

PRISCILA MARCHIORO

**ANÁLISES CITOGENÉTICAS EM VESPAS DO GÊNERO *POLYBIA*
(*MYRAPETRA*) LEPELETIER, 1836 (VESPIDAE)**

Dissertação 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 *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2019

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

T

M317a
2019 Marchioro, Priscila, 1992-
Análises citogenéticas em vespas do gênero *Polybia* (*Myrapetra*) Lepeletier, 1836 (Vespidae) / Priscila Marchioro. –
Viçosa, MG, 2019.
v, 49 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Lucio Antonio de Oliveira Campos.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Vespas. 2. Microssatélites (Genética). 3. Cromossomos
B. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia
Geral. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e
Estrutural. II. Título.


CDD 22. ed. 595.798

PRISCILA MARCHIORO

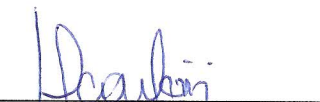
**ANÁLISES CITOGENÉTICAS EM VESPAS DO GÊNERO *POLYBIA*
(*MYRAPETRA*) LEPELETIER, 1836 (VESPIDAE)**

Dissertação 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 *Magister Scientiae*.

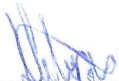
APROVADA: 15 de fevereiro de 2019.



Maykon Passos Cristiano



Danon Clemes Cardoso



Denilce Meneses Lopes
(Presidente)

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus por me manter forte nesses dois anos longe da minha família.

Aos meus pais José Marchioro e Salete Marchioro, minhas irmãs Bruna Marchioro e Bárbara Marchioro Gularte, e meu sobrinho Lucas Marchioro Gularte pela compreensão, pelo amor, apoio e incentivo para que eu pudesse realizar esse sonho.

Ao meu noivo Augusto Tessele pelo total apoio, confiança, amor, por sempre me ouvir e me ajudar e principalmente por sempre me incentivar.

Ao professor Lúcio Campos e a professora Denilce Meneses Lopes pela orientação, pelos conselhos e por toda a experiência que me passaram nesses dois anos.

Aos professores da pós-graduação em Biologia Celular da Universidade Federal de Viçosa, pelo conhecimento transmitido.

Ao professor Orlando Tobias Silveira pela identificação das vespas utilizadas neste estudo.

As amigas do laboratório, Marina Cunha, Natália Travenzoli, Camila Novaes, Jaqueline Amorim, Gisele Amaro e Alessandra Faustino por toda a ajuda nas coletas, no FISH, nas análises e nas correções. Obrigada pelo apoio, vocês sempre estarão no meu coração.

A todos os meus amigos de Palotina e Viçosa por compartilhar momentos bons e ruins, pelo apoio e conselhos.

A todas as pessoas que participaram direta e indiretamente para que eu pudesse realizar esse trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

MARCHIORO, Priscila, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2019. **Análises Citogenéticas em Vespas do gênero *Polybia* (*Myrapetra*) Lepeletier, 1836 (Vespidae)**. Orientador: Lucio Antônio de Oliveira Campos. Coorientadora: Denilce Meneses Lopes.

Polybia, com 58 espécies, é o gênero de vespa social mais numeroso da tribo Epiponini, e tem uma ampla distribuição na América do Sul. As espécies de *Polybia* são muito semelhantes entre si, e a coloração do corpo é muito variável, dificultando a identificação das espécies do gênero e causando problemas taxonômicos. A maioria dos estudos citogenéticos neste gênero se baseiam na descrição cariotípica de oito espécies. Assim, neste estudo descrevemos o cariótipo de *Polybia fastidiosuscula* com a presença de um cromossomo B relatado pela primeira vez na família Vespidae; apresentamos as diferenças e semelhanças de colônias de *Polybia* (gr. *occidentalis*), mostrando que a citogenética pode ser usada como ferramenta auxiliar na diferenciação das espécies do grupo ajudando na resolução dos problemas taxonômicos. Sugerimos que os indivíduos analisados neste estudo e classificados como *P.* (gr. *occidentalis*) pertencem a duas espécies distintas. Investigamos também a composição da cromatina dessas espécies através da coloração com fluorocromos DAPI/CMA₃ e o mapeamento de sete microssatélites e do rDNA 18S, verificando que *P. fastidiosuscula* tem uma composição cromossômica muito diferente das espécies de *P.* (gr. *occidentalis*) tanto na distribuição dos microssatélites como das regiões ricas em AT e GC. Sugerimos a origem intraespecífica do cromossomo B de *P. fastidiosuscula* baseado no compartilhamento da composição heterocromática e do microssatélite TAT₍₁₀₎ com os cromossomos do complemento A. Por fim mostramos que TTAGG₍₆₎ e TCAGG₍₆₎ não são sequências teloméricas de *Polybia*, assim a sequência telomérica deste grupo ainda precisa ser investigada.

ABSTRACT

MARCHIORO, Priscila, M.Sc, Universidade Federal de Viçosa, February, 2019. **Cytogenetic analysis of wasps from the genus *Polybia* (*Myrapetra*) Lepeletier, 1836 (Vespidae)**. Adviser: Lucio Antônio de Oliveira Campos. Co-adviser: Denilce Meneses Lopes.

The genus *Polybia*, containing 58 species, has the largest number of social wasps in the Epiponini tribe, and has a wide distribution in South America. The species of *Polybia* are very similar to each other, and the color of the body is very variable, making it difficult to identify the species of the genus and causing taxonomic problems. The majority of cytogenetic studies in this genus are based in the karyotype description of eight species. Therefore, in this study, we described the karyotype of *Polybia fastidiosuscula*, and made the first report of the presence of B chromosome in the Vespidae family; we presented differences and similarities among colonies of the *Polybia* (gr. *occidentalis*), detailing that cytogenetic studies are a useful tool to support species differentiation in this group, which fills the gap of taxonomic issues. We suggested that the individuals analyzed in this study, and categorized as *P.* (gr. *occidentalis*) belong to two distinct species. We also investigated the chromatin composition of these species through fluorochrome dyes DAPI/ CMA₃, mapping of seven microsatellites, and 18S rDNA. We verified that *P. fastidiosuscula* has a chromosomal composition markedly different from species of *P.* (gr. *occidentalis*) for both microsatellite distribution as well as AT and CG-rich regions. We suggested the interspecific origin of B chromosome of *P. fastidiosuscula* based on shared heterochromatin composition, and TAT₍₁₀₎ microsatellite with complement chromosomes A. Finally, we showed that TTAGG₍₆₎ and TCAGG₍₆₎ are not telomeric sequences of *Polybia*, so the telomeric sequence of this group requires further investigation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. CAPÍTULO I.....	9
Resumo	10
Introdução	11
Material e Métodos	12
Resultados	13
Discussão	14
Referências.....	18
3. CAPÍTULO II.....	29
Resumo	30
Introdução	31
Material e Métodos	32
Resultados	33
Discussão	35
Referências.....	39
4. CONCLUSÕES GERAIS	49

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 *Vespidae*

Vespa é o nome popular mais utilizado para indicar insetos da família Vespidae (Souza e Zanuncio, 2012). Esses insetos pertencem à ordem Hymenoptera, considerada uma das ordens mais diversa de insetos, com 132 famílias (Aguiar et al. 2013). A família Vespidae possui diferentes organizações sociais, compreendendo de espécies solitárias a eussociais (Hunt, 2007), por isso é considerada um importante grupo para estudar a evolução da socialidade, sendo utilizada geralmente como modelo evolutivo (Jandt e Toth, 2015). Além disso, atuam no controle biológico, na polinização de plantas e são importantes como indicadores de conservação da biodiversidade (Carpenter e Marques, 2001; De Oliveira Lima, 2008).

Vespidae possui seis subfamílias, porém Polistinae é a única que ocorre no Brasil, essa subfamília abrange 28 gêneros e mais de 900 espécies neotropicais com ampla diversidade, seja na morfologia ou no comportamento (Somavilla, 2012). Ela é dividida nas tribos Ropalidiini, Epiponini, Polistini e Mischocytarini (Richards, 1978; Ross e Matthews, 1991). A tribo Epiponini é exclusiva da região Neotropical, e agrupa a maioria dos gêneros de vespas sociais (Ross e Matthews, 1991; Carpenter e Marques, 2001). Dentre eles, *Polybia* é o mais numeroso com 58 espécies descritas que são encontradas do sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina (Richards, 1978; Carpenter et al. 2000; Carpenter e Marques, 2001).

Polybia tem um histórico taxonômico confuso e foi criado para inserir as espécies que não se encaixam em nenhum outro gênero (Richards, 1978). O maior subgênero, *Myrapetra*, inclui as espécies que possuem os maiores problemas taxonômicos devido ao grande número de polimorfismos existentes (Richards, 1978). O subgênero possui o grupo chamado *P.* (gr. *occidentalis*), com 12 espécies. As espécies desse grupo têm diferenças estruturais muito pequenas, e a coloração do corpo, característica importante utilizada na identificação, é muito variável, e como possuem ampla distribuição, o intervalo de variação de cada espécie se torna maior dificultando ainda mais a sua classificação (Richards, 1978; Carpenter et al. 2000).

1.2 *Citogenética*

Cada espécie ou grupo de espécies possui um conjunto de cromossomos com número e morfologia característica que é chamado cariótipo (Guerra, 1988). Algumas espécies possuem cromossomos extras ou supranumerários ao conjunto normal do

cariótipo e a eles dá-se o nome de cromossomos B (Camacho et al. 2000). Esses cromossomos não fazem parte do conjunto normal (cromossomos A), e a sua origem e efeitos ainda não são bem compreendidos para a maioria das espécies que os possuem (Revisado em Houben et al. 2014; Valente et al. 2017).

Cromossomos B ocorrem em aproximadamente 15% dos eucariotos (Revisado em Houben et al. 2014). Na ordem Hymenoptera, já foram registrados em formigas (Imai, 1974; Imai et al. 1977; Palomeque et al. 1990), abelhas (Costa et al. 1992; Lopes et al. 2008; Barth et al. 2011), vespas da família Pteromalidae, Sphecidae e Trichogrammatidae (Werren 1991; Araújo et al. 2000; Stouthamer et al. 2001), porém na família Vespidae eles ainda não foram relatados.

Todos os cromossomos, inclusive os B, são formados por um complexo de DNA e proteínas chamado cromatina, a cromatina é classificada de acordo com o grau de compactação e os níveis de expressão dos genes. A eucromatina é menos condensada, tipicamente rica em genes e, portanto, tem maior expressão dos mesmos, enquanto a heterocromatina é altamente condensada, pobre em genes, por isso exibe níveis mais baixos de expressão (Sumner, 2003). Mesmo apresentando níveis baixos de expressão, a heterocromatina é funcional e está envolvida em complexas redes reguladoras, além disso, pode atuar como um depósito onde novas moléculas funcionais poderão ser formadas (Pennisi, 2012). A distribuição da heterocromatina pode ser analisada em um cariótipo por meio da técnica de bandamento C, a qual permite ainda diferenciar cariótipos e identificar rearranjos cromossômicos (Imai et al. 1986; Pompolo e Takahashi, 1990a; Menezes et al. 2013).

A heterocromatina é rica em DNA repetitivo que é encontrado em grandes quantidades no genoma dos eucariotos (Britten e Kohne, 1968). Eles são classificados como DNA repetitivo *in tandem* (DNAs satélites, microssatélites, minissatélites e famílias multigênicas como o DNA ribossomal) ou DNA repetitivo disperso (transposons e retrotransposons) (Revisado em López-Flores e Garrido-Ramos, 2012). Neste estudo abordaremos duas classes de DNA repetitivo *in tandem*, os microssatélites e os rDNA. Os microssatélites são repetições pequenas com menos de 9 nucleotídeos encontrados em matrizes menores que 1 kb, e podem ser encontrados em regiões codificadoras e não codificadoras, e o rDNA, transcrito em rRNA, é o principal componente estrutural e catalítico dos ribossomos, pois desempenha um papel vital na síntese de proteínas; o rDNA nos eucariotos compõe a região organizadora de nucléolo (NOR) em um ou mais cromossomos (Stephan e Walsh, 2001). Através da técnica de

FISH (hibridização *in situ* fluorescente) é possível mapear essas sequências de DNA repetitivo diretamente nos cromossomos, auxiliando no reconhecimento dos homólogos e na comparação entre espécies (Guerra, 2004).

Pesquisas citogenéticas detalhadas envolvendo características morfológicas e moleculares dos cromossomos como o mapeamento de DNA repetitivo, nos permitem analisar particularidades da morfologia, estrutura, organização e composição dos cromossomos, trazendo respostas sobre a relação entre as espécies, grupos de espécies ou populações, além de mostrar os processos envolvidos na evolução do cariótipo (Menezes et al. 2013, 2014; Piccoli et al. 2018; Santos et al. 2018).

1.3 Citogenética de Vespidae

Estudos citogenéticos em Vespidae começaram com os trabalhos de Pardi (1942) e Kerr (1952), onde basicamente se realizava uma caracterização do cariótipo com a descrição do número e morfologia cromossômica utilizando técnicas citogenéticas convencionais. A partir da década de 80, o número de estudos aumentou passando a considerar não somente número e morfologia cromossômica, mas também características como distribuição da heterocromatina (Hung et al. 1981; Pompolo e Takahashi, 1986, 1987, 1990a, 1990b; Hoshiba et al. 1989). Com o passar do tempo, as técnicas citogenéticas foram aperfeiçoadas e atualmente esses estudos combinam dados citogenéticos e moleculares para compreender os mecanismos envolvidos na evolução cromossômica e na caracterização de rearranjos cromossômicos, tais como inversões e fusões (Menezes et al. 2013, 2014, 2017).

Por meio de pesquisas citogenéticas em Vespidae pode-se verificar um forte envolvimento de segmentos cromossômicos ricos em pares de base GC em diferentes tipos de rearranjos cromossômicos, levando a diversificação do cariótipo, e que o número de marcações e localização de genes ribossomais são conservados no genoma de Vespidae (Menezes et al. 2013, 2014; Cunha et al. 2017). A evolução cromossômica também tem sido discutida, e com base no número de cromossomos de várias espécies e informações obtidas através de estudos filogenéticos, sugere-se que a fusão foi o mecanismo que levou a diminuição gradual do número de cromossomos em Epiponini durante sua história evolutiva (Menezes et al. 2014).

Apesar de a família Vespidae possuir cerca de 4500 espécies (Carpenter e Marques, 2001) apenas 75 tiveram o seu cariótipo estudado. Já no gênero *Polybia* das 58 espécies apenas oito foram estudadas citogeneticamente e a maioria delas apenas

com descrição do número e morfologia cromossômica: *P. jurinei* $n=5$, *P. rejecta* $n=15$, *P. sp. 1* $n=16$, *P. sp. 2* $n=17$, *P. occidentalis* $n=17$, *P. paulista* $n=17$, *P. scutellaris* $n=17$ e *P. sericea* $n=27$ (Pompolo e Takahashi, 1987, 1990b; Menezes et al. 2014). Esses estudos mostram uma grande variação cariotípica tanto em número ($n=5$ até $n=27$), quanto morfologia dos cromossomos, assim essas características podem ser muito importantes na diferenciação dessas espécies.

Além de poucos estudos citogenéticos, o gênero *Polybia* apresenta outras características que o torna um interessante modelo para estudos citogenéticos, como sua ampla distribuição na América do Sul (Richards, 1978), o que facilita a coleta e comparação entre populações de diferentes locais. Como foi visto *Polybia* apresenta problemas taxonômicos pela falta de caracteres diferenciados (Richards, 1978), assim o uso de outras ferramentas como a citogenética se torna muito importante, podendo revelar particularidades das espécies que não são detectadas através da sua morfologia (Sessions, 1996), auxiliando assim na resolução de problemas taxonômicos (Bertollo, 1986). Além disso, *Polybia* apresenta uma grande quantidade de larvas nos ninhos o que possibilita o preparo de uma quantidade considerável de lâminas para análises.

O presente estudo foi dividido em dois capítulos abordando diferentes espécies do gênero *Polybia* (*Myrapetra*) que tiveram como objetivo:

Capítulo 1- descrever e caracterizar o cariótipo de *Polybia fastidiosuscula*. Investigar a composição da cromatina dessa espécie utilizando banda C, coloração com fluorocromos base-específicos e mapeamento físico de microssatélites e rDNA 18S.

Capítulo 2- caracterizar e comparar o cariótipo de sete colônias de *Polybia* pertencentes a *P.* (gr. *occidentalis*) com o intuito de obter marcadores citogenéticos que possam ser usados como caracteres auxiliares na separação das espécies do grupo.

Referências

- Aguiar, A. P., Deans, A. R., Engel, M. S., Forshage, M., Huber, J. T., Jennings, J. T., & Miko, I. (2013). Order hymenoptera. *Zootaxa*, 3703(1), 51-62.
- Araújo, S. M., Pompolo, S. G., Dergam, J. A., & Campos, L. A. (2000). The B chromosome system of *Trypoxylon* (*Trypargilum*) *albitarse* (Hymenoptera, Sphecidae) 1. Banding analysis. *Cytobios*, 101(396), 7-13.
- Barth, A., Fernandes, A., Pompolo, S. G. & Costa, M. A. (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.
- Bertollo, L. A. C., Moreira-Filho, O., & Galetti Jr, P. M. (1986). Cytogenetics and taxonomy: considerations based on chromosome studies of freshwater fish. *Journal of Fish Biology*, 28(2), 153-159.
- Britten, R. J., & Kohne, D. E. (1968). Repeated sequences in DNA. *Science*, 161(3841), 529-540.
- Camacho, J. P. M., Sharbel, T. F., & Beukeboom, L. W. (2000). B-chromosome evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 355(1394), 163-178.
- Carpenter, J. M., Kojima, J. I., & Wenzel, J. W. (2000). *Polybia*, paraphyly, and polistine phylogeny. *American Museum Novitates*, 3298: 1-24.
- Carpenter, J. M., & Marques, O. M. (2001). Contribuição ao estudo dos vespídeos do Brasil. *Universidade Federal da Bahia, Departamento de Fitotecnia, Bahia, CD-ROM, 147p.*
- Costa, M. A., Pompolo, S. G. & Campos, L. A. (1992). Supernumerary chromosomes in *Partamona cupira* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Revista Brasileira de Genética*, 15, 801-806.
- Cunha, D. A. S., Menezes, R. S. T., Costa, M. A., Lima, S. M., Andrade, L. H. C., & Antonialli, W. F. (2017). Integrated Analyses of Cuticular Hydrocarbons, Chromosome and mtDNA in the Neotropical Social Wasp *Mischocyttarus consimilis* Zikán (Hymenoptera, Vespidae). *Neotropical entomology*, 46(6), 642-648.
- De Oliveira Lima, A. C. (2008). Sobre a diversidade das vespas sociais (Vespidae: Polistinae) em fragmentos florestais remanescentes do noroeste e do nordeste do estado de São Paulo, e o seu possível uso como indicadores de conservação da biodiversidade (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
- Guerra, M (2004). *FISH: conceitos e aplicações na citogenética*. Sociedade Brasileira de Genética.
- Guerra, M. D. S. (1988). *Introdução à citogenética geral*. Guanabara Koogan.
- Hoshiaba, H., Matsuura, M., & Imai, H. T. (1989). Karyotype evolution in the social wasps. *The Japanese Journal of Genetics*, 64(3), 209-222.

- Houben, A., Banaei-Moghaddam, A. M., Klemme, S., & Timmis, J. N. (2014). Evolution and biology of supernumerary B chromosomes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *71*(3), 467-478.
- Hung, A. C., Reed, H. C., & Vinson, S. B. (1981). Chromosomes of four species of *Polistes* wasps (Hymenoptera: Vespidae). *Caryologia*, *34*(2), 225-230.
- Hunt, J. H. (2007). *The evolution of social wasps*. Oxford University Press.
- Imai, H. T. (1974). B-chromosomes in the myrmecine ant *Leptothorax spinosior*. *Chromosoma*, *36*, 431-444.
- Imai, H. T., Crozier, R. H. & Taylor, R. W. (1977). Karyotype Evolution in Australian Ants. *Chromosoma*, *59*, 341-393.
- Imai, H. T., Maruyama, T., Gojobori, T., Inoue, Y., & Crozier, R. H. (1986). Theoretical bases for karyotype evolution. 1. The minimum-interaction hypothesis. *The American Naturalist*, *128*(6), 900-920.
- Jandt, J. M., & Toth, A. L. (2015). Physiological and genomic mechanisms of social organization in wasps (Family: Vespidae). In *Advances in Insect Physiology* (Vol. 48, pp. 95-130). Academic Press.
- Kerr, W. E. (1952). A variação do número de cromossomos na evolução dos Hymenoptera. *Scientia Genetica*, *4*, 182-190.
- Lopes, D. M., Pompolo, S. D. G., Campos, L. A. D. O. & Tavares, M. G. (2008). Cytogenetic characterization of *Melipona rufiventris* Lepeletier 1836 and *Melipona mondury* Smith 1863 (Hymenoptera, Apidae) by C banding and fluorochromes staining. *Genetics and Molecular Biology*, *31*, 49-52.
- López-Flores, I., & Garrido-Ramos, M. A. (2012). The repetitive DNA content of eukaryotic genomes. In *Repetitive DNA* (Vol. 7, pp. 1-28). Karger Publishers.
- Menezes, R. S. T., Brady, S. G., Carvalho, A. F., Del Lama, M. A., & Costa, M. A. (2017). The roles of barriers, refugia, and chromosomal clines underlying diversification in Atlantic Forest social wasps. *Scientific Reports*, *7*(1), 7689.
- Menezes, R. S. T., Carvalho, A. F., Correia, J. P. S. O., Silva, T. S., Somavilla, A., & Costa, M. A. (2014). Evolutionary trends in the chromosome numbers of swarm-founding social wasps. *Insectes sociaux*, *61*(4), 385-393.
- Menezes, R. S. T., Silva, T. M., Carvalho, A. F., Andrade-Souza, V., Silva, J. G., & Costa, M. A. (2013). Numerical and structural chromosome variation in the swarm-founding wasp *Metapolybia decorata* Gribodo 1896 (Hymenoptera, Vespidae). *Genetica*, *141*(7-9), 273-280.

- Pardi, L. (1942). Ricerche sui Polistini. 8: La spermatogenesi di *Polistes gallicus* (L.) e di *P.(Leptopolistes) omissus* (Weyrauch). *Scientia Genetica*, 3, 14-22. In: Pompolo, S. G., & Takahashi, C. S. (1990). Chromosome numbers and C-banding in two wasp species of the genus *Polistes* (Hymenoptera Polistinae, Polistini). *Insectes Sociaux*, 37(3), 251-257.
- Palomeque, T., Chica, E. & Guardia, R. D. D. L. (1990). Karyotype, C-banding, chromosomal location of active nucleolar organizing regions, and B-chromosomes in *Lasius niger* (Hymenoptera, Formicidae). *Genome*, 33, 267-272.
- Pennisi, E. (2012) Genomics encode project writes eulogy for junk DNA. *Science* 337(6099):1159–1161.
- Piccoli, M. C. A., Bardella, V. B., & Cabral-de-Mello, D. C. (2018). Repetitive DNAs in *Melipona scutellaris* (Hymenoptera: Apidae: Meliponidae): chromosomal distribution and test of multiple heterochromatin amplification in the genus. *Apidologie*, 49(4), 497-504.
- Pompolo, S. D. G., & Takahashi, C. S. (1986). Karyotype of two species of wasps of the genus *Polistes* (Polistinae, Vespidae, Hymenoptera). *Insectes sociaux*, 33(2), 142-148.
- Pompolo, S. G., & Takahashi, C. S. (1987). Cytogenetics of Brazilian Polybiini wasps (Hymenoptera, Vespidae, Polistinae). *Revista Brasileira de Genética*, 10(3), 483-496.
- Pompolo, S. G., & Takahashi, C. S. (1990a). Chromosome numbers and C-banding in two wasp species of the genus *Polistes* (Hymenoptera Polistinae, Polistini). *Insectes Sociaux*, 37(3), 251-257.
- Pompolo, S. G., & Takahashi, C. S. (1990b). Karyotype of ten species of social wasps (Hymenoptera, Polistinae, Polybiini). *Revista Brasileira de Genética*, 13(3), 469-477.
- Richards, O. W. (1978). The social wasps of the Americas, excluding the Vespinae. *British Museum (Natural History) London*.
- Ross, K. G., & Matthews, R. W. (Eds.). (1991). *The social biology of wasps*. Cornell University Press. 7-32.
- Santos, J. M. D., Diniz, D., Rodrigues, T. A. S., Cioffi, M. D. B., & Waldschmidt, A. M. (2018). Heterochromatin distribution and chromosomal mapping of

- microsatellite repeats in the genome of *Frieseomelitta* stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Florida Entomologist*, 101(1), 33-39.
- Sessions, S. K. (1996). Chromosomes: molecular cytogenetics. *Molecular Systematics*, 2nd edn. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 121-168.
- Somavilla, A. (2012). Aspectos gerais da fauna de vespas (Hymenoptera: Vespidae) da Amazônia central, com ênfase na reserva Ducke, Manaus, Amazonas, Brasil.
- Stephan, W., & Walsh, B. (2001). Repetitive DNA: evolution. *eLS*.
- Stouthamer, R., Van Tilborg, M., De Jong, J. H., Nunney, L., & Luck, R. F. (2001). Selfish element maintains sex in natural populations of a parasitoid wasp. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 268(1467), 617-622.
- Souza, M. D., & Zanuncio, J. C. (2012). Marimbondos-Vespas sociais (Hymenoptera: Vespidae). *Editora UFV, Viçosa*, 79p.
- Sumner, A. T. (2003). *Chromosomes: organization and function*. John Wiley & Sons.
- Valente, G. T., Nakajima, R. T., Fantinatti, B. E., Marques, D. F., Almeida, R. O., Simões, R. P., & Martins, C. (2017). B chromosomes: from cytogenetics to systems biology. *Chromosoma*, 126(1), 73-81.
- Werren, J. H. (1991). The paternal-sex-ratio chromosome of *Nasonia*. *The American Naturalist*, 137(3), 392-402.

2. CAPÍTULO I

Primeiro registro de cromossomo B em *Polybia fastidiosuscula* Saussure, 1854 (Vespidae) e investigação da composição da cromatina através do mapeamento de microssatélites

Priscila Marchioro¹, Lucio Antônio de Oliveira Campos², Denilce Meneses Lopes¹

¹ Laboratório de Citogenética de Insetos, Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Campus Viçosa, Av. P.H. Rolfs s/n, CEP 36570-900, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

² Laboratório de Biologia Molecular de Insetos, Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Campus Viçosa, Av. P.H. Rolfs s/n, CEP 36570-900, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

Resumo

A caracterização do cariótipo é importante pra compreender a estrutura e composição do genoma de uma espécie. *Polybia* é um gênero de vespa social pertencente à Hymenoptera, Vespidae, possui 58 espécies e apenas oito delas tem o número e morfologia cromossômica descrita. Assim o objetivo do estudo foi descrever e caracterizar o cariótipo de *Polybia fastidiosuscula*, relatando a ocorrência de um cromossomo B pela primeira vez em Vespidae. Além disso, investigamos a composição da cromatina dessa espécie por meio de bandamento C, coloração com fluorocromos base-específicos e mapeamento físico de sete microssatélites e do rDNA 18S. Foram analisadas quatro colônias de *P. fastidiosuscula* provenientes dos estados de Minas Gerais (MG) e Paraná (PR), Brasil. O número cromossômico foi $2n=34$ com a presença de um cromossomo B em duas colônias analisadas. Sugerimos a origem intraespecífica do cromossomo B baseada na homologia da composição heterocromática com os cromossomos A. Caracterizamos a composição da cromatina dessa espécie, verificando a existência de diferentes composições heterocromáticas ricas em microssatélites e também enriquecidas com os pares de base AT e GC. Baseado em marcações dos microssatélites sugerimos também a ocorrência de uma translocação recíproca em *P. fastidiosuscula*, e que as sequências TTAGG₍₆₎ e TCAGG₍₆₎ não são sequências teloméricas nessa espécie, são apenas microssatélites que nessa espécie ocorrem no centrômero da maioria dos cromossomos, assim como GAG₍₁₀₎ e CGG₍₁₀₎.

Palavras-chave: cromossomo B, vespas sociais, FISH, microssatélites.

Introdução

O gênero *Polybia* compreende 58 espécies com distribuição do sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina (Richards, 1978). Essa ampla distribuição facilita a coleta e comparação entre populações de diferentes locais, tornando-os um modelo interessante para estudos citogenéticos. *Polybia* pertence à tribo Epiponini da ordem Hymenoptera (Richards, 1978) e é caracterizado pela fundação de novas colônias por enxameagem (Carpenter e Marques, 2001). Estudos citogenéticos foram aplicados somente em oito espécies de *Polybia*, a maioria deles apenas com descrição de número e morfologia cromossômica, e evidenciam variabilidade interespecífica (Pompolo e Takahashi, 1987, 1990; Menezes et al. 2014).

Cromossomos B já foram relatados em várias espécies da ordem Hymenoptera (Imai, 1974; Imai et al. 1977; Palomeque et al. 1990; Werren, 1991; Costa et al. 1992; Araújo et al. 2000; Stouthamer et al. 2001; Lopes et al. 2008; Barth et al. 2011), porém até o momento não foram observados na família Vespidae. Esses cromossomos não fazem parte do conjunto normal (cromossomos A), e são citados como dispensáveis, pois a maioria deles não apresentam genes com efeitos principais e não recombinam com nenhum outro membro do complemento cromossômico normal (Beukeboom, 1994; Jones, 1995). Eles não apresentam herança mendeliana, e ocorrem em aproximadamente 15% dos eucariotos (Camacho et al. 2000). A maioria dos cromossomos B são heterocromáticos e compostos de sequências de DNA repetitivo, que variam tanto no tipo de repetição quanto no número de cópias (Camacho et al. 2000).

Técnicas citogenéticas permitem descrever, classificar e caracterizar o conjunto cromossômico, além disso, permitem investigar a distribuição e composição da cromatina desses cromossomos (Menezes et al. 2014; Bai et al. 2018). Podemos destacar a técnica de hibridização fluorescente *in situ* de DNA (FISH) que permite mapear fisicamente sequências cromossômicas específicas (Larracunte e Ferree, 2015), tais como sequências de DNA ribossomal ou outras regiões de DNA repetitivo.

O genoma dos eucariotos apresenta grandes quantidades de DNA repetitivo (Britten e Kohne, 1968), que são classificados em DNA repetitivo disperso (transposons e retrotransposons) e DNA repetitivo *in tandem* (DNAs satélites, microssatélites, minissatélites e famílias multigênicas como o DNA ribossomal) (Revisado em López-Flores e Garrido-Ramos, 2012). Os DNAs repetitivos, como os microssatélites e os genes ribossomais são utilizados como marcadores moleculares e permitem investigar a

composição e organização da cromatina, além da evolução cromossômica em vários grupos de organismos, inclusive em insetos (Butcher et al. 2000; Brito et al. 2005; Lopes et al. 2014; Menezes et al. 2014; Cunha et al. 2018; Picolli et al. 2018; Santos et al. 2018; Travenzoli, 2018).

Em *Polybia* das 58 espécies, apenas oito foram estudadas citogeneticamente e a maioria delas apenas com descrição do número e morfologia cromossômica: *P. jurinei* $n=5$, *P. rejecta* $n=15$, *P. sp. 1* $n=16$, *P. sp. 2* $n=17$, *P. occidentalis* $n=17$, *P. paulista* $n=17$, *P. scutellaris* $n=17$ e *P. sericea* $n=27$ (Pompolo e Takahashi, 1987, 1990b; Menezes et al. 2014). Esses estudos mostram uma grande variação no número de cromossomos indicando uma alta taxa de reorganização genômica durante a evolução do cariótipo.

No presente estudo caracterizamos o cariótipo de *Polybia fastidiosuscula* relatando a ocorrência de cromossomo B. Além disso, investigamos a composição da cromatina dessa espécie utilizando banda C, coloração com fluorocromos base-específicos e mapeamento físico de microssatélites e do rDNA 18S.

Material e Métodos

Foram coletadas quatro colônias de *Polybia fastidiosuscula* provenientes dos estados de Minas Gerais (MG) e Paraná (PR), Brasil (Tabela 1). Indivíduos adultos de cada colônia foram identificados pelo Dr. Orlando Tobias Silveira do Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, Pará. Os *vouchers* foram depositados na coleção científica do Apiário Central do Museu Regional de Entomologia da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. Para obtenção dos cromossomos mitóticos metafásicos utilizou-se gânglios cerebrais de pré-pupas de acordo com Imai et al. (1988). Os gânglios cerebrais foram submetidos a tratamento na colchicina 0,005% e citrato de sódio 1% por 90 minutos. Posteriormente o material foi macerado seguindo três etapas de fixação à base de etanol, ácido acético e água. A coloração convencional foi realizada com Giemsa (5% em tampão Sörensen). Para visualização do conteúdo e distribuição da heterocromatina utilizou-se o método de bandamento C proposto por Sumner (1972), com modificações (HCl 0,2M por 6 minutos, hidróxido de bário 5% a 60°C por 8 minutos, 2X SSC a 60° por 2 minutos).

Para investigar a composição da cromatina foram utilizadas as técnicas de coloração sequencial com fluorocromos DAPI e CMA₃ seguindo o protocolo proposto por Schweizer (1980) e a hibridização por fluorescência *in situ* (FISH) de acordo com

Pinkel et al. (1986). Para o FISH foram utilizadas sondas dos microssatélites: TAT₍₁₀₎, GA₍₁₅₎, GAG₍₁₀₎, CGG₍₁₀₎, CAA₍₁₀₎, TTAGG₍₆₎, TCAGG₍₆₎, (marcadas pelo método direto com Cy3 na extremidade 5' durante a síntese - Sigma, St. Louis, MO, EUA), e a sonda de DNA ribossomal 18S que foi obtida por amplificação via PCR, utilizando-se *primers* de rDNA 18S F (5'-GTCATATGCTTGTCTCAAAGA-3') e R (3'-TCTAATTTTTTCAAAGTAAACGC-5'), desenvolvidos para a espécie *Melipona quinquefasciata* (Pereira, 2006). Essa sonda foi marcada pelo método indireto utilizando-se digoxigenina-11-dUTP (Roche, Mannheim, Germany) durante a amplificação. A detecção da sonda foi realizada com antidigoxigenina-rodamina (Roche Applied Science) e as lâminas montadas com DAPI (Fluoroshield com DAPI- SIGMA F6057).

Foram analisadas 20 lâminas por colônia e 10 metáfases por lâmina em dois microscópios: Olympus BX-60 acoplado a um sistema de captura de imagens QColor Olympus®, para fotos de Giemsa e banda C e um microscópio de epifluorescência Olympus BX53 com a câmera DP73F Olympus usando o software Cell Sens Imaging para fotos de DAPI/CMA₃ e FISH. Os cromossomos foram medidos no programa Image-Pro Plus 4.5, dispostos de acordo com o tamanho e classificados com base no índice relação de braços maior (q) e menor (p) (Levan et al. 1964).

Resultados

Das quatro colônias de *P. fastidiosuscula* analisadas, todas apresentaram $2n=34$ cromossomos, e em duas colônias foi observado a presença de um cromossomo B, ($2n=34+1B$) (Tabela 1; Fig. 1 e 2). Na colônia 2 (Palotina - PR), o cromossomo B estava presente em 31% dos indivíduos analisados e na colônia 4 (Viçosa - MG) em 68% dos indivíduos analisados, não havendo variação dentro do indivíduo. A fórmula cariotípica foi $2K=30M+2SM+2ST$ em todas as colônias, sendo o par 10 submetacêntrico, o par 11 subteloentrico e o restante dos pares foram metacêntricos (Fig. 1 e 2). O cromossomo B não foi classificado, pois não foi possível a visualização do centrômero.

Doze pares cromossômicos apresentaram heterocromatina na região centromérica e/ou pericentromérica, cinco pares cromossômicos foram eucromáticos (Fig. 1b, 2b) e o cromossomo B foi totalmente heterocromático (Fig. 2b).

Quanto à composição da cromatina, o microssatélite TAT₍₁₀₎ apresentou sinais positivos na região pericentromérica de 12 pares cromossômicos coincidindo com

regiões heterocromáticas (Fig. 1c, 2c). O cromossomo B também foi marcado positivamente por essa sonda, não sendo marcado por nenhuma das demais sondas utilizadas (Fig. 2). O microssatélite CAA₍₁₀₎ marcou a região heterocromática do braço maior de apenas dois pares de cromossomos (par 8 e 9) (Fig. 1g, 2g).

O microssatélite GA₍₁₅₎ revelou marcações nas regiões eucromáticas de todos os cromossomos, sendo em 12 pares nas regiões terminais dos dois braços e o cromossomo inteiro em 5 pares (Fig. 1d, 2d).

Os microssatélites GAG₍₁₀₎, CGG₍₁₀₎, TTAGG₍₆₎ e TCAGG₍₆₎ marcaram a região centromérica de 12 pares de cromossomos, sendo 11 pares heterocromáticos e um par eucromático (Fig. 1e, f, h, i; 2 e, f, h, i). O gene ribossomal 18S se localizou próximo a região do centrômero do par cromossômico 11 (Fig. 1j, 2j).

Ambos os fluorocromos DAPI e CMA₃ marcaram regiões de heterocromatina, porém, em locais diferentes (Fig. 3). O DAPI marcou a região pericentromérica de 12 pares cromossômicos e também o cromossomo B, assim como a sonda microssatélite TAT₍₁₀₎ (Fig. 3). Já marcações positivas de CMA₃ foram observadas na região centromérica de 12 pares de cromossomos, assim como as sondas microssatélites GAG₍₁₀₎, CGG₍₁₀₎, TTAGG₍₆₎ e TCAGG₍₆₎ (Fig. 3). Não observamos variações nos resultados obtidos nas quatro colônias analisadas em nenhuma das técnicas, exceto a presença de um cromossomo B em duas das colônias.

Discussão

Neste estudo descrevemos o cariótipo de *P. fastidiosuscula* com a presença de um cromossomo B ($2n=34+1B$), aumentando para nove o número de espécies do gênero *Polybia* com descrição cariotípica. Os cariótipos das espécies desse gênero mostram uma grande variação em relação ao número ($n=5$ até $n=27$) (Pompolo e Takahashi, 1987, 1990; Menezes et al. 2014). Essa variação também ocorre dentro da tribo Epiponini como um todo, e sugere uma alta taxa de reorganização genômica durante a evolução do cariótipo (Menezes et al. 2014). Apesar da variação numérica, a morfologia dos cromossomos não apresenta grandes variações, sendo a maioria dos pares classificados como metacêntricos (Pompolo e Takahashi, 1987, 1990; Menezes et al. 2014), como observado em *P. fastidiosuscula*.

Em duas colônias de *P. fastidiosuscula* analisadas observou-se a presença de um cromossomo B. Esse cromossomo foi identificado por suas características peculiares

como o tamanho reduzido em relação aos cromossomos do complemento A, sua variação na frequência nas células mitóticas, a ausência de homólogo e por ser completamente heterocromático. Tais características são genericamente comuns aos cromossomos B (ver Beukeboom, 1994; Camacho et al. 2000).

Cromossomos B são relatados em milhares de espécies de animais, plantas e fungos (Revisado em Houben et al. 2014). Em Hymenoptera, os cromossomos B já foram registrados em formigas (Imai, 1974; Imai et al. 1977; Palomeque et al. 1990), abelhas (Costa et al. 1992; Lopes et al. 2008; Barth et al. 2011), vespas da família Pteromalidae, Sphecidae, e Trichogrammatidae (Werren 1991; Araújo et al. 2000; Stouthamer et al. 2001). Sendo este o primeiro registro para Vespidae.

A presença do cromossomo B variou entre as colônias de *P. fastidiosuscula* (de 0 a 1) e dentro da própria colônia (ocorrência em 31% dos indivíduos na colônia 2 e 68% dos indivíduos na colônia 4), sendo uniformemente observado dentro do indivíduo. Essas variações de frequência e quantidade de cromossomos B já foram reportadas em várias espécies, como por exemplo, em *Partamona helleri* de, 0 a 4 cromossomos B; em *Picea glauca* de, 0 a 6 cromossomos B; em *Vulpes vulpes* de, 0 a 8 cromossomos B; em *Rattus rattus* de, 0 a 5 cromossomos B (Costa et al. 1992; Revisado em Houben et al. 2014). Tais variações devem-se ao fato de que a transmissão dos mesmos não seguem as leis de segregação mendeliana, adotando seus próprios caminhos evolutivos e específicos da espécie (Camacho et al. 2000). Além disso, vimos que o cromossomo B esteve presente em colônias de *P. fastidiosuscula* coletadas em diferentes locais do Brasil (Minas Gerais e Paraná), mostrando que a presença do mesmo não é restrita a uma localidade geográfica. No gafanhoto *Eyprepocnemis plorans* os diferentes limites geográficos influenciam a presença de cromossomos B (Cabrero et al. 1997).

Em geral, cromossomos B são compostos por DNA não codificante e não essenciais para o desenvolvimento normal das espécies que os possuem (Revisado em Houben et al. 2014). No entanto, nas vespas *Nasonia vitripennis* (Werren, 1991) e *Trichogramma kaykai* (Stouthamer et al. 2001), a presença do cromossomo B chamado de PSR (paternal sex ratio) provoca uma alteração na razão sexual da população (Werren, 1991). Em *Trypoxylon albitarse* sabe-se que o cromossomo B está passando por um processo de integração no genoma A (Araújo et al. 2001). Ainda não sabemos quais os efeitos do cromossomo B em *P. fastidiosuscula*, sendo necessário um estudo mais detalhado englobando análises citogenéticas e comportamentais da espécie.

Em relação à composição da cromatina, evidenciamos marcações de apenas um microsatélite nas regiões eucromáticas dos cromossomos. Microsatélites em geral têm sido encontrados em regiões eucromáticas dos cromossomos de insetos como gafanhotos (Ruiz-Ruano et al. 2015), abelhas (Piccoli et al. 2018; Santos et al. 2018; Travenzoli, 2018), formigas (Barros et al. 2018) e vespas *P. (gr. occidentalis)* (Marchioro, 2019 cap. 2). Porém, nós relatamos aqui que a maioria dos microsatélites analisados se localizaram em regiões coincidentes com a heterocromatina dos cromossomos de *P. fastidiosuscula*, sugerindo que os mesmos podem ser encontrados na cromatina como um todo dependendo da espécie (Milani e Cabral-de-Mello, 2014).

A heterocromatina evidenciada pela primeira vez em uma espécie do gênero *Polybia* apresentou diferentes composições de microsatélites, uma rica em sequências de DNA repetitivo TAT₍₁₀₎ e CAA₍₁₀₎ (em dois cromossomos) encontrada na região pericentromérica, e outra rica em CGG₍₁₀₎, GAG₍₁₀₎, TTAGG₍₆₎ e TCAGG₍₆₎ encontrada na região centromérica da maioria dos pares cromossômicos. A distribuição desses microsatélites na região centromérica sugere que tais sequências podem desempenhar um papel importante na estrutura organizacional e funcional do centrômero e, conseqüentemente, do genoma desta espécie (Raskina et al. 2008). As regiões centroméricas dos cromossomos são formadas por DNA repetitivo muito heterogêneo em composição, sendo regiões pouco conservadas entre as espécies (Tyler-Smith e Florida, 2000), e até mesmo dentro da espécie, um exemplo é a cana-de-açúcar onde sequências de DNA repetitivo da família SCEN são encontradas no centrômero de apenas parte dos cromossomos (Nagaki et al. 1998). Isso pode explicar porque essas sequências microsatélites não foram encontradas em todos os centrômeros de *P. fastidiosuscula*.

TTAGG é uma sequência telomérica difundida entre os insetos (Vitkova et al. 2005), porém não é universalmente observada dentro da classe (Mravinac et al. 2011). Segundo Frydrychová et al. (2004), TTAGG é uma sequência ancestral dos telômeros dos insetos, mas foi perdida repetidas vezes ao longo do tempo evolutivo. Em Hymenoptera, TTAGG já foi encontrada nos telômeros de abelhas e formigas (Sahara et al. 1999; Lorite et al. 2002; Korandová et al. 2014; Pereira et al. 2018; Travenzoli, 2018), não sendo observada na família Vespidae e nem em outras famílias de vespas parasitas (Gokhman et al. 2014; Menezes et al. 2017).

Uma sequência telomérica alternativa encontrada em alguns insetos, como, por exemplo, Coleópteros da superfamília Tenebrionoidea é a repetição TCAGG (Mravinac

et al. 2011). Nossos dados mostram que essas duas sequências TTAGG₍₆₎ e TCAGG₍₆₎ estão presentes nos cromossomos de *P. fastidiosuscula*, porém não nos telômeros. Essas sequências foram encontradas em regiões centroméricas da maioria dos cromossomos, por isso acreditamos que não são sequências teloméricas nesta espécie, mas sim apenas sequências repetitivas que ocorrem no centrômero de alguns cromossomos, elas podem ter sido sequências teloméricas ancestrais que foram perdidas no decorrer da evolução através de rearranjos como fusão e inversão e agora são apenas resquícios que ficaram restritos a região do centrômero. Durante os rearranjos a sequência telomérica pode ter sido substituída por outra ainda não conhecida.

O número de marcações e a localização do rDNA 18S em *P. fastidiosuscula* coincidiu com marcações de genes ribossomais de três espécies da mesma tribo, *Metapolybia decorata*, *Metapolybia docilis*, e *Metapolybia cingulata* (Menezes et al. 2013; Menezes et al. 2014). O único par heterocromático não marcado pelos microssatélites CGG₍₁₀₎, GAG₍₁₀₎, TTAGG₍₆₎ e TCAGG₍₆₎ na região centromérica foi o par marcado pela sonda ribossomal 18S, inicialmente esse par cromossômico poderia ter a mesma constituição centromérica dos demais pares heterocromáticos, porém no decorrer da evolução cromossômica pode ter ocorrido uma translocação recíproca, onde ocorre uma troca de material entre cromossomos não homólogos, assim o par heterocromático teria passado a sequência centromérica para o par eucromático e em contrapartida o par eucromático teria transferido a sequência do gene ribossomal (Badaeva et al. 1998; 2007).

Os fluorocromos base específicos DAPI/CMA₃ mostram regiões com riqueza em pares de base AT e GC respectivamente e em *P. fastidiosuscula* ambos foram observados na heterocromatina. Os sítios ricos em pares de base AT foram coincidentes com regiões heterocromáticas, incluindo o cromossomo B, evidenciando que a composição do cromossomo B é semelhante à heterocromatina dos cromossomos A, mais um indício de sua possível origem. As bandas CMA₃⁺ foram observadas nas regiões heterocromáticas centroméricas, assim como os microssatélites GAG₍₁₀₎, CGG₍₁₀₎, TTAGG₍₆₎ e TCAGG₍₆₎. Essas marcações CMA₃⁺ diferiram de outras espécies de *Polybia* analisadas e foram semelhantes a espécies de *Metapolybia* (Menezes et al. 2013, 2014) evidenciando o compartilhamento dessa característica entre gêneros. Além disso, regiões CMA₃⁺ em Epiponini estão envolvidas em diferentes tipos de rearranjos cromossômicos, indicando uma intensa dinâmica evolutiva dessas regiões (Menezes et al. 2014).

Nossos dados apontam para uma homologia em relação à composição heterocromática do cromossomo B com os cromossomos do complemento A. Baseado em marcações DAPI⁺ e TAT₍₁₀₎ positivas, mostramos que o cromossomo B de *P. fastidiosuscula* possui a mesma composição heterocromática dos cromossomos do complemento A. Existem duas principais hipóteses de origem dos cromossomos B: intraespecífica (se originam como subprodutos de rearranjos ocorridos nos cromossomos A da espécie), e interespecífica (originados a partir de cromossomos A de espécies relacionadas, mediante hibridização) (Camacho et al. 1997, 2000; Araújo et al. 2000). A junção dessas duas hipóteses para explicar o surgimento do cromossomo B também já foi proposta (Li et al. 2017). Assim sugerimos que o cromossomo B de *P. fastidiosuscula* tenha se originado da fragmentação de uma porção heterocromática de um cromossomo A, corroborando com a hipótese de origem intraespecífica, assim como sugerido no peixe *Steindacnerina inculpita* (Sampaio et al. 2015); na abelha *Melipona rufiventris* (Lopes et al. 2008) e na vespa *Trypoxylon albitarse* (Araújo et al. 2000), através da observação de homologia entre os cromossomos do complemento A e B em relação a composição heterocromática rica em pares de base AT.

Neste estudo descrevemos o cariótipo de *P. fastidiosuscula* com a presença de um cromossomo B, baseado na sua composição heterocromática sugerimos sua origem como sendo intraespecífica. Além disso, nosso estudo forneceu dados sobre a organização de sequências de microssatélites no genoma de *P. fastidiosuscula*, destacando a existência de diferentes composições heterocromáticas. Verificamos também que os microssatélites TTAGG₍₆₎ e TCAGG₍₆₎, não são sequências teloméricas de *P. fastidiosuscula*. O próximo passo é usar um maior número de espécies para compreender os padrões de distribuição desses microssatélites em *Polybia*.

Referências

- Araújo, S. M., Pompolo, S. G., Dergam, J. A., & Campos, L. A. (2000). The B chromosome system of *Trypoxylon* (Trypargilum) *albitarse* (Hymenoptera, Sphecidae) 1. Banding analysis. *Cytobios*, 101(396), 7-13.
- Araújo, S. M. S. R., Pompolo, S. G., Perfectti, F., & Camacho, J. P. M. (2001). Integration of a B chromosome into the A genome of a wasp. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 268(1472), 1127-1131.

- Badaeva, E. D., Dedkova, O. S., Gay, G., Pukhalskiy, V. A., Zelenin, A. V., Bernard, S., & Bernard, M. (2007). Chromosomal rearrangements in wheat: their types and distribution. *Genome*, *50*(10), 907-926.
- Badaeva, E. D., Friebe, B., Zoshchuk, S. A., Zelenin, A. V., & Gill, B. S. (1998). Molecular cytogenetic analysis of tetraploid and hexaploid *Aegilops crassa*. *Chromosome Research*, *6*(8), 629-637.
- Bai, Q., Wang, L., Wang, Z., Lo, N., & Che, Y. (2018). Exploring the diversity of Asian *Cryptocercus* (Blattodea: Cryptocercidae): species delimitation based on chromosome numbers, morphology and molecular analysis. *Invertebrate Systematics*, *32*(1), 69-91.
- Barros, L. A. C., Teixeira, G. A., de Aguiar, H. J. A. C., Lopes, D. M., & das Graças Pompolo, S. (2018). Cytogenetic studies in *Trachymyrmex holmgreni* Wheeler, 1925 (Formicidae: Myrmicinae) by conventional and molecular methods. *Sociobiology*, *65*(2), 185-190.
- Barth, A., Fernandes, A., Pompolo, S. G. & Costa, M. A. (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.
- Beukeboom, L. W. (1994). -Bewildering Bs: an impression of the 1st B-Chromosome Conference. *Heredity*, *73*(3), 328-335.
- Brito, R. M., das Graças Pompolo, S., Magalhães, M. F. M., de Barros, E. G., & Sakamoto-Hojo, E. T. (2005). Cytogenetic characterization of two *Partamona* species (Hymenoptera, Apinae, Meliponini) by fluorochrome staining and localization of 18S rDNA clusters by FISH. *Cytologia*, *70*(4), 373-380.
- Britten, R. J., & Kohne, D. E. (1968). Repeated sequences in DNA. *Science*, *161*(3841), 529-540.
- Butcher, R. D. J., Hubbard, S. F., & Whitfield, W. G. F. (2000). Microsatellite frequency and size variation in the parthenogenetic parasitic wasp *Venturia canescens* (Gravenhorst) (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Insect molecular biology*, *9*(4), 375-384.
- Cabrero, J., Lo, M. D., Go, R., Castro, A. J., Marti, A. & Camacho, J. P. M. (1997). Geographical distribution of B chromosomes in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*, along a river basin, is mainly shaped by non-selective historical events. *Chromosome Research*, *5*, 194-198.

- Camacho, J. P. M., Shaw, M. W., López-León, M. D., Pardo, M. C., & Cabrero, J. (1997). Population dynamics of a selfish B chromosome neutralized by the standard genome in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *The American Naturalist*, *149*(6), 1030-1050.
- Camacho, J. P. M., Sharbel, T. F., & Beukeboom, L. W. (2000). B-chromosome evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, *355*(1394), 163-178.
- Carpenter, J. M., & Marques, O. M. (2001). Contribuição ao estudo dos vespídeos do Brasil. *Universidade Federal da Bahia, Departamento de Fitotecnia, Bahia, CD-ROM, 147p.*
- Costa, M. A., Pompolo, S. G. & Campos, L. A. (1992). Supernumerary chromosomes in *Partamona cupira* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Revista Brasileira de Genética*, *15*, 801-801.
- Cunha, M. S. D., Travenzoli, N. M., Ferreira, R. D. P., Cassinela, E. K., Silva, H. B. D., Oliveira, F. P. M., & Lopes, D. M. (2018). Comparative cytogenetics in three *Melipona* species (Hymenoptera: Apidae) with two divergent heterochromatic patterns. *Genetics and molecular biology*, *41*(4), 806-813.
- Frydrychová, R., Grossmann, P., Trubac, P., Vítková, M., & Marec, F. E. (2004). Phylogenetic distribution of TTAGG telomeric repeats in insects. *Genome*, *47*(1), 163-178.
- Gokhman, V. E., Anokhin, B. A., & Kuznetsova, V. G. (2014). Distribution of 18S rDNA sites and absence of the canonical TTAGG insect telomeric repeat in parasitoid Hymenoptera. *Genetica*, *142*(4), 317-322.
- Houben, A., Banaei-Moghaddam, A. M., Klemme, S., & Timmis, J. N. (2014). Evolution and biology of supernumerary B chromosomes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *71*(3), 467-478.
- Imai, H. T. (1974). B-chromosomes in the myrmecine ant *Leptothorax spinosior*. *Chromosoma*, *36*, 431-444.
- Imai, H. T., Crozier, R. H. & Taylor, R. W. (1977). Karyotype Evolution in Australian Ants. *Chromosoma*, *59*, 341-393.
- 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. *The Japanese journal of genetics*, *63*(2), 159-185.

- Jones, R. N. (1995). Tansley review no. 85. B chromosomes in plants. *New Phytologist*, 411-434.
- Korandová, M., Krůček T., Vrbová, K., & Frydrychová, R. Č. (2014). Distribution of TTAGG-specific telomerase activity in insects. *Chromosome research*, 22(4), 495-503.
- Larracuente, A. M., & Ferree, P. M. (2015). Simple method for fluorescence DNA in situ hybridization to squashed chromosomes. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (95).
- Levan, A., Fredga, K., & Sandberg, A. A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52(2), 201-220.
- Li, Y., Jing, X. A., Aldrich, J. C., Clifford, C., Chen, J., Akbari, O. S., & Ferree, P. M. (2017). Unique sequence organization and small RNA expression of a “selfish” B chromosome. *Chromosoma*, 126(6), 753-768.
- Lopes, D. M., Fernandes, A., Diniz, D., Scudeler, P. E. S., Foresti, F., & Campos, L. A. D. O. (2014). Similarity of heterochromatic regions in the stingless bees (Hymenoptera: Meliponini) revealed by chromosome painting. *Caryologia*, 67(3), 222-226.
- Lopes, D. M., Pompolo, S. D. G., Campos, L. A. D. O. & Tavares, M. G. (2008). Cytogenetic characterization of *Melipona rufiventris* Lepeletier 1836 and *Melipona mondury* Smith 1863 (Hymenoptera, Apidae) by C banding and fluorochromes staining. *Genetics and Molecular Biology*, 31, 49-52
- López-Flores, I., & Garrido-Ramos, M. A. (2012). The repetitive DNA content of eukaryotic genomes. In *Repetitive DNA* (Vol. 7, pp. 1-28). Karger Publishers.
- Lorite, P., Carrillo, J. A., & Palomeque, T. (2002). Conservation of (TTAGG) n telomeric sequences among ants (Hymenoptera, Formicidae). *Journal of Heredity*, 93(4), 282-285.
- Marchioro, P. (2019). *Análises Citogenéticas em Vespas do gênero Polybia (Myrapetra) Lepeletier, 1836 (Vespidae)* (Masters dissertation), Universidade Federal de Viçosa).
- Menezes, R. S. T., Bardella, V. B., Cabral-de-Mello, D. C., Lucena, D. A., & Almeida, E. A. (2017). Are the TTAGG and TTAGGG telomeric repeats phylogenetically conserved in aculeate Hymenoptera? *The Science of Nature*, 104(9-10), 85.

- Menezes, R. S. T., Carvalho, A. F., Correia, J. P. S. O., Silva, T. S., Somavilla, A., & Costa, M. A. (2014). Evolutionary trends in the chromosome numbers of swarm-founding social wasps. *Insectes sociaux*, *61*(4), 385-393.
- Menezes, R. S. T., Silva, T. M., Carvalho, A. F., Andrade-Souza, V., Silva, J. G., & Costa, M. A. (2013). Numerical and structural chromosome variation in the swarm-founding wasp *Metapolybia decorata* Gribodo 1896 (Hymenoptera, Vespidae). *Genetica*, *141*(7-9), 273-280.
- Milani, D., & Cabral-de-Mello, 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*(5), e97956.
- Mravinac, B., Meštrović, N., Čavrak, V. V., & Plohl, M. (2011). TCAGG, an alternative telomeric sequence in insects. *Chromosoma*, *120*(4), 367-376.
- Nagaki, K., Tsujimoto, H., & Sasakuma, T. (1998). A novel repetitive sequence of sugar cane, SCEN family, locating on centromeric regions. *Chromosome Research*, *6*(4), 295-302.
- Palomeque, T., Chica, E. & Guardia, R. D. D. L. (1990). Karyotype, C-banding, chromosomal location of active nucleolar organizing regions, and B-chromosomes in *Lasius niger* (Hymenoptera, Formicidae). *Genome*, *33*, 267-272.
- Pereira, J. O. P. (2006). *Diversidade genética da abelha sem ferrão Melipona quinquefasciata baseada no seqüenciamento das regiões ITS1 parcial e 18S do DNA ribossômico nuclear* (Doctoral dissertation, D. Sc. Thesis, Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, Brazil).
- Pereira, T. T. P., dos Reis, A. C. C. C., Cardoso, D. C., & Cristiano, M. P. (2018). Molecular phylogenetic reconstruction and localization of the (TTAGG)_n telomeric repeats in the chromosomes of *Acromyrmex striatus* (Roger, 1863) suggests a lower ancestral karyotype for leafcutter ants (Hymenoptera). *Comparative cytogenetics*, *12*(1), 13.
- Piccoli, M. C. A., Bardella, V. B., & Cabral-de-Mello, D. C. (2018). Repetitive DNAs in *Melipona scutellaris* (Hymenoptera: Apidae: Meliponidae): chromosomal distribution and test of multiple heterochromatin amplification in the genus. *Apidologie*, *49*(4), 497-504.

- Pinkel, D., Straume, T., & Gray, J. W. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(9), 2934-2938.
- Pompolo, S. G., & Takahashi, C. S. (1987). Cytogenetics of Brazilian Polybiini wasps (Hymenoptera, Vespidae, Polistinae). *Revista Brasileira de Genética*, 10(3), 483-496.
- Pompolo, S. G., & Takahashi, C. S. (1990). Karyotype of ten species of social wasps (Hymenoptera, Polistinae, Polybiini). *Revista Brasileira de Genética*, 13(3), 469-477.
- Raskina, O., Barber, J. C., Nevo, E., & Belyayev, A. (2008). Repetitive DNA and chromosomal rearrangements: speciation-related events in plant genomes. *Cytogenetic and Genome Research*, 120(3-4), 351-357.
- Richards, O. W. (1978). The social wasps of the Americas, excluding the Vespinae. *British Museum (Natural History) London*.
- Ruiz-Ruano, F. J., Cuadrado, Á., Montiel, E. E., Camacho, J. P. M., & López-León, M. D. (2015). Next generation sequencing and FISH reveal uneven and nonrandom microsatellite distribution in two grasshopper genomes. *Chromosoma*, 124(2), 221-234.
- Sampaio, T. R., Gouveia, J. G., da Silva, C. R., Dias, A. L., & da Rosa, R. (2015). Molecular Analysis of the B Microchromosome in *Steindachnerina insculpta* (Characiformes: Curimatidae) by Microdissection. *Cytogenetic and genome research*, 146(1), 51-57.
- Santos, J. M. D., Diniz, D., Rodrigues, T. A. S., Cioffi, M. D. B., & Waldschmidt, A. M. (2018). Heterochromatin distribution and chromosomal mapping of microsatellite repeats in the genome of *Frieseomelitta* stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Florida Entomologist*, 101(1), 33-39.
- Sahara, K., Marec, F., & Traut, W. (1999). TTAGG telomeric repeats in chromosomes of some insects and other arthropods. *Chromosome research*, 7(6), 449-460.
- Schweizer, D. (1980). Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA-DAPI bands) in human chromosomes. *Cytogenetic and Genome Research*, 27(2-3), 190-193.
- Stouthamer, R., Van Tilborg, M., De Jong, J. H., Nunney, L., & Luck, R. F. (2001). Selfish element maintains sex in natural populations of a parasitoid

- wasp. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 268(1467), 617-622.
- Sumner, A. T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*, 75, 304-306.
- Travanzoli, N. M. (2018). *Citogenética Clássica e Molecular com Ênfase na Evolução Cromossômica em Meliponini* (Doctoral dissertation, Universidade Federal de Viçosa).
- Tyler-Smith, C., & Florida, G. (2000). Many Paths to the Top of the Mountain. *Cell*, 102(1), 5-8.
- Vítková, M., Král, J., Traut, W., Zrzavý, J., & Marec, F. (2005). The evolutionary origin of insect telomeric repeats,(TTAGG) n. *Chromosome Research*, 13(2), 145-156.
- Werren, J. H. (1991). The paternal-sex-ratio chromosome of *Nasonia*. *The American Naturalist*, 137(3), 392-402.

Tabela 1. Colônias analisadas de *Polybia fastidiosuscula*, locais de coleta, coordenadas geográficas e número diploide ($2n$).

Nº Colônia	Local de coleta	Coordenadas Geográficas	$2n$
1	Viçosa-MG	20°45'31.3"S 42°52'05.5"W	$2n=34$
2	Palotina-PR	24°17'03.7"S 53°50'27.3"W	$2n=34+1B$
3	Viçosa-MG	20°48'07.3"S 42°51'30.5"W	$2n=34$
4	Viçosa-MG	20°45'31.3"S 42°52'05.5"W	$2n=34+1B$

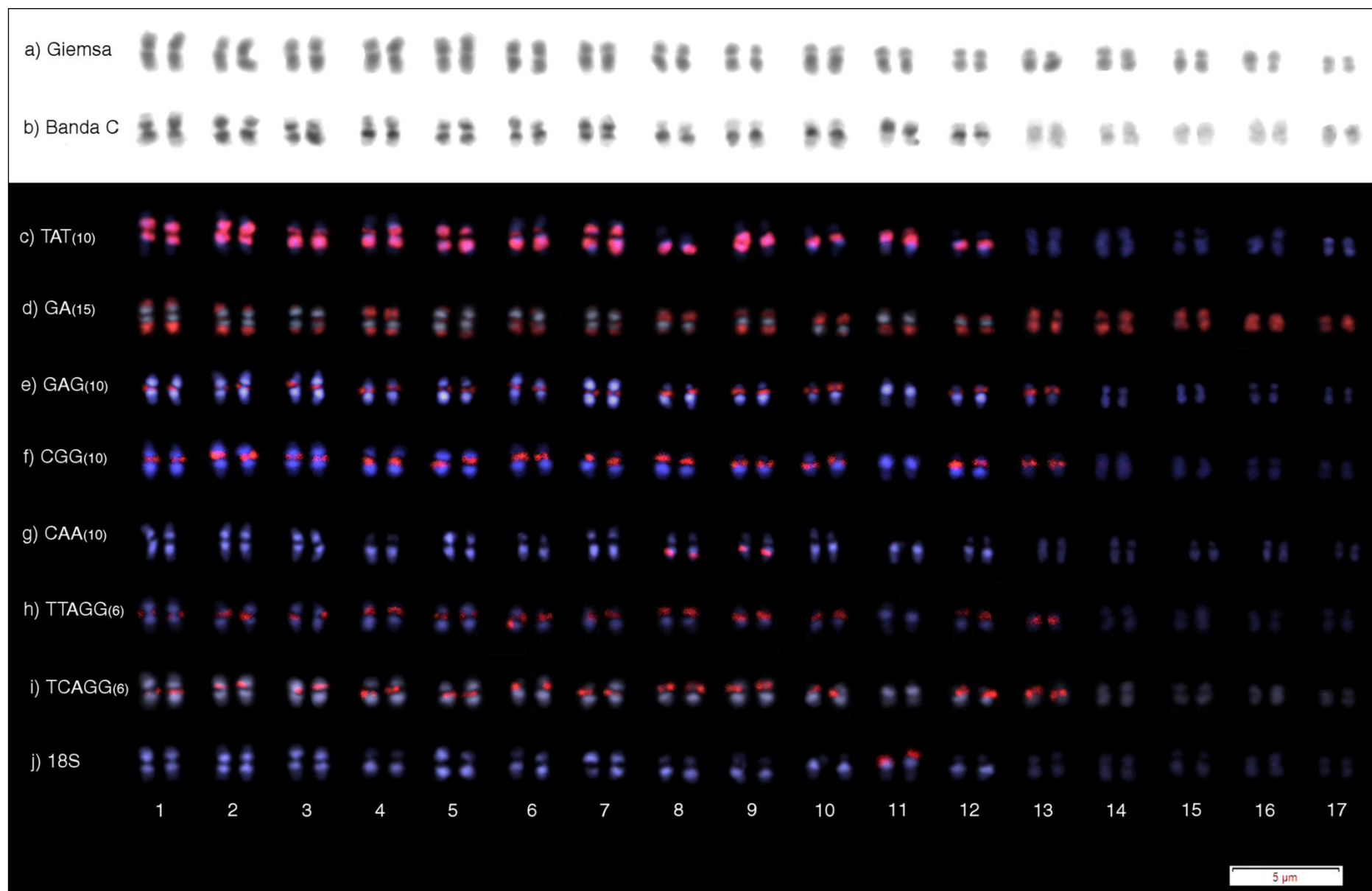


Figura 1: Cariótipo de fêmeas de *P. fastidiosuscula* a) Giemsa; b) banda C c) microssatélite TAT₍₁₀₎, d) GA₍₁₅₎, e) GAG₍₁₀₎, f) CGG₍₁₀₎, g) CAA₍₁₀₎, h) TTAGG₍₆₎, i) TCAGG₍₆₎, j) rDNA 18S. Em azul, cromossomos corados com DAPI e em vermelho sondas hibridizadas.

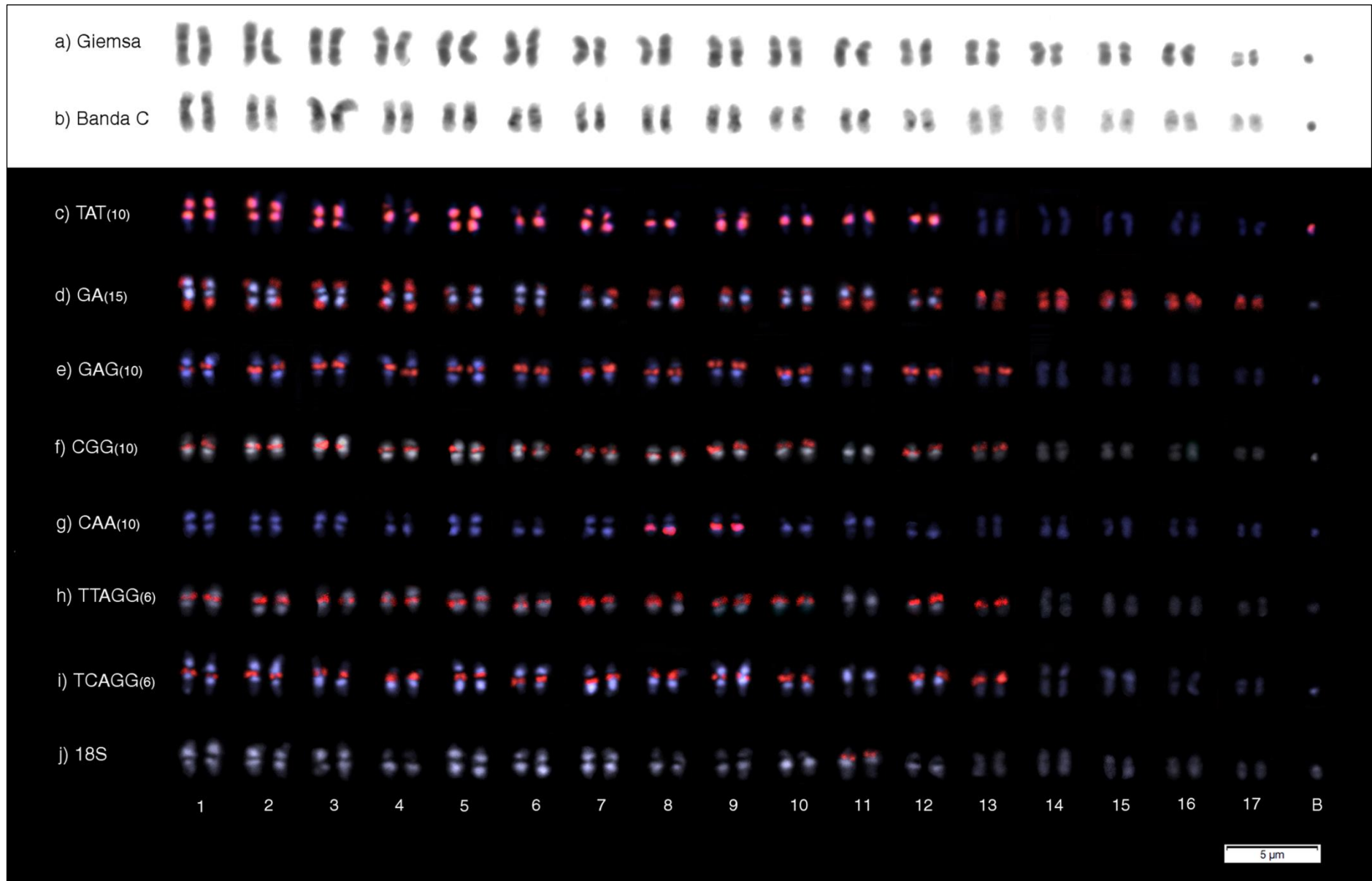


Figura 2: Cariótipo de fêmeas de *P. fastidiosuscula* com a presença do cromossomo B a) Giemsa; b) banda C c) microssatélite TAT₍₁₀₎, d) GA₍₁₅₎, e) GAG₍₁₀₎, f) CGG₍₁₀₎, g) CAA₍₁₀₎, h) TTAGG₍₆₎, i) TCAGG₍₆₎, j) rDNA 18S. Em azul, cromossomos corados com DAPI e em vermelho sondas hibridizadas.

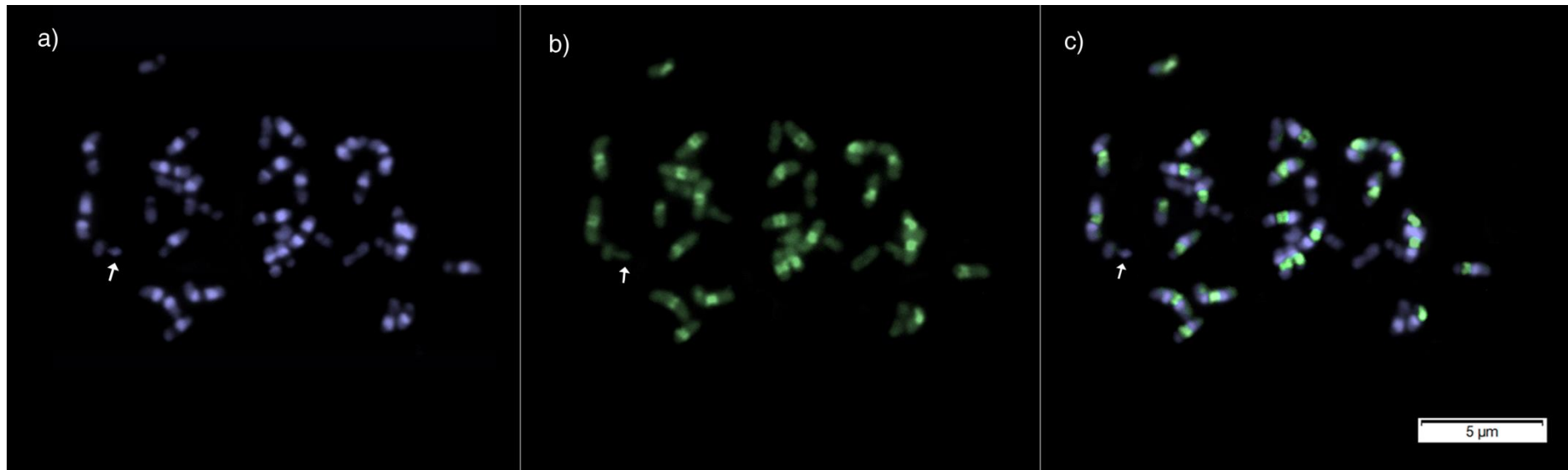


Figura 3: Cromossomos mitóticos metafásicos de fêmeas de *P. fastidiosuscula* corados com a) DAPI, b) CMA₃, c) DAPI/CMA₃. Marcas brilhantes indicam regiões com marcação positiva. Setas indicam o cromossomo B.

3.CAPÍTULO II

Estudo citogenético em *Polybia* (gr. *occidentalis*) Olivier, 1791 (Vespidae): implicações na taxonomia e evolução

Priscila Marchioro¹, Lucio Antônio de Oliveira Campos², Denilce Meneses Lopes¹

¹ Laboratório de Citogenética de Insetos, Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Campus Viçosa, Av. P.H. Rolfs s/n, CEP 36570-900, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

² Laboratório de Biologia Molecular de Insetos, Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Campus Viçosa, Av. P.H. Rolfs s/n, CEP 36570-900, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

Resumo

Polybia é o gênero de vespa social mais comum da América do Sul. Essas vespas possuem um importante papel no controle biológico de pragas urbanas e agrícolas e na polinização de diversas plantas. Em relação à taxonomia não existe uma revisão atual para o gênero *Polybia*, e a existente apresenta problemas em relação à classificação das espécies, em especial quanto ao subgênero *Myrapetra*. Dentro desse subgênero algumas espécies foram inseridas em um grupo constituído por 12 espécies que são muito semelhantes e recebeu o nome de *Polybia* (gr. *occidentalis*). Nesse caso o uso de outras ferramentas como a citogenética pode ser útil na diferenciação dessas espécies. Assim, o objetivo deste estudo foi caracterizar e comparar o cariótipo de sete colônias de *Polybia* pertencentes a *P.* (gr. *occidentalis*) através de técnicas citogenéticas buscando marcadores citogenéticos que auxiliem na separação das espécies. Sugerimos que os indivíduos analisados neste trabalho que foram classificados como *P.* (gr. *occidentalis*) pertencem a duas espécies distintas. Mostramos variações no número cromossômico e na distribuição da heterocromatina entre as espécies de *P.* (gr. *occidentalis*) e que a eucromatina tem diferentes composições evidenciadas pela riqueza em distintos microssatélites. Sugerimos também uma possível evidência de fusão cromossômica com base no número de cromossomos e nas marcações do rDNA 18S. Marcações positivas de DAPI foram relacionadas com regiões heterocromáticas e marcações CMA₃⁺ com o rDNA 18S, padrão encontrado também em outros himenópteros. Marcações positivas das sequências TTAGG e TCAGG foram observadas, mas não nas regiões teloméricas de *Polybia*, portanto a sequência do telômero desse grupo ainda permanece desconhecida. Por fim sugerimos uma revisão taxonômica do gênero *Polybia* mostrando que a citogenética pode ser usada como ferramenta auxiliar na diferenciação das espécies ajudando na resolução de problemas taxonômicos.

Palavras-chave: *Polybia*, microssatélites, FISH, vespa, citogenética.

Introdução

Polybia é o gênero de vespa social mais comum da América do Sul (Richards, 1978). Essas vespas atuam na polinização de diversas plantas (Sühs et al. 2009; Fernández Corujo et al. 2010) e são predadoras de insetos atuando no controle biológico de pragas urbanas e agrícolas (Gobby e Machado, 1985, 1986; Prezoto et al. 2005). Em relação à taxonomia, não existe uma revisão atual de *Polybia*, sendo o trabalho proposto por Richards (1978) utilizado para a classificação das espécies desse gênero, porém, existe certa dificuldade com a classificação das mesmas. Segundo Richards (1978), as espécies que não se enquadram em nenhum outro gênero são classificadas como *Polybia*. Existe também dúvida sobre o monofiletismo do grupo, pois, vários subgêneros apresentam ausência de apomorfias e são sustentados por homoplasias (Carpenter et al. 2000).

Polybia possui 58 espécies que são divididas em 11 subgêneros, o maior deles é *Myrapetra* com 21 espécies (Richards, 1978). Esse subgênero “inclui as espécies cuja separação é mais problemática” devido ao grande número de polimorfismos existentes (Richards, 1978; Carpenter et al. 2000). Nove espécies classificadas neste subgênero são mais distintas entre si, assim podem ser identificadas com maior facilidade, já as 12 espécies restantes de *Myrapetra* são semelhantes à espécie *Polybia occidentalis*, por isso foram inseridas em um grupo que leva o nome da espécie: *Polybia* (gr. *occidentalis*), as espécies inseridas nele possuem diferenças estruturais muito pequenas, e a coloração do corpo, característica importante utilizada na identificação, é muito variável, podendo não justificar a separação entre elas (Richards, 1978).

Em casos como o de *P.* (gr. *occidentalis*), em que as características morfológicas são pouco diferenciáveis, o uso de outras ferramentas como a citogenética podem ser úteis (Bai et al. 2018). A citogenética pode nos mostrar diferenças no cariótipo de indivíduos, espécies ou populações (Sessions, 1996). Isso é possível através de técnicas citogenéticas que permitem a contagem do número de cromossomos, análise de sua morfologia, e também através da citogenética molecular, que já auxiliou na descrição de novas espécies, na caracterização mais precisa de espécies (Petitpierre, 1996; Christoff et al. 2000; Lukhtanov e Dantchenko, 2017; Bai et al. 2018), e na detecção de espécies crípticas (Nichols, 2001; Milhomem et al. 2008), levando a resolução de problemas taxonômicos (Bertollo, 1986; Dobigny et al. 2008).

Das 21 espécies do subgênero *Myrapetra* apenas três tem o cariótipo descrito: *P. paulista* $2n=34$, *P. occidentalis* $2n=34$ e *P. scutellaris* $2n=34$, e apesar dessas espécies

mostrarem uma constância no número de cromossomos, o gênero *Polybia* como um todo mostra uma grande variação ($n=5$ até $n=27$) (Pompolo e Takahashi, 1987; 1990; Menezes et al. 2014). Assim, o objetivo deste estudo foi caracterizar e comparar o cariótipo de sete colônias de *Polybia* pertencentes a *P.* (gr. *occidentalis*) com o intuito de obter marcadores citogenéticos que possam ser usados como caracteres auxiliares na separação das espécies do grupo.

Material e Métodos

Foram coletadas sete colônias de vespas do gênero *Polybia* (*Myrapetra*) em diferentes localidades do Brasil, dentre elas duas colônias foram de *Polybia paulista* e o restante identificadas como *P.* (gr. *occidentalis*) (Tabela 1). A identificação dos espécimes foi realizada pelo Dr. Orlando Tobias Silveira do Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, Pará e depositados na coleção científica do Apiário Central do Museu Regional de Entomologia da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

Foram utilizados gânglios cerebrais de pré-pupas para obtenção dos cromossomos mitóticos metafásicos, de acordo com a metodologia de Imai et al. (1988). Os gânglios foram inseridos em solução hipotônica colchicina (0,005%) por 90 minutos, passando para a etapa de maceração e fixação do material. As lâminas foram coradas com Giemsa (5% em tampão Sørensen). Para visualização dos padrões heterocromáticos utilizou-se o método de banda C proposto por Sumner (1972) com modificações: *P. paulista* e *P.* (gr. *occidentalis*) colônias 3, 4 e 5 (HCl 0,2M por 5 minutos, hidróxido de bário 5% a 60°C por 5 minutos, 2X SSC a 60° por 2 minutos), já para *P.* (gr. *occidentalis*) colônias 6 e 7 (HCl 0,2M por 5 minutos, hidróxido de bário 5% a 60°C por 5 minutos, 2X SSC a 60° por 1 minuto).

Para o mapeamento cromossômico dos microsatélites TAT₍₁₀₎, GA₍₁₅₎, GAG₍₁₀₎, CAA₍₁₀₎, CGG₍₁₀₎, TTAGG₍₆₎, TCAGG₍₆₎ e o rDNA 18S, utilizamos a técnica de FISH (hibridização por fluorescência *in situ*) de acordo com o protocolo de Pinkel et al. (1986) onde os cromossomos foram desnaturados em formamida 70% a 75 °C por 3 minutos. As sondas de microsatélites foram marcadas diretamente com Cy3 na extremidade 5' (Sigma St. Louis, MO, EUA).

A sonda de rDNA 18S foi obtida utilizando-se *primers* de rDNA 18S F (5'-GTCATATGCTTGTCTCAAAGA-3') e R (3'-TCTAATTTTTTCAAAGTAAACGC-5') por amplificação via PCR, desenvolvidos para a espécie de abelha *Melipona quinquefasciata* (Pereira, 2006). Essa sonda foi marcada indiretamente com

digoxigenina-11-dUTP (Roche, Mannheim, Germany) durante a amplificação. A detecção da sonda foi feita com antidigoxigenina-rodamina (Roche Applied Science) e as lâminas montadas com DAPI (Fluoroshield com DAPI- SIGMA F6057).

Utilizamos a técnica de coloração sequencial com fluorocromos para localização de regiões ricas em pares de base AT (DAPI⁺) e GC (CMA₃⁺) seguindo o protocolo proposto por Schweizer (1980) com modificações: as lâminas foram mergulhadas em DAPI (0,3µg/ml) por 30 minutos, seguida da etapa de adição de 150µl de solução de (Cromomicina A₃ 0,5 mg/ml) em cada lâmina por 45 minutos. Para a montagem das lâminas utilizamos solução de sacarose 50% e mantivemos as mesmas em estufa a 37°C por 48 horas.

Foram analisadas 10 metáfases por lâmina e 20 lâminas por colônia em microscópio Olympus BX-60 acoplado a um sistema de captura de imagens QColor Olympus®, e em microscópio de epifluorescência Olympus BX53 com a câmera DP73F Olympus usando o software Cell Sens Imaging. Os cromossomos foram medidos no programa Image-Pro Plus 4.5 e classificados de acordo com o índice relação de braços (RB = comprimento do braço maior/comprimento do braço menor) (Levan et al. 1964).

Resultados

Com relação ao número e morfologia cromossômica, *P. paulista* apresentou $2n=34$ cromossomos (2K=28M+6SM) sendo os pares 7, 8 e 11 submetacêntricos (Fig. 1). Nas colônias de *P.* (gr. *occidentalis*) o número de cromossomos variou, por isso as separamos em sp. 1 e sp. 2 (Tabela 1). *P.* sp.1 (gr. *occidentalis*) apresentou $2n=34$ (2K=28M+6SM), sendo os pares 1, 2 e 8 submetacêntricos; e *P.* sp.2 (gr. *occidentalis*) apresentou $2n=40$ (2K=36M+4SM), sendo os pares 7 e 12 submetacêntricos (Fig. 2 e 3).

A distribuição da heterocromatina variou entre as colônias analisadas. Em *P. paulista* a heterocromatina se concentrou no braço maior de um par de cromossomos e no centrômero de dois pares (Fig. 1b). Em *P.* sp.1 (gr. *occidentalis*) a heterocromatina esteve presente no centrômero de seis pares e no braço maior de um par cromossômico (Fig. 2b), e em *P.* sp.2 (gr. *occidentalis*) todos os cromossomos apresentaram regiões heterocromáticas, sendo concentrada em um dos braços em 9 pares e no centrômero de 11 pares cromossômicos (Fig. 3b).

Os microssatélites apresentaram ampla distribuição nos cromossomos, variando em quantidade e localização entre as colônias analisadas. Sinais positivos do

microsatélite TAT₍₁₀₎ foram observados em 9 pares de cromossomos na região do centrômero de *P. paulista*, sendo que em um par a marcação se estendeu para o braço maior (Fig. 1c); em 7 pares na região do centrômero em *P. sp.1* (gr. *occidentalis*) (Fig. 2c) e em 12 pares de cromossomos na região do centrômero em *P. sp.2* (gr. *occidentalis*) (Fig. 3c).

Os microsatélites GA₍₁₅₎, GAG₍₁₀₎ e CAA₍₁₀₎ se localizaram ao longo dos cromossomos na eucromatina em todas as colônias analisadas. Como a variação da distribuição desses microsatélites seguiu as regiões eucromáticas das espécies, colônias com maior quantidade de eucromatina tiveram maior distribuição desses microsatélites como blocos bem definidos (*P. paulista* e *P. sp.1* (gr. *occidentalis*)) e conseqüentemente colônias com menor quantidade de eucromatina tiveram menor distribuição desses microsatélites (*P. sp.2* (gr. *occidentalis*)) (Fig. 1d, e, f; 2d, e, f; 3d, e, f).

Não foram identificados sinais de hibridização do microsatélite CGG₍₁₀₎ em nenhuma das colônias analisadas (Fig. 1g; 2g; 3g). Os sinais positivos dos microsatélites TTAGG₍₆₎ e TCAGG₍₆₎ foram muito semelhantes entre si em todas as colônias analisadas e também apresentaram marcações na região eucromática dos cromossomos, não ficando restrita apenas às extremidades (Fig. 1h,i; 2h,i; 3h,i).

Os sinais de hibridização com a sonda de rDNA 18S na espécie *P. paulista* e em *P. sp.1* (gr. *occidentalis*) se localizaram em um par de cromossomos na região pericentromérica (Fig. 1j; 2j), enquanto que em *P. sp.2* (gr. *occidentalis*) se localizaram na região terminal do braço menor em dois pares de cromossomos (Fig. 3j).

Regiões DAPI⁺ foram observadas em regiões coincidentes com a heterocromatina em todas as colônias analisadas (Fig. 4 a, b, c). Regiões CMA₃⁺ em *P. paulista* e em *P. sp.1* (gr. *occidentalis*) foram visualizadas em um par de cromossomos na região do centrômero, já em *P. sp.2* (gr. *occidentalis*) marcaram dois pares de cromossomos na região terminal do braço curto (Fig. 4a, b, c). Todas as marcações CMA₃⁺ foram coincidentes com regiões marcadas pelo rDNA 18S.

Em *P. sp.1* (gr. *occidentalis*) foi observado em alguns indivíduos da colônia 4 e 5 um heteromorfismo morfológico com diferença de tamanho entre os cromossomos homólogos do par 14, esse par heteromórfico foi marcado com o rDNA 18S que coincidiu com as marcações CMA₃⁺ (Fig. 2k; 4b).

Discussão

Polybia (gr. *occidentalis*) engloba várias espécies que são difíceis de classificar devido a sua morfologia muito semelhante (Richards, 1978). *P. paulista* foi a única a ser identificada em nível de espécie por suas características peculiares em relação à estrutura do ninho, as demais foram classificadas como pertencentes a *P.* (gr. *occidentalis*), pois não existe uma revisão taxonômica atual para esse gênero, e a chave taxonômica atualmente usada (Richards, 1978) não é suficiente para resolver o problema das identidades dessas espécies, só sendo possível atribuir com segurança nomes às diversas formas (algumas bem distintas da forma típica) deste grupo após um estudo taxonômico revisional (Orlando Tobias Silveira - Comunicação Pessoal). Assim, o presente estudo torna-se importante não apenas no campo da citogenética, mas também na taxonomia, pois apontamos diferenças cariotípicas que podem ser usadas na diferenciação das espécies desse grupo.

Através dos resultados obtidos separamos as colônias de *P.* (gr. *occidentalis*) em duas espécies baseado inicialmente no número cromossômico, mas posteriormente observamos que elas possuem outras diferenças como na distribuição de heterocromatina, de microssatélites e do rDNA 18S. *P. sp1.* (gr. *occidentalis*) apresentou $2n= 34$ cromossomos, caracterizados com baixa quantidade de heterocromatina presente apenas em alguns cromossomos e um par cromossômico com marcações do rDNA 18S, já *P. sp.2* (gr. *occidentalis*) apresentou $2n=40$ cromossomos, heterocromatina presente em todos os cromossomos e dois pares contendo marcações do rDNA 18S. O microssatélite TAT₍₁₀₎ mostrou ser um bom marcador citogenético, e pode ser utilizado na diferenciação das espécies, pois marcou um número diferente de pares cromossômicos entre as duas espécies. Os outros microssatélites também variaram entre as espécies de acordo com a distribuição eucromática. A partir desses dados, e visto que as espécies cariotipadas do gênero não têm variações cromossômicas entre populações da mesma espécie, nós acreditamos que os indivíduos separados pertencem a espécies distintas.

Polybia paulista, mesmo tendo o mesmo número de cromossomos de *P. sp.1* (gr. *occidentalis*), apresentou diferenças na distribuição e quantidade de heterocromatina e no número de marcações do microssatélite TAT₍₁₀₎. Isso mostra que os dados citogenéticos foram essenciais na caracterização e diferenciação das colônias de *P.* (gr. *occidentalis*).

Apesar das espécies do subgênero *Myrapetra* descritas citogeneticamente até o momento apresentarem o mesmo número de cromossomos $2n=34$ (Pompolo e Takahashi, 1987; 1990; Menezes et al. 2014), a presença de $2n=40$ em *P. sp.2* (gr. *occidentalis*) mostra que o número cromossômico não é constante dentro do subgênero, além disso, as espécies do gênero como um todo apresentam grande variação cromossômica: *P. jurinei* $n=5$, *P. rejecta* $n=15$; *P. sp. 1* $n=16$, *P. sp. 2* $n=17$, *P.occidentalis* $n=17$, *P. paulista* $n=17$, *P. scutellaris* $n=17$, e *P. sericea* $n=27$ (Pompolo e Takahashi, 1987, 1990; Menezes et al. 2014), sendo portanto o $2n=40$ descrito pela primeira vez em *Polybia*.

Padrões de distribuição da heterocromatina são reportados pela primeira vez em *P. (gr. occidentalis)*, e as diferenças nestes padrões são aspectos notáveis entre as espécies estudadas, mostrando que a heterocromatina é uma característica importante na diferenciação das espécies desse grupo, assim como ocorre nas abelhas *Euglossa tonwsendi* e *Euglossa carolina* onde as variações na quantidade e localização da heterocromatina são critérios utilizados na diferenciação citogenética dessas espécies (Fernandes et al. 2013).

Regiões DAPI⁺ foram coincidentes com regiões heterocromáticas em todas as colônias de *P. (gr. occidentalis)* analisadas, já regiões CMA₃⁺ foram coincidentes com as marcações do rDNA 18S em todas as colônias analisadas, semelhante ao encontrado em outros hymenopteros como abelhas e na vespa *Trypoxylon albitarse* (Araújo et al. 2000; Rocha et al. 2002; Brito et al. 2005; Duarte et al. 2009; Cunha et al. 2018; Silva et al. 2018), o que confirma a predominância de pares de bases GC ao redor das regiões de genes ribossomais (Sumner, 2003). Menezes et al. (2014) encontraram padrões diferentes de marcações de CMA₃⁺ na espécie *P. occidentalis*, *P. rejecta* e *P. jurinei* onde marcações foram localizadas em ambas as extremidades do cromossomo, cobrindo todo um braço curto ou todo o comprimento dos cromossomos, especialmente os menores, diferente também do encontrado em *Polybia fastidiosuscula* onde as marcações ocorreram na região centromérica da maioria dos pares cromossômicos (Marchioro, 2019 – cap. 1), assim parece não existir um padrão de marcações CMA₃⁺ dentro do gênero.

Em *P. sp.1* (gr. *occidentalis*) observamos um par de cromossomos com heteromorfismo de tamanho em alguns indivíduos, esse par foi marcado pelo rDNA 18S que coincidiu também com marcações CMA₃⁺. Heteromorfismo de tamanho no par de cromossomos homólogos carregando genes ribossomais já foram relatados em

Melipona scutellaris, e *Melipona compressipes* (Rocha et al. 2002; Piccoli et al. 2018), e relacionados a (NORs) em *Melipona asilvae* e sugerem a existência de regulação gênica entre os homólogos, possivelmente envolvendo regiões organizadoras de nucléolo (NORs) (Rocha et al. 2002), que são a regiões nucleares responsáveis pela produção e processamento das diferentes subunidades ribossomais (Stephan e Walsh, 2001).

Neste estudo também mostramos que a eucromatina em *P.* (gr. *occidentalis*) tem diferentes composições evidenciadas pela riqueza de distintos microssatélites ($GA_{(15)}$, $GAG_{(10)}$, $CAA_{(10)}$, $TTAGG_{(6)}$ e $TCAGG_{(6)}$) que apresentaram ampla distribuição nos cromossomos, e foram independentes do enriquecimento de pares de base AT ou GC, assim como no gafanhoto *Abracris flavolineata* (Milani e Cabral-de-Melo, 2014). Microssatélites em regiões eucromáticas já foram observados em insetos como gafanhotos (Ruiz-Ruano et al. 2015), abelhas (Piccoli et al. 2018; Santos et al. 2018; Travenzoli, 2018) e formigas (Barros et al. 2018). Já o microssatélite $TAT_{(10)}$ diferenciou-se dos demais por estar relacionado ao centrômero de alguns pares de cromossomos, inclusive estando relacionado a heterocromatina centromérica de alguns pares cromossômicos, sugerindo que essa sequência possa desempenhar alguma função, ou fazer parte da estrutura do centrômero.

O microssatélite $CGG_{(10)}$ não marcou nenhum dos cromossomos das colônias analisadas, diferente do encontrado para *P. fastidiosuscula* que marcou o centrômero de vários pares cromossômicos (Marchioro, 2019 – cap. 1), mostrando que a distribuição desse microssatélite não segue um padrão nem mesmo em espécies do mesmo subgênero.

$TTAGG$ e $TCAGG$ são sequências encontradas nos telômeros de insetos (Vitkova et al. 2005; Mravinac et al. 2011). A sequência $TTAGG$ já foi testada em 16 espécies de Vespidae, inclusive um uma espécie do gênero *Polybia*, e revelou a ausência dessa sequência nas espécies analisadas (Menezes et al. 2013, 2017). Em nossas análises, as sequências $TTAGG_{(6)}$ e $TCAGG_{(6)}$ não marcaram o telômero dos cromossomos de nenhuma colônia de *P.* (gr. *occidentalis*), essas sequências foram coincidentes com regiões eucromáticas dos cromossomos, assim como os outros microssatélites analisados, em *P. fastidiosuscula*, as sequências $TTAGG_{(6)}$ e $TCAGG_{(6)}$ também coincidiram com marcações de outros microssatélites, não ocorrendo nos telômeros (Marchioro, 2019 – cap. 1), assim, essa é mais uma evidência de que o telômero de vespas deve ser formado por outra sequência ainda não conhecida.

As marcações do rDNA 18S em *P. paulista* e em *P. sp.1* (gr. *occidentalis*) foram semelhantes em número e localização, assim como em outras vespas como *P. fastidiosuscula*, *Metapolybia decorata*, *Metapolybia docilis* e *Metapolybia cingulata* que mostraram a conservação de genes ribossomais marcando também um par de cromossomos na região centromérica (Menezes et al. 2013; 2014; Marchioro, 2019 – cap. 1), as únicas colônias diferentes desse padrão foram em *P. sp.2* (gr. *occidentalis*) onde as marcações do rDNA 18S variaram em número e localização.

Baseado em evidências filogenéticas (Carpenter et al. 2000) e cromossômicas, Menezes et al. (2014) sugerem que *Polybia* apresenta um padrão de diminuição gradual do número cromossômico dentro do nível de subgênero, sugerindo que eventos de fusão tenham sido o principal mecanismo para essa diminuição, assim, foi visto que espécies basais tem um alto número de cromossomos e espécies derivadas menor número cromossômico. Uma possível evidencia de fusão pode ser vista através do número e localização de marcações do rDNA 18S em *P. (gr. occidentalis)*, *P. sp.2* (gr. *occidentalis*) apresentou 40 cromossomos e dois pares marcados na região terminal do braço curto, e *P. paulista* e *P. sp.1* (gr. *occidentalis*) apresentou 34 cromossomos e 1 par marcado na região centromérica. Pode ser que esses dois pares cromossômicos de *P. sp.2* (gr. *occidentalis*) tenham se fundido gerando apenas um par com marcação centromérica como em *P. paulista* e em *P. sp.1* (gr. *occidentalis*), o mesmo pode ter ocorrido com outros pares cromossômicos levando a diminuição do número de cromossomos, assim se essa hipótese é verdadeira provavelmente no decorrer da evolução a heterocromatina pode ter sido perdida nesses eventos de fusão, isso porque as fusões são frequentemente acompanhadas de uma redução na heterocromatina nos locais de fusão (Elder e Hsu, 1988).

Neste estudo evidenciamos a necessidade de uma revisão taxonômica no gênero *Polybia* e mostramos que dados citogenéticos podem ser usados como caracteres auxiliares na diferenciação das espécies de *P. (gr. occidentalis)*, ajudando na resolução dos problemas taxonômicos existentes no grupo. Também mostramos dados sobre a distribuição dos microssatélites no genoma de *P. (gr. occidentalis)*, que foram encontrados em sua maioria na eucromatina. Além disso, sugerimos uma possível evidencia de fusão cromossômica com base em marcações do rDNA 18S e no número cromossômico. Por fim mostramos que TTAGG e TCAGG não são sequências teloméricas de *P. (gr. occidentalis)*, portanto a sequência do telômero desse grupo ainda permanece desconhecida.

Referências

- Araújo, S. M., Pompolo, S. G., Dergam, J. A., & Campos, L. A. (2000). The B chromosome system of *Trypoxylon* (Trypargilum) *albitarse* (Hymenoptera, Sphecidae) 1. Banding analysis. *Cytobios*, *101*(396), 7-13.
- Bai, Q., Wang, L., Wang, Z., Lo, N., & Che, Y. (2018). Exploring the diversity of Asian *Cryptocercus* (Blattodea: Cryptocercidae): species delimitation based on chromosome numbers, morphology and molecular analysis. *Invertebrate Systematics*, *32*(1), 69-91.
- Barros, L. A. C., Teixeira, G. A., de Aguiar, H. J. A. C., Lopes, D. M., & das Graças Pompolo, S. (2018). Cytogenetic studies in *Trachymyrmex holmgreni* Wheeler, 1925 (Formicidae: Myrmicinae) by conventional and molecular methods. *Sociobiology*, *65*(2), 185-190.
- Bertollo, L. A. C., Moreira-Filho, O., & Galetti Jr, P. M. (1986). Cytogenetics and taxonomy: considerations based on chromosome studies of freshwater fish. *Journal of Fish Biology*, *28*(2), 153-159.
- Brito, R. M., das Graças Pompolo, S., Magalhães, M. F. M., de Barros, E. G., & Sakamoto-Hojo, E. T. (2005). Cytogenetic characterization of two *Partamona* species (Hymenoptera, Apinae, Meliponini) by fluorochrome staining and localization of 18S rDNA clusters by FISH. *Cytologia*, *70*(4), 373-380.
- Carpenter, J. M., Kojima, J. I., & Wenzel, J. W. (2000). *Polybia*, paraphyly, and polistine phylogeny. *American Museum Novitates*, 1-24.
- Christoff, A. U., Fagundes, V., Sbalqueiro, I. J., Mattevi, M. S., & Yonenaga-Yassuda, Y. (2000). Description of a new species of *Akodon* (Rodentia: Sigmodontinae) from southern Brazil. *Journal of Mammalogy*, *81*(3), 838-851.
- Cunha, M. S. D., Travençoli, N. M., Ferreira, R. D. P., Cassinela, E. K., Silva, H. B. D., Oliveira, F. P. M., & Lopes, D. M. (2018). Comparative cytogenetics in three *Melipona* species (Hymenoptera: Apidae) with two divergent heterochromatic patterns. *Genetics and molecular biology*, *41*(4), 806-813.
- Dobigny, G., Lecompte, E., Tatard, C., Gauthier, P., Bâ, K., Denys, C., & Granjon, L. (2008). An update on the taxonomy and geographic distribution of the cryptic species *Mastomys kollmannspergeri* (Muridae, Murinae) using combined cytogenetic and molecular data. *Journal of Zoology*, *276*(4), 368-374.

- Duarte, O. M. P., Martins, C. C. C., Waldschmidt, A. M., & Costa, M. A. (2009). Occurrence of multiple nucleolus organizer regions and intraspecific karyotype variation in *Scaptotrigona xanthotricha* Moure (Hymenoptera, Meliponini). *Genetics and Molecular Research*, 8(3), 831-839.
- Elder, F. F. B., & Hsu, T. C. (1988). Tandem fusion in the evolution of mammalian chromosomes. *The cytogenetics of mammalian autosomal rearrangements*, 481-506. In: Daniel A (ed) *The cytogenetics of mammalian autosomal rearrangements*. Alan R. Liss, New York, pp 481-506.
- Fernandes, A., Werneck, H. A., Pompolo, S. G., & Lopes, D. M. (2013). Evidence of separate karyotype evolutionary pathway in *Euglossa* orchid bees by cytogenetic analyses. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 85(3), 937-944.
- Fernández Corujo, VL, Alicia Basílio, M., & Galati, BG (2010). Teor de pólen acumulado em ninhos de *Polybia scutellaris* (Hymenoptera, Vespidae). *Grana*, 49 (4), 308-313.
- Gobbi, N., & Machado, V. L. L. (1985). Material capturado e utilizado na alimentação de *Polybia (Myrapetra) paulista* Ihering, 1896 (Hymenoptera, Vespidae). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 14(2), 189-195.
- Gobbi, N., & Machado, V. L. L. (1986). Material capturado e utilizado na alimentação de *Polybia (Trichothorax) ignobilis* (Haliday, 1836) (Hymenoptera, Vespidae). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 15, 117-124.
- 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. *The Japanese journal of genetics*, 63(2), 159-185.
- Levan, A., Fredga, K., & Sandberg, A. A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52(2), 201-220.
- Lukhtanov, V. A., & Dantchenko, A. V. (2017). A new butterfly species from south Russia revealed through chromosomal and molecular analysis of the *Polyommatus (Agrodiaetus) damonides* complex (Lepidoptera, Lycaenidae). *Comparative cytogenetics*, 11(4), 769.
- Marchioro, P. (2019). *Análises Citogenéticas em Vespas do gênero Polybia (Myrapetra) Lepeletier, 1836 (Vespidae)* (Masters dissertation), Universidade Federal de Viçosa).

- Menezes, R. S. T., Bardella, V. B., Cabral-de-Mello, D. C., Lucena, D. A., & Almeida, E. A. (2017). Are the TTAGG and TTAGGG telomeric repeats phylogenetically conserved in aculeate Hymenoptera?. *The Science of Nature*, *104*(9-10), 85.
- Menezes, R. S. T., Carvalho, A. F., Correia, J. P. S. O., Silva, T. S., Somavilla, A., & Costa, M. A. (2014). Evolutionary trends in the chromosome numbers of swarm-founding social wasps. *Insectes sociaux*, *61*(4), 385-393.
- Menezes, R. S. T., Silva, T. M., Carvalho, A. F., Andrade-Souza, V., Silva, J. G., & Costa, M. A. (2013). Numerical and structural chromosome variation in the swarm-founding wasp *Metapolybia decorata* Gribodo 1896 (Hymenoptera, Vespidae). *Genetica*, *141*(7-9), 273-280.
- Milani, D., Cabral-de-Mello, 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* (5), e97956.
- Milhomem, S. S., Pieczarka, J. C., Crampton, W. G., Silva, D. S., De Souza, A. C., Carvalho, J. R., & Nagamachi, C. Y. (2008). Chromosomal evidence for a putative cryptic species in the *Gymnotus carapo* species-complex (Gymnotiformes, Gymnotidae). *BMC genetics*, *9*(1), 75.
- Mravinac, B., Meštrović, N., Čavrak, V. V., & Plohl, M. (2011). TCAGG, an alternative telomeric sequence in insects. *Chromosoma*, *120*(4), 367-376.
- Nichols, R. (2001). Gene trees and species trees are not the same. *Trends in Ecology & Evolution*, *16*(7), 358-364.
- Pereira, J. O. P. (2006). *Diversidade genética da abelha sem ferrão Melipona quinquefasciata baseada no seqüenciamento das regiões ITS1 parcial e 18S do DNA ribossômico nuclear* (Doctoral dissertation, D. Sc. Thesis, Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, Brazil).
- Petitpierre, E. (1996). Molecular cytogenetics and taxonomy of insects, with particular reference to the Coleoptera. *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, *25*(1-2), 115-134.
- Piccoli, M. C. A., Bardella, V. B., & Cabral-de-Mello, D. C. (2018). Repetitive DNAs in *Melipona scutellaris* (Hymenoptera: Apidae: Meliponidae): chromosomal distribution and test of multiple heterochromatin amplification in the genus. *Apidologie*, *49*(4), 497-504.

- Pinkel, D., Straume, T., & Gray, J. W. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(9), 2934-2938.
- Pompolo, S. G., & Takahashi, C. S. (1987). Cytogenetics of Brazilian Polybiini wasps (Hymenoptera, Vespidae, Polistinae). *Revista Brasileira de Genética*, 10(3), 483-496.
- Pompolo, S. G., & Takahashi, C. S. (1990). Karyotype of ten species of social wasps (Hymenoptera, Polistinae, Polybiini). *Revista Brasileira de Genética*, 13(3), 469-477.
- Prezoto, F., Lima, M. A., & Machado, V. L. (2005). Survey of preys captured and used by *Polybia platycephala* (Richards) (Hymenoptera: Vespidae, Epiponini). *Neotropical Entomology*, 34(5), 849-851.
- Richards, O. W. (1978). The social wasps of the Americas, excluding the Vespinae. *British Museum (Natural History) London*.
- Rocha, M. P., Pompolo, S. D. G., Dergam, J. A., Fernandes, A., & Campos, L. A. D. O. (2002). DNA characterization and karyotypic evolution in the bee genus *Melipona* (Hymenoptera, Meliponini). *Hereditas*, 136(1), 19-27.
- Ruiz-Ruano, F. J., Cuadrado, Á., Montiel, E. E., Camacho, J. P. M., & López-León, M. D. (2015). Next generation sequencing and FISH reveal uneven and nonrandom microsatellite distribution in two grasshopper genomes. *Chromosoma*, 124(2), 221-234.
- Santos, J. M. D., Diniz, D., Rodrigues, T. A. S., Cioffi, M. D. B., & Waldschmidt, A. M. (2018). Heterochromatin distribution and chromosomal mapping of microsatellite repeats in the genome of *Frieseomelitta stingless* bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Florida Entomologist*, 101(1), 33-39.
- Schweizer, D. (1980). Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA-DAPI bands) in human chromosomes. *Cytogenetic and Genome Research*, 27(2-3), 190-193.
- Sessions, S. K. (1996). Chromosomes: molecular cytogenetics. *Molecular Systematics*, 2nd edn. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 121-168.
- Silva, A. A., Rocha, M. P., das Graças Pompolo, S., de Oliveira Campos, L. A., & Tavares, M. G. (2018). Karyotypic description of the stingless bee *Melipona quinquefasciata* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera, Meliponini) with emphasis on the presence of B chromosomes. *Comparative Cytogenetics*, 12, 471.

- Stephan, W., & Walsh, B. (2001). Repetitive DNA: evolution. *eLS*.
- Sumner, A. T. (2003). *Chromosomes: organization and function*. John Wiley & Sons.
- Sumner, A. T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*, 75, 304-306.
- Sühs, R. B., Somavilla, A., Köhler, A., & Putzke, J. (2009). Vespídeos (Hymenoptera, Vespidae) vetores de pólen de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae), Santa Cruz do Sul, RS, Brasil. *Revista Brasileira de Biociências*, 7(2).
- Travanzoli, N. M. (2018). *Citogenética Clássica e Molecular com Ênfase na Evolução Cromossômica em Meliponini* (Doctoral dissertation, Universidade Federal de Viçosa).
- Vítková, M., Král, J., Traut, W., Zrzavý, J., & Marec, F. (2005). The evolutionary origin of insect telomeric repeats,(TTAGG) n. *Chromosome Research*, 13(2), 145-156.

Tabela 1. Colônias analisadas de *P.* (gr. *occidentalis*), locais de coleta, coordenadas geográficas e número diploide ($2n$).

Nº	Local de coleta	Coordenadas Geográficas	$2n$	Espécie
1	Palotina- PR	24°16'44.0"S 53°50'46.6"W	$2n=34$	<i>P. paulista</i>
2	Palotina- PR	24°17'40.1"S 53°49'41.2"W	$2n=34$	<i>P. paulista</i>
3	Ponte Nova- MG	20°24'50.6"S 42°53'55.8"W	$2n=34$	<i>P. sp.1</i> (gr. <i>occidentalis</i>)
4	Ponte Nova- MG	20°25'04.2"S 42°54'27.3"W	$2n=34$	<i>P. sp.1</i> (gr. <i>occidentalis</i>)
5	Palmas- TO	10°12'34.1"S 48°19'22.6"W	$2n=34$	<i>P. sp.1</i> (gr. <i>occidentalis</i>)
6	Pedra do Anta- MG	20°35'49.7"S 42°42'45.8"W	$2n=40$	<i>P. sp.2</i> (gr. <i>occidentalis</i>)
7	Viçosa- MG	20°45'19.5"S 42°52'25.0"W	$2n=40$	<i>P. sp.2</i> (gr. <i>occidentalis</i>)

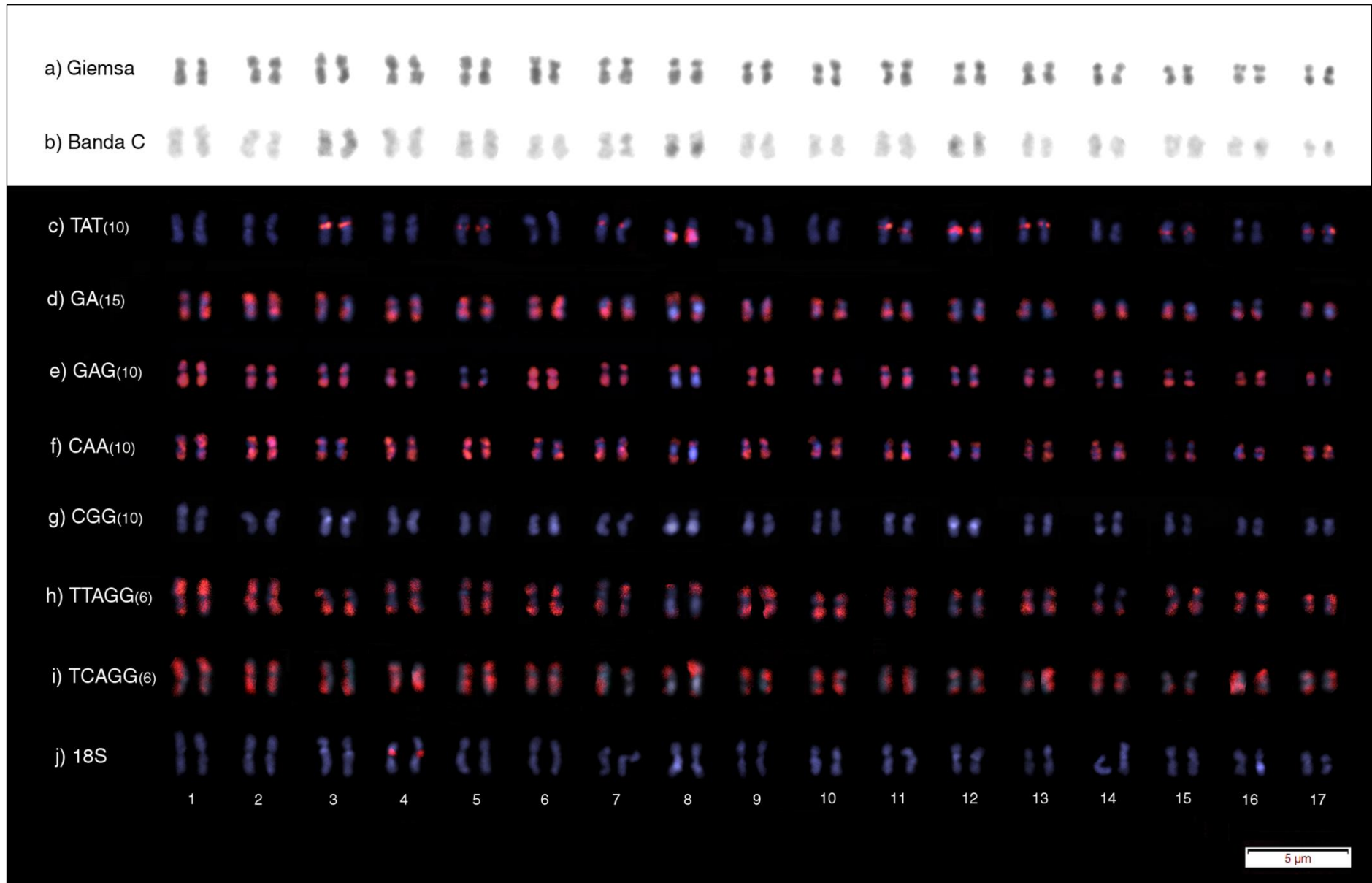


Figura 1: Cariótipo de fêmeas de *P. paulista* a) Giemsa; b) banda C c) microsatélite TAT₍₁₀₎, d) GA₍₁₅₎, e) GAG₍₁₀₎, f) CAA₍₁₀₎, g) CGG₍₁₀₎, h)TTAGG₍₆₎, i) TCAGG₍₆₎, j) rDNA 18S. Em azul, cromossomos corados com DAPI e em vermelho sondas hibridizadas.

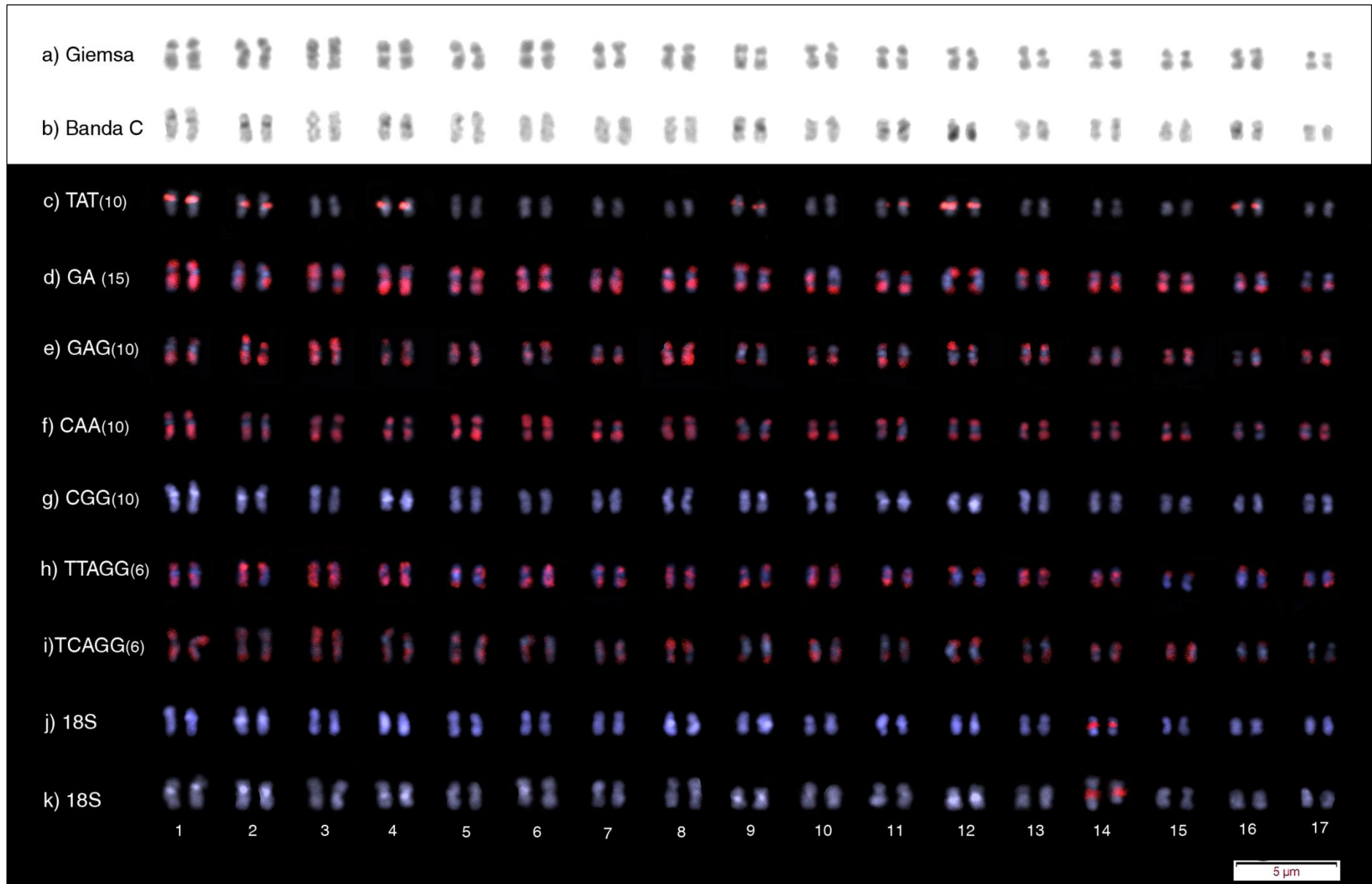


Figura 2: Cariótipo de fêmeas de *P. sp.1* (gr. *occidentalis*) a) Giemsa; b) banda C c) microssatélite TAT₍₁₀₎, d) GA₍₁₅₎, e) GAG₍₁₀₎, f) CAA₍₁₀₎, g) CGG₍₁₀₎, h)TTAGG₍₆₎, TCAGG₍₆₎, j) rDNA 18S par 14, k) rDNA 18S par 14, evidenciando o heteromorfismo. Em azul, cromossomos corados com DAPI e em vermelho sondas hibridizadas.

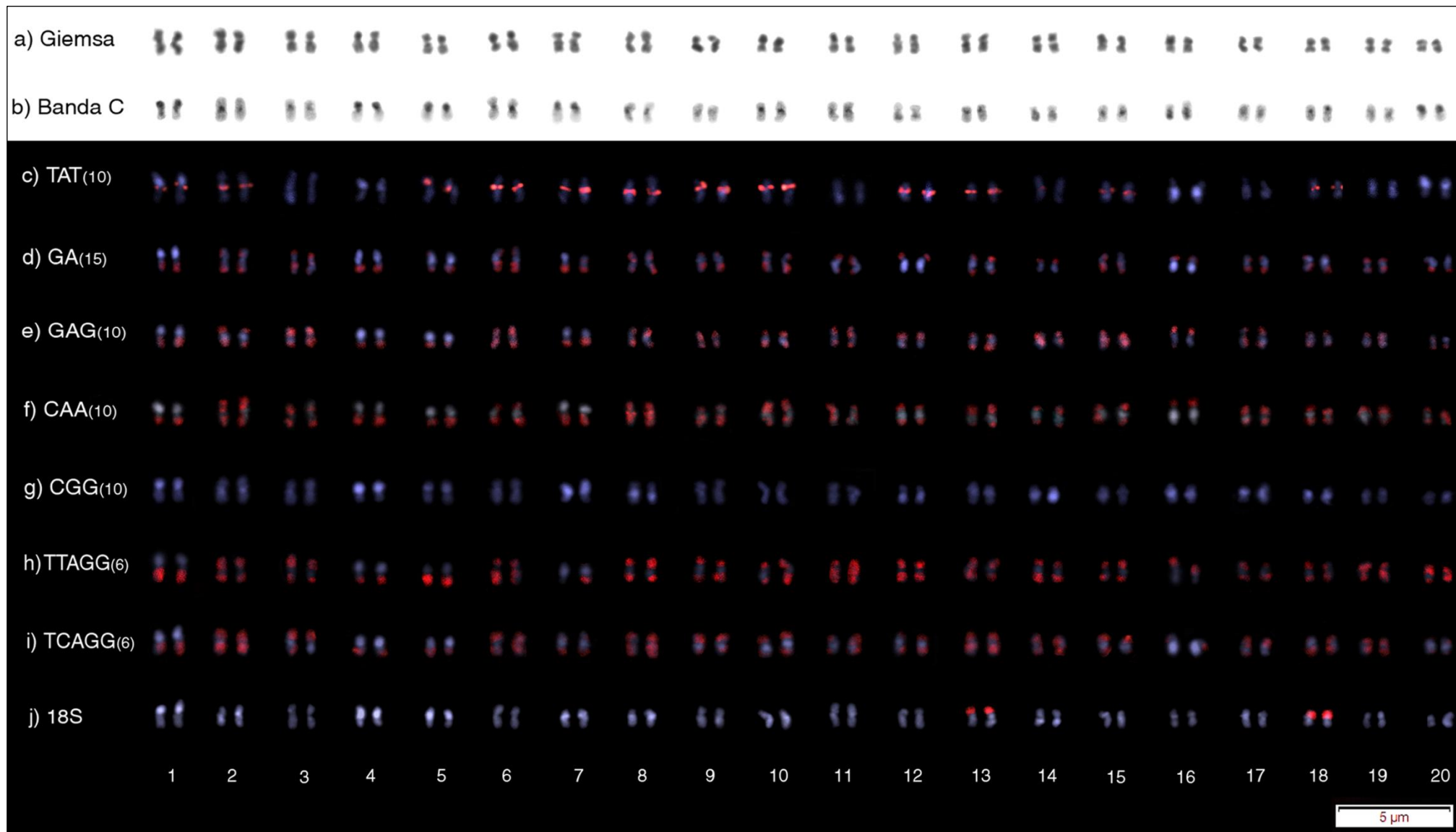


Figura 3: Cariótipo de fêmeas de *P. sp.1* (gr. *occidentalis*) a) Giemsa; b) banda C c) microssatélite TAT₍₁₀₎, d) GA₍₁₅₎, e) GAG₍₁₀₎, f) CAA₍₁₀₎, g) CGG₍₁₀₎, h)TTAGG₍₆₎, i) TCAGG₍₆₎, j) rDNA 18S. Em azul, cromossomos corados com DAPI e em vermelho sondas hibridizadas.

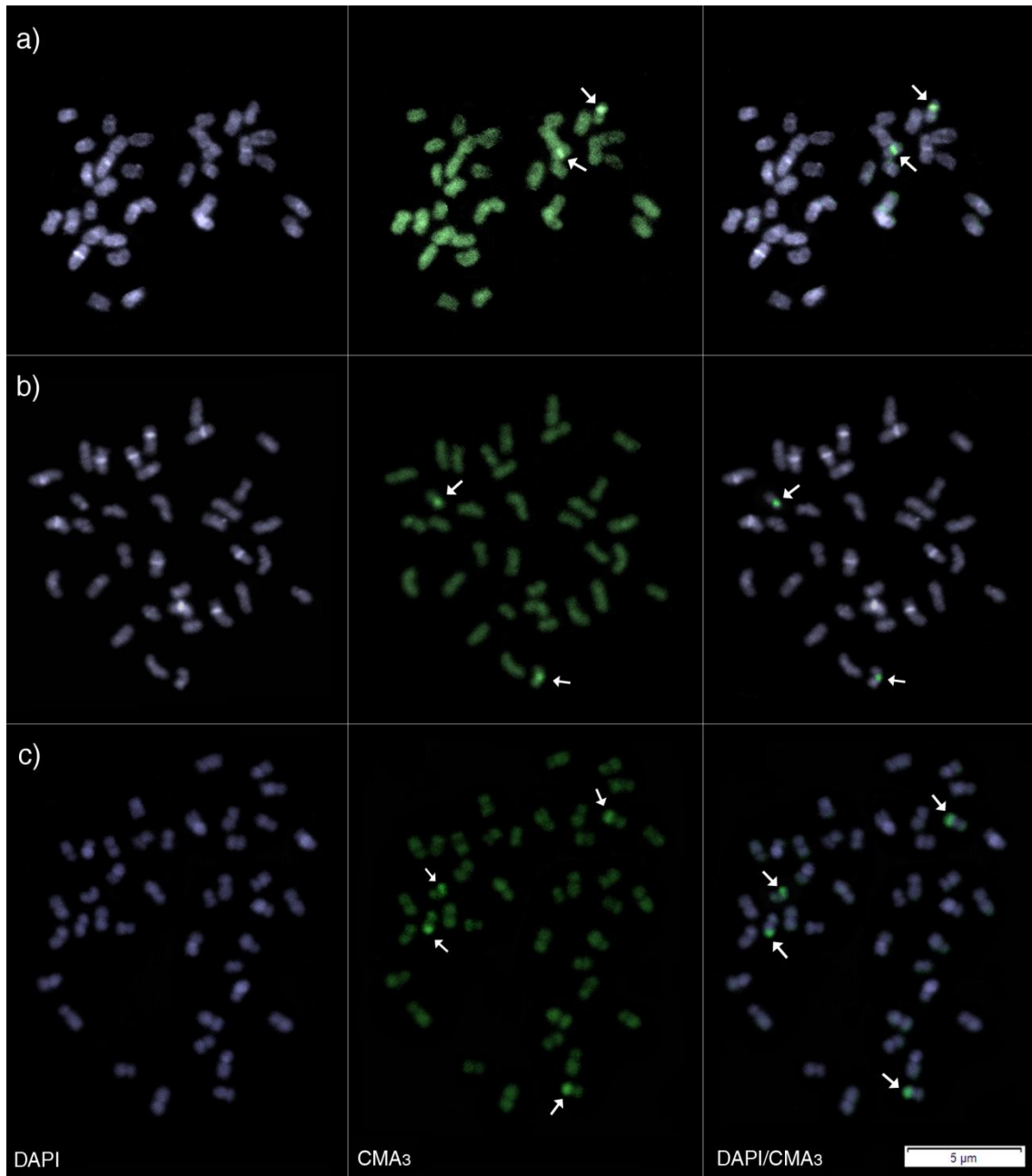


Figura 4: Cromossomos mitóticos metafásicos de fêmeas corados com DAPI, CMA₃ e DAPI/ CMA₃. a) *P. paulista*, b) *P. sp.1* (gr. *occidentalis*), c) *P. sp.2* (gr. *occidentalis*). Regiões brilhantes indicam marcações positivas. Setas indicam marcações CMA₃⁺.

4. CONCLUSÕES GERAIS

- Mostramos que as espécies do gênero *Polybia* (*Myrapetra*) são muito diferentes entre si com relação ao seu cariótipo mesmo apresentando muitas semelhanças em sua morfologia.
- Evidenciamos a necessidade de uma revisão taxonômica no gênero *Polybia* e mostramos que dados citogenéticos podem ser usadas como caracteres auxiliares na diferenciação das espécies, ajudando na resolução dos problemas taxonômicos.
- Sugerimos que o cromossomo B de *P. fastidiosuscula* tenha uma origem intraespecífica baseado no compartilhamento da composição heterocromática e do microssatélite TAT₍₁₀₎ com os cromossomos A.
- Fornecemos os primeiros dados sobre a organização de sequências de microssatélites no genoma de espécies do gênero *Polybia*, mostrando que eles podem ser encontrados tanto na heterocromatina como na eucromatina dependendo da espécie.
- Sugerimos uma evidencia de fusão cromossômica nas espécies de *P.* (gr. *occidentalis*) baseada no número de cromossomos e em marcações do rDNA 18S.
- Verificamos que as sequências TTAGG₍₆₎ e TCAGG₍₆₎ nas espécies estudadas não fazem parte do telômero desses insetos, assim a sequência telomérica de vespas ainda precisa ser investigada.