

JAQUELINE AMORIM PEREIRA

**ISOLAMENTO E ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS DE DNA REPETITIVO EM
ESPÉCIES DA TRIBO MELIPONINI**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

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

T

P436i
2018

Amorim Pereira, Jaqueline, 1993-

Isolamento e análise de sequências de DNA repetitivo em
espécies da Tribo Meliponini / Jaqueline Amorim Pereira. –
Viçosa, MG, 2018.

viii, 36 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Tânia Maria Fernandes Salomão.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Heterocromatina. 2. Enzimas de restrição,DNA.
3. Evolução. 4. *Melipona*. 5. *Tetragonisca*. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa
de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

CDD 22. ed. 572.87

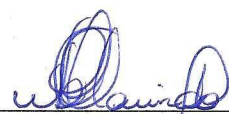
JAQUELINE AMORIM PEREIRA

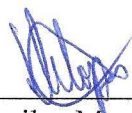
**ISOLAMENTO E ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS DE DNA REPETITIVO EM
ESPÉCIES DA TRIBO MELIPONINI**

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

APROVADA: 26 de julho de 2018.


Rúdo de Paiva Ferreira


Wellington Ronildo Clarindo


Denilce Meneses Lopes
(Presidente)

À minha mãe, por todos ensinamentos e incentivo.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela força e coragem para sempre acreditar.

Ao meu pai Rogério por sempre me apoiar, a minha mãe Helena por não medir esforços para que meus sonhos se tornem realidade, à minha irmã Gabriela pela amizade e apoio de sempre.

Ao Guilherme pelo incentivo, paciência e companheirismo nesses anos.

À CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo auxílio financeiro.

À Universidade Federal de Viçosa pelo acolhimento desde a graduação até o mestrado.

Ao Departamento de Biologia Geral e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural pela oportunidade e por contribuir para meu crescimento profissional.

À Beth por toda a disponibilidade e ajuda.

Ao Leandro, Adriana e Gustavo pela disponibilidade.

Aos colegas de trabalho do laboratório de Biologia Molecular de Insetos pelas conversas e aprendizado.

À Renata, técnica do laboratório de Biologia Molecular de Insetos por toda ajuda nesses anos.

À professora Dr^a. Silvia Pompolo e ao professor Dr. Jorge Abdala Dergam por disponibilizar o laboratório.

Ao professor Dr. Lúcio Campos por todos os ensinamentos e por sempre se fazer presente desde a minha graduação em Biologia na Universidade Federal de Viçosa até o mestrado.

Aos professores Dr. Rúdo e Dr. Wellington por aceitarem fazer parte da banca e contribuírem para este trabalho.

À professora Dr^a. Tânia Salomão por me aceitar como orientanda e por toda ajuda e disponibilidade durante o mestrado.

À professora Dr^a. Denilce Meneses, pela orientação e auxílio em todos os momentos desse trabalho. Obrigada por todos os ensinamentos e por sempre estar disposta a ajudar.

Às meninas do Laboratório de Citogenética de Insetos, Natália Travenzoli, Marina Cunha, Priscila Marchioro, Camila Novaes, Gisele Teixeira e Alessandra Faustino, agradeço por todos ensinamentos, pela amizade e por tornarem os dias muito mais alegres.

A todos que fizeram ou fazem parte da minha caminhada, em especial aos amigos de coração, de alguma forma vocês contribuíram para essa conquista.

Obrigada!

RESUMO

PEREIRA, Jaqueline Amorim, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2018. **Isolamento e análise de sequências de DNA repetitivo em espécies da Tribo Meliponini.** Orientadora: Tânia Maria Fernandes Salomão. Coorientadora: Denilce Meneses Lopes.

O DNA repetitivo compõe grandes frações do genoma sendo representado por elementos transponíveis, DNA satélite, minissatélites e microsatélites. Com o avanço de novas tecnologias de estudo, tais como uso de enzimas de restrição, sequenciamento, citogenética molecular, o DNA repetitivo deixou de ser considerado “Junk DNA” e passou a ter suas funções reconhecidas. Como papel na manutenção da heterocromatina, estruturação de centrômeros e telômeros, montagem do cinetócoro e segregação cromossômica. Além disso, essas sequências altamente dinâmicas estão sendo relacionadas com processos de evolução e especiação em diferentes grupos taxonômicos. As abelhas da Tribo Meliponini, apresentam diferenças na distribuição de heterocromatina, tornando-os alvos em estudos com sequências de DNA repetitivo. Esses indivíduos são conhecidos como “abelhas indígenas sem ferrão” e constituem os principais polinizadores, sendo, portanto, importantes para a agricultura e manutenção do ecossistema. No presente estudo, sequências de DNA repetitivo foram analisadas em espécies da Tribo Meliponini, com intuito de auxiliar na compreensão da evolução da heterocromatina neste grupo de abelhas. Sequências de DNA repetitivo foram obtidas por meio de digestão enzimática do DNA total e os fragmentos utilizados como sondas na técnica de Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH) para a identificação de possíveis sequências deste tipo de DNA nos cromossomos. Espécies dos quatro subgêneros de *Melipona* com alto e baixo conteúdo heterocromático foram investigadas utilizando sequência repetitiva de *Melipona mondury*. Os resultados dessa análise mostraram a presença dessa sequência na heterocromatina das espécies do subgênero *Melikerria*, indicando que a mesma é conservada apenas nesse subgênero e que a heterocromatina surgiu de forma independente em *Melipona*, considerando que *Melipona fasciculata*, espécie de alto conteúdo de heterocromatina não apresentou nenhuma marcação com a sonda utilizada. A sequência repetitiva de *Tetragonisca angustula* foi empregada para análise em espécies de diferentes gêneros com diferentes relações filogenéticas. Os resultados mostraram que essa sequência foi conservada apenas entre *Tetragonisca angustula* e *Tetragonisca fiebrigi*, resultado este, possivelmente, relacionado com o curto tempo de diversificação entre essas espécies. Nesse estudo mostramos que a heterocromatina é rica de uma determinada sequência de DNA repetitivo e que esta tem

alta taxa de diversificação, evoluindo de forma diferente em cada gênero bem como entre as espécies do gênero.

ABSTRACT

PEREIRA, Jaqueline Amorim, M.Sc, Universidade Federal de Viçosa, July, 2018, **Isolation and analysis of repetitive DNA sequences in Meliponini tribe species.** Adviser: Tânia Maria Fernandes Salomão. Co-adviser: Denilce Meneses Lopes.

The repetitive DNA makes up large fractions of the genome being represented by transposable elements, satellite DNA, minisatellites and microsatellites. With the advancement of new study technologies, such as the use of restriction enzymes, sequencing, molecular cytogenetics, repetitive DNA is no longer considered "Junk DNA" and has its functions recognized. As role in the maintenance of heterochromatin, structuring of centromere and telomeres, assembly of the kinetochore and chromosome segregation. In addition, these highly dynamic sequences are being related to processes of evolution and speciation in different taxonomic groups. The Meliponini Tribe bees show differences in the distribution of heterochromatin, making them targets in studies with repetitive DNA sequences. These individuals are known as "stingless indigenous bees" and are the main pollinators and are therefore important for agriculture and ecosystem maintenance. In the present study, repetitive DNA sequences were analyzed in Meliponini Tribe species, in order to aid in understanding the evolution of heterochromatin in this group of bees. Repetitive DNA sequences were obtained by enzymatic digestion of the total DNA and the fragments used as probes in Fluorescent Hybridization *in situ* (FISH) technique to identify possible sequences of this type of DNA in the chromosomes. Species of the four subgenus of *Melipona* with high and low heterochromatic content were investigated using repetitive sequence of *Melipona mondury*. The results of this analysis showed the presence of this sequence in the heterochromatin of the species of the subgenus *Melikerria*, indicating that it is conserved only in this subgenus and that heterochromatin appeared independently in *Melipona*, considering that *Melipona fasciculata*, a species of high heterochromatin content did not present no marking with the probe used. The repetitive sequence of *Tetragonisca angustula* was used for analysis in species of different genera with different phylogenetic relationships. The results showed that this sequence was conserved only between *Tetragonisca angustula* and *Tetragonisca fiebrigi*, a result possibly related to the short time of diversification among these species. In this study we showed that heterochromatin is rich in a certain repetitive DNA sequence and that this has a high rate of diversification, evolving differently in each genus as well as among species of the genus.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. CAPÍTULO I.....	10
Resumo	11
Introdução.....	12
Materiais e Métodos	13
Resultados	14
Discussão.....	14
Referências	12
3. CAPÍTULO II.....	23
Resumo	24
Introdução.....	25
Materiais e Métodos	26
Resultados	27
Discussão.....	27
Referências	29
4. CONCLUSÕES GERAIS	36

INTRODUÇÃO GERAL

1.1 DNA repetitivo

O genoma dos eucariotos é amplamente enriquecido por sequências de DNA repetitivo. Essas sequências podem ser classificadas como elementos transponíveis e retrotransponíveis, DNAs satélites, minissatélites e microssatélites (Bostock, 1980; Charlesworth *et al.*, 1994). Os elementos retro- e transponíveis são caracterizados por serem sequências moderadamente repetitivas, apresentarem mobilidade e estarem dispersos nos cromossomos. Os DNAs satélites são considerados como altamente repetitivos sendo compostos por arranjos de 100 ou mais pares de bases. Já os minissatélites são formados por arranjos de repetições em tandem de ~15 pares de bases e os microssatélites repetições de 2-5 pb, e são classificadas como moderadamente repetitivas (Charlesworth *et al.*, 1994).

O DNA satélite é encontrado preferencialmente nas porções heterocromáticas dos cromossomos, que são regiões pobres em genes e permanecem condensadas ao longo do ciclo celular, formando as regiões centroméricas, pericentroméricas, subteloméricas, podendo também estar presentes em regiões intersticiais dos cromossomos (Charlesworth *et al.*, 1994). Além disso, essas sequências podem conter grandes variações tanto em número de cópias quanto em sequências de nucleotídeos, comprimento e abundância das unidades repetidas. No entanto, elas sempre compartilham a propensão em se organizar em longos arranjos e formar regiões heterocromáticas (Ugarkovic *et al.*, 2002).

A ocorrência do DNA repetitivo no genoma eucarioto foi descoberta em 1961 (Kit, 1961, Seuoka, 1961). Por meio de experimentos de ultracentrifugação em gradiente de cloreto de cério observou-se duas bandas de DNA com densidades diferentes. A banda mais leve representava cerca de 10% do genoma e foi denominada DNA satélite (Kit, 1961, Seuoka, 1961). Mais tarde, observou-se que a taxa de re-naturação dessa banda era maior do que a do restante do DNA, concluindo que possuíam repetições pelo genoma. Com isso, uma nova técnica para investigar essas sequências passou a ser utilizada, conhecida como Cinética de reassociação (Cot) demonstrando que a taxa de re-associação estava diretamente relacionada ao número de repetições que a sequência portava no genoma (Waring & Britten, 1966; Britten & Davidson, 1971).

Apesar da técnica Cot ter proporcionado grandes achados e ser de grande importância, ela não possibilita o estudo da sequência de maneira específica. Assim outras técnicas começaram a ser desenvolvidas com base no uso de ferramentas de biologia

molecular. Essas técnicas fundamentam-se no tratamento do DNA genômico com endonucleases de restrição, que são capazes de reconhecer sequências nucleotídicas específicas, que separa DNAs satélites de outras sequências repetitivas, além de possibilitar a obtenção de sequências específicas (Hörz & Zachau, 1977; Singer, 1982). Posteriormente, as sequências de DNA satélite são identificadas em gel de agarose como bandas evidentes, tornando possível a purificação, clonagem e eventual identificação e caracterização dessas sequências (revisado em Garrido-Ramos, 2017). Atualmente, a Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH) usando sondas de sequências de DNA satélite, possibilita a análise e localização dessas sequências abrindo campo para novas análises citogenéticas (Ratan *et al.*, 2017).

A partir desses avanços foi possível ampliar o conhecimento acerca dos DNAs repetitivos, mostrando sua função na estruturação do centrômero e telômeros, montagem do cinetócoro, segregação cromossômica e reconhecimento dos cromossomos homólogos durante a meiose (Ugarkovic *et al.*, 2002; Plohl *et al.*, 2008; Plohl *et al.*, 2014). Além disso, eventos de amplificação ou deleção podem ocasionar polimorfismos em uma família de DNA satélite, sendo a base para alterações evolutivas entre espécies (Plohl *et al.*, 2012). Recentemente, papéis funcionais foram atribuídos a transcritos de DNA satélite, em processos de regulação genômica, montagem de cinetócoro e manutenção da heterocromatina (Feliciello *et al.*, 2015; Koo *et al.*, 2016). Ademais, cromossomos B tem mostrado ser constituídos de sequências repetitivas, que podem estar presentes ou não no complemento A contribuindo para identificação da origem desses cromossomos (Teruel *et al.*, 2010; Teruel *et al.*, 2014; Ruiz-Ruano *et al.*, 2016; Milani *et al.*, 2017).

A diversidade de características atreladas ao DNA repetitivo se deve principalmente à alta taxa de variação dessas sequências (Plohl *et al.*, 2012). Segundo o modelo da “evolução em concerto”, as variações tenderiam a se espalhar pelo genoma levando a uma homogeneização das sequências. Por processos envolvendo a reprodução sexuada, tais sequências seriam fixadas (Dover, 1982; Dover, 1986; Dover, 2002). Dessa forma, organismos reprodutivamente ligados tendem a homogeneizar as mutações das sequências repetitivas em seus genomas mais rapidamente do que aqueles que não estão ligados reprodutivamente, podendo assim levar a uma evolução divergente (Plohl *et al.*, 2012). Apesar da rápida evolução dessas sequências, Salser *et al.* (1976) propôs a “hipótese biblioteca”, na qual espécies relacionadas compartilham uma biblioteca ancestral de diferentes sequências de DNA repetitivos que por sua vez podem ser amplificadas de forma diferente em cada espécie.

Em virtude da relevância atribuída a essas sequências, vários estudos vêm sendo desenvolvidos. Em abelhas, estudos citogenéticos com essas sequências de DNA repetitivo se restringem a poucas publicações, sendo que com espécies da Tribo Meliponini apenas estudos restritos com *Melipona* e *Tetragonisca* (Tares *et al.*, 1993; Rouleux-Bonnin *et al.*, 2004; Lopes *et al.*, 2014; Picolli *et al.*, 2018).

1.2 Tribo Meliponini

A tribo Meliponini constitui um grupo de abelhas eussociais conhecido popularmente como “abelhas indígenas sem ferrão” e distribui-se em todas as regiões tropicais, podendo também ocorrer em algumas regiões subtropicais (Silveira *et al.*, 2002; Michener, 2007). Apesar de terem preferência por algumas plantas, às abelhas sem ferrão podem visitar várias espécies florais, são de fácil domesticação e seus ninhos são permanentes (Heard, 1999; Roubik, 2006). Assim, elas são importantes agentes polinizadores de plantas cultiváveis bem como de plantas nativas. Portanto, elas possuem alto valor econômico e ecológico, sendo indispensáveis para a manutenção do ecossistema e para produção agrícola (Michener, 2000; Michener, 2007; Gallai *et al.*, 2009).

No mundo, aproximadamente 150 bilhões de euros são gerados em função da ação polinizadora das abelhas (Gallai *et al.*, 2009). No entanto, nos últimos anos, tem-se observado um decréscimo nas populações desses insetos, que é decorrente principalmente do uso incessante de defensivos agrícolas e do desmatamento (Mullin *et al.*, 2010). Esse declínio, por sua vez, repercute diretamente na produção agrícola, pois uma polinização defasada reflete na quantidade e qualidade dos frutos que são gerados (Messinger *et al.*, 2016). Assim, cada vez mais tem se chamado a atenção para os estudos relacionados à conservação desse grupo e da sua importância para o ecossistema.

1.2 Citogenética na tribo Meliponini

Desde 1948, estudos citogenéticos vêm sendo desenvolvidos com espécies da tribo Meliponini (Kerr, 1948). Esses estudos têm gerado conhecimentos citológicos, genéticos e evolutivos, enfatizando as características dos cromossomos, como número, morfologia, grau de condensação, organização, além de suas variações como resultado de rearranjos cromossômicos que ocorreram durante a evolução da tribo (Guerra, 1988; Kasahara, 2009; Tavares *et al.*, 2017).

Estudos citogenéticos na Tribo Meliponini são ainda muito escassos, tendo sido documentados para apenas 104 espécies correspondendo a menos de 20% das espécies descritas (Tavares *et al.*, 2017). Com relação à citogenética molecular, apenas estudos de localização e distribuição de genes ribossomais (Brito *et al.*, 2005; Cunha *et al.*, 2018 *no prelo*) e de sequências microssatélites (Piccoli *et al.*, 2018) foram conduzidos para algumas espécies de *Partamona* Schwarz e de *Melipona* Illiger. Estudos com DNA repetitivo foram relatados apenas para *Melipona* e *Tetragonisca fiebrigi* Schwarz (Lopes *et al.*, 2014; Piccoli *et al.*, 2018).

De acordo com os estudos citogenéticos com as espécies de Meliponini, o padrão de distribuição da heterocromatina é em geral encontrado em um dos braços cromossômicos, além disso, podem apresentar em grades proporções. Assim podemos encontramos um braço eucromático e outro heterocromático (Hoshiba & Imai, 1993; Rocha *et al.*, 2003; Costa *et al.*, 2004; Carvalho & Costa, 2011 Godoy *et al.*, 2013; Miranda *et al.*, 2013). Dentre as espécies com essa característica incluem as do gênero *Tetragonisca* Moure, como *T. angustula* e *T. fiebrigie*, com predominância de heterocromatina no braço curto dos cromossomos (Barth *et al.*, 2011).

O gênero *Melipona* se destaca dos demais Meliponini pela variação na localização e quantidade de heterocromatina entre suas espécies, a qual divide o gênero em dois grupos (Rocha & Pompolo 1998; Rocha *et al.* 2002). O primeiro grupo constitui as espécies que apresentam menos de 50% de heterocromatina e com distribuição da mesma na região pericentromérica dos cromossomos. Nesse grupo encontram-se espécies pertencentes aos subgêneros *Eomelipona* Moure, *Melipona* Illiger e *Melikerria* Moure. O segundo grupo é representado pelas espécies com mais de 50% de heterocromatina com localização na região intersticial dos cromossomos, ocupando quase toda a sua extensão. Nesse último grupo encontram-se espécies pertencentes aos subgêneros *Michmelia* Moure e *Melikerria* (Rocha & Pompolo, 1998; Rocha *et al.*, 2002). Posteriormente, outros estudos citogenéticos e de quantificação do DNA apoiaram essa divisão (Tavares *et al.*, 2010, 2012; Cunha *et al.*, 2018 *no prelo*).

Visto os diferentes padrões e a grande proporção de heterocromatina que as espécies de Meliponini podem apresentar, estudos com sequências repetitivas poderiam contribuir para melhorar o conhecimento dessa região e sua relação com a evolução cromossômica nas espécies dessa Tribo. Assim, esse estudo teve como intuito isolar sequências de DNA repetitivo em espécies da Tribo Meliponini e utilizá-las para investigar a composição e evolução da heterocromatina neste grupo de abelhas.

Com base nessa proposta, esse estudo foi dividido em dois capítulos os quais tiveram como objetivos:

- a) Capítulo 1: Isolar uma sequência de DNA repetitivo de uma espécie de *Melipona* e relacionar sua distribuição entre as espécies de alto e baixo conteúdo de heterocromatina.
- b) Capítulo 2: Obter uma sequência de DNA repetitivo de *Tetragonisca angustula*, analisar e fazer uma relação da distribuição dessa sequência dentro desse gênero e entre outros gêneros da Tribo Meliponini.

Referências

- Barth, A., Fernandes, A., Pompolo, S. D. G. & Costa, M. A. 2011. Occurrence of B chromosomes in *Tetragonisca* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): a new contribution to the cytotaxonomy of the genus. *Genetics and molecular biology*. 34.1: 77-79.
- Britten, R.J. & Davidson, E.H. 1971. Repetitive and non-repetitive DNA sequences and a speculation on the origins of evolutionary novelty. *The Quarterly review of biology*. 46.2:111-138.
- Brito, R.M., das Graças Pompolo, S., Magalhães, M. F. M., de Barros, E. G., & Sakamoto-Hojo, E.T. 2005. Cytogenetic characterization of two *Partamona* species (Hymenoptera, Apinae, Meliponini) by fluorochrome staining and localization of 18S rDNA clusters by FISH. *Cytologia*. 70.4: 373-380.
- Bostock, C. 1980. A function for satellite DNA? *Trends in biochemical sciences*. 5.5: 117-119.
- Carvalho, A.F. & Costa, M.A. 2011. Cytogenetic characterization of two species of *Frieseomelitta* Ihering, 1912 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Genetics and molecular biology*. 34.2: 237-239.
- Charlesworth, B., Paul, S. & Wolfgang, S. 1994. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature*. 371.6494: 215-220.
- Costa, K.F., Brito, R.M. & Miyazawa, C.S. 2004. Karyotypic description of four species of *Trigona* (Jurine, 1807) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) from the State of Mato Grosso, Brazil. *Genetics and molecular biology*. 27.2: 187-190.
- Cunha, M.S., Travençoli, N.M., Ferreira, R.P., Cassinela, E.K., Silva, H., Salomão, T.M.F. & Lopes, D.M. 2018. Comparative cytogenetics in three *Melipona* species

- (Hymenoptera: Apidae) with two divergent heterochromatic patterns. *Genetics and Molecular Biology (no prelo)*.
- Dover, G.A. 1982. Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. *Nature*. 299.5879: 111-117.
- Dover, G.A. 1986. Molecular drive in multigene families: how biological novelties arise, spread and are assimilated. *Trends in genetics*. 2:159-165.
- Dover, G.A. 2002. Molecular drive. *Trends in Genetics*. 18.11: 587-589.
- Feliciello, I., Akrap, I. & Ugarković. Đ. 2015. Satellite DNA modulates gene expression in the beetle *Tribolium castaneum* after heat stress. *PLoS genetics*. 11.8: e1005466.
- Gallai, N., Salles, J.M., Settele, J. & Vaissière, B.E. 2009. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological Economics*. 68.3: 810-821
- Garrido-Ramos, M. A. 2017. Satellite DNA: An evolving topic. *Genes*. 8.9: 230.
- Godoy, D.C., Ferreira, R.P. & Lopes, D.M. 2013. Chromosomal Variation and Cytogenetics of *Plebeia lucii* and *P. phrynostoma* (Hymenoptera: Apidae). *Florida entomologist*. 96.4: 1559-1566.
- Guerra, M.S. 1988. Introdução à citogenética geral. Guanabara Koogan.
- Heard, T.A. 1999. The role of stingless bees in crop pollination. *Annual Review of Entomology*. 44.1: 183-206.
- Hörz, W. & Zachau, H. G. 1977. Characterization of distinct segments in mouse satellite DNA by restriction nucleases. *European journal of biochemistry*. 73.2: 383-392.
- Hoshiba, H. & Imai, H.T. 1993. Chromosome evolution of bees and wasps (Hymenoptera, Apocrita) on the basis of C-banding pattern analyses. *Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology*. 61.3: 465-492.
- Kasahara, S. 2009. Introdução à pesquisa em citogenética de vertebrados. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto. 160.
- Kerr, W.E. 1948. Estudos sobre o gênero *Melipona*. *Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz*. 5:181-276.
- Kit, S. 1961. Equilibrium sedimentation in density gradients of DNA preparations from animal tissues. *Journal of molecular biology*. 3.6:711IN1-716IN2.
- Koo, D.H., Zhao, H. & Jiang J. 2016. Chromatin-associated transcripts of tandemly repetitive DNA sequences revealed by RNA-FISH. *Chromosome Research*. 24.4: 467-480.

- Lopes, D.M., Fernandes, A., Diniz, D., Scudeler, P.E.S., Foresti, F. & Campos, L.A.O. 2014. Similarity of heterochromatic regions in the stingless bees (Hymenoptera: Meliponini) revealed by chromosome painting. *Caryologia*. 67.3: 222-226.
- Messinger, J., Martini, M.M., Rossi, G., Samuels, J. & Lauerer, M. 2016. Successful pollination of the Neotropical crop *Solanum quitoense* by *Bombus terrestris*: behavior, efficiency and yield. *Journal of Applied Entomology*. 140.1-2: 124-134
- Michener, C.D. 2000. *The Bees of the World*. Baltimore and London The John Hopkins University Press. 1.
- Michener, C.D. 2007. *The Bees of the World*. The John Hopkins, 2nd Ed. University Press, Baltimore. pp953.
- Milani, D., Ramos, É., Loreto, V., Martí, D. A., Cardoso, A. L., Moraes, K. C. M. & Cabral-de-Mello, D. C. 2017. The satellite DNA AflaSAT-1 in the A and B chromosomes of the grasshopper *Abracris flavolineata*. *BMC genetics*. 18.1:81.
- Miranda, R.V., Fernandes, A. & Lopes, D.M. 2013. Karyotype description of *Cephalotrigona femorata* Smith (Hymenoptera: Apidae) and the C-banding pattern as a specific marker for *Cephalotrigona*. *Sociobiology*. 60.1: 131-134.
- Mullin, C.A., Frazier. M., Frazier. J., Ashcraft, S., Simonds, R., van Engelsdorp, D. & Pettis, J.S. 2010. High levels of miticides and agrochemicals in north American apiaries: Implications for honey bee health. *PLoS ONE*. 5.3: e9754
- Piccoli, M. C. A., Bardella, V. B. & Cabral-de-Mello, D.C. 2018. Repetitive DNAs in *Melipona scutellaris* (Hymenoptera: Apidae: Meliponidae): chromosomal distribution and test of multiple heterochromatin amplification in the genus. *Apidologie*. 1-8.
- Plohl, M., Luchetti, A., Meštrović, N. & Mantovani, B. 2008. Satellite DNAs between selfishness and functionality: Structure, genomics and evolution of tandem repeats in centromeric (hetero)chromatin. *Gene*. 409.1:72–82.
- Plohl, M., Meštrović, N. & Mravinac, B. 2012. Satellite DNA evolution. *Repetitive DNA*. 126-152.
- Plohl, M., Meštrović, N. & Mravinac, B. 2014. Centromere identity from the DNA point of view. *Chromosoma*. 123.4: 313–325.
- Ratan, Z.A., Zaman, S.B., Mehta, V., Haidere, M.F., Runa, N.J. & Akter, N. 2017. Application of Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) Technique for the Detection of Genetic Aberration in Medical Science. *Cureus*. 9.6.

- Rocha, M.P. & Pompolo, S.G. 1998. Karyotypes and heterochromatin variation (C-bands) in *Melipona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Genetics and Molecular Biology*. 21.1: 41–45
- Rocha, M.P., Pompolo, S.G., Dergam, J.A., Fernandes, A., Campos, L.A.O. 2002. DNA characterization and karyotypic evolution in the bee genus *Melipona* (Hymenoptera Meliponini). *Hereditas* 136.1:19–27
- Rocha, M.P., Cruz, M.P., Fernandes, A., Waldschmidt, A.M., Silvajúnior, J.C. & Pompolo, S.G. 2003. Longitudinal differentiation in *Melipona mandacaia* (Hymenoptera, Meliponini) cromossomes. *Hereditas*. 138.2: 133-137.
- Rouleux-Bonnin, F., Bigot, S. & Bigot, Y. 2004. Structural and transcriptional features of *Bombus terrestris* satellite DNA and their potential involvement in the differentiation process. *Genome*. 47.5: 877-888
- Roubik, D.W. 2006. Stingless bee nesting biology. *Apidologie*. 37.2: 124-143
- Ruiz-Ruano, F. J., Cabrero, J., López-León, M. D. & Camacho, J. P. M. 2017. Satellite DNA content illuminates the ancestry of a supernumerary (B) chromosome. *Chromosoma*. 126.4: 487-500.
- Salser, W., Bowen, S., Browne, D., El Adli F., Fedoroff, N., Fry, K., Heindell, H., Paddock, G., Poon, R., Wallace, B. & Whitcome, P. 1976. Investigation of the organization of mammalian chromosomes at the DNA sequence level. *Federation proceedings*. 35.1: 23-35.
- Singer, M.F. 1982. Highly repeated sequences in mammalian genomes. *International review of cytology*. 76: 67–112.
- Silveira, F.A., Melo, G.A.R. & Almeida, E.A.B. 2002. Abelhas brasileiras: sistemática e identificação. Belo Horizonte. 253.
- Sueoka, N., 1961. Variation and heterogeneity of base composition of deoxyribonucleic acids: A compilation of old and new data. *Journal of Molecular Biology*. 3.1: 31–40
- Tares, S., Cornuet, J. M. & Abad, P. 1993. Characterization of an unusually conserved AluI highly reiterated DNA sequence family from the honeybee, *Apis mellifera*. *Genetics*. 134.4: 1195-1204.
- Tavares, M.G., Lopes, D.M. & Campos, L.A.O. 2017. An overview of cytogenetics of the tribe Meliponini (Hymenoptera: Apidae). *Genetica*, 14.3: 241-258.

- Tavares, M.G., Carvalho, C.R. & Soares, F.A.F. 2010. Genome size variation in *Melipona* species (Hymenoptera: Apidae) and sub-grouping by their DNA content. *Apidologie*. 41.6: 636–642
- Tavares, M.G., Carvalho, C.R., Soares, F.A.F. & Campos, L.A.O. 2012. Genome size diversity in stingless bees (Hymenoptera: Apidae, Meliponini). *Apidologie* 43.6: 731–736
- Teruel, M., Ruíz-Ruano, F. J., Marchal, J. A., Sánchez, A., Cabrero, J., Camacho, J. P., & Perfectti, F. 2014. Disparate molecular evolution of two types of repetitive DNAs in the genome of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Heredity*. 112.5: 531.
- Teruel, M., Cabrero, J., Perfectti, F. & Camacho, J.P.M. 2010. B chromosome ancestry revealed by histone genes in the migratory locust. *Chromosoma*. 119.2: 217–225.
- Ugarković, D. & Plohl, M. 2002 Variation in satellite DNA profiles—causes and effects. *The EMBO journal*. 21.22: 5955-5959.
- Waring, M., & Britten, R. J. 1966. Nucleotide sequence repetition: a rapidly reassociating fraction of mouse DNA. *Science*. 154.3750:791-794.

2. CAPÍTULO I

Evolução da heterocromatina em *Melipona* (Apidae: Meliponini) com base no estudo de sequências de DNA repetitivo.

Jaqueline Amorim Pereira¹, Monique Póvoa de Oliveira¹, Tânia Maria Fernandes Salomão¹, Denilce Meneses Lopes¹

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

Resumo

O genoma dos eucariotos é enriquecido por diferentes tipos de sequências de DNA repetitivo. Historicamente nenhuma função foi atribuída a essas sequências, tornando-as alvo de intensos estudos nos quais têm demonstrado sua importância estrutural e funcional no genoma. O gênero *Melipona* possui espécies com ampla variação no conteúdo de heterocromatina, 8% a 73%, característica esta utilizada para a separação das mesmas em dois grupos, e alvo para estudos de sequências de DNA repetitivo. No presente estudo objetivou-se estudar uma sequência de DNA repetitivo de uma espécie de *Melipona* e comparar a distribuição dessa sequência entre as espécies com alto e baixo conteúdo de heterocromatina desse gênero. A sequência de DNA repetitivo foi isolada do DNA total da espécie de *M. mondury*, por meio da digestão enzimática com a enzima MspI. A sequência isolada foi utilizada como sonda e analisada em cromossomos de oito espécies de *Melipona*. A sequência repetitiva isolada pela enzima MspI de *M. mondury* hibridizou nas porções de heterocromatina de todos os cromossomos desta espécie, bem como nos cromossomos das espécies com alto conteúdo de heterocromatina pertencentes ao subgênero *Michmelia*. Diferentemente, sinais de hibridização não foram observados nos cromossomos das outras espécies dos subgêneros avaliados. Estes resultados indicam que a sequência de DNA repetitivo utilizada é um constituinte da heterocromatina de *Michmelia* e que surgiu do ancestral comum das espécies desse subgênero. Além disso, nossos resultados foram condizentes com o surgimento independente da heterocromatina entre *Melikerria* e *Michmelia* e poderão subsidiar futuras discussões sobre evolução da heterocromatina no gênero *Melipona*.

Introdução

Sequências de DNA repetitivo compõem uma porção considerável do genoma dos eucariotos, dentre essas sequências incluem os elementos transponíveis, microssatélites, minisatélites e DNAs satélites. (Bostock, 1980; Charlesworth *et al.*, 1994). Anteriormente essas sequências repetitivas eram consideradas como “sem função”. Entretanto, elas têm sido alvo de intensos estudos que demonstraram sua importância na organização e função no genoma dos eucariotos (Ugarkovic *et al.*, 2005; Palomeque & Lorite, 2008; Lower *et al.*, 2018), além de serem os principais constituintes da heterocromatina, relacionando com sua formação e manutenção (Charlesworth *et al.*, 1994; Grewal & Jia, 2007).

Sequências repetitivas são caracterizadas por se diferenciarem de forma rápida durante a evolução (Phol *et al.*, 2012). Além disso, podem apresentar modo particular de evolução, conhecida como evolução em concerto, que consiste em homogeneização e fixação das sequências a partir da divergência do ancestral comum (Charlesworth *et al.*, 1994; Dover, 1982; Dover, 1986; Dover, 2002). Com base nesse modelo, a similaridade entre sequências de indivíduos de uma espécie seria maior do que quando comparado com espécies próximas, em que essas sequências acumulariam diferenças e evoluíam independentemente em cada espécie ou grupo de espécies (Elder & Turner, 1995; Plohl *et al.*, 2012). Apesar de sequências repetitivas possuírem em geral rápida evolução, acredita-se que espécies relacionadas compartilhem uma biblioteca ancestral de diferentes sequências, conhecida como “hipótese biblioteca” (Salser *et al.*, 1976). Essa hipótese explica como uma sequência satélite pode ser compartilhada por diferentes espécies mesmo após longos períodos evolutivos (Plohl *et al.*, 2010).

O gênero *Melipona* Illiger é um táxon promissor no que tange ao estudo da evolução de sequências repetitivas, uma vez que o gênero possui espécies com características bem distintas em relação à quantidade de heterocromatina que varia entre 8% e 73% (Rocha *et al.*, 2002; Tavares *et al.*, 2010). Com base nestes dados citogenéticos, o gênero é dividido citogeneticamente em dois grupos: grupo I composto por espécies com baixo conteúdo heterocromático e grupo II composto por espécies com alto conteúdo heterocromático (Rocha & Pompolo, 1998; Rocha *et al.*, 2002). Morfologicamente este gênero é dividido em quatro subgêneros: *Eomelipona* Moure, *Melipona stricto sensu* Illiger, *Melikerria* Moure e *Michmelia* Moure (Camargo & Pedro, 2013). Comparando as características morfológicas e citogenéticas, os subgêneros *Eomelipona* e *Melipona stricto sensu* são compostos apenas por espécies com baixo conteúdo heterocromático,

Michmelia apenas por espécies com alto conteúdo, enquanto *Melikerria* possui espécies com ambos os padrões heterocromáticos (revisado em Cunha *et al.*, 2018).

Considerando as características do gênero *Melipona* e que estudos com sequências repetitivas podem contribuir para a compreensão da evolução cromossômica desse grupo, esse trabalho objetivou isolar uma sequência de DNA repetitivo de uma espécie de *Melipona* e comparar a distribuição dessa sequência entre espécies com alto e baixo conteúdo de heterocromatina desse gênero.

Materiais e Métodos

Espécies coletadas e preparações cromossômicas

Oito espécies de *Melipona* foram analisadas (Tabela 1): *M. bicolor*, *M. puncticollis*, *M. quinquefasciata*, *M. quadrifasciata*, *M. flavolineata*, *M. mondury*, *M. rufiventris* e *M. fasciculata*. Os espécimes foram identificados por Sílvia Regina de Menezes Pedro (Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil), e depositados na coleção científica do Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Os cromossomos mitóticos foram obtidos de gânglios cerebrais de larvas (Imai *et al.*, 1988). Espécimes de machos e fêmeas foram usados nas análises.

Técnica com enzima de restrição

O isolamento da sequência de DNA repetitivo da espécie de *M. mondury* foi realizado por meio da técnica de enzima de restrição. O DNA genômico (100-500 ng/μl) desta espécie foi extraído de acordo com Waldschmidt *et al.* (1997). Experimentos preliminares foram realizados considerando a quantidade de enzima, quantidade de DNA e tempo de reação. Foram feitos testes separadamente com as enzimas de restrição MspI, MffI, HindIII, BfaI, BglI, PstI, HaeIII e os produtos da digestão foram avaliados em gel de agarose 1,2%. O padrão de bandas típico para sequências de DNA repetitivo foi observado apenas com a enzima MspI com incubação a 37°C por 6 h. Uma banda de 750 pb do gel foi purificada do gel utilizando o kit NucleoSpin® Gel e PCR (Neumann-Neander-Str. 6-8 · 52355 Düren · Alemanha) seguindo as instruções do fabricante.

Hibridização fluorescente in situ

O FISH seguiu o protocolo descrito por Pinkel *et al.* (1986) com modificações: os cromossomos mitóticos foram desnaturados com formamida 70% a 75°C por 5 minutos; posteriormente os cromossomos foram hibridizados com sonda preparada a partir da

sequência de DNA repetitivo de 750 pb marcada utilizando Mix Dig-Nick Translation (Roche Applied Science) seguindo as instruções do fabricante; as lâminas foram mantidas a 37°C em câmara úmida durante a noite. Para detecção do sinal utilizamos anti-digoxigenina-rodamina (Roche Applied Science) e posteriormente as lâminas foram lavadas com 4xSSCTWEEN. Os cromossomos foram contracolorados com DAPI (Sigma). As metáfases foram capturadas em um microscópio Olympus BX53F equipado com uma câmera MX10 Olympus, usando o software de imagem CellSens.

Resultados

Obtivemos um padrão de bandas típico para sequências repetitivas com a enzima MspI. Com base no FISH empregando a sonda de DNA repetitivo de 750 pb de *M. mondury*, sinais de fluorescência foram detectados nas porções de heterocromatina em todos os cromossomos do cariótipo de *M. mondury*. Foram observados sinais fortes em toda a região heterocromática do primeiro par cromossômico, os demais pares cromossômicos apresentaram sinais com diferentes níveis de intensidade ao longo da região heterocromática.

Quanto às espécies de alto conteúdo heterocromático pertencentes ao subgênero *Michmelia*, *M. flavolineata* e *M. rufiventris*, foram detectadas marcações nos cariótipos na região heterocromática. Nessas espécies a intensidade de hibridização variou em todos os cromossomos na região heterocromática. Quando comparamos a intensidade das marcações com a entre as espécies de *Michmelia*, *M. mondury* é a que apresenta maior intensidade de hibridização. Não foram observadas marcações nos cromossomos de *M. fasciculata*, embora seja reconhecida como espécie com alto conteúdo heterocromático (Fig. 1).

As espécies com baixo teor de heterocromatina (*M. bicolor*, *M. puncticollis*, *M. quinquefasciata* e *M. quadrifasciata*) não apresentaram marcações.

Discussão

Nossas análises mostram um resultado positivo para isolamento de uma sequência de DNA repetitivo de *M. mondury* pela digestão enzimática com a enzima MspI. Entre os Meliponini esse é o primeiro estudo na qual se isola uma sequência de DNA repetitivo por meio do uso de enzimas de restrição. Essa técnica foi utilizada em outros organismos como formigas (Lorite *et al.*, 2004), anuros (Amor *et al.*, 2010), peixes (Vicari *et al.*, 2010), na qual isolaram sequências de DNA repetitivo a partir do DNA total, em todas essas espécies as sequências isoladas mostraram ser sequências de DNA satélite. Com

isso fica evidente a importância do emprego dessa ferramenta para estudo dessas sequências abrindo um novo campo para estudos nessa tribo. Enzimas de restrição clivam uma região específica de DNA conhecida como sítio de restrição, as diferenças entre a composição nucleotídica da sequência refletirão no padrão de clivagem (Hörz & Zachau, 1977; Singer, 1982). Dessa forma, diferentes enzimas podem ser utilizadas, permitindo abranger diferentes regiões do genoma.

A sequência repetitiva obtida de *M. mondury* (subgênero *Michmelia*), marcou todos os cromossomos desta espécie na região heterocromática, bem como os cromossomos das outras espécies do subgênero *Michmelia*, as quais também possuem alto conteúdo heterocromático. Nessas espécies a banda-C evidenciou que os blocos heterocromáticos (Rocha & Pompolo, 1998) se concentram ao longo de quase toda a extensão cromossômica, coincidindo com o local de hibridização da sequência de DNA isolada. Assim, esses resultados mostram que essa sequência de DNA repetitivo de 750bp deve estar presente em grande número de cópias na região heterocromática dessas espécies sendo congruentes com o estudo de Lopes *et al.* (2014). Os resultados obtidos por esses autores, a partir de pintura cromossômica com sondas de sequências heterocromáticas de *M. rufiventris*, mostraram que todos os cromossomos dessa espécie compartilhavam sequências comuns às quais não foram encontradas em *Tetragonisca fiebrigie*, sugerindo que tais sequências seriam abundantes no genoma e específicas da espécie ou do gênero (Lopes *et al.*, 2014).

A exclusividade de marcações apenas na heterocromatina do subgênero *Michmelia*, sugere que está sequência de DNA repetitivo é um marcador exclusivo desse grupo. O compartilhamento dessa sequência entre as espécies de *Michmelia* pode ser explicado pela “hipótese biblioteca”, em que espécies próximas filogeneticamente compartilham uma biblioteca ancestral de diferentes sequências que pode ser amplificada diferencialmente em cada espécie (Salser *et al.*, 1976; Plohl *et al.*, 2012). Assim possivelmente a sequência isolada parece ter surgido no ancestral de *Michmelia* e foi transmitida para as outras espécies desse subgênero. Como o acúmulo de divergências entre as repetições de uma sequência e propagação das mutações dentro do genoma ou entre uma população pode estar relacionada com o tempo (Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2012), a recente diversificação do subgênero *Michmelia*, ~5 milhões de anos atrás (Ramirez *et al.*, 2010), pode explicar a conservação da sequência de DNA repetitivo nesse grupo. Resultado semelhante foi relatado para espécies de Coleoptera do gênero *Pimelia*

separados $\sim 5 \pm 6$ Mya, que também apresentaram sequência de DNA satélite conservado (Pons *et al.*, 1997).

Apesar da conservação da sequência de DNA repetitivo dentro de *Michmelia*, observamos variações no padrão de hibridização entre os cromossomos dessas espécies com uma intensidade maior em *M. mondury*. Além de variações entre todos os cromossomos de *M. mondury*, *M. flavolineata* e os de *M. rufiventris*. Como essas espécies divergiram de uma ancestral comum, e eventualmente herdaram a sequência de DNA repetitivo desse ancestral, as variações observadas indicam que essas sequências podem estar sendo alvo de variações no número de cópias, bem como expansão e modificação decorrente da ação de fatores como conversão gênica, crossing-over desigual, deslizamento durante a replicação (Charlesworth *et al.*, 1994; Palomeque & Lorite, 2008; Plohl *et al.*, 2012).

Melipona fasciculata, inclusa no subgênero *Melikerria*, apesar de possuir alto conteúdo heterocromático, não apresentou marcações com a sequência de DNA repetitivo. A ausência da sequência do DNA repetitivo no cariótipo de *M. fasciculata*, corrobora com estudos anteriores que sugerem independência do surgimento do alto conteúdo heterocromático em *Michmelia* e *Melikerria* (Cunha *et al.*, 2018; Piccoli *et al.*, 2018). Alguns fatores podem ter contribuído para o aumento da heterocromatina como à pressão de seleção favorável a estas sequências, que podem servir de sítios de ligação de proteínas importantes em vários processos celulares, como a segregação cromossômica (Shestakova *et al.*, 2004; Ugarkovic, 2005; Ferree & Prasad, 2012; Huang *et al.*, 2016). Além disso, dois eventos independentes de crescimento da heterocromatina no gênero *Melipona* apontam que esse processo estaria relacionado com alguma vantagem adaptativa para essas espécies.

A ausência de marcações nas espécies de baixo conteúdo heterocromático e de *M. fasciculata*, indica que a composição da heterocromatina dessas espécies é diferente daquelas do subgênero *Michmelia* na qual observamos marcações com a sequência de DNA repetitivo isolada. Com isso fica evidente que dentro do gênero *Melipona* a heterocromatina está evoluindo de forma divergente entre as espécies. Esse processo de divergência pode ser reflexo das mudanças no número de cópias de sequências repetitivas e da ocorrência de rearranjos cromossômicos o que pode contribuir para a evolução cromossômica, podendo levar ao isolamento reprodutivo e especiação (Ugarkovic & Plohl, 2002; Ferree & Prasad, 2012).

Nesse trabalho evidenciamos a importância do uso da citogenética molecular para estudo de sequências de DNA repetitivo em abelhas. Além disso, demonstramos uma sequência de DNA repetitivo exclusiva da heterocromatina de espécies do subgênero *Michmelia*. Indicamos que dentro do gênero *Melipona* possivelmente encontramos diferentes sequências repetitivas compondo a heterocromatina das espécies, o que pode ser reflexo da evolução dessa região nessas espécies. Ademais, esse trabalho será a base para subsidiar discussões acerca da evolução da heterocromatina no gênero *Melipona*.

Referências

- Amor, N., Odierna, G., Chinali, G., Said, K., & Picariello, O. 2009. Unusual chromosomal distribution of a major satellite DNA from *Discoglossus pictus* (Amphibia, Anura). *Cytogenetic and genome research*. 127.1:33-42.
- Bostock, C. 1980. A function for satellite DNA? *Trends in biochemical sciences* 5.5: 117-119.
- Camargo, J.M.F. & Pedro, S.R.M. 2013. *Meliponini* Lepeletier, 1836. In Moure JS, Urban D and Melo GAR (eds) *Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region*.
- Charlesworth, B., Paul, S. & Wolfgang, S. 1994. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature*. 371.6494: 215-220.
- Cunha, M.S., Travenzoli, N.M., Ferreira, R.P., Cassinela, E.K., Silva, H., Salomão, T.M.F. & Lopes, D.M. 2018. Comparative cytogenetics in three *Melipona* species (Hymenoptera: Apidae) with two divergent heterochromatic patterns. *Genetics and Molecular Biology (no prelo)*
- Dover, G. A. 1982. Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. *Nature*. 299.5879: 111-117.
- Dover, G. A. 1986. Molecular drive in multigene families: how biological novelties arise, spread and are assimilated. *Trends in genetics*. 2:159-165.
- Dover, G. A. 2002. Molecular drive. *Trends in Genetics* 18.11: 587-589.
- Elder, Jr. J. F. & Turner, B. J. 1995. Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes. *The Quarterly Review of Biology*. 70.3: 297-320.
- Ferree, P. M. & Prasad, S. 2012. How can satellite DNA divergence cause reproductive isolation? Let us count the chromosomal ways. *Genetics research international*. 2012.

- Grewal, S. I. & Jia, S. 2007. Heterochromatin revisited. *Nature Reviews Genetics*. 8.1: 35.
- Hörz, W. & Zachau, H. G. 1977. Characterization of distinct segments in mouse satellite DNA by restriction nucleases. *European journal of biochemistry*. 73.2: 383-392.
- Huang, Y. C., Lee, C. C., Kao, C. Y., Chang, N. C., Lin, C. C., Shoemaker, D. & Wang, J. 2016. Evolution of long centromeres in fire ants. *BMC Evolutionary Biology*. 16.1: 189.
- Imai, H.T., Taylor, R.W., Crosland, M.W. & Crozier, R.H. 1988. Modes of spontaneous chromosomal mutation and karyotype evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis. *Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology*. 63.2: 159-185.
- Lorite, P.; Carrillo, J.A.; Tinaut, A.; Palomeque, T. 2004. Evolutionary dynamics of satellite DNA in species of the genus *Formica* (Hymenoptera, Formicidae). *Gene*. 332:159–168.
- Lopes, D.M., Fernandes, A., Diniz, D., Scudeler, P.E.S., Foresti, F. & Campos, L.A.O. 2014. Similarity of heterochromatic regions in the stingless bees (Hymenoptera: Meliponini) revealed by chromosome painting. *Caryologia*. 67.3: 222-226.
- Lower, S. S., McGurk, M. P., Clark, A. G. & Barbash, D. A. 2018. Satellite DNA evolution: old ideas, new approaches. *Current Opinion in Genetics & Development*. 49: 70-78.
- Palomeque, T. & Lorite, P. 2008. Satellite DNA in insects: a review. *Heredity*. 100.6 :564.
- Pérez-Gutiérrez, M.A.; Suárez-Santiago, V.N.; López-Flores, I.; Romero, A.T.; Garrido-Ramos, M.A. 2012. Concerted evolution of satellite DNA in *Sarcocapnos*: A matter of time. *Plant molecular biology*. 78.1-2: 19-29.
- Piccoli, M. C. A., Bardella, V. B. & Cabral-de-Mello, D.C. Repetitive DNAs in *Melipona scutellaris* (Hymenoptera: Apidae: Meliponidae): chromosomal distribution and test of multiple heterochromatin amplification in the genus. *Apidologie*. 1-8.
- Pinkel, D., Straume, T. & Gray, J.W. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 83.9: 2934-2938.
- Plohl, M., Petrović, V., Luchetti, A., Ricci, A., Satović, E., Passamonti, M. & Mantovani, B. 2010. Long-term conservation vs high sequence divergence: the case of an extraordinarily old satellite DNA in bivalve mollusks. *Heredity*. 104.6: 543–551.

- Plohl, M., Meštrović, N. & Mravinac, B. 2012. Satellite DNA evolution. *Genome Dynamics*. 7: 126–152.
- Pons, J., Bruvo, B., Juan, C., Petitpierre, E., Plohl, M. & Ugarković, D. 1997. Conservation of satellite DNA in species of the genus *Pimelia* (Tenebrionidae, Coleoptera). *Gene*. 205.1: 183-190.
- Ramírez, S. R., Nieh, J. C., Quental, T. B., Roubik, D. W., Imperatriz-Fonseca, V. L. & Pierce, N. E. 2010. A molecular phylogeny of the stingless bee genus *Melipona* (Hymenoptera: Apidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 56.2: 519-525.
- Rocha, M.P. & Pompolo, S.G. 1998. Karyotypes and heterochromatin variation (C-bands) in *Melipona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Genetics and Molecular Biology*. 21.1: 41–45.
- Rocha, M.P., Pompolo, S.G., Dergam, J.A., Fernandes, A. & Campos, L.A.O. 2002. DNA characterization and karyotypic evolution in the bee genus *Melipona* (Hymenoptera Meliponini). *Hereditas*. 136.1: 19–27.
- Salser, W., Bowen, S., Browne, D., El Adli, F., Fedoroff, N., Fry, K., Heindell, H., Paddock, G., Poon, R., Wallace, B. & Whitcome, P. 1976. Investigation of the organization of mammalian chromosomes at the DNA sequence level. *Federation proceedings*. 35.1: 23-35.
- Shestakova, E. A., Mansuroglu, Z., Mokrani, H., Ghinea, N. & Bonnefoy, E. 2004. Transcription factor YY1 associates with pericentromeric γ -satellite DNA in cycling but not in quiescent (G0) cells. *Nucleic acids research*. 32.14: 4390-4399.
- Singer, M.F. 1982. Highly repeated sequences in mammalian genomes. *International review of cytology*. 76: 67–112.
- Tavares, M. G., Carvalho, C. R. & Soares, F. A. F. 2010. Genome size variation in *Melipona* species (Hymenoptera: Apidae) and sub-grouping by their DNA content. *Apidologie*, 41.6: 636-642.
- Ugarković, Đ., & Plohl, M. 2002. Variation in satellite DNA profiles-causes and effects. *The EMBO journal*. 21.22:5955-5959.
- Ugarkovic, D. 2005. Functional elements residing within satellite DNAs. *EMBO reports*. 6.11: 1035-1039.
- Vicari, M. R., Nogaroto, V., Noleto, R. B., Cestari, M. M., Cioffi, M. B., Almeida, M. C. & Artoni, R. F. 2010. Satellite DNA and chromosomes in Neotropical fishes: methods, applications and perspectives. *Journal of Fish Biology*. 76.5: 1094-1116.

Waldschmidt, A.M., Salomão, T.M.F., Barros, E.G.D. & Campos, L.D.A.O. 1997.
Extraction of genomic DNA from *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera:
Apidae, Meliponinae). Brazilian Journal of Genetics. 20.3.

Tabela 1. Locais de coleta das espécies de *Melipona* do Brasil. As espécies estão separadas em relação ao seu padrão de bandas C em baixo ou alto teor de heterocromatina.

<i>Subgênero</i>	<i>Espécie</i>	<i>Heterocromatina</i>	<i>Localidade</i>
<i>Eomelipona</i>	<i>M. bicolor</i>	Baixo teor	Viçosa, Minas Gerais
	<i>M. puncticollis</i>	Baixo teor	Altamira, Pará
<i>Melikerria</i>	<i>M. quinquefasciata</i>	Baixo teor	Viçosa, Minas Gerais
	<i>M. fasciculate</i>	Alto teor	Altamira, Pará
<i>Melipona</i>	<i>M. quadrifasciata</i>	Baixo teor	Viçosa, Minas Gerais
<i>Michmelia</i>	<i>M. flavolineata</i>	Alto teor	Urbano Santos, Maranhão
	<i>M. mondury</i>	Alto teor	Viçosa, Minas Gerais
	<i>M. rufiventris</i>	Alto teor	Viçosa, Minas Gerais

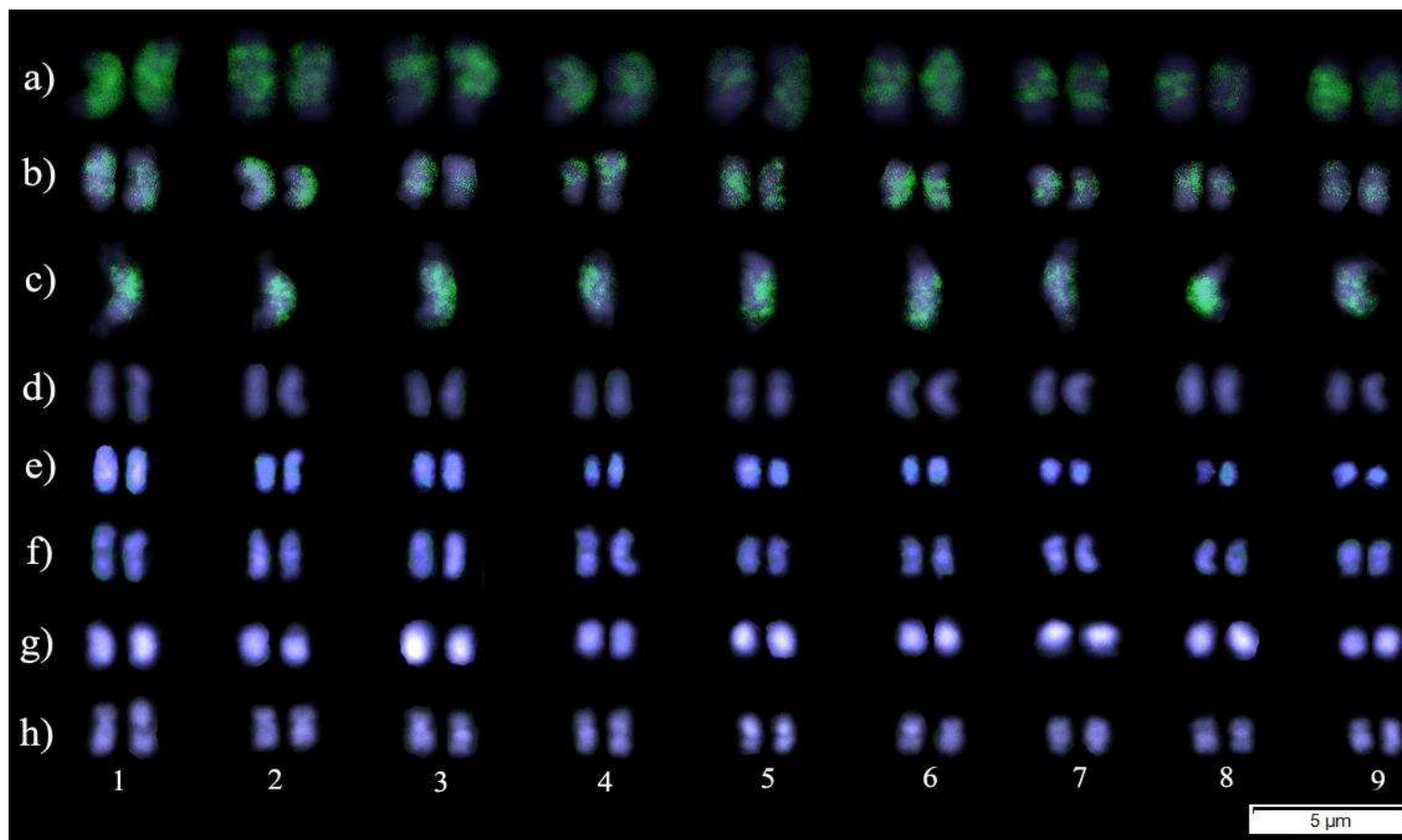


Figura 1 – Padrão de sinais de fluorescência obtido pela sequência de DNA repetitivo de *M. mondury*: a) *M. mondury*. b) *M. flavolineata*. c) *M. rufiventris*. d) *M. puncticolis*. e) *M. bicolor*. f) *M. quinquefasciata*. g) *M. quadrifasciata*. Barra = 5 μm

3. CAPÍTULO II

Estudo de sequências de DNA repetitivo em espécies da Tribo Meliponini

Jaqueline Amorim Pereira¹, Tânia Maria Fernandes Salomão¹, Denilce Meneses Lopes^{1*}

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

Resumo

Sequências de DNA repetitivo são os principais componentes da heterocromatina. Consideradas por muito tempo como sem função, atualmente, têm sido relacionadas à manutenção da heterocromatina, estudos evolutivos e de especiação, principalmente em virtude das variações a que estão sujeitas. As espécies de Meliponini, como em espécies de *Melipona*, possuem grande quantidade de heterocromatina que ocupa o braço longo dos cromossomos ou até mesmo quase todo o cromossomo. Com isso o propósito desse trabalho foi analisar a distribuição de uma sequência de DNA repetitivo no cariótipo de diferentes espécies da Tribo Meliponini. Assim foi isolada uma sequência de DNA repetitivo de *T. angustula* e analisada em cromossomos de sete espécies (*Tetragonisca angustula*, *Tetragonisca fiebrigi*, *Melipona mondury*; *Nannotrigona testaceicornis*, *Frieseomellita varia*, *Partamona helleri* e *Austroplebeia australis*). Os resultados mostraram que a sequência de DNA repetitivo isolada de *T. angustula* compôs a heterocromatina de todos cromossomos dessa espécie, assim como também de *T. fiebrigi*. No entanto, o mesmo não foi observado para as demais espécies avaliadas indicando que a sequência isolada é conservada dentro do gênero *Tetragonisca* e que as sequências que possivelmente compõem a heterocromatina nos outros gêneros passaram por diferentes processos de diversificação ou tenham surgido de forma independente. A conservação da sequência analisada em *Tetragonisca* pode estar relacionada com o tempo recente de diversificação de *T. angustula* e de *T. fiebrigi*. A caracterização da heterocromatina com base em sequências repetitivas contribui para o entendimento da evolução dessas regiões em Meliponini.

Introdução

Sequências repetitivas constituem grandes frações do genoma dos eucariotos (Bostock, 1980; Charlesworth *et al.*, 1994). Por muito tempo essas sequências foram consideradas como sem função, no entanto, vários papéis funcionais têm sido atribuídos a elas, sendo relacionada à montagem de cinetócoros (Huang *et al.*, 2016), manutenção da heterocromatina (Charlesworth *et al.*, 1994; Grewal & Jia, 2007), podendo até mesmo apresentar transcritos relacionados com a regulação gênica (Koo *et al.*, 2016).

Além disso, sequências repetitivas têm sido usadas para estudos relacionados com especiação e evolução entre as espécies, principalmente por estarem sujeitas a rápidas variações (Ugarkovic *et al.*, 2002; Plohl *et al.*, 2012). Por sua vez as variações que venham a ocorrer em uma sequência podem espalhar pelo genoma pelo processo de homogeneização e pela reprodução sexuada podem ser fixadas entre indivíduos de uma espécie. O processo de homogeneização e fixação é conhecido como evolução em concerto (Dover, 1982; Dover, 1986; Dover, 2002). Apesar da rápida evolução, espécies relacionadas podem compartilhar uma biblioteca de sequências de DNA satélite, como proposto pela “hipótese biblioteca” (Salser *et al.*, 1976).

A heterocromatina em meliponíneos é encontrada em abundância nos cromossomos dessa Tribo e pode apresentar variações em relação à sua distribuição nos cromossomos. Em *Tetragonisca angustula* Latreille, a heterocromatina predomina no braço curto dos cromossomos, já em *Plebeia phrynostoma* Moure se encontra principalmente nas regiões centroméricas e terminais dos cromossomos (Hoshiba & Imai, 1993; Rocha *et al.*, 2003; Costa *et al.*, 2004; Barth *et al.*, 2011; Carvalho & Costa, 2011;; Godoy *et al.*, 2013; Miranda *et al.*, 2013). *Melipona* Illiger apresenta um padrão peculiar de distribuição de heterocromatina, com espécies com heterocromatina somente na região pericentromérica e outras ocupando quase toda a extensão cromossômica (Rocha & Pompolo, 1998; Rocha *et al.*, 2002). Estudos relacionados com sequências de DNA repetitivo na heterocromatina dos cromossomos da Tribo Meliponini são muito escassos (Lopes *et al.*, 2014; Picolli *et al.*, 2018) a ampliação desses estudos pode contribuir para o entendimento da evolução dessas regiões nessas abelhas.

Com base na alta variabilidade que sequências repetitivas podem apresentar e considerando a grande quantidade de heterocromatina presente entre a maioria dos Meliponínios, esse trabalho teve o intuito de analisar uma sequência de DNA repetitivo de uma espécie pertencente ao gênero *Tetragonisca* e comparar entre outros diferentes

gêneros dessa Tribo, a fim de contribuir o entendimento da evolução dessas regiões nessas abelhas.

Materiais e métodos

Amostras biológicas e preparação cromossômica

Cromossomos de (Tabela 1) *Tetragonisca angustula*, *Tetragonisca fiebrigie* Schwarz, *Melipona mondury* Smith, *Nannotrigona testaceicornis* Lepeletier, *Frieseomelitta varia* Lepeletier, *Partamona helleri* Friese, *Austroplebeia australis* foram analisados. Para a obtenção dos cromossomos mitóticos foram utilizados gânglios cerebrais de larvas em estágio pós-defecante (Imai *et al.*, 1988). Em média 30 metáfases de cada espécie foram investigadas.

Obtenção da DNA repetitivo pela técnica de enzima de restrição

DNA total da espécie *T. angustula* (100-500 ng/μl) foi extraído (Waldschmidt *et al.* 1997) e previamente testado com enzimas de restrição MspI, EcoRI, HinfI, BclI, BglII, Bsp68I, HinfI e VspI. Os testes levaram em consideração a concentração de enzima, o tempo de reação e o uso de cada enzima separadamente. A clivagem do DNA foi conduzida em banho-maria a 37°C por 6 h. O produto da digestão enzimática foi avaliado em gel de agarose 1.2%, e a enzima Bsp68I apresentou um padrão para sequências repetitivas. O fragmento correspondente a sequência repetitiva foi purificado utilizando NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit (Neumann-Neander-Str. 6-8 52355 Düren Germany) conforme instruções do fabricante.

Hibridização fluorescente in situ

A sequência obtida por enzima de restrição Bsp68I foi utilizada como sonda para FISH de acordo com Pinkel *et al.*, (1986) com modificações. A desnaturação de cromossomos mitóticos foi obtida com formamida 70% a 75°C por 5 minutos. A sequência repetitiva foi marcada com o Mix Dig-Nick Translation (Roche Applied Science) seguindo instruções do fabricante, e para hibridização da sonda nos cromossomos as lâminas foram mantidas a 37°C em câmara úmida durante a noite. O sinal foi detectado com o anti-digoxigenina-rodamina (Roche Applied Science). As lâminas foram lavadas 4xSSCTWEEN. Os cromossomos foram contracorados com DAPI (Sigma). As imagens foram capturadas em microscópio Olympus BX53F equipado com uma câmera MX10 Olympus, e o software de imagem CellSens.

Resultados

Padrão de bandas típico de sequências repetitivas foi observado apenas para a enzima de restrição Bsp 68I utilizada na análise do DNA total de *T. angustula* (Fig. 1). Sinais de fluorescência a partir da sonda com a sequência de DNA repetitivo foram observados como pontos concentrados na região heterocromática do braço curto de todos os cromossomos de *T. angustula*. Em *T. fiebrigi* também observamos a presença da sequência de DNA repetitivo na qual se concentrou em toda a extensão do braço curto de todos os cromossomos, ou seja, em toda a heterocromatina. Ressalta-se que as marcações na heterocromatina de *T. fiebrigi* mostraram-se mais fluorescentes que as observadas em *T. angustula*. Nenhuma marcação foi observada nos cromossomos das outras espécies investigadas (Fig. 2).

Discussão

Nesse trabalho obtivemos resultado satisfatório para obtenção de uma sequência de DNA repetitivo de *T. angustula* quando utilizamos para digestão enzimática Bsp68I. A sequência de DNA repetitivo, isolada de *T. angustula*, faz parte da composição da heterocromatina dessa espécie, bem como de *T. fiebrigi*. A predominância dessa sequência em quase toda a extensão heterocromatina em *T. angustula* e toda em *T. fiebrigi* indica a heterocromatina dessas espécies é enriquecida com a sequência repetitiva isolada. Um estudo recente de pintura cromossômica evidenciou que sequências repetitivas localizadas na heterocromatina dos cromossomos de *T. fiebrigi* eram compartilhadas por todos os cromossomos (Lopes *et al.*, 2014), corroborando com o observado no presente estudo.

Nossos resultados salientam o compartilhamento da sequência de DNA repetitivo entre *T. angustula* e *T. fiebrigi*. Apesar do dinamismo e alta variabilidade do DNA repetitivo, espécies relacionadas podem compartilhar sequências de DNA repetitivo (Maravinac *et al.*, 2002). Essa característica pode estar relacionada com o tempo de diversificação entre as espécies, já que a propagação de uma nova variante pode depender basicamente do tempo (Pons *et al.*, 1997; Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2012). *T. angustula* e *T. fiebrigi* se diversificaram muito recentemente, além disso, alguns autores propõe que elas sejam subespécies e não espécies, o que pode ter contribuído para a conservação da sequência de DNA repetitivo (Schwarz, 1938; Castanheira & Contel, 2005; Moure *et al.*, 2007; Barth *et al.*, 2011; Francisco *et al.*, 2013).

Embora o tempo possa ser um fator para explicar o compartilhamento de sequências de DNA repetitivo entre espécies próximas filogeneticamente, é importante considerar que a taxa de evolução dessas sequências em longo prazo pode ter influência de outros fatores. Dentre esses fatores podemos considerar a localização e organização dessas sequências (Navajas-Pérez *et al.*, 2009), fatores biológicos (Lorite *et al.*, 2017), restrições funcionais (Shestakova *et al.*, 2004; Tsoumani *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2016). No gênero *Solenopsis*, a conservação de sequência satélite centromérica *CenSol* está relacionada com a segregação cromossômica por ser o sítio de ligação de proteínas associadas ao fuso (Huang *et al.*, 2016). Outro mecanismo para conservação das sequências repetitivas foi relatado em formigas, onde as sequências satélites estariam relacionadas com o sistema de determinação do sexo por haplodiploidia (Lorite *et al.*, 2017). Da mesma forma, a conservação dessa sequência em *Tetragonisca* pode estar relacionada com sua haplodiploidia. Neste caso, considerando que eventos, como crossing-over, são importantes para que novas mutações nas sequências de DNA satélite sejam homogeneizadas entre os cromossomos o fato de os machos serem haploides e não apresentarem recombinação pode dificultar a transmissão das mutações e consequentemente preservar a composição nucleotídica das sequências repetitivas (Lorite *et al.*, 2017).

Visto a abundância de heterocromatina presente nos cromossomos entre a maioria dos Meliponini, uma possibilidade seria que a amplificação dessa região teria ocorrido em um ancestral dos Meliponini e, posteriormente, compartilhada entre os gêneros dessa Tribo. Por outro lado, Lopes *et al.* (2014) relataram que os cromossomos de *Melipona rufiventris* e *T. fiebrigie* possuem heterocromatina com sequências repetitivas diferentes. O gênero *Melipona* divergiu recentemente e apresenta características cromossômicas que o difere dos outros Meliponini (Rocha & Pompolo, 1998; Rocha *et al.*, 2002; Rasmussem *et al.*, 2010). Assim, a variação na composição da heterocromatina poderia estar relacionada com um caminho evolutivo diferente desse gênero.

Dentre as espécies estudadas, *A. australis* é a mais distante filogeneticamente do gênero *Tetragonisca*, fazendo parte do clado Indo-Malaia/Austrásia, (Rasmussem *et al.*, 2010). Mesmo apresentando grandes blocos heterocromáticos (Travenzoli, comunicação pessoal), nenhum sinal de marcação nos cromossomos de *A. australis* foi notado, sugerindo que a sequência de DNA repetitivo avaliada poderia ter surgido mais recentemente dentro dos Meliponini Neotropicais. No entanto, nenhuma outra espécie no

presente estudo apresentou marcações, incluindo *F. varia* que, segundo Rasmusem *et al.* (2010), é a espécie investigada mais próxima filogeneticamente de *Tetragonisca*.

A divergência na sequência em cada família de DNA repetitivo geralmente está relacionada com variação no número de cópias e na sequência de nucleotídeos (Ugarkovic e Plohl, 2002). Mudanças nesses parâmetros podem levar ao surgimento de arranjos espécie-específicos como parece ter ocorrido entre as espécies analisadas. Em alguns casos, a mudança no DNA repetitivo pode estar relacionada com evolução cromossômica e até mesmo influenciar no processo de especiação (Ugarkovic e Plohl, 2002).

Com isso, consideramos que a sequência de DNA repetitivo presente na heterocromatina das espécies de *Tetragonisca* surgiu no ancestral comum entre elas. Como não observamos a presença dessa sequência de *T. angustula* em espécies de outros gêneros, a conservação é consequência do tempo recente de diversificação, as sequências não acumularam mutações a ponto de se tornarem divergentes. Além disso, o não compartilhamento da sequência de DNA repetitivo dentro da Tribo Meliponini, indica que essas sequências estão evoluindo de forma rápida e diferente em cada gênero.

Referências

- Barth, A., Fernandes, A., Pompolo, S. D. G. & Costa, M. A. 2011. Occurrence of B chromosomes in *Tetragonisca* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): a new contribution to the cytotaxonomy of the genus. Genetics and molecular biology. 34.1: 77-79.
- Bostock, C. 1980. A function for satellite DNA? Trends in biochemical sciences 5.5: 117-119.
- Castanheira, E.B. & Contel, E.P. 2005. Geographic variation in *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). Journal of apicultural research. 44.3:101–105.
- Charlesworth, B., Paul, S. & Wolfgang, S. 1994. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. Nature. 371.6494: 215-220.
- Dover, G. A. 1982. Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. Nature. 299.5879: 111-117.
- Dover, G. A. 1986. Molecular drive in multigene families: how biological novelties arise, spread and are assimilated. Trends in genetics. 2:159-165.
- Dover, G. A. 2002. Molecular drive. Trends in Genetics. 18.11:587-589.

- Ferree, P. M. & Prasad, S. 2012. How can satellite DNA divergence cause reproductive isolation? Let us count the chromosomal ways. *Genetics research international*, 2012.
- Francisco, F. O., Santiago, L. R., Brito, R. M., Oldroyd, B. P. & Arias, M. C. 2014. Hybridization and asymmetric introgression between *Tetragonisca angustula* and *Tetragonisca fiebrigi*. *Apidologie*. 45.1: 1-9.
- Godoy, D.C., Ferreira, R.P. & Lopes, D.M. 2013. Chromosomal Variation and Cytogenetics of *Plebeia lucii* and *P. phrynostoma* (Hymenoptera: Apidae). *Florida entomologist*. 96.4: 1559-1566.
- Grewal, S. I. & Jia, S. 2007. Heterochromatin revisited. *Nature Reviews Genetics*. 8.1: 35.
- Huang, Y. C., Lee, C. C., Kao, C. Y., Chang, N. C., Lin, C. C., Shoemaker, D. & Wang, J. 2016. Evolution of long centromeres in fire ants. *BMC Evolutionary Biology*. 16.1: 189.
- Hoshiba, H. & Imai, H.T. 1993. Chromosome evolution of bees and wasps (Hymenoptera, Apocrita) on the basis of C-banding pattern analyses. *Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology*. 61.3: 465-492.
- Imai, H.T., Taylor, R.W., Crosland, M.W. & Crozier, R.H. 1988. Modes of spontaneous chromosomal mutation and karyotype evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis. *Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology*. 63.2: 159-185.
- Koo, D.H., Zhao, H. & Jiang J. 2016. Chromatin-associated transcripts of tandemly repetitive DNA sequences revealed by RNA-FISH. *Chromosome Research*. 24.4: 467-480.
- Lorite, P., Muñoz-López, M., Carrillo, J.A., Sanllorente, O., Vela, J., Mora, P. & Palomeque, T. 2017. Concerted evolution, a slow process for ant satellite DNA: study of the satellite DNA in the *Aphaenogaster* genus (Hymenoptera, Formicidae). *Organisms Diversity & Evolution*. 17.3: 595-606.
- Lopes, D.M., Fernandes, A., Diniz, D., Scudeler, P.E.S., Foresti, F. & Campos, L.A.O. 2014. Similarity of heterochromatic regions in the stingless bees (Hymenoptera: Meliponini) revealed by chromosome painting. *Caryologia*. 67.3: 222-226.
- Miranda, R.V., Fernandes, A. & Lopes, D.M. 2013. Karyotype description of *Cephalotrigona femorata* Smith (Hymenoptera: Apidae) and the C-banding pattern as a specific marker for *Cephalotrigona*. *Sociobiology*. 60.1: 131-134.

- Moure, J.S., Urban, D. & Melo, G.A.R. 2007. Catálogo das Abelhas (Hymenoptera, Apoidea) na Região Neotropical. Sociedade Brasileira de Entomologia, Curitiba. p. 1058.
- Navajas-Pérez, R., Del Bosque, M. Q., & Garrido-Ramos, M. A. 2009. Effect of location, organization, and repeat-copy number in satellite-DNA evolution. *Molecular Genetics and Genomics*. 282.4: 395-406.
- Pérez-Gutiérrez, M.A.; Suárez-Santiago, V.N.; López-Flores, I.; Romero, A.T.; Garrido-Ramos, M.A. 2012. Concerted evolution of satellite DNA in *Sarcocapnos*: A matter of time. *Plant molecular biology*. 78.1-2: 19-29.
- Piccoli, M. C. A., Bardella, V. B. & Cabral-de-Mello, D.C. 2018. Repetitive DNAs in *Melipona scutellaris* (Hymenoptera: Apidae: Meliponidae): chromosomal distribution and test of multiple heterochromatin amplification in the genus. *Apidologie*. 1-8.
- Pinkel, D., Straume, T. & Gray, J.W. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 83.9: 2934-2938.
- Plohl, M., Meštrović, N. & Mravinac, B. 2012. Satellite DNA evolution. *Genome Dynamics*. 7:126–152.
- Pons, J., Bruvo, B., Juan, C., Petitpierre, E., Plohl, M. & Ugarkovic, D. 1997. Conservation of satellite DNA in species of the genus *Pimelia* (Tenebrionidae, Coleoptera). *Gene*. 205.1: 183-190.
- Salser, W., Bowen, S., Browne, D., El Adli, F., Fedoroff, N., Fry, K., Heindell, H., Paddock, G., Poon, R., Wallace, B. & Whitcome, P. 1976. Investigation of the organization of mammalian chromosomes at the DNA sequence level. *Federation proceedings*. 35.1: 23-35.
- Schwarz, H.F. 1938. The stingless bees (Meliponidae) of British Guiana and some related forms. *Bulletin of the AMNH*. 74.7: 437–508.
- Shestakova, E. A., Mansuroglu, Z., Mokrani, H., Ghinea, N. & Bonnefoy, E. 2004. Transcription factor YY1 associates with pericentromeric γ -satellite DNA in cycling but not in quiescent (G0) cells. *Nucleic acids research*. 32.14: 4390-4399.
- Tsoumani, K. T., Drosopoulou, E., Mavragani-Tsipidou, P. & Mathiopoulos, K. D. 2013. Molecular characterization and chromosomal distribution of a species-specific transcribed centromeric satellite repeat from the olive fruit fly, *Bactrocera oleae*. *PloS one*. 8.11: e79393.

- Rasmussen, C. & Cameron, S.A. 2010. Global stingless bee phylogeny supports ancient divergence, vicariance, and long distance dispersal. *Biological Journal of the Linnean Society*. 99.1: 206–232.
- Rocha, M.P. & Pompolo, S.G. 1998. Karyotypes and heterochromatin variation (C-bands) in *Melipona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Genetics and molecular biology*. 21.1: 41–45
- Rocha, M.P., Pompolo, S.G., Dergam, J.A., Fernandes, A. & Campos, L.A.O. 2002. DNA characterization and karyotypic evolution in the bee genus *Melipona* (Hymenoptera Meliponini). *Hereditas*. 136.1: 19–27
- Ugarković, Đ. & Plohl, M. (2002). Variation in satellite DNA profiles-causes and effects. *The EMBO journal*. 21.22: 5955-5959.
- Waldschmidt, A.M., Salomão, T.M.F., Barros, E.G.D. & Campos, L.D.A.O. 1997. Extraction of genomic DNA from *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). *Brazilian Journal of Genetics*. 20.3.

Tabela 1. Locais de coleta das espécies de Meliponini.

Gênero	Espécies	Localização
<i>Tetragonisca</i>	<i>T. fiebrigi</i>	Tangará da Serra – Mato Grosso
	<i>T. angustula</i>	Mutum – Minas Gerais
<i>Melipona</i>	<i>M. mondury</i>	Viçosa – Minas Gerais
<i>Partamona</i>	<i>P. helleri</i>	Viçosa – Minas Gerais
<i>Nannotrigona</i>	<i>N. testaceicornis</i>	Januária – Minas Gerais
<i>Frieseomellita</i>	<i>F. varia</i>	Viçosa – Minas Gerais
<i>Austroplebeia</i>	<i>A. australis</i>	Sidney – Austrália

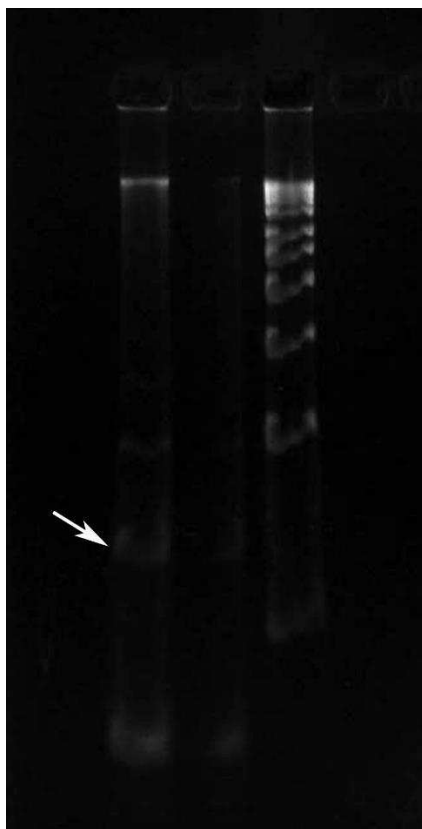


Figura 1: Separação por eletroforese em gel de agarose 1,2% do DNA total de *T. angustula* digerido pela enzima BspI. **Seta-** fragmento de DNA repetitivo utilizado nas análises.

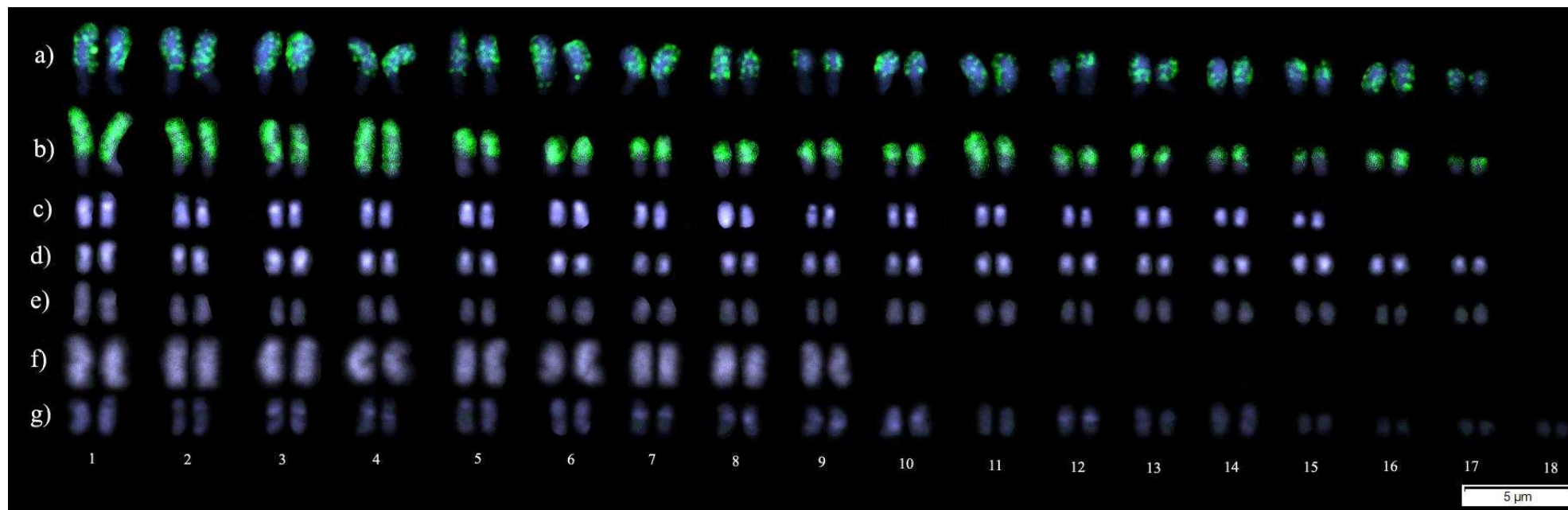


Figura 2: Padrão de hibridização da sequência de DNA repetitivo obtida de *T. angustula* por meio da FISH em (a) *T. angustula*; (b) *T. fiebrigi* (c) *F. varia* (d) *P. helleri* (e) *N. testaceicornis* (f) *M. mondury* (g) *A. australis*. Barra = 5 μm.

4. CONCLUSÕES GERAIS

Por meio desse estudo com espécies da Tribo Meliponini concluímos que na heterocromatina parece predominar uma determinada sequência de DNA repetitivo. Além disso, demonstramos uma sequência de DNA repetitivo específica de espécies de um subgênero de *Melipona* e outra sequência compartilhada apenas entre espécies do gênero *Tetragonisca*, indicando que sequências de DNA repetitivo estão evoluindo de maneira rápida e diferente dentro da Tribo Meliponini. A conservação de uma sequência de DNA repetitivo entre as espécies próximas filogeneticamente do gênero *Melipona* e *Tetragonisca* pode estar relacionada com o curto tempo de diversificação entre elas.