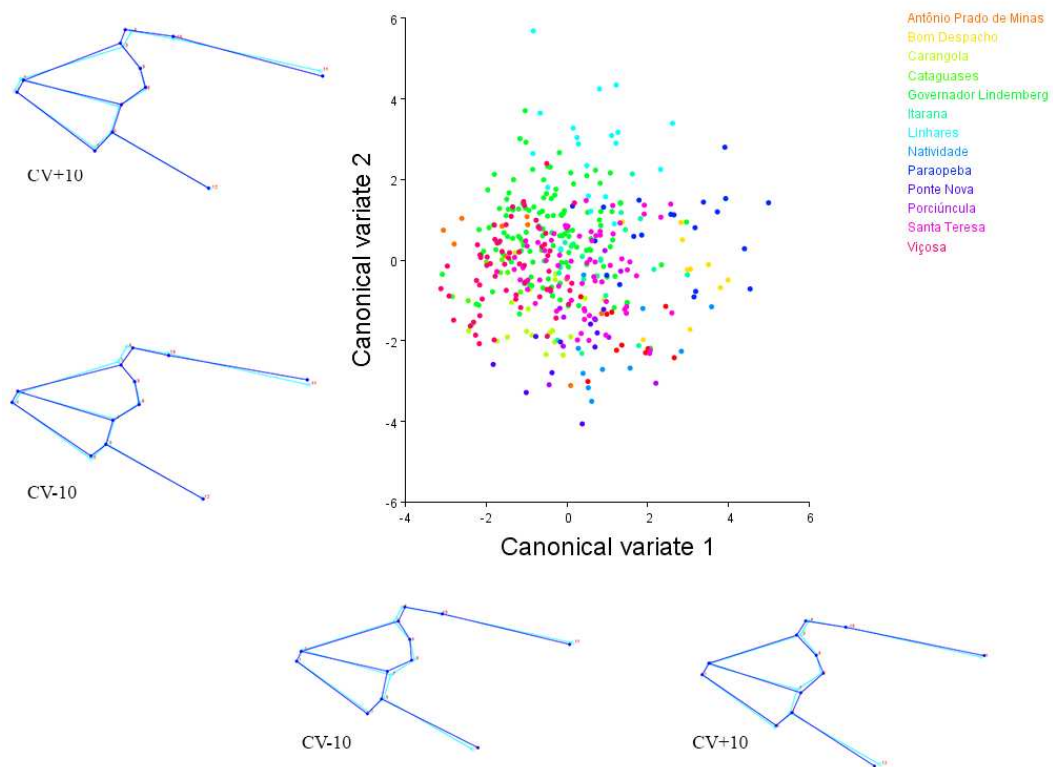


Figura 2: Gráfico dos escores das variáveis canônicas CV1 e CV2 da asa anterior direita de *P. helleri*. Os outlines em azul escuro representam as deformações das asas encontradas nas extremidades dos eixos CV1 (abaixo) e CV2 (na esquerda), já os outlines em azul claro representam a deformação média. Os valores abaixo dos outlines indicam os extremos das variações positiva e negativa para cada CV.

Tabela 2: Distâncias de Mahalanobis entre as espécies e seu p-valor para teste de permutação de 1000 réplicas. Resultado do CVA da asa anterior direita.

Distâncias de Mahalanobis													
	Antônio Prado	Bom Despacho	Carangola	Cataguases	Governador Lindemberg	Itarana	Linhares	Natividade	Paraopeba	Ponte Nova	Porciúncula	Santa Teresa	Viçosa
Antônio Prado de Minas	6,2054												
Bom Despacho	5,5213	6,5257											
Carangola	4,7718	3,9895	5,4769										
Cataguases	5,2804	4,3499	6,2722	3,8175									
Governador Lindemberg	5,1961	3,4107	5,2957	3,119	3,9524								
Itarana	5,7446	3,6186	5,7288	3,5731	4,9791	2,9056							
Linhares	6,6535	4,996	5,7177	4,6336	5,2543	3,6264	4,1766						
Natividade	6,8981	5,9989	6,8437	5,0108	6,6944	4,9699	4,2796	6,7105					
Paraopeba	5,1784	5,0585	4,3184	4,7151	5,3776	3,6684	3,3103	4,0889	5,1628				
Ponte Nova	6,2149	4,7672	5,897	3,8119	5,1968	4,1199	4,1771	6,027	4,9037	5,5328			
Porciúncula	5,3471	4,4883	5,3896	3,3056	4,9789	3,676	3,4155	5,1753	5,2131	4,5845	3,6063		
Santa Teresa	5,0229	3,8825	5,2169	2,7369	4,0187	2,3211	2,3669	3,4819	4,8142	3,2396	3,5006	2,7826	
Viçosa	5,4344	3,6056	5,5133	2,7756	3,2591	2,5588	3,5015	4,1647	5,3586	4,3861	4,3234	3,9439	2,6183
Valor-p para teste de permutação de 1000 réplicas													
	Antônio Prado	Bom Despacho	Carangola	Cataguases	Governador Lindemberg	Itarana	Linhares	Natividade	Paraopeba	Ponte Nova	Porciúncula	Santa Teresa	Viçosa
Antônio Prado de Minas		<.0001											
Bom Despacho		<.0001	<.0001										
Carangola		<.0001	<.0001	<.0001									
Cataguases		<.0001	<.0001	<.0001	<.0001								
Governador Lindemberg		<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001							
Itarana		<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001						
Linhares		<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001					
Natividade		<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001				

Paraopeba	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001		
Ponte Nova	<.0001	<.0001	0,0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	
Porciúncula	<.0001	0,0002	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0,0001	<.0001	<.0001
Santa Teresa	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
Viçosa	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001

---

Tabela 3: Distâncias de Procrustes entre as espécies e seu p-valor para teste de permutação de 1000 réplicas. Resultado do CVA da da asa anterior direita

	Distâncias de Procrustes												
	Antônio Prado	Bom Despacho	Carangola	Cataguases	Governador Lindemberg	Itarana	Linhares	Natividade	Paraopeba	Ponte Nova	Porciúncula	Santa Teresa	Viçosa
Antônio Prado de Minas	0,0227												
Bom Despacho	0,02	0,0253											
Carangola	0,0201	0,0147	0,0189										
Cataguases	0,0235	0,0178	0,0247	0,012									
Governador Lindemberg	0,0183	0,015	0,0147	0,0114	0,0194								
Itarana	0,019	0,0142	0,018	0,0122	0,02	0,0087							
Linhares	0,0229	0,0223	0,0176	0,0165	0,0221	0,0126	0,0158						
Natividade	0,0189	0,0191	0,0223	0,0141	0,0197	0,0154	0,012	0,0205					
Paraopeba	0,0184	0,0238	0,0136	0,0175	0,0232	0,0137	0,0128	0,0151	0,0155				
Ponte Nova	0,0234	0,0199	0,0209	0,0153	0,018	0,0161	0,0172	0,0218	0,0183	0,0218			
Porciúncula	0,0201	0,0199	0,0169	0,0158	0,0198	0,0153	0,0133	0,0213	0,0165	0,0156	0,0151		
Santa Teresa	0,0183	0,0178	0,0157	0,0106	0,0168	0,0096	0,0085	0,0136	0,0124	0,0107	0,0134	0,0108	
Viçosa	0,0204	0,0144	0,0198	0,0081	0,0129	0,0126	0,0113	0,0181	0,014	0,0167	0,017	0,0137	0,01
Valor-p para teste de permutação de 1000 réplicas													
	Antônio Prado	Bom Despacho	Carangola	Cataguases	Governador Lindemberg	Itarana	Linhares	Natividade	Paraopeba	Ponte Nova	Porciúncula	Santa Teresa	Viçosa
Antônio Prado de Minas		<.0001											
Bom Despacho		<.0001	<.0001										
Carangola		<.0001	0,0001	<.0001									
Cataguases		<.0001	<.0001	<.0001	0,0004								
Governador Lindemberg		<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001							
Itarana		<.0001	0,0005	<.0001	<.0001	<.0001	0,0001						
Linhares		<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001					
Natividade		<.0001	0,0006	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0,0002	<.0001				

Paraopeba	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0,0002			
Ponte Nova	<.0001	0,0001	0,0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001		
Porciúncula	<.0001	0,0007	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0,0001	<.0001	0,0001	<.0001	0,0001	
Santa Teresa	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0,0003	<.0001	<.0001	<.0001	0,0001	0,0006
Viçosa	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001

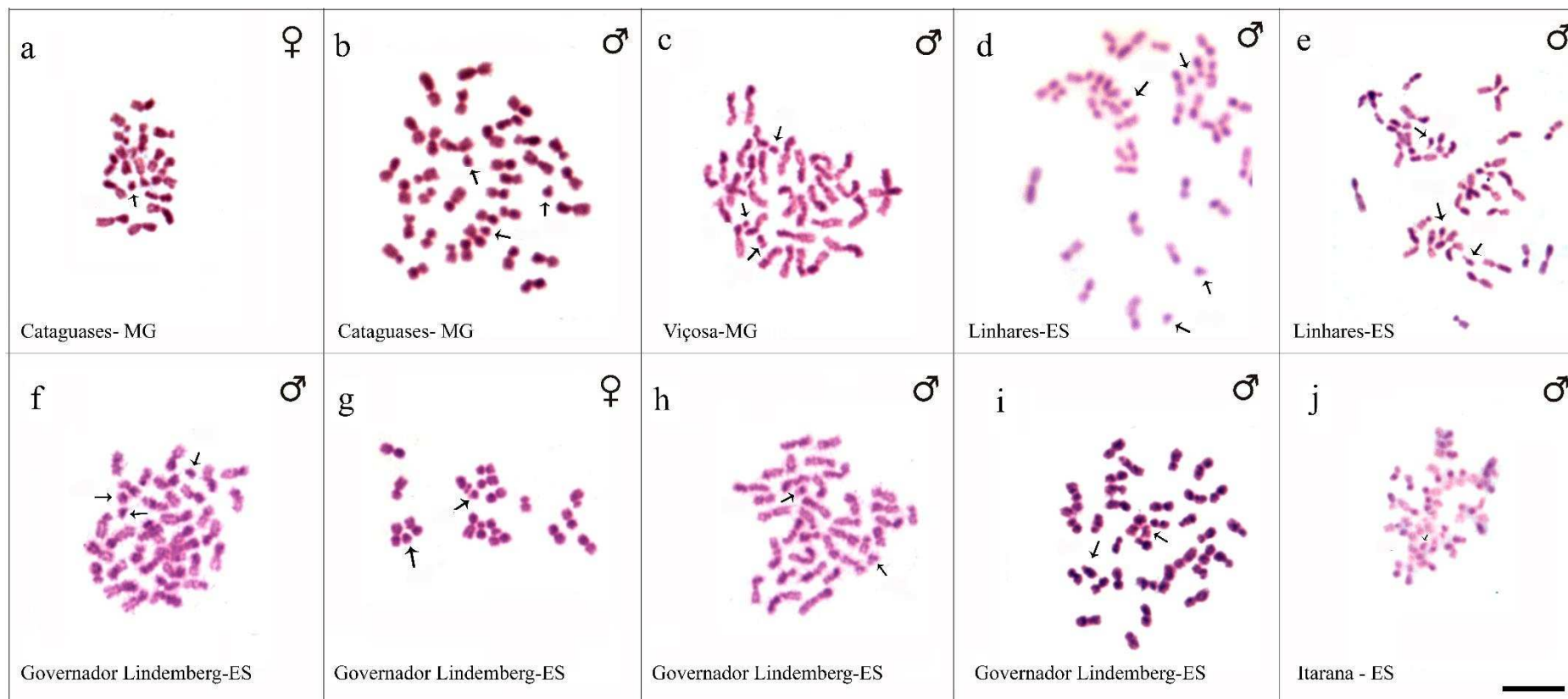


Figura 3: Cromossomos de *P. helleri* de acordo com as localidades de coleta. As setas indicam os cromossomos B. Barra: 5µm.

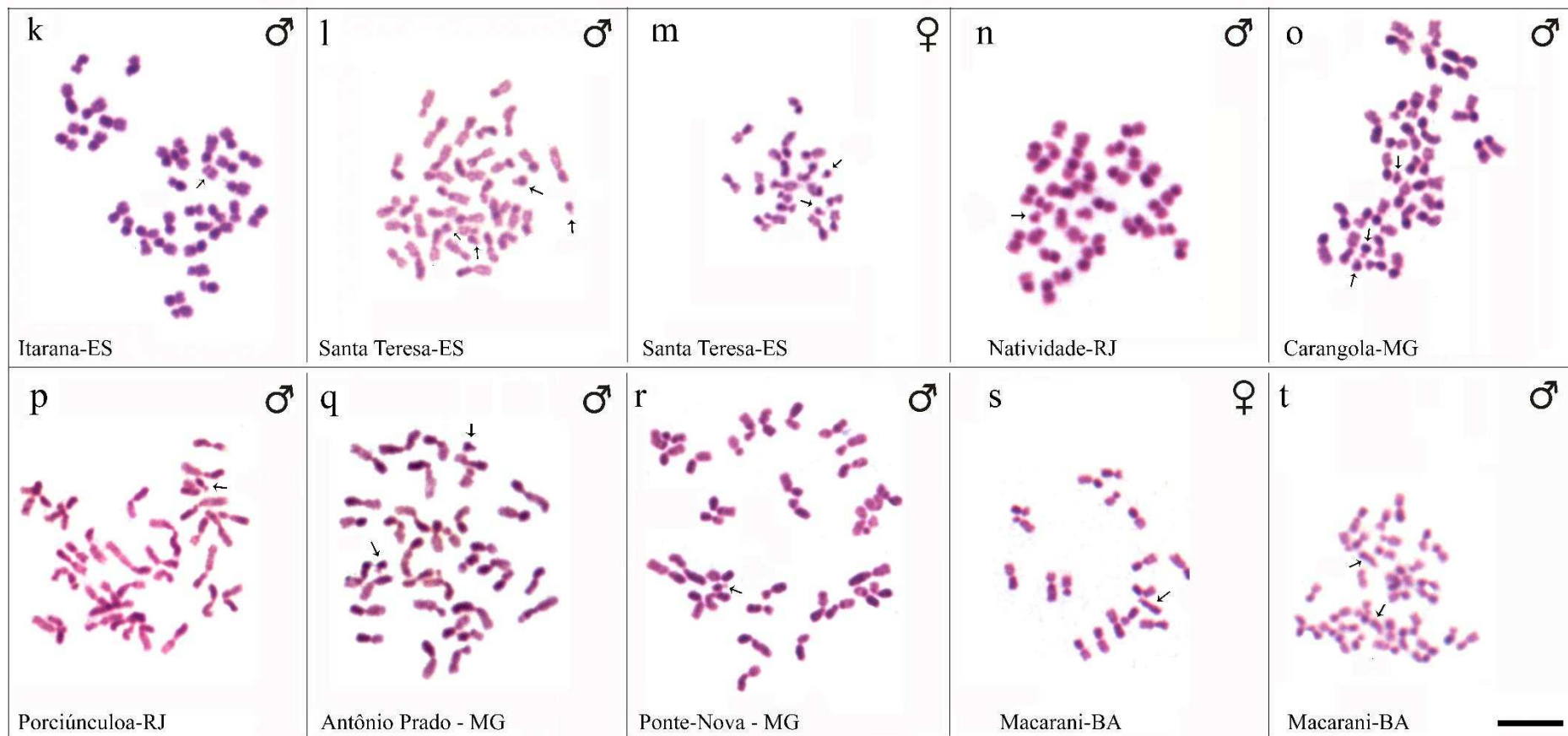


Figura 3 continuação: k) Cromossomos de *P. helleri* de acordo com as localidades de coleta. As setas indicam os cromossomos B. Barra: 5µm.

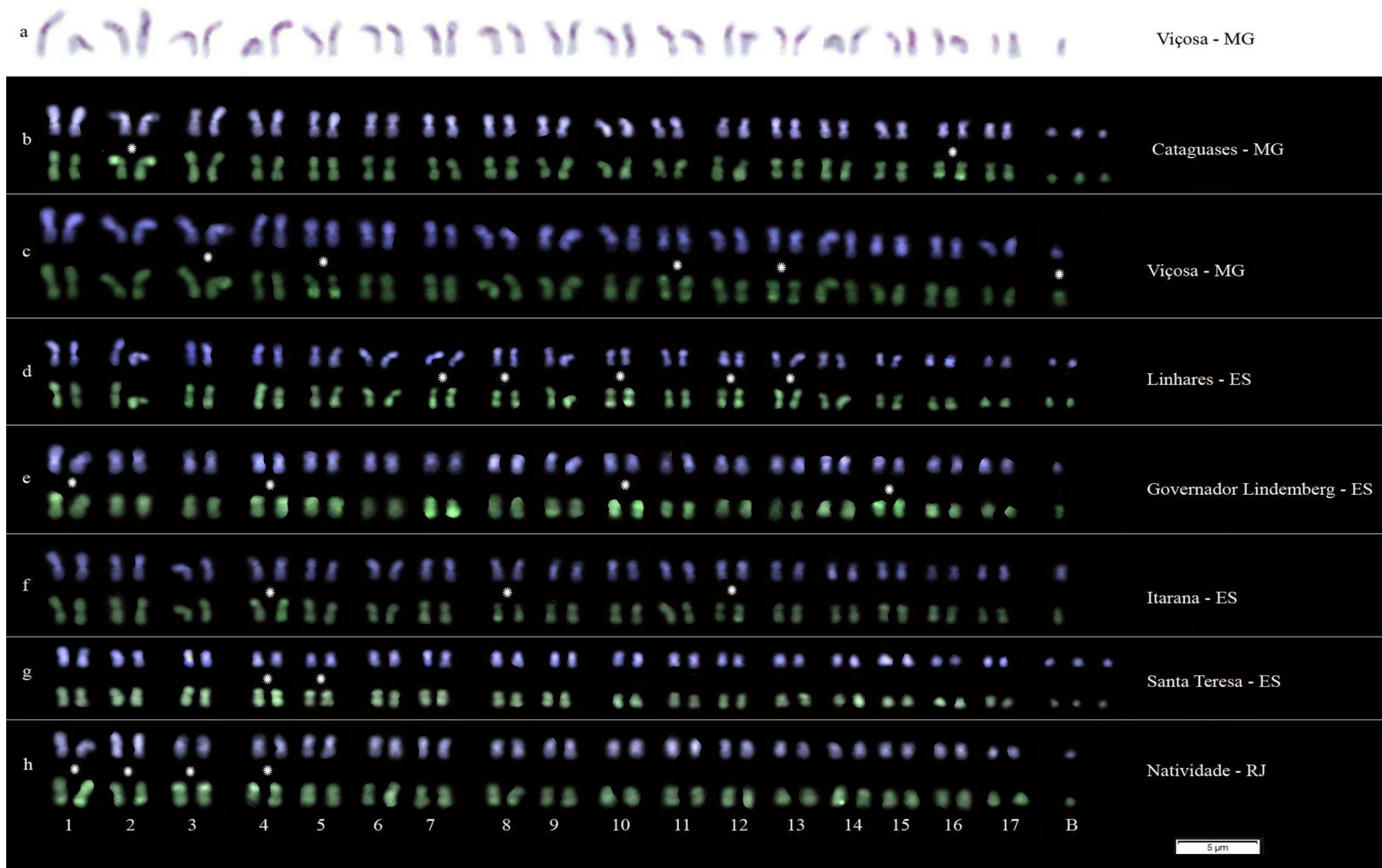


Figura 4: a) Cariótipo de *P. helleri* submetido a banda C. b-h) Fluorocromos DAPI em azul e CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> em verde. Os asteriscos indicam os sinais positivos.

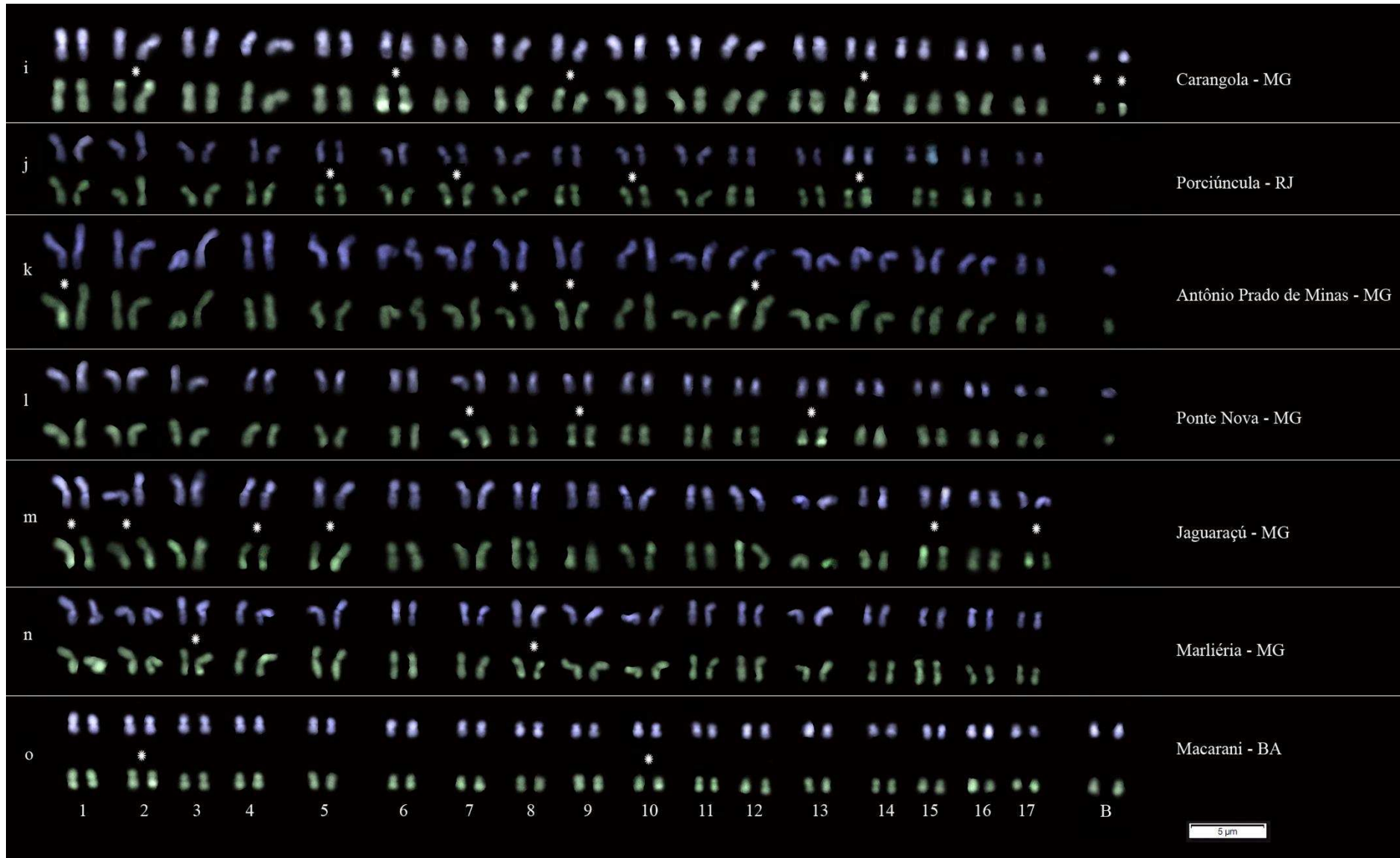


Figura 4 continuação: Cariótipo de *P. helleri* de acordo com as localidades de coleta. Fluorocromos DAPI em azul e CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> em verde. Os asteriscos indicam os sinais positivos.

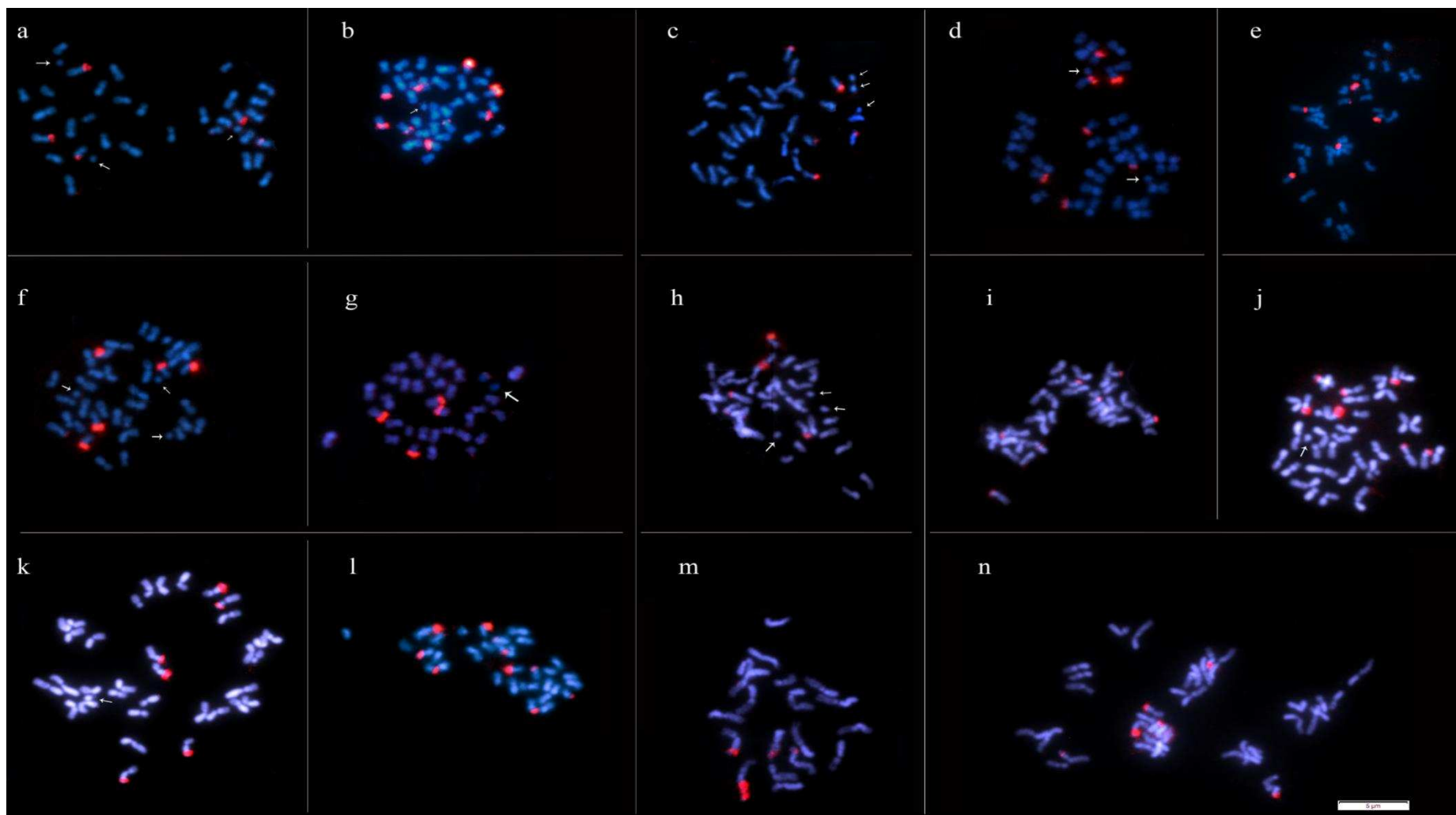


Figura 5: FISH do rDNA 18S nas metáfases de *P. helleri*. Em azul, cromossomos corados com DAPI e em vermelho o rDNA 18S. Setas indicam os cromossomos B. a) Cataguases-MG; b) Viçosa-MG; c) Linhares-ES; d) Governador Lindenberg-ES; e) Itarana-ES; f) Santa Teresa-ES; g) Natividade-RJ; h) Carangola-MG; i) Porciúncula-RJ; j) Antônio Prado de Minas-MG; k) Ponte Nova-MG; l) Jaguará-MG; m,n) Macarani-BA. (m) Macho, os demais cariótipos são referentes às fêmeas.

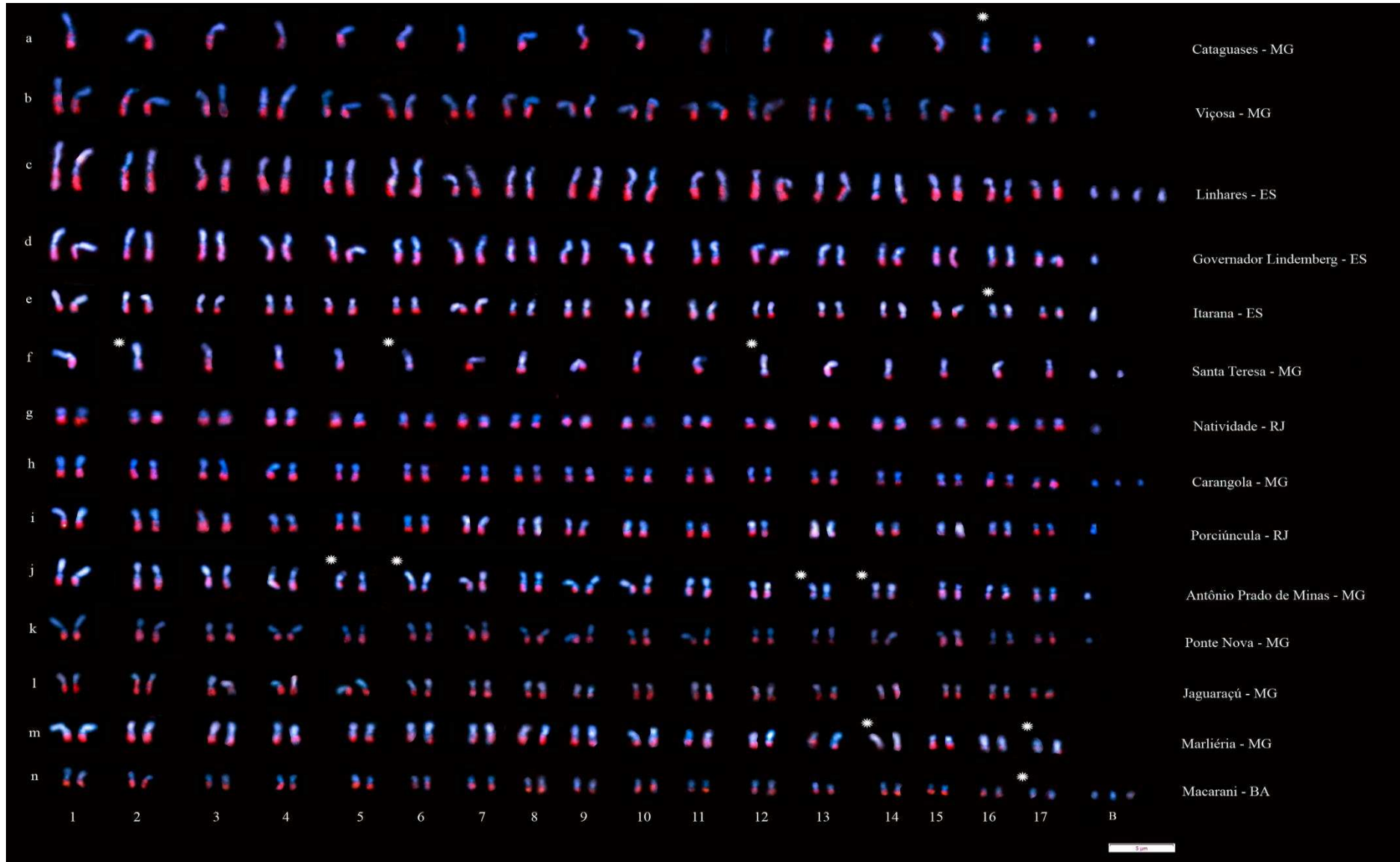


Figura 6: Cariogramas de *P. helleri* com sinais positivos do microssatélite GA<sub>(15)</sub>. Em azul os cromossomos corados com DAPI e em vermelho as marcações do microssatélite GA<sub>(15)</sub>. (a, f) Machos, (b, c, d, e, g, h, i, j, k, l, m, n) fêmeas. Os asteriscos indicam as variações encontradas.

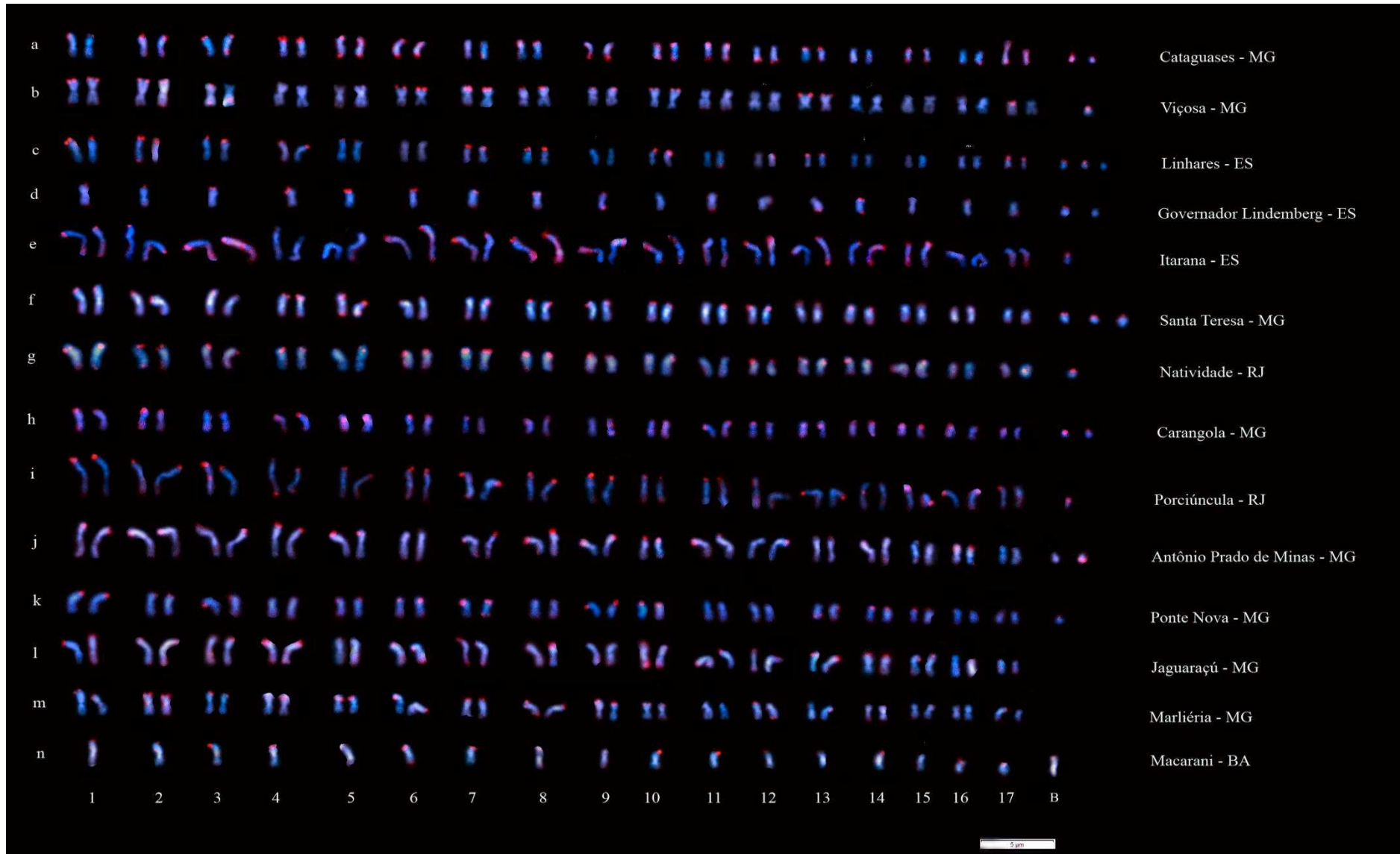


Figura 7: Cariogramas de *P. helleri* com sinais positivos do microssatélite TTAGG<sub>(6)</sub>. Em azul os cromossomos corados com DAPI e em vermelho as marcações do microssatélite TTAGG<sub>(6)</sub>. (d e n) Machos, (a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m) fêmeas.



Figura 8: Cariogramas de *P. helleri*. Os cromossomos estão estequiometricamente corados e possuem as porções teloméricas e centroméricas bem definidas, pré-requisitos para o mensuramento dos valores de área, DO e DOI. Barra = 20 μm.

Tabela 4: Localidades amostradas, número de cromossomos B por localidade e dados cariotípicos de *P. helleri*.

Localidade	Coordenadas	Número de cromossomos B	Morfologia dos cromossomos B	CMA <sub>3</sub> <sup>+</sup> <sup>a</sup>	rDNA18S <sup>a</sup>	GA <sub>(15)</sub> <sup>b</sup>	TTAGG <sub>(6)</sub> <sup>b</sup>	Classificação
Cataguases – MG	21°14'36.12" 42°43'57.40"	Até 3 em fêmeas e 1 em macho	Telocêntrica	4	5	Cromossomo 16	Ambos os braços. *	Citótipo 1
Viçosa - MG	21°14'36.12" 42°43'57.40"	Até 3	Telocêntrica; submetacêntrica; acrocêntrica	6 *	9	Bloco uniforme em todos os cromossomos	Ambos os braços. *	Citótipo 2
Linhares - ES	19°24'58.0" 040°04'31.8"	Até 4	Telocêntrica e acrocêntrica	7	5	Bloco uniforme em todos os cromossomos	Ambos os braços. *	Citótipo 3
Governador Lindemberg - ES	19°17'18.5" 040°30'08.4"	Até 3 em fêmeas e até 2 em machos	telocêntrica	6	7	Bloco uniforme em todos os cromossomos	Ambos os braços. *	Citótipo 4
Itarana - ES	19°50'54.4" 040°53'13.5"	Até 2	Submetacêntrica	4	6	Bloco uniforme em todos os cromossomos	Ambos os braços. *	Citótipo 5
Santa Teresa - ES	19°57'13.0" 040°36'18.2"	2 Cromossomos no macho e 5 nas fêmeas	Telocêntrica e acrocêntrica	4	5	Cromossomos 2, 6 e 12	Ambos os braços. *	Citótipo 1
Natividade - RJ	21°2'32.65" 41°58'16.94"	1 Cromossomo	telocêntrica	7	4	Bloco uniforme em todos os cromossomos	Ambos os braços. *	Citótipo 6
Carangola - MG	20°39'59.71" 42°1'12.33"	Até 3	telocêntrica	7 *	6	Bloco uniforme em todos os cromossomos	Ambos os braços. *	Citótipo 7

Porciúncula - RJ	20°59'16.45' 42°6'8.23"	1 Cromossomo	telocêntrica	8	7	Bloco uniforme em todos os cromossomos	Ambos os braços. *	Citótipo 8
Antônio Prado de Minas - MG	20°58'55.12" 42°09'47.49"	Até 2	Telocêntrica	5	7	Pares 5, 6, 13 e 14	Ambos os braços. *	Citótipo 9
Ponte Nova - MG	20°25'08.56" 42°55'41.87"	1 Cromossomo	Telocêntrica	6	6	Bloco uniforme em todos os cromossomos	Ambos os braços. *	Citótipo 10
Jaguaraçu - MG	19°39'7.07" 42°42'57.59"	Sem cromossomo B	-	9	9	Bloco uniforme em todos os cromossomos	Ambos os braços.	Citótipo 11
Marliéria - MG	19°43'13.03" 42°44'9.24"	Sem cromossomo B	-	3	-	Pares 14 e 17	Ambos os braços.	-
Macarani - BA	15°49'22.0" 40°31'52.3"	1 nos machos e 2 nas fêmeas	Telocêntrica	4	4-macho; 6-fêmea	Par 17	Ambos os braços. *	Citótipo 5

<sup>a</sup> número de cromossomos do complemento A com sinais positivos.

\*cromossomo B com sinais positivos.

<sup>b</sup> variação de intensidade de sinal.

Tabela 5: Densidade óptica integrada (DOI) dos cromossomos metafásicos A e B de *P. helleri*.

Cromossomo	Cromossomo A <sup>a</sup>	Cromossomo B <sup>b</sup>			
		Carangola-MG	Viçosa-MG	Linhares-ES	Santa Teresa-ES
1	0,672 ± 0,0015	Metáfase 1	Metáfase 1	Metáfase 1	Metáfase 1
2	0,635 ± 0,0009	0,28	0,28	0,28	0,12
3	0,5506 ± 0,0015	0,27	Metáfase 2	0,22	0,08
4	0,548 ± 0,0067	0,22	0,20	0,21	0,08
5	0,453 ± 0,0003	0,18	Metáfase 3	0,14	Metáfase 2
6	0,484 ± 0,0044	Metáfase 2	0,05	0,15	0,15
7	0,437 ± 0,0021	0,22	Metáfase 4	Metáfase 2	0,13
8	0,432 ± 0,0005	0,21	0,01	0,20	
9	0,452 ± 0,0004	0,14	Metáfase 5	0,18	
10	0,448 ± 0,0011	0,15	0,15	0,16	
11	0,422 ± 0,0013	Metáfase 3	Metáfase 6	Metáfase 3	
12	0,418 ± 0,00007	0,18	0,25	0,32	
13	0,416 ± 0,0088	0,16	Metáfase 7	0,27	
14	0,392 ± 0,0125	Metáfase 4	0,31	0,25	
15	0,419 ± ,00007	0,18	Metáfase 8	Metáfase 4	
16	0,390 ± 0,00237	0,16	0,11	0,33	
17	0,388 ± 0,00006	Metáfase 5	Metáfase 9	0,18	
		0,13	0,18		
		0,11			

<sup>a</sup> Média dos valores de densidade óptica integrada (DOI) de cada cromossomo do complemento A obtida de 22 metáfases. ± desvio padrão

b DOI (densidade óptica integrada) dos cromossomos B individuais.

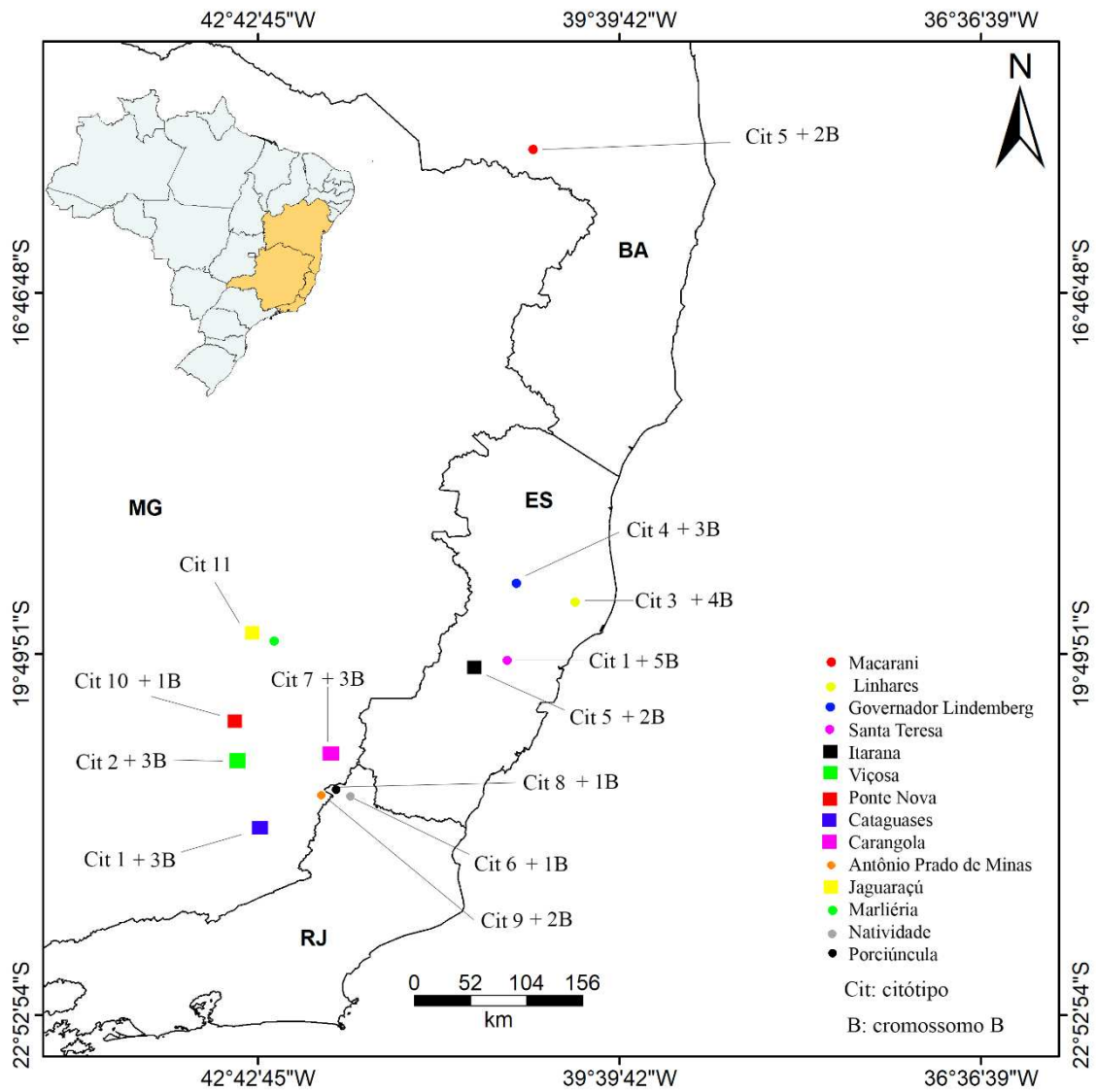


Figura 9: Mapa com distribuição dos citótipos encontrados em *P. helleri* de acordo com a localidade geográfica e distribuição dos cromossomos B.

## 6. CONCLUSÕES

- As espécies do gênero *Partamona* apresentam um número diploide conservado;
- Apesar da estabilidade numérica, os cromossomos das espécies de *Partamona* apresentam diferentes padrões de distribuição de DNA repetitivo que permitem separar o gênero em dois grupos;
- Os dois grupos não concordam com os grupos propostos na literatura, sugerindo que eles não sejam naturais;
- Os grupos baseados em marcadores citogenéticos e moleculares sugerem que as espécies de *Partamona* têm seguido caminhos evolutivos distintos;
- *P. cupira* e *P. ailyae* são distinguíveis pela morfologia da asa anterior direita das operárias adultas;
- *P. gregaria*, *P. chpadicola*, *P. auripennis*, *P. rustica* e *P. helleri* não apresentaram uma discriminação completa entre as espécies em relação à forma das asas, porém observou-se uma ligeira separação dessas espécies em dois grupos que vão de encontro à separação dos grupos definidos com base em marcadores citogenéticos e moleculares;
- Embora sutis, as asas anteriores direita das operárias adultas de *P. helleri* apresentam variações;
- Os indivíduos de Paraopeba-MG não apresentam diferenciação morfológica, apesar de apresentarem hábito de nidificação diferente do considerado comum de *P. helleri*;
- A ausência de variação morfológica dos indivíduos de Paraopeba-MG indica que essa população não seja uma espécie nova;
- A utilização de um substrato diferente do considerado comum da espécie pode estar relacionada à fatores ecológicos/ambientais como a disponibilidade de recursos para nidificação;
- *P. helleri* apresenta uma diversidade cariotípica dos cromossomos do complemento A, apresentando 11 citótipos;
- Os cromossomos B de *P. helleri* apresentam diferentes DOI indicando distintos conteúdos de DNA e evidenciando a diversidade desses cromossomos na espécie;