

VANDER CALMON TOSTA

MARCADOR MOLECULAR ASSOCIADO A
CROMOSSOMOS B EM *Partamona helleri*
(HYMENOPTERA, APIDAE).

Tese apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Genética e
Melhoramento, para obtenção do título
de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
AGOSTO-2001

VANDER CALMON TOSTA

MARCADOR MOLECULAR ASSOCIADO A
CROMOSSOMOS B EM *Partamona helleri*
(HYMENOPTERA, APIDAE).

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das exigências
do Programa de Pós-Graduação em Genética e
Melhoramento, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

APROVADA: 03 de agosto de 2001.

Prof. Everaldo Gonçalves de Barros
(Conselheiro)

Profa. Silvia das Graças Pompolo
(Conselheira)

Profa. Mara Garcia Tavares

Prof. José Eduardo Serrão

Prof. Lucio Antonio de Oliveira Campos
(Orientador)

“Liberdade - essa palavra
que o sonho humano alimenta:
e que não há ninguém que explique,
e ninguém que não entenda!”

Cecília Meireles

“Posso não concordar com uma palavra
que vós dizeis, mas defenderei até a morte
o direito de dizê-las.”

Voltaire

A memória do meu avô e pai
Aguinaldo Vieira Tosta

AGRADECIMENTO

À CAPES, ao CNPq e à FAPEMIG, pelo apoio financeiro.

À Universidade Federal de Viçosa, especialmente ao Departamento de Biologia Geral, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao Curso de Pós Graduação em Genética e Melhoramento, pelo incentivo.

Às três mulheres da minha vida: minha avó, Lourdes; minha mãe, Kicia e minha esposa, Marielce; por todo apoio e carinho que sempre me deram.

Ao amigo, tutor e orientador Professor Lucio Antonio de Oliveira Campos, pela confiança em mim depositada, pelos “altos papos” e pela experiência de vida passada.

À professora Sílvia das Graças Pompolo por todo apoio, pelas idéias e aconselhamento.

Ao professor Everaldo Gonçalves de Barros pela oportunidade de trabalhar no laboratório de Genética Molecular de Plantas, pelas sugestões e pelo interesse.

À professora Elza Fernandes de Araújo pela oportunidade de trabalhar no laboratório de Genética de Microorganismos e pelo exemplo de profissionalismo a ser seguido.

À professora Tânia Maria Fernandes Salomão, minha primeira orientadora, pelo apoio incondicional, sem o qual este trabalho não teria sido concluído, também, a todo pessoal do laboratório de Genética de Microorganismos, em especial a Denise e Patrícia.

À professora Mara Garcia Tavares, pelas idéias, pelo interesse e pela disposição em ajudar sempre.

A todos com os quais trabalhei nestes anos; seja no laboratório de Biologia Molecular do DBG, no laboratório de Citogenética de Insetos, no laboratório de Genética Molecular de Plantas ou no Apiário. Em especial, a Dra. Ana Maria Waldschmidt pela amizade e, principalmente, pela ajuda e paciência no aprendizado das técnicas de Biologia Molecular; a Rute Magalhães Brito pelo incentivo e ajuda no aprendizado das técnicas de citogenética, ao Pedro Ivo Vieira Good-God pela amizade e apoio durante o estágio no laboratório de Genética Molecular de Plantas, a Mariana ,André e Lenira pela amizade e “altos papos” acompanhados de iguarias baianas.

Aos amigos de República; Pablo, Samuel e Márcio pelo apoio de sempre.

Aos colegas do curso de Genética e Melhoramento; Eduardo, Ricardo, Policárpio, Nair, João, Ana Paula e Gisele pela ajuda nas horas mais difíceis.

Aos colegas de PET, pela amizade e por todo o aprendizado que me proporcionaram, em especial à Lucia “Mala”, Gabriel, Dercy, e Francismar.

A todos meus tios e primos, em especial à meus padrinhos; Tia Zicia, pelos conselhos e Tio Márcio, pelo apoio; e também ao meu Tio Joaquim, que mesmo sem saber, me ensinou que a humildade pode ser uma grande virtude do ser humano.

A toda a “galera” de Sete Lagoas: Podrão, Sô zé, Chicão, Geovani , Leo, Tercinho, Flavinho, Titão, Juliano, o pessoal do “skate” e do “heavy-metal” e o pessoal da Igreja Mormón. Sem essa “galera”, eu nunca teria adquirido o senso crítico que tenho hoje e, com certeza, não estaria tentando me tornar um cientista.

Enfim, a todos que, de alguma forma, contribuíram para que este trabalho se concretizasse.

BIOGRAFIA

VANDER CALMON TOSTA, filho de Maria de Lourdes Calmon Tosta e Aguinaldo Vieira Tosta, nasceu em 24 de fevereiro de 1975, em Sete Lagoas, Minas Gerais.

Em agosto de 1999, graduou-se bacharel e licenciado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Viçosa, tendo participado do grupo PET/CAPES (Programa Especial de Treinamento) a partir de novembro de 1995, ano que ingressou no curso, até a colação de grau, sob orientação do Prof. Lucio Antonio de Oliveira Campos.

Em agosto de 1999, ingressou no curso de Mestrado em Genética e Melhoramento na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese em 03 de agosto de 2001.

INDÍCE

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. O que são cromossomos B?.....	1
1.2. Qual a origem do cromossomo B?.....	2
1.3. Evolução molecular e estrutura dos cromossomos B.....	6
1.3.1. Evolução molecular dos cromossomos B.....	6
1.3.2. Estrutura dos cromossomos B.....	7
1.4. Os cromossomos B em Hymenoptera.....	11
1.5. Os cromossomos B em <i>Partamona</i> (Hymenoptera, Apidae).....	13
1.6. Usos de técnicas de genética molecular no estudo dos cromossomos B.....	14
1.6.1. Uso de técnicas de hibridização para estudo dos cromossomos B.....	14
1.6.2. Uso de marcadores RAPD para estudo dos cromossomos B.....	16
1.7. Objetivos.....	17
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19

2.1. Colônia de <i>Partamona helleri</i> utilizada no estudo.....	19
2.2. Extração do DNA.....	19
2.3. Amplificação do DNA genômico.....	20
2.4. Identificação de novos marcadores RAPD associados a cromossomos B em <i>Partamona helleri</i>	21
2.5. Purificação e clonagem do marcador RAPD associado a cromossomos B.....	22
2.6. Seqüenciamento e análise do marcador RAPD clonado.....	23
2.7. “Southern Blot”	24
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
3.1. Marcadores moleculares RAPD associados a cromossomos B.....	27
3.2. Obtenção de clones do marcador RAPD associado aos cromossomos B.....	29
3.3. Verificação da homologia entre os clones e o marcador RAPD associado a cromossomos B por “Southern Blot”.....	34
3.4. Análise da seqüência do marcador molecular RAPD associado aos cromossomos B.....	37
4. RESUMO E CONCLUSÕES.....	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44

RESUMO

TOSTA, Vander Calmon, M. S., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2001.
Marcador Molecular associado a cromossomos B em *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae). Orientador: Lucio Antonio de Oliveira Campos.
Conselheiros: Everaldo Gonçalves de Barros e Silvia das Graças Pompolo.

Cromossomos B são cromossomos extras ao complemento normal, dispensáveis e que seguem suas próprias vias evolutivas, ou seja, têm um padrão de herança distinto do usual (mendeliano) entre os indivíduos que os carregam. Eles podem se originar tanto intraespecificamente, a partir de quebra dos cromossomos do complemento normal, como interespecificamente, por transposição ou hibridação interespecífica. Estes cromossomos possuem uma característica típica resultante da sua evolução molecular, que os torna heterocromatinizados, com acúmulo de seqüências repetitivas e elementos transponíveis, às vezes possuindo genes que podem ter efeitos diretos ou indiretos no “fitness” dos indivíduos que os apresentam. Em *Partamona helleri* foram encontrados indivíduos com até quatro cromossomos B. No intuito de obter informações sobre a origem e estrutura dos cromossomos B dessa espécie foi utilizada a técnica de RAPD para se isolar fragmentos de DNA

associados a esses cromossomos. Verificou-se que a técnica de RAPD é útil para detectar seqüências específicas dos indivíduos portadores de cromossomos B. Um marcador RAPD associado aos cromossomos B em *Partamona helleri*, identificado previamente, foi isolado, clonado e seqüenciado. Os clones obtidos serão muito importantes para a construção de uma sonda específica para cromossomos B em *Partamona helleri*. Isto permitirá posterior hibridização *in situ* dessa sonda no genoma desta espécie e de outras relacionadas fornecendo dados sobre a origem dos cromossomos B. Um dos clones do marcador RAPD associado aos cromossomos B isolado foi seqüenciado. Uma análise desta seqüência mostrou que a mesma não codifica nenhuma proteína conhecida, não apresenta homologia com nenhuma outra seqüência específica de cromossomos B e possivelmente é característica de regiões de DNA repetitivo desses cromossomos de *Partamona helleri*.

ABSTRACT

TOSTA, Vander Calmon, M. S., Universidade Federal de Viçosa, August 2001.
Molecular marker joined with B chromosomes in *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae). Adviser: Lucio Antonio de Oliveira Campos.
Committee members: Everaldo Gonçalves de Barros e Silvia das Graças Pompolo.

B chromosomes are additional dispensable chromosomes that follow their own evolutionary pathway showing an unusual pattern of heredity (non-mendelian) among the individuals that carry them. The B chromosomes could be arisen intraespecifically as fragments of normal chromosomes, or interespecifically for transposition or hybridization. The typical morphological traits of these chromosomes are results of their molecular evolution that become them heterochromatic, with repeated sequences and transposable elements, sometimes show genes affecting directly or indirectly the fitness of the individuals. *Partamona helleri* presented at most for chromosomes B per individual. In order to obtain information about the origin and structure of the B chromosomes of *Partamona*

helleri was used a RAPD technical to isolated DNA fragments joined with these chromosomes. The work verified RAPD technical is useful to detect specific sequences of the individual with B chromosomes. One RAPD marker joined with B chromosomes in *Partamona helleri*, previously identified, was isolated, cloned and sequenced. The clones got will be so important to make specific probe to B chromosomes in *Partamona helleri*. This becomes possible *in situ* hybridization of this probe in the genome of this specie and other related species supply information about the origin of the B chromosomes. One of the clones of the RAPD marker joined with B chromosomes isolated was sequenced. Analysis of this sequence showed that it does not codify any protein known, does not present homology with any other B chromosome specific sequence and probably it is characteristic of repetitive DNA regions of the *Partamona helleri* B chromosomes.

1. INTRODUÇÃO

1.1. O que são cromossomos B ?

O termo cromossomo B foi usado pela primeira vez por Randolph (1928) para identificar cromossomos extras em milho, que não seriam duplicação de nenhum dos cromossomos do complemento normal. Sua descoberta, entretanto, pode ser creditada a Stevens (1908) o qual descreveu a presença de pequenos cromossomos, em número variável, nas populações das espécies de Coleóptera *Diabrotica soror* e *Diabrotica punctata*. Wilson (1906) já tinha utilizado o termo para cromossomos extras em insetos Hemípteras, do gênero *Methapodi*, entretanto ele não tinha uma amostra populacional ampla que confirmasse seus dados (JONES, 1995).

Diferentes nomes são utilizados para denominar estes cromossomos, como supranumerários, acessórios, fragmentos extracromossômicos ou somente B, que é, hoje em dia, o termo padrão e segundo (JONES, 1995) o mais conveniente de ser utilizado.

Atualmente, sabe-se que cromossomos B são encontrados amplamente em espécies vegetais, animais e fungos. Estima-se a sua ocorrência em aproximadamente 15 por cento das espécies vivas descritas, sendo que a cada ano são descobertas mais ocorrências dos mesmos (BEUKEBOOM, 1994). Segundo BEUKEBOOM (1994), eles sempre foram definidos como: extras ao conjunto cromossômico normal (cromossomos A); dispensáveis; normalmente menores que os cromossomos A; herdados de modo não mendeliano; heterocromatinizados; não carreadores (ou raramente) de região organizadora de nucléolo; mitoticamente instáveis, resultando em frequências variadas em diferentes órgãos, no mesmo indivíduo; que reduzem a fertilidade e o crescimento quando em número elevado; e que não apresentam genes com efeitos principais. Segundo CAMACHO et al. (2000), uma definição mais atual e simplificada para este tipo de cromossomo seria: “cromossomos extras ao conjunto cromossômico normal, dispensáveis, que seguem suas próprias vias evolutivas, ou seja, têm um padrão de herança distinto do usual (mendeliano) entre os indivíduos que os carregam”. JONES (1995) apresenta uma definição semelhante a esta. Ele define os cromossomos B como: “cromossomos dispensáveis, os quais não recombina com nenhum outro membro do complemento cromossômico A e têm padrão irregular e não mendeliano de herança”.

1.2. Qual a origem dos cromossomos B?

A origem e evolução dos cromossomos B permaneceram obscuras desde sua descrição por Wilson em 1906. Somente nas últimas duas décadas, principalmente com o desenvolvimento das técnicas de genética e citogenética molecular, foi possível obter um panorama um pouco mais claro sobre estes aspectos (BEUKEBOOM, 1994).

Atualmente, considera-se que cromossomos B de diferentes espécies possam ter origens distintas, podendo se originar tanto intraespecificamente como interespecificamente. Contudo, apontar a origem do DNA progenitor desses cromossomos, nem sempre é possível (CAMACHO et al., 2000).

Os cromossomos B, que se originam intraespecificamente, são originados a partir de quebra de cromossomos do complemento normal. Esta quebra pode ser a partir de cromossomos autossomais ou sexuais (CAMACHO et al., 2000). Os exemplos mais comuns referem-se às quebras a partir dos cromossomos autossomais como: nas espécies vegetais; *Crepis capillaris* (JAMILENA et al., 1994, 1995); centeio (*Secale cereale*) (BLUNDEN et al., 1993), (CUADRADO & JOUVE, 1994), (WILKES et al., 1995), (HOUBEN et al., 1996) e (ZHANG et al., 1999); milho (*Zea Mays*) (ALFENITO & BICHLER, 1993) e (STARK et al., 1996); *Brachycome dichromosomatica* (LEACH et al., 1995), (DONALD et al., 1995), (FRANKS et al., 1996) e (HOUBEN et al., 1997a, 1999); em insetos, (*Drosophila subsilvestris*) (GUTKNECHT et al., 1995); em peixes, (*Astyanax scabripines*) (NÉO et al., 2000); em répteis, (*Dicoptodom tenebrosus*) (BRINKMAN et al., 2000) e em mamíferos (*Pteauroides volans*) (McQUADE et al., 1994), (*Reithrodontomys megalotis*) (PEPPERS et al., 1997).

No que tange a origem dos cromossomos B a partir de cromossomos sexuais, deve-se salientar que ela pode acontecer tanto em sistemas em que não há heteromorfismo entre os cromossomos sexuais, quanto em sistemas onde há heteromorfismo. Como exemplo de origem a partir de cromossomos sexuais não heteromórficos pode-se citar os supranumerários do gafanhoto *Eyprepocnemis plorans* – XX/XO - (LÓPEZ-LEÓN et al., 1994). Quando os cromossomos sexuais são heteromórficos, teoricamente, os cromossomos B poderiam se originar tanto do cromossomo sexual que determina o sexo homogamético, quanto do cromossomo sexual que determina o sexo heterogamético. Na prática, contudo, só se registraram casos em que o cromossomo B se originou a partir do cromossomo que determina o

sexo heterogamético como: em insetos Diptera (*Glossina spp.*) (AMOS & DOVER, 1981) e em anfíbios (*Leiopelma hochstetteri*) (SHARBEL et al., 1998).

Casos em que ocorre origem interespecífica dos cromossomos B são bem mais raros. Nestes casos, a origem dos cromossomos B deve-se a transposição ou hibridação interespecífica. Há na literatura apenas três exemplos que apontam esta origem: em plantas do gênero *Coix* (SAPRE & DESPHANDE, 1987); em peixes (*Poecilia formosa*) (SHARTL et al., 1995) e em insetos Hymenoptera (*Nasonia vitripennis*) (McALLISTER & WERREN, 1997); nestes exemplos, a origem se dá por hibridação interespecífica. Entretanto, é importante salientar que, mesmo tendo origem por hibridação, estes cromossomos podem ter em sua composição seqüências derivadas de elementos transponíveis, como em *Nasonia vitripennis* (McCALLISTER, 1995) e (McALLISTER & WERREN, 1997).

Pode-se questionar como os autores chegam a conclusão de que um dado cromossomo B, de uma dada espécie, tem esta e não aquela origem. Como já foi dito, a descoberta da origem dos cromossomos B só se tornou possível a partir do desenvolvimento de avançadas técnicas de genética molecular e citogenética molecular. BEUKEBOOM (1994) aponta algumas das técnicas usadas para a detecção da origem dos cromossomos supranumerários: “southern blot”, hibridização “in situ”, hibridização substrativa, hibridização cruzada de micro-clone, diversos métodos baseados em PCR (Polymerase chain reaction), análise de seqüências.

CAMACHO et al. (2000), afirmam que essas técnicas provêm evidências para origem dos cromossomos B. Eles dividem essas evidências em cinco categorias:

- 1) padrão de bandejamento similar entre os cromossomos B e os do complemento normal, como em insetos Dípteras, *Chironomus plomosus* (KEYL & HÄGELE, 1971);

2) seqüências de DNA repetitivas dos cromossomos B encontradas também nos cromossomos A, como: em plantas, *Crepis capillaris* (JAMILENA et al., 1995); centeio (*Secale cereale*) (BLUNDEN et al., 1993), (CUADRADO & JOUVE, 1994), e (HOUBEN et al., 1996); milho (*Zea Mays*) (ALFENITO & BICHLER, 1993) e (STARK et al., 1996); *Brachycome dichromosomatica* (LEACH et al., 1995), (FRANKS et al., 1996) e (HOUBEN et al., 1997a, 1999); em insetos, (*Drosophila subsilvestris*) (GUTKNECHT et al., 1995) e (*Glossina spp.*) (AMOS & DOVER, 1981); em répteis, (*Dicoptodom tenebrosus*) (BRINKMAN et al., 2000); em mamíferos, (*Pteauroides volans*) (McQUADE et al., 1994);

3) seqüências de DNA repetitivas dos cromossomos B não encontradas nos cromossomos A, mas presentes em espécies relacionadas, como em plantas do gênero *Coix* (SAPRE & DESPHANDE, 1987), em peixes (*Poecilia formosa*) (SHARTL et al., 1995) e em insetos Hymenoptera (*Nasonia vitripennis*) (McALLISTER & WERREN, 1997);

4) observação direta da origem de fragmentos cromossômicos em cruzamentos interespecíficos, como em plantas do gênero *Coix* (SAPRE & DESPHANDE, 1987) e em peixes (*Poecilia formosa*) (SHARTL et al., 1995);

5) relações filogenéticas dos elementos transponíveis compartilhada pelos cromossomos B com o complemento normal (intra e interespecificamente) (McALLISTER, 1995) e (McALLISTER & WERREN, 1997).

1.3. Evolução molecular e estrutura dos cromossomos B

1.3.1. Evolução molecular dos cromossomos B

No início dos estudos sobre cromossomos B imaginava-se que eles fossem bastante semelhantes em seqüência e estrutura com os cromossomos que lhes davam origem de modo que, eles pudessem formar sinapses e recombinar com os mesmos. Entretanto, estudos mais recentes indicam que esses cromossomos, ao se originarem, modificam rapidamente sua estrutura, em algumas gerações, impedindo a sinapse com o seu “progenitor” de modo a seguir suas próprias vias evolutivas, isolando-se do resto do genoma (CAMACHO et al., 2000).

CAMACHO et al. (2000) perguntam: se um novo cromossomo B origina-se de outro cromossomo, o que inibe inicialmente a sinapse entre os dois cromossomos relacionados e permite que o cromossomo B inicie sua jornada de evolução independente? Embora a resposta a esta questão continue obscura, dados como os obtidos por LANGDON et al. (2000) em centeio (*Secale cereale*), mostram que os cromossomos B podem, ao se originar, estarem restritos a tecidos, ou linhagens celulares não ligados á reprodução e, portanto não serem herdados, de modo que eles seriam gerados *de novo* a cada geração a partir dos autossomais sem disjunção, até se tornarem unidades independentes. Além disso, eles seriam heteropcnóticos e não se pareariam com os cromossomos A. Isto sugere a presença de mecanismos celulares, que, podem causar rápida heterocromatinização dos elementos extras como sugerido por THOMAS (1995) constituindo a base para diferenciação dos cromossomos B e, posteriormente, para sua evolução independente.

Recentemente, ARAÚJO et al. (2001) apresentaram um dado extremamente interessante sobre a evolução dos cromossomos B. Eles mostraram que, na vespa *Trioxylon albitarse*, os cromossomos B regularizaram seu comportamento meiótico e limitaram seu número a um cromossomo por genoma haplóide, indicando que

seria possível após anos de evolução independente, uma integração destes cromossomos ao complemento normal.

CAMACHO et al. (2000) afirmam que subsequente ao isolamento sináptico, cromossomos B de ambos os tipos de origem (intra e interespecífica) seguem processos similares de evolução molecular. Os cromossomos B, então, convergem para uma morfologia degenerada característica. Dessa forma as suas características seriam mais um reflexo destes processos de evolução molecular que do modo como foram originados (GREEN, 1990).

É possível caracterizar quatro processos de evolução molecular que moldam os cromossomos B:

- 1) o acúmulo de seqüências repetitivas de DNA pelo cromossomo B, com subsequente isolamento meiótico através de uma mudança conformacional na estrutura do seu DNA (heterocromatinização);
- 2) a origem do cromossomo B em regiões organizadoras de nucléolo (NOR), podendo esse cromossomo perder seu rDNA em recombinações intracromossômicas o que não acontece com os cromossomos do complemento normal;
- 3) o acúmulo de elementos transponíveis pelos cromossomos B, alterando sua estrutura e silenciando genes que os mesmos carregam do cromossomo progenitor;
- 4) mudanças epigenéticas nos cromossomos B, como metilação e acetilação, que controlam a sua expressão (CAMACHO et al., 2000).

1.3.2. Estrutura dos cromossomos B

Os processos de evolução molecular irão conferir aos cromossomos B a sua estrutura característica. Em geral os cromossomos B são menores que os cromossomos A, com tamanho de $\frac{1}{4}$ a $\frac{3}{4}$ do tamanho destes cromossomos. Estes minúsculos cromossomos, também, diferem dos cromossomos A no que diz respeito

à posição do centrômero, de modo que são facilmente identificados nas células mitóticas (JONES, 1995).

Além disso, JONES (1995) salienta que eles são geralmente heterocromáticos e que, a variação da heterocromatina nos cromossomos B é muito maior que no complemento normal e há casos em que os B são menos heterocromatinizados que os cromossomos A.

Para melhor entender a estrutura final dos cromossomos B moldada pelos processos de evolução molecular JONES (1995) diz ser pertinente perguntar: os cromossomos B possuem genes? Durante algum tempo, a resposta categórica era, não (JONES & REES, 1982). Porém, nos últimos anos, vários autores mostraram a presença de genes nos cromossomos B, como: os que codificam rRNA em plantas, *Brachycome dichrosomatica* (DONALD et al., 1995) e *Crepis capillaris* (JAMILENA et al., 1994); os envolvidos na organização de nucléolo (NOR) no gafanhoto *Eyprepocnemis plorans* (CABRERO et al., 1987), genes para virulência em fungo *Nectria haematococa* (MIAO et al., 1991) e genes da esterase em centeio (*Secale cereale*) (BANG & CHOI, 1990).

Segundo CAMACHO et al. (2000), os cromossomos B apresentam vários efeitos nos indivíduos que os carregam. Contrastando com o que se acreditava antigamente, esses cromossomos apresentam genes que podem ser expressos, como os ribossomais, e os efeitos dos cromossomos B no “fitness” dos organismos, muitas vezes, estão relacionados aos produtos desses genes, como o controle da resistência à “ferrugem” propiciada pelos cromossomos B em aveia (*Avena sativa*) (Dherawattana & Sadanaga, 1973 *apud* CAMACHO et al., 2000).

O gene, da família gênica dos citocromos P-450 (*Pd*,); presente em cromossomos B do fungo patogênico *Nectria haematococa*, isolado por MIAO et al. (1991); pode ser considerado o primeiro gene conhecido de um cromossomo B. Este gene é responsável pela desintoxicação da fitoalexina pisantina um composto antimicrobiano, produzido pela ervilha (*Pisum sativum*) que é nocivo ao fungo. Este trabalho mostra não só que os cromossomos B podem ter genes funcionais, como

estes genes podem influenciar no “fitness” dos indivíduos, pois os fungos que apresentam tais cromossomos são resistentes a ação da fitoalexina, gerando variação patogênica em *Nectria*.

Além dos efeitos diretamente relacionados aos genes, principalmente aos ribossomais, CAMACHO et al. (2000), afirma que existem amplas evidências de que os cromossomos B, indiretamente, podem afetar um vasto número de processos celulares e fisiológicos, tanto em plantas quanto em animais.

Todavia, CAMACHO et al. (2000) chamam atenção para o fato de que estes efeitos raramente se manifestam no fenótipo externo. como por exemplo em *Allium schoenoprasum*, espécie onde plantas que possuem cromossomos B, apresentam em condição de “stress hídrico”, vantagem, pois necessitam de menos água para germinar que as plantas sem estes cromossomos (PLOWMAN & BOUGORD, 1994), ou na espécie de Díptera *Chironomus plumosus*, onde os indivíduos que apresentam cromossomos B são mais adaptados a condições de poluição extrema (MICHAILOVA & METTINEN, 2000).

Geralmente, os efeitos se restringem ao fenótipo interno, celular, como constatado em milho (*Zea Mays*) onde a presença dos cromossomos B altera a frequência de quiasmas (CARLSON, 1993), ou no gafanhoto *Eyprepocnemis plorans* no qual os cromossomos B afetam a expressão das regiões organizadoras de nucléolo dos autossomos (CABRERO et al., 1987).

Na vespa parasitóide *Nasonia vitripennis*, o efeito da presença do cromossomo B, também chamado de PSR (“Paternal Sexual Ratio”), é drástico. Este é carregado pelos machos e, após a fertilização de um óvulo, por um mecanismo ainda desconhecido, este cromossomo PSR induz a fragmentação e eliminação do resto do genoma paterno, restando então apenas o conjunto cromossômico materno e o próprio B, o que leva à eclosão de machos PSR, pois o sistema de determinação de sexo dessa espécie é do tipo partenogênese arrenótoca. Assim, a razão sexual que normalmente seria de 90% de fêmeas e 10% de machos, passa a ser de 90% machos PSR, originados dos ovos nos quais o genoma paterno foi eliminado (apresentando o

cromossomo B) e 10% machos normais, originados a partir dos 10% de ovos que normalmente não são fecundados nessa espécie (WERREN, 1991).

Aparentemente, a maioria dos genes encontrados nos cromossomos B não é expresso. Todavia, CAMACHO et al. (2000) afirmam que a inatividade dos cromossomos B não deve ser somente considerada em termos de não codificação ou não transcrição do DNA, mas, também, em termos da formação de complexos do DNA com proteínas ou outras moléculas orgânicas, os quais podem afetar e serem afetados pela estrutura física da cromatina. Como exemplos pode-se citar o trabalho de HOUBEN et al. (1997b), que mostra que os cromossomos B em *Brachycome dichrosomatica* são desacetilados em relação aos cromossomos do complemento normal e, em conjunto com a replicação tardia dos supranumerários, tornam-se geneticamente inertes; e os trabalhos de LÓPEZ-LEÓN et al. (1991, 1995 a,b) com o gafanhoto *Eyprepocnemis plorans*, LEACH et al. (1995) com *Brachycome dichrosomatica* e NEVES et al. (1992) em centeio (*Secale cereale*) que mostram um certo controle da expressão dos cromossomos B por meio de metilação.

CAMACHO et al. (2000) concluíram que, apesar de alguns cromossomos B apresentarem efeitos diretos ou indiretos no “fitness”, muito mais pesquisas são necessárias para se aceitar como verdadeira a opinião geral, que se tem hoje, de que todos os cromossomos B apresentam genes ativos. Além disso, ele enfatiza que os efeitos dos cromossomos B dependem das condições ambientais nas quais populações que os carregam se encontram e assim, esses efeitos podem apresentar variação tanto temporal quanto espacial.

Além de genes, as pesquisas utilizando técnicas de genética molecular e citogenética molecular, a partir da década de noventa, permitiram identificar várias seqüências específicas dos cromossomos B. Estas seqüências são em geral responsáveis pela heterocromatinização dos cromossomos B após a sua origem, sendo ricas em adenina e timina e, em geral, apresentam seqüências repetitivas (JONES, 1995).

Há vários estudos onde se isolou e sequenciou alguma porção dos cromossomos B. Em plantas *Crepis capilaris* JAMILENA et al. (1994) isolaram uma sequência nos cromossomos B homóloga a regiões teloméricas dos cromossomos A; em centeio (*Secale cereale*), foram isoladas duas sequências repetitivas, uma de 1.1 e outra de 3.9kb, específicas dos cromossomos B (SANDERY et al., 1990), (BLUNDEN et al., 1993); em milho (*Zea Mays*) (ALFENITO & BICHLER, 1993), (STARK et al., 1996) isolaram sequências homólogas a regiões centroméricas e a retrotransposons respectivamente; no gafanhoto *Eyprepocnemis plorans* (LÓPEZ-LEÓN et al., 1995c) isolaram uma sequência repetitiva.

Na vespa parasitóide *Nasonia vitripennis* várias sequências foram isoladas, três famílias de sequências repetitivas (171-214pb) específicas dos cromossomos B e uma família de sequências repetitivas (94pb) homólogas com os cromossomos do complemento normal (EICKBUSH et al., 1992), além de uma sequência identificada como sendo um retrotransposon, denominado de NATE (“*Nasonia* transposable element”), encontrado no genoma de espécies relacionadas (McCALLISTER, 1995), (McCALLISTER & WERREN, 1997).

1.4. Os cromossomos B em Hymenoptera

A ordem Hymenoptera, na qual se encontram insetos bastante conhecidos, como abelhas, formigas e vespas, tem sido alvo de vários estudos, principalmente devido à presença entre estes, desde espécies solitárias e parasitas, até espécies com um elevado e intrincado nível de sociabilidade, o que os torna um modelo único para o estudo de evolução do comportamento social (WILSON, 1975). Além disso, grande interesse é despertado também pelo fato de, a esta ordem pertencerem os principais grupos de parasitóides (Calcidoidea e Ichneumoidea) e de polinizadores

(Apoidea). Diversos Hymenoptera têm grande importância econômica: abelhas, pela produção de mel, como *Apis mellifera* e *Tetragonisca angustula*; formigas cortadeiras, pelo dano causado a diversas culturas; entre outros. Do ponto de vista genético, essa ordem representa um interessante objeto de estudo, visto que a maioria de suas espécies apresenta sistema de determinação de sexo bastante peculiar, a partenogênese arrenótoca, em que as fêmeas são originadas de ovos fertilizados e são diplóides e os machos, de ovos não fertilizados sendo, portanto haplóides.

Até o momento, a respeito de cromossomos B, há poucos trabalhos na ordem Hymenoptera. Em formigas, IMAI (1974) encontrou de 1 a 12 cromossomos B em *Leptothorax spinosior*; IMAI et al. (1977) descreveram um sistema de cromossomos B em *Podomyrma adelaide*, cujo número variou de 6 a 11; e também IMAI et al. (1984) encontraram de 6 a 11 cromossomos B nas spp. *Pseudolasius* sp. e *Prenolepis jerdoni*. Mais recentemente, PALOMEQUE et al. (1990) mostraram a presença de cromossomos B em *Lasius niger* com variação intra e interindividual, e LORITE et al. (2000) mostraram a presença de cromossomos B na subfamília Myrmecinae.

Em vespas, destaca-se o caso clássico de *Nasonia vitripennis* que se apresenta como um ótimo modelo para estudos dos cromossomos B, o supranumerário chamado de PSR, inicialmente observado por NUR et al. (1988), um caso semelhante ao de *Nasonia* foi descrito em populações da vespa *Thricogramma kaykai* por STOUTHAMER et al. (2001), sendo que nestas vespas, o cromossomo B também leva às fêmeas a só produzirem machos na prole. Em Sphecoidea encontra-se a presença de cromossomos B em *Trypoxolon albitarse*, objeto de estudos de ARAUJO et al. (2000, 2001).

Em abelhas, apenas em meliponídeos (Apidae) são encontrados relatos de cromossomos B, como os encontrados por ROCHA (*inf.* Pessoal) que mostrou a presença de cromossomos B em *Melipona quinquifasciata*.

1.5. Os cromossomos B em *Partamona* (Hymenoptera, Apidae)

O gênero *Partamona* é largamente distribuído do sul do Brasil à região central do México. Estas abelhas são denominadas popularmente, no Brasil por “abelhas cachorro” ou “Cupira”. Elas ocorrem em florestas tropicais, cerrados, caatinga e regiões montanhosas como os Andes. Algumas espécies são observadas em áreas urbanas, construindo ninhos em vasos de plantas, frestas de paredes e muros. Os ninhos são construídos de forma bastante variada, mas algumas espécies só constroem seus ninhos em cupinzeiros (PEDRO, 1998).

No gênero *Partamona*, COSTA et al. (1992), BRITO et al. (1997) e BRITO-RIBON et al. (1999) caracterizaram citogeneticamente um total de seis espécies do: *Partamona helleri*, *Partamona* sp. aff. *nigrrior*, *Partamona vicina*, *Partamona ayaleae*, *Partamona mulata*, *Partamona* sp. n.. Somente a espécie *Partamona helleri* após caracterização citogenética apresentou indivíduos com cromossomos B.

Em *Partamona helleri*, COSTA et al. (1992) encontraram de um a três destes cromossomos B, em diferentes indivíduos. BRITO et al. (1997) concluíram que existem dois tipos de cromossomos B morfológicamente distintos. TOSTA et al. (1998) encontraram indivíduos com até quatro cromossomos B nesta espécie.

BRITO (1998) caracterizou citogeneticamente a espécie *Partamona helleri* utilizando as técnicas de banda C; método GTG; banda NOR; coloração com cromomicina A₃ e DAPI; banda Q; e FISH utilizando-se sonda rDNA 18S-FITC de milho (*Zea Mays*), concluindo que os cromossomos B de *Partamona helleri* são heterocromáticos e possuem regiões ricas em AT, o que possibilitou um conhecimento da estrutura molecular desses cromossomos.

Pouco, ou nada, se sabe sobre a origem, a dinâmica populacional e os efeitos dos cromossomos B que os indivíduos de *Partamona helleri* carregam. BRITO (1998) concluiu em uma análise citogenética por método FISH (hibridização *in situ* fluorescente) que os cromossomos B de *Partamona helleri* devem ter surgido a partir de outro segmento do complemento normal que não aquele distalmente

posicionado no braço longo do par heteromórfico (par 2), como se achava anteriormente (BRITO et al., 1997), pois a técnica mostrou que estes cromossomos têm composição de bases diferentes.

No mesmo trabalho, em uma análise de “Southern Blot”, BRITO (1998) mostrou que, após tratamento do DNA genômico de indivíduos com e sem cromossomos B com a enzima de restrição *EcoRI*, os indivíduos com cromossomo B apresentavam bandas não presentes nos indivíduos sem este cromossomo, o que sugeriu a presença de seqüências específicas de B nesta espécie.

As evidências de que possam existir seqüências específicas nos cromossomos B de *Partamona helleri*, foram reforçadas pelo trabalho de TOSTA et al., (1999) que identificaram um marcador RAPD associado a estes cromossomos. Esse marcador foi utilizado por IRSIGLER et al., (2000) em um estudo de assimetria flutuante com populações de *Partamona helleri*. Foi sugerido que indivíduos portadores de B são mais assimétricos que aqueles que não possuem esses cromossomos. Visto que indivíduos mais simétricos têm maior “fitness” esses cromossomos podem estar diminuindo o “fitness” dos indivíduos que os carregam.

1.6. Uso de técnicas de genética molecular no estudo dos cromossomos B

1.6.1. Uso de técnicas de hibridização para estudo dos cromossomos B

O princípio no qual todos os métodos de hibridização molecular são baseados é a formação de uma dupla hélice por duas fitas de DNA complementares. Este processo foi primeiramente descrito por Marmur e Doty em 1961. Duas importantes premissas do processo foram prontamente estabelecidas; as duas seqüências envolvidas na formação do “duplex” devem ter um grau de complementaridade, e a estabilidade do “duplex” formado depende deste grau de complementaridade. Estas

duas premissas sugeriram modos pelos quais esse processo poderia ser usado para analisar relações entre seqüências de ácidos nucléicos, isso foi rapidamente aplicado à solução de uma série de problemas biológicos (Southern *apud* HAMES & HIGGINS 1991).

Dentre as técnicas de hibridização, usadas na genética molecular, a mais comum é “Southern Blot”. Nesta técnica, o DNA de interesse é inicialmente digerido por enzimas de restrição, e esses fragmentos são separados por eletroforese em gel de agarose. Os fragmentos são desnaturados, mergulhando-se o gel em solução alcalina, e então são transferidos para uma membrana de nitrocelulose ou náilon, de forma a reproduzir na membrana a distribuição dos fragmentos no gel. A membrana é imersa em solução de hibridização contendo a sonda (seqüência de interesse), marcada radioativamente ou por enzimas que, colocadas em contato com determinado substrato, emitem luz, chamada marcação a frio. Os fragmentos que hibridaram com a sonda são posteriormente revelados por auto-radiografia (LENINGHER et al. 1995).

No decorrer da década de noventa, vários estudos utilizando hibridização para se determinar a origem e estudar a evolução dos cromossomos B foram realizados. Em *Crepis capillaris* JAMILENA et al. (1994) utilizaram a técnica de “Southern” para isolar uma seqüência nos cromossomos B homóloga a regiões teloméricas dos cromossomos B. Em centeio (*Secale cereale*), também por “Southern”, foram isoladas duas seqüências repetitivas, uma de 1.1 e outra de 3.9kb, específicas dos cromossomos B (SANDERY et al., 1990) (BLUNDEN et al., 1993). Em *Nasonia vitripennis* várias seqüências foram isoladas por esta técnica; três famílias de seqüências repetitivas (171-214pb) específicas dos cromossomos B e uma família de seqüências repetitivas (94pb) com homologia com os cromossomos do complemento normal por EICKBUSH et al. (1992). Além de uma seqüência identificada como sendo um retrotransposon, que foi denominado de NATE (“*Nasonia* transposable element”), encontrado no genoma de espécies relacionadas (McCALLISTER, 1995), (McCALLISTER & WERREN, 1997).

1.6.2. Uso de marcadores moleculares RAPD para estudo dos cromossomos B

A técnica de RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”) foi desenvolvida por WILLIAMS et al. (1990) e é baseada na reação de PCR, desenvolvida por Kary Mullis em 1984. A diferença básica entre a variante RAPD e a reação de PCR convencional, é a utilização na técnica de RAPD de seqüências arbitrárias de DNA como “primers”, os quais são menores que os utilizados em PCR (WILLIAMS et al., 1990).

WILLIAMS et al. (1990) afirmam que o uso de marcadores moleculares em mapeamentos genéticos, diagnósticos genéticos, taxonomia molecular e estudos evolutivos é muito importante. Eles também ressaltam que os marcadores comumente utilizados até aquele momento, os RFLPs (“Restriction fragment length polymorphism”) eram identificados por hibridização o que os tornavam laboriosos e incompatíveis com estudos que precisavam de rápidos avanços. Além disso, eles afirmam que, apesar de testes genéticos baseados em PCR serem simples, eles necessitam de conhecimento de seqüências específicas de DNA para que se possa desenhar “primers específicos”. Assim, eles concluem que a técnica de RAPD seria uma revolução pois agilizaria de forma nunca vista o estudo de polimorfismos utilizando marcadores moleculares já que os “primers” são aleatórios e não precisam de conhecimento prévio de qualquer seqüência. AVISE (1994) chama a atenção que a técnica de RAPD é a mais fácil de se instalar em um laboratório de Biologia molecular e também a menos dispendiosa.

Apesar de todas estas vantagens, a técnica de RAPD, e mesmo outras versões da técnica de PCR, são muito pouco utilizadas no estudo dos cromossomos B. McQUADE et al. (1994) em mamíferos, *Ptauroides volans* e BRINKMAN et al. (2000) em répteis, *Dicamptodom tenebrosus* utilizaram uma metodologia baseada em PCR e hibridização. Eles microdissecaram cromossomos B desta espécie, amplificaram o DNA destes cromossomos por PCR e o utilizaram como sonda para

uma hibridação com DNA genômico de indivíduos com e sem cromossomos B, obtendo dados relevantes sobre a origem e evolução dos supranumerários nestas espécies. TANIC et al. (2000), trabalhando com ratos da espécie *Apodemus flavicollis*, realizaram um experimento baseado em AP-PCR (uma variação da técnica de PCR) no qual encontraram bandas polimórficas associadas a presença de cromossomos B. Neste estudo, os autores tentaram sem sucesso diferenciar a variação numérica dos cromossomos B (esta espécie apresenta de 1 a 3 supranumerários), através de uma quantificação da intensidade das bandas, quando uma determinada banda estava presente em indivíduos com diferentes números cromossômicos.

GOURMET & RAYBURN (1996), trabalhando com milho (*Zea mays*), encontraram associação entre marcadores RAPD e cromossomos supranumerários, em uma análise populacional utilizando quatro “primers”, o que os permitiram concluir que marcadores RAPD são úteis para se conduzir vários tipos de pesquisa com cromossomos B como, mapeamento do cromossomo B e estudos sobre a origem e evolução dos mesmos. LIN & CHOU (1997), também utilizando milho (*Zea mays*), fizeram um mapa físico dos cromossomos B mostrando serem coerentes as conclusões de GOURMET & RAYBURN (1996). Em *Partamona helleri*, TOSTA et al. (1999) também descobriram um marcador RAPD associado a cromossomos B. Juntos, estes trabalhos demonstram que esta técnica poderá fornecer dados importantes sobre a origem e evolução dos cromossomos B.

1.7. Objetivos

Este trabalho foi realizado com o intuito de ampliar o conhecimento sobre os cromossomos B em *Partamona helleri*.

Os objetivos específicos do presente trabalho foram:

- Testar novos “primers” RAPD para identificar novos marcadores associados a cromossomos B em *Partamona helleri*;
- Isolar, clonar e seqüenciar marcador previamente identificado associado a cromossomos B em *Partamona helleri*;
- Verificar se existe homologia entre a seqüência do marcador e regiões presentes em cromossomos B já seqüenciadas em outros organismos, especialmente em insetos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Colônia de *Partamona helleri* utilizada no estudo

Para as análises do presente trabalho foram utilizadas operárias de *Partamona helleri*, da colônia nº 588, mantidas no apiário da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG (20°45'LS, 42°52'W). Essas operárias, em caracterização citogenética prévia, apresentavam indivíduos com e sem cromossomos B, na proporção de 1:1.

2.2. Extração do DNA

Para extração do DNA genômico foi utilizado o protocolo descrito por WALDSCHMIDT et al. (1997). Cada indivíduo foi macerado, individualmente, com pistilo de plástico em microtubo contendo 600µl de tampão de extração gelado (CTAB - brometo de cetiltrimetilamônio - 2%; NaCl 1,4M; Tris/HCl 100mM pH

8,0; EDTA 20mM pH 8,0; e 100µg/ml de proteinase K). O macerado foi, então, incubado a 65°C por 30 min. As desproteínações foram feitas com 1 volume de clorofórmio, seguida de centrifugação a 13000 rpm/min em centrífuga Eppendorf modelo 650. O sobrenadante foi então tratado com RNase incubando-se o mesmo a 37° C por 30 min.

O DNA isolado foi precipitado com 1 volume de isopropanol sob incubação a -20°C por 2 a 24 horas. Passado este tempo, a solução foi submetida à centrifugação a 14.000 rpm por 30min, o precipitado formado foi lavado com etanol 70%, seco ao ar livre, e ressuspenso em 100µl de TE (Tris HCl 10mM, pH 8,0, EDTA 1mM). A suspensão obtida foi submetida à eletroforese em gel de agarose 0,8% contendo 10µg/ml de brometo de etídio, para verificar a integridade e a pureza do DNA extraído.

2.3. Amplificação do DNA genômico

O DNA foi amplificado pela técnica de RAPD, conforme metodologia de WILLIAMS et al. (1990). A mistura de reação de 25µl consistiu de: 2,0µl de DNA, MgCl₂ 3,5mM, Tris/KCl 10mM/50mM; 0,1mM de cada dos seguintes desoxirribonucleosídeo trifosfato (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), um “primer” decâmero 0,4µM (OPERON Technologies Alameda, CA, EUA) e 1U de TAQ polimerase. A mistura foi incubada em termociclador, modelo PTC-100 (MJ Research), programado para 40 ciclos, consistindo cada ciclo de um passo de desnaturação (15s a 94°C), um passo de pareamento (30’’ a 35°C) e um passo de extensão (1min a 72°C). Ao final dos 40 ciclos um passo extra de extensão (7 min a 72°C) foi realizado.

A separação dos produtos de reação foi feita por eletroforese em gel de agarose 1,2% contendo 10µg/ml de brometo de etídio, imerso em tampão TBE (Tris-borato 90mM, EDTA 1mM, pH 8,0). Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados sob luz ultravioleta e fotografados em máquina POLAROID apropriada.

2.4. Identificação de novos marcadores RAPD associados a cromossomos B em *Partamona helleri*

Para identificar os indivíduos com e sem cromossomos B da colônia 588, o DNA dos mesmos foi submetido à amplificação com o “primer” OPK-14, que revela um fragmento de DNA detectado, unicamente, nos indivíduos portadores de cromossomos B em *Partamona helleri* (TOSTA et al., 1999).

Para a identificação de outros marcadores moleculares RAPD associados aos cromossomos B utilizou-se a técnica de “bulks”, que consiste em reunir o DNA genômico de vários indivíduos com uma determinada característica, em um único grupo, e amplificá-los em conjunto, no lugar de amplificar o DNA de indivíduo por indivíduo, isoladamente.

Assim 36 indivíduos da colônia 588 foram identificados quanto à presença ou ausência de cromossomos B, através da amplificação com o primer OPK-14. Após esta identificação o DNA genômico de 8 indivíduos que apresentavam cromossomos B foram agrupados em um “bulk” C1, o DNA de outros 8 indivíduos que também apresentavam cromossomos B foram agrupados em outro bulk C2, da mesma forma o DNA genômico de dezesseis indivíduos sem os cromossomos B foram agrupados em outros dois “bulks” de oito indivíduos denominados S1 e S2. Estes “bulks” então foram amplificados utilizando-se 100 diferentes “primers” através da técnica descrita em 2.3.

2.5. Purificação e clonagem do marcador RAPD associado a cromossomos B

Para a clonagem da banda associada a indivíduos com cromossomos B, obtida a partir do padrão de amplificação com o “primer” OPK-14 , foi feita a purificação da mesma do gel de agarose. A purificação consistiu em isolar com um bisturi a banda de DNA identificada como marcador do restante do gel, cortando somente a porção do gel no qual ela se encontrava. Após o corte, a banda de DNA foi eluída do gel por meio do Kit da QIAGEN (Qiagen, Cat. No. 24106).

Os fragmentos purificados foram ligados, com auxílio da enzima T_4 ligase, ao vetor plasmidial pGEM-T easy (PROMEGA-pGEM-T e pGEM-T easy vector systems – No. Cat. A 1360). Após essa etapa, o vetor plasmidial foi utilizado para transformar células competentes da bactéria *Escherichia coli* DH5 α . Após transformação, as células bacterianas foram plaqueadas em meio LB contendo ampicilina (100 μ g/ml), 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactosídeo (X-gal) e isopropil-tio- β -D-galactosídeo (IPTG), e incubadas a 37°C. A identificação dos clones positivos foi feita pela análise da cor das colônias na placa contendo LB. As colônias que continham o plasmídeo sem o fragmento de DNA inserido ficaram azuis, pois conseguiam degradar o X-gal, enquanto as que possuíam o plasmídeo com o fragmento de DNA inserido ficaram brancas, por terem o gene Lac Z interrompido pelo fragmento inserido, não produzindo a enzima β -galactosidase e portanto, não degradando o X-gal.

O diagnóstico das colônias brancas foi feito, inicialmente, por meio da técnica de PCR. Uma porção da colônia foi inoculada em uma placa contendo meio LB e ampicilina, devidamente identificada, e uma outra porção foi inoculada em um tubo contendo os componentes para a reação de amplificação. A região do inserto foi amplificada utilizando-se oligonucleotídeos (M13 Forward e M13 Reverse) que flanqueiam as duas extremidades do sítio de clonagem. Os produtos dessa amplificação foram analisados em gel de agarose 1,2%, sendo que os insertos são

acrescidos de 254pb, correspondentes a DNA plasmidial, outra forma de análise das colônias com o fragmento de DNA inserido foi realização de uma lise rápida de colônias, na qual verificou-se o tamanho do plasmídeo liberado através de uma eletroforese; uma colônia azul, contendo o plasmídeo sem o inserto de DNA, foi utilizada como controle. Todas as colônias que apresentaram plasmídeos maiores que os do controle na eletroforese foram consideradas colônias recombinantes, ou seja que apresentavam o fragmento de DNA inserido.

A extração plasmidial foi feita utilizando-se o QIA prep Spin Miniprep (Qiagen, Cat. No. 27106). O diagnóstico do plasmídeo recombinante foi feito por meio de uma reação de clivagem com a enzima de restrição *Eco* RI, para a liberação do inserto.

2.6. Seqüenciamento e análise do marcador RAPD clonado

O fragmento amplificado com o primer OPK-14, já clonado no vetor pGEM-T easy, foi seqüenciado usando-se um seqüenciador automático de DNA da Perkin-Elmer – modelo ABI-310, pelo método da terminação da cadeia com dideoxynucleotídeo (SANGER et al., 1977)

As reações de seqüenciamento foram feitas utilizando-se o ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer) e os oligonucleotídeos M13 Forward ou M13 Reverse. O programa de amplificação linear dos fragmentos foi o seguinte:

96° C por 2 min + 25 X (96°C por 30s + 50°C por 15s + 60°C por 4 min).

As seqüências de desoxirribonucleotídeos foram comparadas com seqüências diponíveis no GeneBank (<http://www2.ncbi.nlm.nih.gov/>).

2.7. “Southern Blot”

Uma amplificação de dois indivíduos de *Partamona helleri* com cromossomos B, utilizando o “primer” OPK-14 foi realizada e o produto da reação submetido a uma eletroforese em gel de agarose 1,4%. O gel, então, foi inicialmente incubado em solução de desnaturação (NaCl 1,5 M e NaOH 0,5 M) duas vezes, por 20 minutos cada. Posteriormente, o gel foi incubado em solução de neutralização (Tris-HCl 500 M pH 7,0) e transferido para uma membrana de náilon (SAMBROCK et al., 1989). A membrana foi então lavada em 10X SSC por cinco minutos e o DNA foi imobilizado na mesma, utilizando-se “Stratalinker” da STRATAGENE, aplicando-se radiação UV numa potência de 120.00 μ joules/cm². Esta membrana foi pré-hibridizada na solução *QuikHyb* (STRATAGENE) a 65° C por 15 minutos. A reação de hibridização foi conduzida a 55° C, por no mínimo duas horas, em solução de hibridação (10ml de *QuikHyb* e 1 μ l de sonda obtida a partir do marcador de RAPD clonado). Após a hibridização, a membrana foi lavada em 1X SSC SDS 0,1% por duas vezes de 15 minutos cada, a 55° C.

A membrana foi equilibrada em tampão 1 (Tris-HCl 0,1mol/L pH 7,5, NaCl 0,15 mol/L), por 15 minutos, e incubada em tampão 2 (Tris-HCl 0,1mol/L pH 7,5 NaCl 0,15 mol/L, reagente de bloqueio do Kit -“ IlluminatorTm Chemiluminescent Detection System” - , STRATAGENE) por 30 minutos, a 60° C. Após a incubação, a membrana foi lavada com TBST (0,05% de Tween 20 em tampão 1) à temperatura ambiente, por duas vezes, e incubada com o anticorpo-antifluoresceína (1 μ l de antifluoresceína conjugado à fosfatase alcalina para 10ml do tampão TBST) por uma hora. Após este período, a membrana foi lavada três vezes em TBST, por 15 minutos cada, e, subsequentemente, equilibrada em 100mL do tampão 3 (60 μ l de dietanolamina e MgCl₂ 0,1 mol/L). Após a membrana ter sido incubada no tampão 3 contendo 70 μ l de CSPD o DNA hibridizado foi visualizado por auto-radiografia.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesse trabalho foram utilizadas operárias de *Partamona helleri* da colônia 588 do apiário central da UFV, que apresentava em análises citogenéticas prévias, indivíduos portadores (com um cromossomo B) e não portadores de cromossomos B. É importante salientar que, nessa espécie, foram encontrados indivíduos com até quatro cromossomos B (Figura 1) e, que o uso de marcadores moleculares pode ajudar a se saber mais sobre a origem destes cromossomos; como eles se mantêm na população, muitas vezes aumentando sua frequência; e quais são seus efeitos sobre a adaptação dos indivíduos que os apresentam.

TOSTA et al. (1999) identificaram um marcador RAPD associado aos cromossomos B em *Partamona helleri*, que marcava indistintamente indivíduos com um, dois, três ou quatro cromossomos B. Esse marcador foi utilizado, aqui, para identificar a presença ou ausência de cromossomos B nas operárias de *Partamona helleri* da colônia 588. Após a identificação dos indivíduos estes tiveram seu DNA amplificado com diferentes “primers” no intuito de se identificar novos marcadores. O marcador encontrado por TOSTA et al. (1999), também, foi isolado, clonado e seqüenciado.

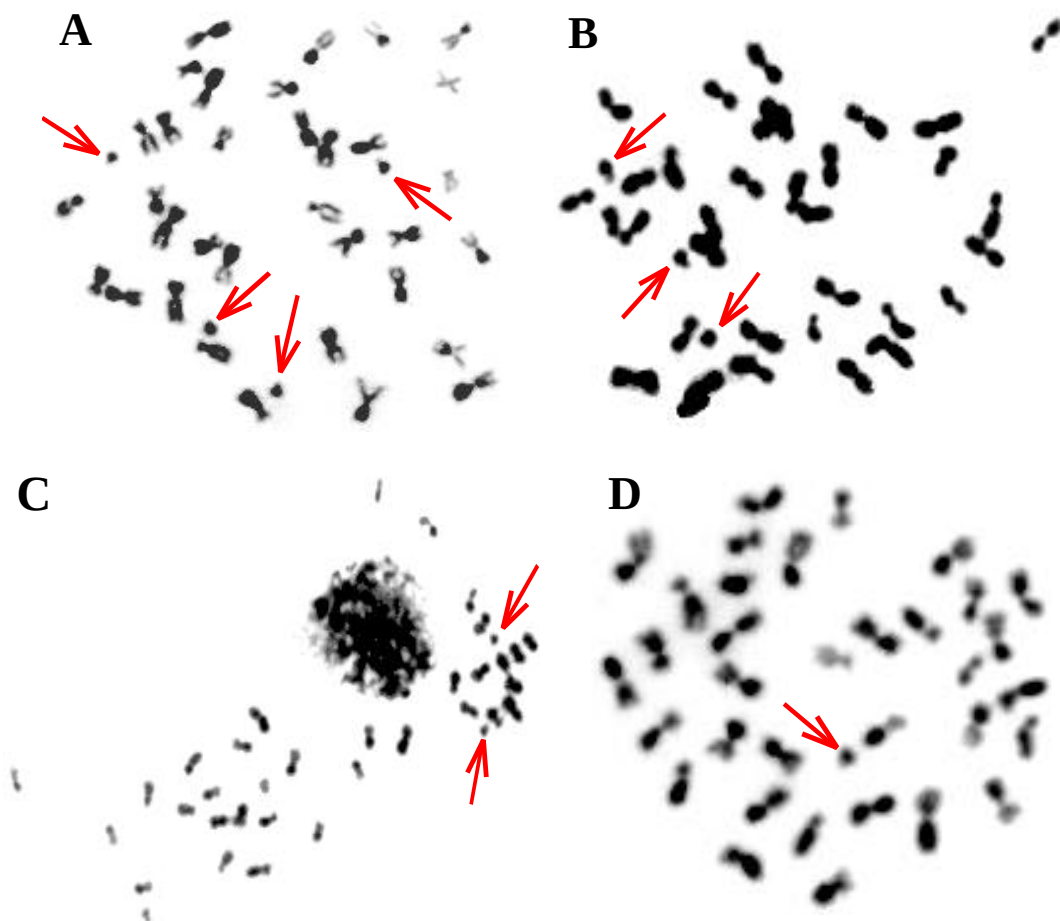


Figura 1 - Metáfases ganglionares de pré-pupas de operárias de *Partamona helleri* com $2n = 38$ (A), $2n = 37$ (B), $2n = 36$ (C) e $2n = 35$ (D) evidenciando a presença de 4, 3, 2 e 1 cromossomos B (seta), respectivamente. Adaptado de TOSTA et al., 1999.

3.1. Marcadores moleculares RAPD associados a cromossomos B

Os quatro “bulks” de DNA (C1 e C2 de indivíduos com, S1 e S2 de indivíduos sem cromossomos B) foram amplificados com os 100 diferentes “primers” e nenhum novo marcador foi encontrado (Figura 2).

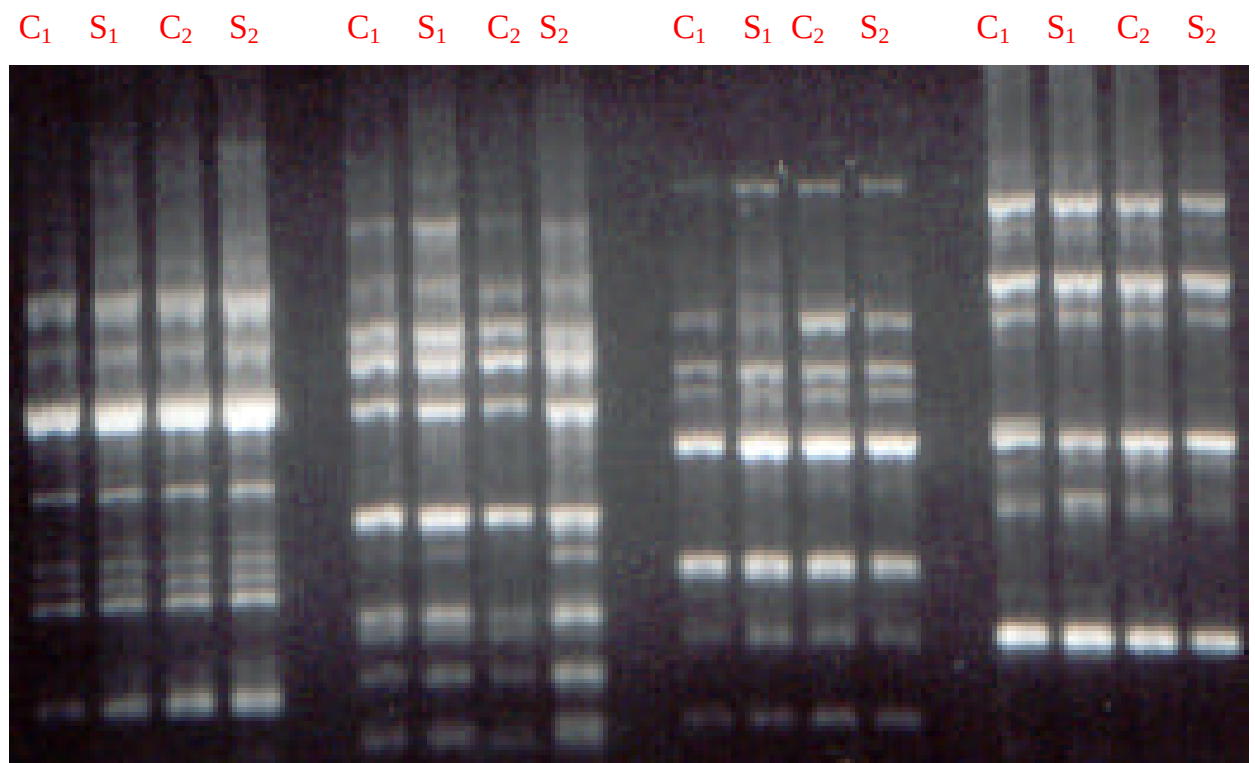


Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose 1,2% mostrando o padrão de amplificação com quatro dos 100 “primers” utilizados. C1 e C2 (“bulks” de DNA de indivíduos com cromossomos B). S1 e S2 (“bulks” de DNA de indivíduos sem cromossomos B). Nestes quatro “primers” como nos restantes nenhuma banda associada aos cromossomos B foi encontrada.

Apesar de não se obter novos marcadores moleculares RAPD associados à presença de cromossomos B no presente estudo, pode-se dizer que, o uso de marcadores desta natureza é útil para se estudar esses cromossomos. Utilizando a técnica de RAPD foi possível, tanto em abelhas (*Partamona helleri*) (TOSTA et al., 1999) como em milho (*Zea mays*) (GOURMET & RAYBURN 1996), identificar marcadores moleculares associados aos cromossomos B. Além disso, dados, como

os obtidos por TANIC et. al. (2000), mostram que outras técnicas com base em PCR como: AP-PCR, microssatélites, entre outras; podem ser usadas para detecção de sequências específicas dos cromossomos B; e dados como os de LIN & CHOU (1997), também em milho(*Zea mays*), mostram ser possíveis utilizar os marcadores RAPD para mapear esses cromossomos.

A distinção dos indivíduos quanto ao número de cromossomos B que eles carregam, utilizando marcadores moleculares seria, particularmente útil em espécies nos quais a detecção citogenética dos mesmos só pode ser feita em larvas, que é o caso de *Partamona helleri*. Essa detecção permitiria o refinamento de estudos como o realizado por IRSIGLER et al. (2000), no qual se pesquisou o efeito dos cromossomos B, sobre o “fitness” dos indivíduos adultos, em *Partamona helleri*, utilizando medidas de assimetria flutuante. Neste estudo os indivíduos foram classificados somente quanto à presença e ausência dos cromossomos B. Isto, porque o marcador identificado por TOSTA et al. (1999) e utilizado por IRSIGLER et al. (2000) para tipar os indivíduos; não permitia detectar o número de cromossomos B. Visto que, segundo WHITE (1973), o acúmulo de cromossomos B diminui o “fitness” dos indivíduos, sabendo a quantidade de B que cada indivíduo possuía, teria permitido a IRSIGLER et al. dados mais conclusivos, apesar de que foi possível detectar a influência negativa dos cromossomos B no “fitness” dos indivíduos portadores pois estes eram mais assimétricos.

TANIC et al.(2000) tentaram realizar a diferenciação numérica entre portadores de cromossomos B utilizando uma análise da intensidade das bandas de AP-PCR associadas a esses cromossomos em ratos (*Apodemus flavicollis*), mas não encontraram nenhuma diferença. Talvez a utilização de marcadores AFLP fosse uma boa alternativa para este problema; neste sistema, para se identificar indivíduos heterozigotos vem sendo utilizado, com sucesso, leitura quantitativa das bandas nos autoradiogramas por densitometria, possibilitando a diferenciação de duas bandas aparentemente idênticas (FERREIRA & GRATAPAGLIA, 1998).

3.2. Obtenção de clones do marcador RAPD associado aos cromossomos B

Para clonar o marcador molecular RAPD associado aos cromossomos B identificado por TOSTA et al., (1999) em primeiro lugar, o DNA de uma operária adulta de *Partamona helleri* foi amplificado em dez reações com o “primer” OPK-14, e o padrão eletroforético deste DNA comparado com o obtido por TOSTA et al. (1999). Identificada a banda marcadora associada aos cromossomos B, ela foi isolada (Figura 3).

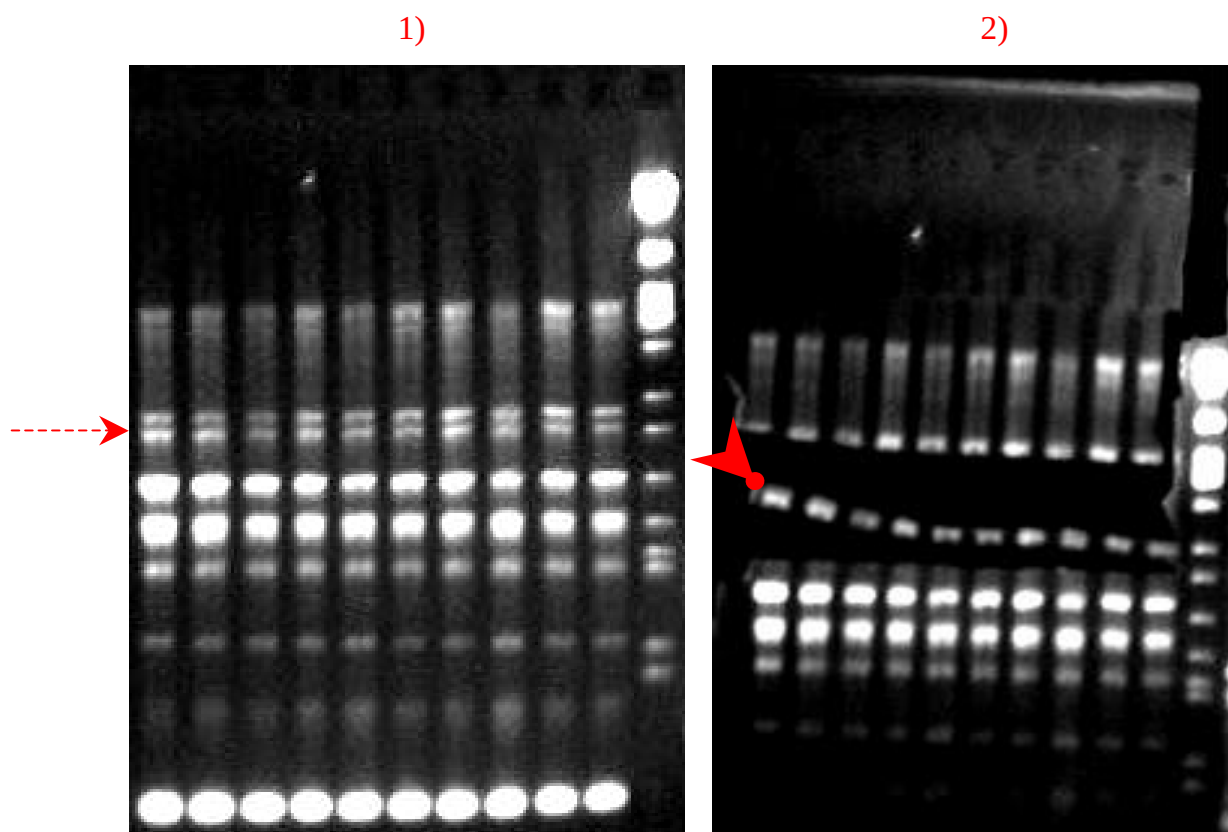


Figura 3 Em 1 eletroforese em gel de agarose 1,2%, mostrando o padrão eletroforético de amplificação com “primer” OPK-14; em todos os “slots” o DNA amplificado é do mesmo indivíduo, a seta tracejada indica a banda associada aos cromossomos B identificada por TOSTA et al. (1999). Em 2 a banda associada aos cromossomos B é excisada com bisturi, para posterior clonagem (cabeça de seta). Em 1 e 2 a última coluna da esquerda para direita mostra padrão eletroforético do DNA do fago λ digerido com as enzimas *EcoRI* e *HindIII* utilizado como marcador de peso molecular.

Realizaram-se dez amplificações do DNA do mesmo indivíduo no intuito de aumentar a concentração de DNA durante a eluição do mesmo do gel de agarose.

Após a excisão, a banda marcadora foi purificada e o DNA presente na mesma foi submetido à eletroforese para checagem e quantificação. A banda obtida a partir da eletroforese deste DNA purificado mostrava padrão eletroforético semelhante ao da banda excisada, demonstrando adequação do método utilizado (Figura 4).

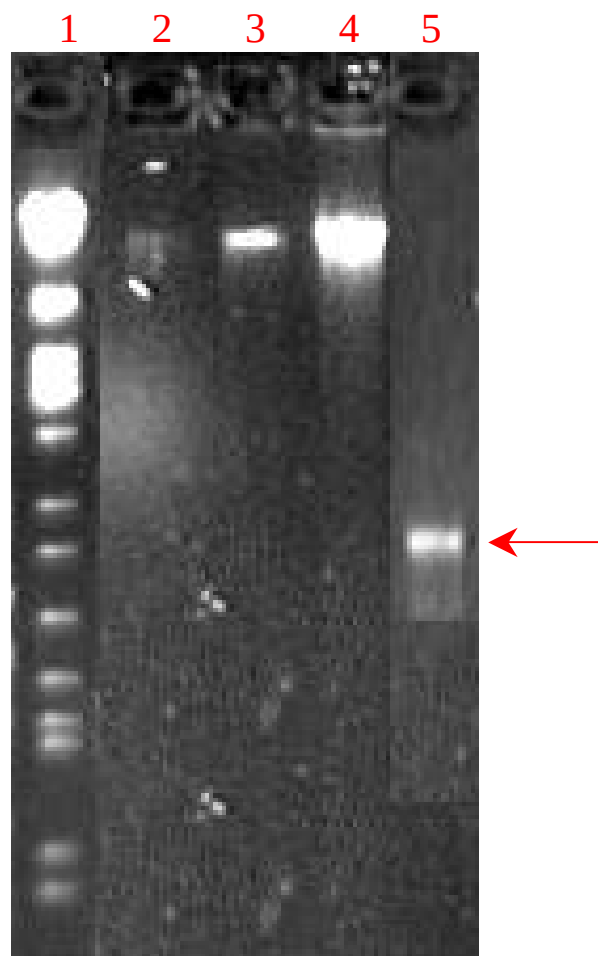


Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose 1,2%, evidenciando a banda associada aos cromossomos B purificada (seta- coluna 5). 1- DNA de fago λ digerido com as enzimas *EcoRI* e *HindIII* usado como marcador de peso molecular, 2- marcador de concentração de DNA de 50ng, 3-marcador de concentração de DNA de 100ng, 4-marcador de concentração de DNA de 150ng.

O DNA da banda purificada foi então ligado a um vetor plasmidial, e inserido em células da bactéria *Escherichia coli*, linhagem DH5 α , por meio de transformação por choque térmico. Foram obtidos 27 clones positivos (Figura 5). Esses clones são representados pelas colônias de bactérias brancas, as quais apresentam tal coloração por possuírem um plasmídeo contendo o inserto, ou seja, ligado com a banda purificada, o que provoca a interrupção do gene da enzima β -galactosidase e portanto a não degradação do X-gal.

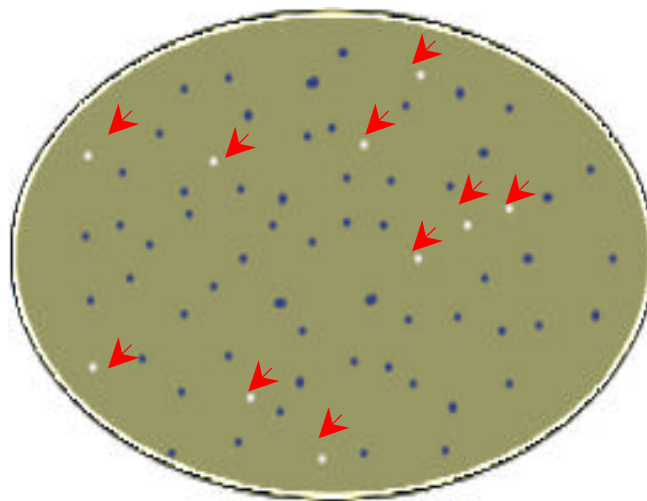


Figura 5 - Esquema representando uma placa de Petri contendo culturas isoladas, originadas de células de *Escherichia coli*, linhagem DH5 α , após transformação por choque térmico. As colônias brancas (setas) representam os clones positivos, ou seja onde o plasmídeo por ter o fragmento de DNA (ou parte deste) ligado tem o gene da β -galactosidase interrompido, não degradando a lactose.

O DNA contido na banda excisada pode ser quebrado quando exposto por um tempo excessivo à radiação ultra-violeta, isso pode gerar falsos clones, ou seja bactérias brancas que contém partes quebradas do DNA da banda marcadora, e não o DNA intacto. Além disso, no ato de coleta de uma dada colônia na placa de petri esta pode ser contaminada se não se agir com muito cuidado. Assim uma verificação dos clones positivos se torna necessário.

Para verificar se os clones positivos realmente possuíam o marcador RAPD associado aos cromossomos B ligado ao plasmídeo foi feito inicialmente uma reação de PCR de colônias, o que não produziu resultados satisfatórios. Então, optou-se por uma lise rápida de colônias e obteve-se quatro clones nos quais havia possibilidade do marcador RAPD estar inserido no plasmídeo. O DNA plasmidial destes clones foi extraído e o plasmídeo clivado com a enzima *EcoRI*. O resultado mostrou que dois clones apresentavam o fragmento referente ao marcador RAPD OPK-14 associado aos cromossomos B (Figura 6).

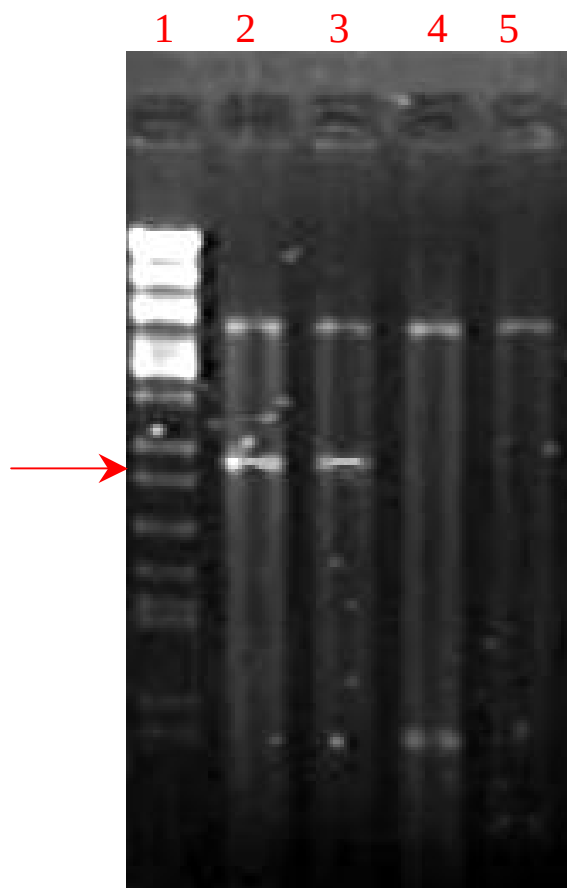


Figura 6 - Eletroforese em gel de agarose 1,2% do DNA plasmidial de quatro clones tratados com *EcoRI* evidenciando a banda associada aos cromossomos B clonada (seta- colunas 1 e 2). Em 1 o clone P1 e em 2 o clone P2.. Ver que os clones das colunas 4 e 5 não possuíam a banda associada aos cromossomos B. 1- DNA do fago λ digerido com as enzimas *EcoRI* e *HindIII* usado como marcador de peso molecular

Esta constitui a primeira clonagem de um marcador RAPD associado a cromossomos B. Clonagens de seqüências específicas de cromossomos B têm sido realizadas, principalmente, com seqüências identificadas a partir de fragmentos obtidos pelo tratamento do DNA total com enzimas de restrição, como nos trabalhos realizados por: EICKBUSH et al. (1992) em vespas (*Nasonia vitripennis*), STARK et al. (1996) em milho (*Zea Mays*), LÓPEZ-LEÓN et al.(1995c) no gafanhoto (*Eyprepocnemis plorans*). Clonagens de seqüências amplificadas por PCR a partir de DNA extraído de cromossomos microdissecados, como nos trabalhos de: MAcQUADE et al. (1994) com ratos (*Petauroides volans*), JAMILENA et al. (1995) com plantas (*Crepis capilaris*), BRINKMAN et al. (2000) com salamandras (*Dicamptodon tenebrosus*), são, também, bastante comuns.

Os clones obtidos foram identificados como P1 e P2, o clone P1 foi utilizado para a análise de “Southern” e para o seqüenciamento. Esses clones serão importantes na construção de sondas específicas para os cromossomos B de *Partamona helleri*, com a qual se pretende fazer hibridação *in situ* com o genoma dessa espécie e de espécies afins, o que poderá elucidar a origem desses cromossomos conforme proposto por BRITO (1998).

A técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH), tem sido utilizada freqüentemente para análise de estrutura de cromossomos B, em várias espécies, como por exemplo: em centeio (*Secale cereale*) (CUADRADO & JOUVE, 1994) e (WILKES et al., 1995); em *Brachycome dichrossomatica* (DONALD et al., 1995), em gafanhotos (*Eyprepocnemis plorans*) (LÓPEZ-LEÓN et al., 1994), em *Drosophila subsilvestris* (GUTKNECHT et al. 1995), no ratão do banhado (*Nectomys*) (SILVA & YONENAGA-YASSUDA, 1998), e em *Partamona helleri* (BRITO, 1998); mas nem sempre é possível se ter uma sonda específica, ou seja feita a partir de uma seqüência específica do cromossomo B. Este foi o caso de BRITO (1998) que utilizou uma sonda de rDNA, e não uma sonda específica nos seus estudos acerca da origem dos cromossomos B em *Partamona helleri*.

Em caso de em uma análise por FISH, obter-se uma hibridização da sonda somente com os cromossomos B, seria plausível supor uma origem destes cromossomos interespecificamente, seja por transposição, seja por hibridização interespecífica, que é o caso de *Nasonia vitripennis* (McCALISTER & WERREN, 1997). Em caso da sonda hibridizar com cromossomos do complemento normal, seria fácil identificar de qual região cromossômica eles se originaram pois o cariótipo de *Partamona helleri* já foi muito bem caracterizado por BRITO (1998).

3.2. Verificação da homologia entre os clones e o marcador RAPD associados a cromossomos B por “Southern Blot”

A técnica de RAPD tem muitas vantagens como: apresentar resultados mais rápidos que outros marcadores, como RFLP (WILLIAMS et al), e baixo custo de implementação (AVISE, 1994), além de não exigir nenhum conhecimento prévio do genoma ao qual vai ser aplicado, o que o torna universal (FERREIRA & GRATAPAGLIA, 1998).

Apesar das vantagens, como toda técnica, a técnica de RAPD tem suas limitações. Segundo FERREIRA & GRATAPAGLIA (1998), os marcadores RAPD apresentam como principal problema a baixa reprodutibilidade, que muitas vezes é resultante da ambiguidade das bandas. Este problema se deve a três fatores: o baixo poder de um dado “primer” discriminar entre sítios de amplificação distintos; a competição entre diferentes sítios de amplificação por substrato e enzima, de maneira que a presença de certos segmentos pode interferir com a amplificação de outros num processo equivalente a uma interação “epistática” que influencia o fenótipo final de bandas; os problemas relacionados com a padronização de condições de laboratório para laboratório, como resultado de perfis térmicos diferentes entre diferentes aparelhos termocicladores.

Além dos problemas técnicos, FERREIRA & GRATAPAGLIA (1998) chamam a atenção que é importante ter em mente o problema da homologia entre fragmentos RAPD. Segundo eles esta homologia é dada pela combinação de duas características: (1) homologia apenas nas sequências extremas onde o “primer” hibridiza e inicia a síntese dos fragmentos e (2) homologia pela igualdade no tamanho do fragmento amplificado dentro da resolução obtida na eletroforese. As sequências internas dos segmentos amplificados podem não ser homólogas. Evidentemente, se a eletroforese for realizada de maneira adequada, isto é, por uma distância de corrida suficiente ($> 10\text{cm}$) em uma concentração de agarose adequada ($> 1,5\%$) para a separação dos fragmentos RAPD típicos a probabilidade de dois fragmentos não homólogos serem amplificados pelo mesmo “primer” e apresentarem bandas coincidentes é bastante pequena. Entretanto, a eletroforese em matriz de agarose não permite uma resolução adequada quando a diferença entre os dois fragmentos é menor que 10 a 20 pares de bases.

Assim, devido a toda esta problemática poderia se imaginar a possibilidade de se haver clonado um fragmento de tamanho similar a banda marcadora, diferente da mesma, o que não seria interessante pois este fragmento poderia estar presente também nos indivíduos sem cromossomo B. Para testar esta hipótese foi, então, realizado um “Southern Blot” onde o clone P1 foi marcado “a frio” e utilizado como sonda em uma hibridização com a reação de RAPD como o “primer” OPK-14, que revela uma banda associada aos cromossomos B em indivíduos que apresentam tais cromossomos (Figura 7).

Como pode ser observado na figura 7; a sonda hibridizou como a banda associada aos cromossomos B nos dois indivíduos utilizados na análise. Assim, pode-se confirmar que a banda clonada era homóloga a banda marcadora associada aos indivíduos portadores de cromossomos B, identificada por TOSTA et al. (1999).

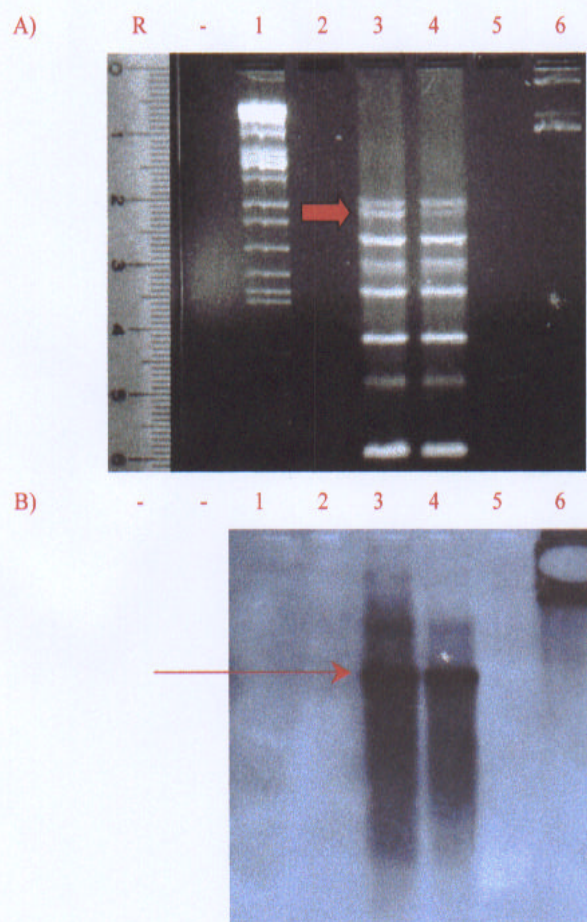


Figura 7 - Análise de "Southern" para verificação de homologia entre o clone P1 e a banda associada a cromossomos B. A) Eletroforese em gel de agarose 1,5% com o primer OPK-14 que revela banda associada aos cromossomos B. Este gel foi utilizado para transferência para a membrana de náilon. B) Autoradiografia de membrana de "nylon" hibridizada. Em A, R= régua para escalonar. Em A e B, 1 é o DNA do fago λ digerido com as enzimas *EcoRI* e *HindIII* usado como marcador de peso molecular. Em 3 e 4 indivíduos que possuíam a banda marcadora de cromossomos B como mostrado em A (seta larga), que foi marcada pela sonda em B (seta fina), mostrando ser o fragmento clonado homólogo ao marcador. Em 6 DNA do plasmídeo contendo a banda, que foi utilizado para fazer a sonda sendo portanto um controle positivo, que foi marcado em B. Em 2 e 5 "slots" vazios, apenas para melhorar a visualização.

Este resultado, somado com o fato de amplificações com o “primer” OPK-14 utilizando indivíduos com e sem cromossomos B terem sido conduzidas em três laboratórios diferentes, em pelo menos seis diferentes termocicladores, sempre com o mesmo padrão, mostram ser o marcador consistente.

A possibilidade de utilizar uma marcação a frio do clone e utilizá-lo como sonda para análise de “Southern” possibilita uma outra alternativa para o estudo da possível origem dos cromossomos B em *Partamona helleri*. Esta alternativa, seria uma hibridização direta da banda marcadora com DNA genômico de indivíduos com e sem cromossomos B como realizado por NUR et al. (1988), que ao acharem uma sequência repetitiva nos B de *Nasonia vitripennis* realizaram este tipo de experimento. Eles observaram que a sonda obtida a partir da sequência repetitiva só hibridizava com o DNA genômico dos indivíduos que possuíam cromossomos B o que os possibilitou afirmar serem esta sequência específica de portadores de B e deveriam ter surgido interespecificamente.

Recentemente, BRINKMAN et al. (2000) em salamandras *Dicamptodon tenebrosus* conduziram um experimento semelhante, hibridizando uma sequência específica dos cromossomos B dessa espécie com DNA genômico de indivíduos não portadores de B da mesma espécie, e de espécies correlatas. Eles obtiveram hibridização em todos os casos; o que os permitiu concluir que os cromossomos B destas salamandras devem ter se originado intraespecificamente, a partir de algum outro cromossomo do complemento normal.

3.4. Análise da sequência do marcador molecular RAPD associado aos cromossomos B

Um dos dois clones obtidos, o clone P1, foi escolhido ao acaso e parcialmente sequenciado (Figura 8). Análise da sequência mostra que, como esperado, a mesma

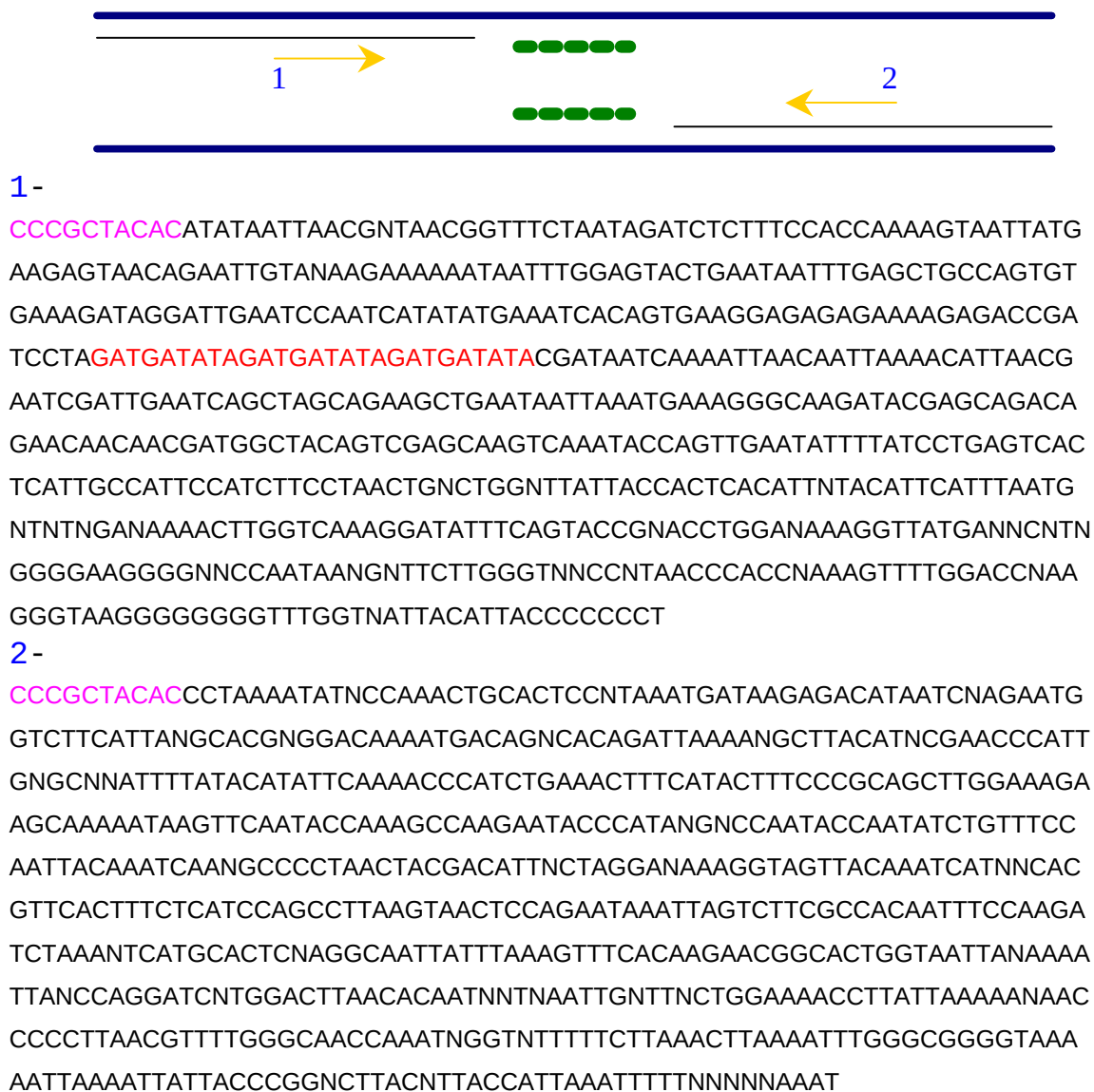


Figura 8 Representação esquemática das regiões seqüenciadas do clone P1. A fita de DNA esta representada em azul. As setas indicam a direção das regiões seqüenciadas. As seqüências estão representadas por 1 e 2 (A=adenina, G=guanina, C=citosina, T=timina, N= nucleotídeo não identificado pelo seqüenciador.) O pontilhado em verde representa o intervalo não seqüenciado. Em vermelho a seqüência repetida três vezes (GATGATATA). Em rosa a seqüência do “primer” OPK-14, mostrando o início do fragmento clonado.

inicia pelos nucleotídeos que compõem o “primer” OPK-14 utilizado para sua obtenção.

A sequência é extremamente rica em Adenina e Timina, o que é próprio dos cromossomos B de *Partamona helleri* como foi demonstrado por BRITO (1998), com o uso de fluorocromos. Este dado é importante, pois mostra a grande valia das informações obtidas a partir das análises de citogenética molecular por BRITO (1998). Várias repetições em “tandem” de adenina são encontradas, às vezes até oito adeninas seguidas.

Uma análise preliminar no “Gene Bank” mostrou que esta sequência não tem homologias com sequências de cromossomos B de outras espécies. Nesta análise ainda, verificou-se uma região repetida três vezes na sequência (GATGATATA) que apresenta homologia com sequências repetitivas do DNA do vírus da Varíola. Visto ser possível a presença de sequências derivadas de elementos transponíveis na estrutura dos cromossomos B, como verificado em *Nasonia vitripennis* (McCALLISTER, 1995), este é um dado no mínimo interessante, indicando que poderia ser encontrada a presença de elementos transponíveis em sequências específicas dos cromossomos B de *Partamona helleri*.

Foi analisada, também, no “Gene Bank”, a possibilidade de uma determinada proteína ser codificada pela sequência, não sendo encontrada nenhuma proteína conhecida, possível de ser codificada pela mesma. Isso leva a acreditar ser esta sequência uma região não codificadora.

Além da análise aleatória, na busca de homologias no “Gene Bank”, foi realizada uma análise de comparação direta com as sequências de cromossomos B já conhecidas de vespas (*Nasonia vitripennis*) (EICKBUSH et al., 1992) e de gafanhotos (*Eyprepocnemis plorans*) (LÓPEZ-LEÓN et al, 1995c), por serem estas sequências pertencentes a insetos e portanto estarem mais próximas filogeneticamente de *Partamona helleri*. A comparação da sequência obtida (clone P1) com os clones de número X75637 de *Eyprepocnemis plorans* e os clones X64904, X64905 e X64906 de *Nasonia vitripennis*, disponíveis no “Gene Bank” e

que representam seqüências específicas dos cromossomos B, não apresentaram nenhuma homologia.

Outro aspecto importante de se ter acesso à seqüência específica dos cromossomos B é a possibilidade da construção de “primers” específicos para amplificação de seqüências típicas desses cromossomos.

Com os dados obtidos da seqüência específica dos cromossomos B pode-se propor, inicialmente, a construção de um “primer” que tenha a seqüência inicial do primer OPK-14 CCCGCTACAC, mais dez a quinze pares de base subsequentes. Contudo uma análise em programas computacionais adequados seria interessante para se saber se estas seqüências forneceriam “primers” estáveis, e , se não, qual outra região da seqüência específica dos cromossomos B seria melhor para desenhar os “primers” específicos. Uma vez desenhados esses “primers” poderiam ser utilizados na tentativa de seqüenciar uma porção maior, ou todo, cromossomo B utilizando a técnica de “Chromosome Walking”.

Uma análise mais detalhada desta seqüência é necessária, porém pode-se afirmar que ela não codifica proteínas conhecidas, não apresenta homologia com outras seqüências específicas de cromossomos B e possivelmente é característica de regiões de DNA repetitivo dos cromossomos B.

4. RESUMO E CONCLUSÕES

Com o objetivo de ampliar o conhecimento sobre a origem, evolução e efeitos dos cromossomos B sobre a adaptação dos indivíduos, em *Partamona helleri*, foram empregadas, no presente trabalho, técnicas de genética molecular como RAPD, transformação por choque térmico para clonagem, “Southern Blot” e seqüenciamento.

Com estas técnicas esperava-se identificar novos marcadores moleculares RAPD associados a cromossomos B em *Partamona helleri*, bem como isolar, clonar e seqüenciar marcadores RAPD encontrados, associados a esses cromossomos. Além disso, verificar se existia homologia entre as seqüências especificadas por esses marcadores e regiões já seqüenciadas em outros organismos, especialmente insetos.

Para compor os dados da tese, foram utilizadas operárias da colônia 588, que apresentavam em caracterizações citogenéticas prévias; indivíduos com e sem cromossomos B.

Nenhum novo marcador RAPD associado aos cromossomos B em *Partamona helleri* foi identificado após o uso de 100 “primers”. A clonagem do fragmento de

RAPD associados a esses cromossomos, identificado por TOSTA et al. (1999) foi possível. Foram obtidos dois clones apresentando o fragmento de RAPD associado aos cromossomos B. A clonagem deste fragmento constituiu a primeira de um marcador RAPD associado a cromossomos B. Os clones obtidos foram identificados como clone P1 e clone P2, o clone P1 foi utilizado para a análise de “Southern” e para o seqüenciamento.

Devido aos problemas intrínsecos da utilização da técnica de RAPD uma hipótese de haver se clonado um fragmento de tamanho similar à banda marcadora, diferente da mesma poderia ser cogitada. Para se testar esta hipótese foi, então, realizado um “Southern Blot” onde o clone P1 foi marcado “a frio” e utilizado como sonda em uma hibridização com a reação de RAPD que revela a banda associada aos cromossomos B. A sonda hibridizou com a banda associada aos B nos dois indivíduos utilizados na análise. Assim, pôde-se confirmar que a banda clonada era homologa a banda marcadora associada aos indivíduos portadores de cromossomos B, identificada por TOSTA et al. (1999).

O clone P1, foi parcialmente seqüenciado. A seqüência como esperado é extremamente rica em Adenina e Timina. Uma região repetida três vezes na seqüência (GATGATATA) que apresenta homologia com seqüências repetitivas do DNA do vírus da Varíola, foi identificada e sugere ser esta seqüência uma região de DNA repetitivo dos cromossomos B de *Partamona helleri*. Análises no “Gene Bank” mostraram que esta seqüência não tem homologias com seqüências de cromossomos B de outras espécies, nem mesmo se considerando seqüências de espécies mais próximas como na comparação com seqüências da vespa *Nasonia vitripennis* e do gafanhoto *Eyprepocnemis plorans*. As análises no “Gene Bank” mostraram também, que essa seqüência não codifica nenhuma proteína conhecida.

Como perspectivas pode-se vislumbrar a possibilidade de se encontrar novos marcadores moleculares RAPD associados aos cromossomos B aumentando o número de “primers” utilizados. Além disso, a utilização de outras técnicas de marcação molecular como microssatélites e AFLP podem e devem ser usadas. O uso

destes outros marcadores poderá diferenciar os indivíduos quanto ao número de cromossomos B que os mesmos possuem, o que seria importante para estudos sobre o efeito dos cromossomos B no “fitness” dos indivíduos portadores em *Partamona helleri*.

A utilização dos clones obtidos na construção de sondas específicas para os cromossomos B e posterior hibridação *in situ* fluorescente (FISH) ou hibridização por “Southern” desses tipos de sondas no genoma de *Partamona helleri* e em espécies afins poderá, oferecer pistas sobre a origem desses cromossomos, mostrando se eles se originaram intra ou interespecificamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENITO, M. R. & BIRCHLER, J. A. (1993) Molecular characterization of a maize B-chromosome centric sequence. **Genetics**. **135**, 589-597.
- AMOS, A. & DOVER, G. (1981) The distribution of repetitive DNAs between regular and supernumerary chromosomes in species of *Glossina* (tse-tse): a two-step process in the origin of supernumeraries. **Chromosoma**. **81**, 673-690.
- ARAÚJO, S. M. S. R., POMPOLO, S. G., DERGAM, J. A. S., CAMPOS, L. A. O. (2000) The B chromosome system of *Trypoxylon* (*Trypargilum*) *albitarse* (Hymenoptera, Sphecidae) I. banding analysis. **Cytobios**. **101**, 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. **Proc. R. Soc. Lond. B**. **268**, 1127-1131.

- AVISE, J. C. (1994) **Molecular markers, natural history and evolution**. New York: Chapman & Hall, 511p.
- BANG, J. W. & CHOI, H. W. (1990) Genetic analysis of esterase isozymes in rye (*Secale cereale* L.). **Korean Journal of Genetics**. **12**, 87-94.
- BEUKEBOOM, L. W. (1994) Bewildering Bs: an impression of the 1 st B-Chromosome conference. **Heredity**. **73**, 328-336.
- BLUNDEN, R., WILKES, T. J., FORSTER, J. W., JIMENEZ, M. M., SANDERY, M. J., KARP, A., JONES, R. N. (1993) Identification of the E3900 family, a second family of rye B chromosome specific repeated sequences. **Genome**. **36**, 706-711.
- BRINKMAN, J. N., SESSIONS, S. K., HOUBEN, A., GREEN, D. M. (2000) Structure and evolution of supernumerary chromosomes in the Pacific giant salamander, *Dicamptodon tenebrosus*. **Chromosome Research**. **8**, 477-485.
- BRITO, R. M., COSTA, M. A., POMPOLO, S. G. (1997) Characterization and distribution of supernumerary chromosomes in 23 colonies of *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Brazilian Journal of Genetics**. **20**, 185-188.
- BRITO, R. M. (1998) **Caracterização citogenética de duas espécies do gênero *Partamona* schwarz, 1939 (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae)**. Viçosa: UFV, 1998. 97p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa.

- BRITO-RIBON, M., MIYAZAWA, C. S., POMPOLO, S. G. (1999) First karyotype characterization of four species of *Partamona* (Fries, 1980) (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) in Mato Grosso State, Brazil. **Cytobios.** **100**, 19-26.
- CABRERO, J., ALCHE, J. D., CAMACHO, J. P. M. (1987) Effects of B chromosomes on the activity of nucleolar organizer regions in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*: activation of a latent nucleolar organizer region on a B chromosome fused to an autosome. **Genome.** **29**, 116-121.
- CAMACHO, J. P. M., SHARBEL, T. F., BEUKEBOOM, L. W. (2000) B-chromosome evolution. **Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.** **355**, 163-178.
- CARLSON, W. R., ROSEMAN, R., ZHENG, Y. (1993) Localizing a region on the B-chromosome that influences crossing-over. **Maydica.** **38**, 107-113.
- COSTA, M. A., POMPOLO, S. G., CAMPOS, L. A. O. (1992) Supernumerary chromosomes in *Partamona cupira* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Revista Brasileira de Genética.** **15**, 801-806.
- CUADRADO, A. & JOUVE, N. (1994) Highly repetitive sequences in B chromosomes of *Secale cereale* revealed by fluorescence in situ hybridization. **Genome.** **37**, 709-712.
- DONALD, T. M., LEACH, C. R., CLOUGH, A., TIMMIS, J. N. (1995) Ribosomal RNA genes and the B chromosome of *Brachycome dichromosomatica*. **Heredity.** **74**, 556-561.

- EICKBUSH, D. G., EICBUSH, T. H., WERREN, J. H. (1992) Molecular characterization of repetitive DNA sequences from a B chromosome. **Chromosoma**. **101**, 575-583.
- FERREIRA, M. E. & GRATAPAGLIA, D. (1998) **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA/CENARGEM, 220p.
- FRANKS, T. K., HOUBEN, A., LEACH, C. R., TIMMIS, J. N. (1996) The molecular organization of a B chromosome tandem repeat sequence from *Brachycome dichromosomatica*. **Chromosoma**. **105**, 223-230.
- GOURMET, C. & RAYBURN, L. (1996) Identification of RAPD markers associated with the presence of B chromosomes in maize. **Heredity**. **77**, 240-244.
- GREEN, D. (1990) Muller's ratchet and evolution of supernumerary chromosomes. **Genome**. **33**, 818-824.
- GUTKNECHT, J., SPERLICH, D., BACHMANN, L. A. (1995) A species specific satellite DNA family of *Drosophila subsivestris* appearing predominantly in B chromosomes. **Chromosoma**. **103**, 533-544.
- HAMES, B. D. & HIGGINS, S. J. (1991) **Nucleic acid hybridization: a practical approach**. Oxford: IRL press. 150 p.

- HOUBEN, A., KYNAST, R. G., HEIM, U., HERMANN, H., JONES, R. N., FORSTER, J. W. (1996) Molecular cytogenetic characterization of the terminal heterochromatic segment of the B-chromosome of rye (*Secale cereale*). **Chromosoma**, **105**. 97-103.
- HOUBEN, A., LEACH, C. R., VERLIN, D., ROFE, R., TIMMIS, J. N. (1997a) A repetitive DNA sequence common to the different B chromosomes of the genus *Brachycome*. **Chromosoma**. **106**, 513-519.
- HOUBEN, A., BELYAEV, N. D., LEACH, C. R., TIMMIS, J. N. (1997b) Differences of histone H4 acetylation and replication timing between A and B chromosomes of *Brachycome dichromosomatica*. **Chromosome Research**, **5**, 233-237.
- HOUBEN, A., THOMPSON, N., AHNE, R., LEACH, C. R., VERLIN, D., TIMMIS, J. N. (1999) A monophyletic origin of the B chromosomes of *Brachycome dichromosomatica* (Asteraceae). **Plant Systematics and Evolution**, **219**. 127-135.
- 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., BROWN JR, W. L., KUBOTA, M et al. (1984) Chromosomes observations of tropical ants in western Malaysia. **Ann. Rep. Natl. Inst. Genet**, **34**. 66-69.

- IRSIGLER, A. S. T., TOSTA, V. C., CAMPOS, L. A. O. (2000) Estudo dos efeitos fenotípicos de cromossomos supranumerários em *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Genet. Mol. Biol.**, **23** (Suppl) 147.
- JAMILENA, M., REJÓN, M. R., REJÓN, C. R. (1994) A molecular analysis of the origin of the *Crepis capillaries* B chromosome. **Journal of Cell Science.** **107**, 703-708.
- JAMILENA, M., GARRIDO-RAMOS, M., REJÓN, M. R., REJÓN, C. R., PARKER, J. S. (1995) Characterisation of repeated sequences from microdissected B chromosomes of *Crepis capillaries*. **Chromosoma.** **104**, 113-120.
- JONES, R. N. (1995) Tansley Review N°. 85 B chromosomes in plants. **New Phytol.** **131**, 411-434.
- JONES, R. N. & REES, H. (1982) **B chromosomes**. New York: Academy Press. 232p.
- KEYL, H. J. & HAGELE, K. (1971) B chromosomen bei *Chironomus*. **Cromosoma.** **35**, 403-417.
- LANGDON, T., SEAGO, C., JONES, R. N., OUGHAM, H., THOMAS, H., FORSTER, J. W., JENKINS, G. (2000) De novo evolution of satellite DNA on the rye B chromosome. **Genetics.** **154**, 869-884.

- LEACH, C. R., DONALD, T. M., FRANKS, T. K., SPINIELLO, S. S., HANRAHAN, C. F., TIMMIS, J. N. (1995) Organisation and origin of a B chromosome centromeric sequence from *Brachycome dichromosomatica*. **Chromosoma**. **103**, 708-714.
- LENINGHER, A. L., NELSON, D. L., COX, M. M. (1995) **Princípios de bioquímica**. São Paulo: Sarvier. 839p.
- LIN, B. Y. & CHOU, H. P. (1997) Physical mapping of four RAPDs in the chromosome of maize. **Theor Appl. Genet.** **94**, 534-538.
- LÓPEZ-LEÓN, M. D., CABRERO, J., CAMACHO, J. P. M. (1991) A nucleolus organizer region in a B-chromosome inactivated by DNA methylation. **Chromosoma**. **100**, 134-138.
- LÓPEZ-LEÓN, M. D., NEVES, N., SCHWARZACHER, T., HESLOP-HARRISON, T. S., HEWITT, G. M., CAMACHO, J. P. M. (1994) Possible origin of a B chromosome deduced from its DNA composition using double FISH technique. **Chromosome Research**. **2**, 87-92.
- LÓPEZ-LEÓN, M. D., CABRERO, J., CAMACHO, J. P. M. (1995a) Changes in NOR activity pattern in the presence of supernumerary heterochromatin in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **Genome**. **38**, 68-74.
- LÓPEZ-LEÓN, M. D., CABRERO, J., CAMACHO, J. P. M. (1995b) Changes in DNA methylation during development in the B chromosome NOR of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **Heredity**. **74**, 296-302.

- LÓPEZ-LEÓN, M. D., VÁZQUEZ, P., HEWITT, G. M., CAMACHO, J. P. M. (1995c) Cloning and sequence analysis of an extremely homogeneous tandemly repeated DNA in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **Heredity**. **75**, 370-375.
- LORITE, P., CARRILLO, J. A., GARCIA, M. F., PALOMEQUE, T. (2000) Chromosome numbers in spanish formicidae III. Subfamily Myrmicinae (Hymenoptera). **Sociobiology**. **36**, 555-570.
- McALLISTER, B.F. (1995) Isolation and characterization of a retroelement from B chromosome (PSR) in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. **Insect Molecular Biology**, **4**, 253-262.
- McALLISTER, B.F., WERREN, J.H. (1997) Hybrid origin of a B chromosome (PSR) in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. **Chromosoma**. **106**, 243-253.
- McQUADE, L. R., HILL, R. J., FRANCIS, D. (1994) B-chromosome systems in the greater glider, *Petauroides volans* (Marsupialia: Pseudocheiridae) - II. investigation of B-chromosome DNA sequences isolated by micromanipulation and PCR. **Cytogenetic and Cell Genetic**. **66**, 155-161.
- MIAO, V. P., COVERT, S. F., VANETTEN, H. D. (1991) A fungal gene for antibiotic resistance on a dispensable ("B") chromosome. **Science**. **254**, 1773-1776.
- MICHAILOVA, P. & METTINEN, A. (2000) Cytotaxonomical variability of *Chironomus* L. and *C-anthracinus* Zett. (Diptera, Chironomidae) from industrial and municipal polluted areas of Finland. **Caryologia**. **53**, 69-81.

- NÉO, D. M., BERTOLLO, L. A. C., MOREIRA FILHO, O . (2000) Morphological differentiation and possible origin of B chromosomes in natural Brazilian population of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Genetica**. **108**, 211-215.
- NEVES, N., BARÃO, A., CASTILHO, A., SILVA, M., MORAIS, L., CARVALHO, V., VIEGAS, W., JONES, R. N. (1992) Influence of DNA methylation on rye B-chromosome nondisjunction. **Genome**. **35**, 650-652.
- NUR, U., WERREN, J. H., EICKBUSH, D. G., BURKE, W. D., EICKBUSH, T. H. (1988) A “selfish” B chromosome that enhances its transmission by eliminating the paternal genome. **Science**. **24**, 512-514.
- PEDRO, S. R. de M. (1998) **Meliponini neotropicais: o gênero *Partamona* schwarz, 1939 (Hymenoptera, Apidae) taxonomia e biogeografia**. Ribeirão Preto: FFCLRP, 1998. 219 p. Tese (Doutoramento em Ciências, área: Entomologia). Universidade de São Paulo, USP.
- PEPPERS, J. A., WIGGINS, L. E., BAKER, R. J. (1997) Nature of B chromosomes in the harvest mouse *Reithrodontomys megalotis* by fluorescence in situ hybridization (FISH). **Chromosome Research**. **5**, 475-479.
- PALOMEQUE, T., CHICA, E., GUARDIA, R. D. DE LA. (1990) Karyotype, C-banding, chromosomal location of active nucleolar organizing regions, and B-chromosomes in *Lasius niger* (Hymenoptera, Formicidae). **Genome**. **33**, 267-272.

- PLOWMAN, A. B. & BOUGOURD, S. M. (1994) Selectively advantageous effects of B chromosomes on germination behaviour in *Allium schoenoprasum* L. **Heredity**. **72**, 587-593.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. (1989) **Molecular cloning – a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SANDERY, M. J., FORSTER, J. W., BLUNDEN, R., JONES, R. N. (1990) Identification of a family of repeated sequences on the rye B-chromosome. **Genome**. **33**, 908-913.
- SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Science USA**. **74**, 5463-5467.
- SAPRE, A. B. & DESPHANDE, D. S. (1987) Origin of B chromosomes in *Coix* L. through spontaneous interespecific hybridization. **Journal of Heredity**. **78**, 191-196.
- SHARBEL, T. F., GREEN, D. M., HOUBEN, A. (1998) B-chromosome origin in the endemic New Zealand frog *Leiopelma hochstetteri* through sex chromosome devolution. **Genome**. **41**, 14-22.
- SHARTL, M., NANDA, I., SCHLUPP, I., WILDE, B., EPPLEN, J. T., SCHMIDT, M., PARZEFALL, J. (1995) Incorporation of subgenomic amounts of DNA as compensation for mutational load in a gynogenetic fish. **Nature**. **373**, 68-71.

- SILVA, J. J. S. & YONENAGA-YASSUDA, Y. (1998), Heterogeneity and meiotic behaviour of B and sex chromosomes, banding patterns and localization of (TTAGGG)_n sequences by fluorescence *in situ* hybridization in the neotropical water rat *Nectomys* (Rodentia, Cricetidae). **Chromosome Research**. **6**, 455-462.
- STARK, E. A., CONNERTON, I., BENNETT, S. T., BARNES, S. R., PARKER, J. S., FORSTER, J. W. (1996) Molecular analysis of the structure of the maize B-chromosome. **Chromosome Research**. **4**, 15-23.
- STOUTHAMER, R., van TILBORG, M., JONG, J. H., NUNNEY, L., LUCK, R. F. (2001) Selfish element maintains sex in natural populations of a parasitoid wasp. **Proc. R. Soc. Lond. B**. **268**, 617-622.
- TANIC, N., DEDOVIC, N., VUJOSEVIC, M., DIMITRIJEVIC, B. (2000) DNA profiling of B chromosomes from the Yellow-necked mouse *Apodemus flavicollis* (Rodentia, Mammalia). **Genome Research**, **10**, 55-61.
- THOMAS, J. H. (1995) Genomic imprinting proposed as a surveillance mechanism for chromosome loss. **Proc. Nat. L. Acad. Sci. USA**. **92**, 5737-5741.
- TOSTA, V. C., WALDSCHMIDT, A. M., BRITO, R. M., POMPOLO, S. G., SALOMÃO, T. M. F., BARROS, E. G., CAMPOS, L. A. O. (1998) Marcadores RAPD ligados a presença de cromossomos supranumerários em *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae). **Genet. Mol. Biol.** **21** (Suppl), 83.
- TOSTA, V. C., WALDSCHMIDT, A. M., GOOD-GOD, P. I. V., POMPOLO, S. G., BARROS, E. G., CAMPOS, L. A. O. (1999) Uso de marcadores moleculares para o estudo de cromossomos supranumerários em *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Genet. Mol. Biol.** **22** (Suppl), 182.

- ZHANG, R. X., CHEN, C. B., SONG, W. Q., LI, X. L., CHEN, R. Y. (1999) Homologous analysis on centromeric region sequences of A and B chromosomes from rye by FISH. **Chinese Science Bulletin**. **44**, 704-707.
- WALDSCHMIDT, A. M., SALOMÃO, T. M. F., BARROS, E. G., CAMPOS, L. A. O. (1997) Extraction of genomic DNA from *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). **Brazil J. Genet.** **20**, 421-423.
- WERREN, J. H. (1991) The paternal sex-ratio of *Nasonia*. **The American Naturalist**. **137**, 392-402.
- WILKES, T. M., FRANCKI, M. G., LANGRIDGE, P., KARP, A., JONES, R. N., FORSTER, J. W. (1995) Analysis of rye B-chromosome structure using fluorescence in situ hybridization (FISH). **Chromosome Research**. **3**, 466-472.
- WILLIAMS, J. G. K., HANAFEY, M. K., RAFALSKI, J. A., TINGEY, S. V. (1990) Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. **Methods in enzymology**. **218**, 704-740.
- WILSON, E. O. (1975) **Sociobiology: the new synthesis**. Boston: Belknap press of Harvard University press. 354p.