

RÍUDO DE PAIVA FERREIRA

**ANÁLISE CITOGENÉTICA DE ABELHAS DO GÊNERO *TRIGONA* JURINE, 1807
(HYMENOPTERA: MELIPONINI)**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2015

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

T
F383a
2015

Ferreira, Rúdo de Paiva, 1985-
Análise citogenética de abelhas do gênero *Trigona* Jurine,
1807 (Hymenoptera: Meliponini) / Rúdo de Paiva Ferreira. –
Viçosa, MG, 2015.
vii, 67f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Denilce Meneses Lopes.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Abelhas sem ferrão - Citogenética. 2. DNA.
3. Heterocromatina. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-graduação
em Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

CDD 22. ed. 595.799

RÍUDO DE PAIVA FERREIRA

**ANÁLISE CITOGENÉTICA DE ABELHAS DO GÊNERO *TRIGONA* JURINE, 1807
(HYMENOPTERA: MELIPONINI)**

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

APROVADA: 28 de julho de 2015.

Vander Calmon Tosta

Silvia das Graças Pompolo

Jorge Abdala Dergam dos Santos

Lucio Antonio de Oliveira Campos

Denilce Meneses Lopes
(Orientador)

Aos meus pais pelo apoio incondicional
e ao meu irmão pelas diferenças,
Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa pela acolhida e pelo ensinamento de qualidade, e ao programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural pela oportunidade profissional,

À Capes pelo suporte financeiro,

Ao laboratório de Biologia Molecular de Insetos pelos suportes técnicos e material na realização deste estudo, e pelo ambiente descontraído de trabalho,

À profa. Denilce Lopes pela paciência, amizade, companherismo nas coletas e orientação,

Ao prof. Lucio Campos pelo exemplo de dedicação ao estudo das abelhas sem-ferrão, e principalmente pelos ensinamentos que vão além dos científicos,

À Juliana Malta e Samira pelas conversas divertidas no laboratório e terapia em grupo,

À Renata, sempre disposta a ajudar no preparo de soluções e entendimento de protocolos,

À Beth por me alertar dos prazos, resolver questões burocráticas e pela amizade,

Ao Apiário central pela acolhida, pelo ensinamento cotidiano sobre abelhas, e onde encontrei amizades fortes,

Aos técnicos do apiário central, Ferreira, Cabrito, Iris, Lulu, os Toninhos pela ajuda cotidiana e conversas descontraídas,

Às abelhudas, Paula Caxu, Mayla, Pri VLK, Camila, Kikis, Fernandinho, Cris Maranhão, Geysi, Talitta pelos assuntos diversos e por tornarem o ambiente mais agradável e acolhedor,

À Priscila Marchioro, Camila e Nathalia pela parceria e pela contribuição neste estudo,

Aos laboratórios de Citogenética de Insetos e Beagle, representados pela profa. Sílvia Pompolo e prof. Jorge Dergan, respectivamente, pelo suporte técnico,

Às Universidade Federal do Pará (UFPA-campus Altamira) e Universidade Federal do Paraná (UFPR-campus Palotina), representadas, respectivamente pelo prof. Francisco Plácido Magalhaes e prof. Milton Rönnau pela parceria firmanda e suporte nas coletas,

À Thaís, prof. Vander Tosta, prof. Anderson Ferandes, prof. Helder Canto e Ferandinho pelo suporte nas coletas e me permitir conhecer mais da diversidade e riqueza das regiões de Minas Gerais,

Ao prof. Fernando Silveira pela disponibilidade em identificar os espécimes,

A todos que, de uma forma ou outra, estiveram presentes nas diversas etapas deste estudo,

Às irapuás deste Brasil.

RESUMO

FERREIRA, Rúdo de Paiva, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2015. **Análise citogenética de abelhas do gênero *Trigona* Jurine, 1807 (Hymenoptera: Meliponini)**. Orientador: Denilce Menezes Lopes.

O gênero *Trigona* é um dos maiores e mais amplamente distribuídos táxons de abelhas da tribo Meliponini. A citogenética comparativa permite através de suas técnicas de bandamento clássica e molecular entender sobre a evolução do cariótipo em diversos organismos. As informações citogenéticas disponíveis para o gênero *Trigona* mostram um número diplóide constante ($2n=34$), além disso, as espécies do gênero compartilham um cromossomo acrocêntrico totalmente eucromático (A^e). Este trabalho buscou (i) verificar se existem variações cromossômicas e como estas se distribuem entre as populações de espécies com ampla distribuição, *Trigona spinipes* (ii) descrever citogeneticamente algumas espécies do gênero e por fim, (iii) buscar alguns caracteres citogenéticos para entender a evolução cariotípica em *Trigona*. Os resultados obtidos neste trabalho reforçam a homogeneidade do número diploide entre as espécies do gênero *Trigona*. O mapeamento do microssatélite $(GA)_{15}$ mostrou-se mais efetivo para separar populações de *T. spinipes* do que as espécies do mesmo gênero. O gene rDNA 18S apresentou variações interespecíficas, contudo não foram observadas diferenças numéricas e de posição desse gene entre as pop *T. spinipes*. Uma comparação usando os marcadores citogenéticos (quantidade de heterocromatina, rDNA 18S e cromossomo A^e) sugere um processo de eliminação da heterocromatina no gênero *Trigona*. Por fim, esse estudo ressalta a importância de se usar técnicas de citogenética molecular em estudos com populações, e de citogenética comparativa de espécies com baixo polimorfismo cromossômico, como as abelhas da tribo Meliponini.

ABSTRACT

FERREIRA, Rúdo de Paiva, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2015. **Cytogenetic analysis of the *Trigona* genus Jurine, 1807 (Hymenoptera: Meliponini)**. Adviser: Denilce Menezes Lopes.

The *Trigona* is a *genus* of the stingless bees rich in species and it is widely distributed. The comparative cytogenetics allows us understanding the karyotype evolution in various organisms. Cytogenetic informations available for *Trigona* showed a constant diploid number ($2n = 34$) and a euchromatic acrocentric chromosome (A^c) is shared among their species. This study aimed to (i) check for chromosomal variations among populations with wide distribution, such as *Trigona spinipes* (ii) describe cytogenetically some species of the genus and finally, (iii) seek some cytogenetic characters to understand karyotype evolution of *Trigona*. The results corroborate the homogeneity of chromosome number among the species of the genus *Trigona*. The mapping of microsatellite $(GA)_{15}$ was more effective to separate populations of *T. spinipes*, than species of the same *genus*. In contrast, the location of the 18S rDNA varied among species. A comparison using cytogenetic markers (amount of heterochromatin, rDNA 18S and chromosome A^c) suggests the elimination of heterochromatin in *Trigona*. Therefore, this study points out the importance of molecular cytogenetics in population studies and in the comparative cytogenetics of species with a few chromosomal variations, such as stingless bees.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
Referências bibliográficas	4
CAPÍTULO 1: Variação intraespecífica revelada pelo mapeamento físico de sequências de DNA repetitivo nos cromossomos da abelha sem-ferrão <i>Trigona spinipes</i> (Hymenoptera, Meliponini)	9
Resumo	10
Introdução	11
Material e Métodos	12
Resultados e discussão	14
Referências bibliográficas	19
CAPÍTULO 2: Citogenética comparativa de cinco espécies do gênero <i>Trigona</i> Jurine 1807 (Hymenoptera, Meliponini)	27
Resumo	28
Introdução	29
Material e Métodos	30
Resultados e Discussão	32
Referências Bibliográficas	35
CAPÍTULO 3: Heterocromatina, organização cromossomal do rDNA 18S e de sequência de DNA repetitivo: marcadores citogenéticos para o estudo de evolução cariotípica do gênero <i>Trigona</i> Jurine, 1807	45
Resumo	46
Introdução	47
Material e Métodos	48
Resultados	50
Discussão	52
Referências Bibliográficas	56
CONCLUSÃO GERAL	67

INTRODUÇÃO GERAL

O gênero *Trigona sensu lato* é um dos maiores e mais amplamente distribuído gênero de abelhas da tribo Meliponini, e agrupa tanto as espécies da região Neotropical quanto as da região Indo-Malásia/Australiana segundo a classificação proposta por Michener (2000). Rasmussen e Cameron (2007) utilizando dados moleculares, e ampliando o número de espécies amostradas na região Neotropical, mostraram que *Trigona s.l.* não formam um grupo monofilético como sugerido por Michener (2000). Esses autores sugerem que no gênero *Trigona* sejam incluídas apenas as espécies que ocorrem nas Américas, correspondendo estas a *Trigona sensu stricto* conforme de Michener (2000).

No Brasil, este gênero possui uma ampla distribuição e abrange quase todo o território nacional (Silveira et al. 2002) e suas espécies compartilham entre outros caracteres morfológicos, a presença de mandíbula com quatro ou cinco dentes e uma área de aparência sedosa na porção interna do basitarso posterior (Schwartz 1948, Michener, 2000; Silveira et al 2002).

As espécies de *Trigona* utilizam uma infinidade de substratos para a construção de seus ninhos, desde cavidades em árvores (*Trigona truculenta* Almeida, 1984; *T. williana* Friese, 1900 e *T. hypogea* Silvestri, 1902), no solo (*T. recursa* Smith, 1863), algumas espécies constroem ninhos aéreos em locais geralmente pouco acessíveis, como as espécies *T. spinipes* (Fabricius, 1793) e *T. hyalinata* (Lepelletier, 1836) (Rasmussen e Camargo 2008).

A maioria das espécies coleta néctar e pólen como principais recursos alimentares, porém, as espécies *T. hypogea*, *T. crassipes* e *T. necrophaga* possuem o hábito de coletar proteína animal (Roubik 1982, Camargo e Roubik 1991, Mateus e Noll 2004). Outras espécies como *Trigona spinipes*, *T. hyalianita* e *T. fuscipennis* coletam substâncias açucaradas secretada por ninfas de hemípteros herbívoros, em troca, as protegem contra predadores.

Deste modo, entre esses insetos foi estabelecida uma relação mutualística (Carvalho 2004, Oda et al 2009).

Atualmente são reconhecidas 32 espécies do gênero *Trigona*, e aproximadamente 28 espécies não descritas (Camargo e Pedro 2013, Pedro 2014). No Brasil, ocorrem em torno de 21 espécies e mais 12, sem suas descrições publicadas (Pedro 2014). As propostas de filogenia molecular usando genes nucleares e mitocondriais posicionam o gênero *Trigona* como grupo-irmão de *Cephalotrigona* (Rasmusen et al 2010) e separam as espécies de *Trigona s.s* em dois grandes grupos denominados A e B (Rasmusen e Camargo 2008).

A citogenética, ao estudar as características cromossômicas pode fornecer informações para estudos de filogenia, diversidade e taxonomia (Pompolo e Takahashi 1986, Rocha et al 2003, Duarte et al 2009, Dutrillaux e Dutrillaux 2013, Menezes et al 2014). As informações citogenéticas sobre as abelhas da tribo Meliponini mostram uma variação de $n=8$ a $n=17$ no número de cromossomos, sendo $n=17$ o número predominante entre os gêneros (Pompolo e Campos 1995, Rocha et al 2002, Rocha et al 2003). O padrão de distribuição de heterocromatina em um dos braços cromossomos e a variação numérica observada sugerem o processo de fissão cromossômica como o principal mecanismo atuante na evolução do cariótipo das espécies desta tribo (Rocha et al 2003). Essas evidências corroboram com a teoria de interação mínima proposta por Imai et al (1988), onde as mudanças observadas no número e morfologia dos cromossomos tendem a reduzir as interações inespecíficas entre eles no núcleo.

Grande parte das informações obtidas sobre as características citogenéticas, em Meliponini, tem sido revelada pelas técnicas de bandamento clássicas (Costa et al 1992, Pompolo e Campos 1995, Brito e Pompolo 1997, Costa et al 2004, Barth et al 2005, Domingues et al 2005, Lopes et al 2008, Duarte et al 2009, Martins et al 2009, Krinski et al 2010, Carvalho e Costa 2011, Francini et al 2011, Lopes et al 2011, Fernandes et al 2013,

Godoy et al 2013, Miranda et al 2013).O uso de técnicas de citogenética molecular tem , nas ultimas décadas, ampliado as informações sobre a estrutura cromossomal em abelhas sem-ferrão (Fernandes et al 2011, Martins et al 2013, Lopes et al 2014).

Atualmente, o mapeamento de DNA ribossomal e de sequências repetitivas têm revelado informações sobre a organização do genoma em diferentes eucariotos (Cuadrado et al 2008, Ciofi et al 2011, Cuadrado e Jouve 2011, Kavalco et al 2013, Palacios-Gimenez e Cabral-de-Melo 2015) e vem sendo aplicado nos estudo evolutivos (Nguyen et al 2011, Cabral-de-Melo 2011) e na diferenciação entre os cromossomos autossômicos e supranumerários em Orthoptera (Milani et al 2014).

Estas ferramentas da citogenética molecular podem ser mais sensíveis para revelar polimorfismos intra- e interespecíficos em organismos que apresentam uma constância no número diplóide e pouca variação cromossômica observadas pelas técnicas de citogenética clássica, como no caso de abelhas da tribo Meliponini (Mampumbu 2002, Duarte 2009, Godoy et al 2013). Dentre os marcadores citogenéticos, os genes de rDNAs ribossomais mapeado nos Meliponini, *Friesella schrottkyi*, *Melipona compressipes*, *Nannotrigona punctata*, *Sacaptotrigona bipunctata* , revelaram baixo polimorfismo no número de pares cromossômicos carregando esses genes entre espécies do mesmo gênero. Porém, diferenças numéricas, de posição e tamanho desses genes são observadas entre os gêneros de Meliponini (Mampumbu 2002, Rocha et al 2002, Brito et al 2005, Godoy 2014). Os trabalhos com mapeamento de sequências microssatélites em abelhas desta tribo são recentes, contudo mostram-se promissores em revelar diferenças entre populações e entre os gêneros de Meliponini (Ferreira et al 2015, Novaes et al 2015, Travenzoli et al 2015).

Considerando a diversidade do gênero *Trigona*, sua ampla distribuição e seus problemas na sistemática e classificação, este estudo teve como objetivos (i) verificar se existem

variações cromossômicas entre as populações de espécies com ampla distribuição, usando como modelo a espécie *Trigona spinipes*, (ii) descrever o cariótipo de algumas espécies de *Trigona*, e conseqüentemente, ampliar as informações citogenéticas para o gênero, e por fim, (iii) analisar marcadores citogenéticos que permitam entender as mudanças cariotípicas em *Trigona*.

Referências bibliográficas

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.

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.

Brito, R. M., Pompolo, S. G. (1997). C; G patterns and fluorochromes staining with DAPI and CMA3 in *Trigona spinipes* (Jurine, 1807) (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Revista Brasileira. Genética*, 20, 62.

Cabral-de-Mello, D. C., Oliveira, S. G., de Moura, R. C., Martins, C. (2011). Chromosomal organization of the 18S and 5S rRNAs and histone H3 genes in Scarabaeinae coleopterans: insights into the evolutionary dynamics of multigene families and heterochromatin. *BMC genetics*, 12(1), 88.

Camargo J. M. F., Pedro, S.R.M. (2013). Meliponini Lepeletier, 1836. In Moure, J. S., Urban, D., Melo, G. A. R. (Orgs). Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region [versão online]. <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. (Acesso em 04 Julho 14).

Camargo, J. M., Roubik, D. W. (1991). Systematics and bionomics of the apoid obligate necrophages: the *Trigona hypogea* group (Hymenoptera: Apidae; Meliponinae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 44(1), 13-39.

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.

Carvalho, R. G. D. L. (2004). *Sobre a biologia e associação de Trigona sp. n. (Hymenoptera: Apidae, Apinae, Meliponini) com hemipteros (Aetalionidae e Membracidae) que excretam líquidos açucarados* (Doctoral dissertation, FFCLRP/USP).

- Cioffi, M. B., Kejnovsky, E., Bertollo, L. A. C. (2011). The chromosomal distribution of microsatellite repeats in the genome of the wolf fish *Hoplias malabaricus*, focusing on the sex chromosomes. *Cytogenetic and Genome Research*, 132(4), 289-296.
- 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.
- Costa, M. A., Del Lama, M. A., Melo, G. A., Sheppard, W. S. (2003). Molecular phylogeny of the stingless bees (Apidae, Apinae, Meliponini) inferred from mitochondrial 16S rDNA sequences. *Apidologie*, 34(1), 73-84.
- Costa, M. A., Pompolo, S. G., Campos, L. A. (1992). Supernumerary chromosomes in *Partamona cupira* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Revista Brasileira de Genética*, 15, 801-806.
- Cuadrado, A., Cardoso, M., Jouve, N. (2008). Physical organization of simple sequence repeats (SSRs) in Triticeae: structural, functional and evolutionary implications. *Cytogenetic and Genome Research*, 120 (3-4), 210-219.
- Cuadrado, Á., Jouve, N. (2011). Novel simple sequence repeats (SSRs) detected by ND-FISH in heterochromatin of *Drosophila melanogaster*. *BMC genomics*, 12(1), 205.
- Domingues, A. M. T., Waldschmidt, A. M., Andrade, S. E., Andrade-Souza, V., Alves, R. M. D. O., Silva Junior, J. C. D., Costa, M. A. (2005). Karyotype characterization of *Trigona fulviventris* Guérin, 1835 (Hymenoptera, Meliponini) by C banding and fluorochrome staining: Report of a new chromosome number in the genus. *Genetics and Molecular Biology*, 28 (3), 390-393.
- Duarte, O. M. P., Martins, C. C. C., Waldschmidt, A. M., Costa, M. A. (2009). Occurrence of multiple nucleolus organizer regions and intraspecific karyotype variation in *Scaptotrigona xanthotricha* Moure (Hymenoptera, Meliponini). *Genetics and Molecular Research*, 8(3), 831-839.
- Dutrillaux, B., Dutrillaux, A. M. (2013). A South American origin of the genus *Dynastes* (Coleoptera: Scarabaeidae: Dynastinae) demonstrated by chromosomal analyses. *Cytogenetic and Genome Research*, 141(1), 37-42.
- Fernandes, A., Barth, A., Sampaio, W. S. (2013). Caracterização citogenética da espécie *Trigona chanchamayoensis* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) encontrada no cerrado brasileiro. *Evolução e Conservação da Biodiversidade*, 4(2), 63-67.
- Fernandes, A., Scudeler, P. E. S., Diniz, D., Foresti, F., de Oliveira Campos, L. A., Lopes, D. M. (2011). Microdissection: a tool for bee chromosome studies. *Apidologie*, 42(6), 743-748.
- Ferreira, R. P., Novaes, C. M., Travençoli, N. M., Lopes D. M. (2015). Intraspecific variation revealed by chromosomal mapping of microsatellite in stingless bee *Trigona spinipes*. *Chromosome Research*. (Supplement 1), 130.

- Francini, I. B., Gross, M. C., Nunes-Silva, C. G., Carvalho-Zilse, G. A. (2011). Cytogenetic analysis of the Amazon stinglessbee *Melipona seminigra merrillae* reveals different chromosome number for the genus. *Scientia Agricola*, 68(5), 592-593.
- Godoy, D. (2014). caracterização cariotípica de cinco espécies de Meliponini da região amazônica. *Master dissertation*, UFV, viçosa.
- 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.
- 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 Genetics*, 63(2), 159-185.
- Kavalco, K. F., Pazza, R., de Oliveira Brandão, K., de Almeida-Toledo, L. F. (2013). Biogeographic patterns in the chromosomal distribution of a satellite DNA in the banded tetra *Astyanax fasciatus* (Teleostei: Characiformes). *Organisms Diversity & Evolution*, 13(1), 67-76.
- Krinski, D., Fernandes, A., Rocha, M. P., Pompolo, S. D. G. (2010). Karyotypic description of the stingless bee *Oxytrigona cf. flaveola* (Hymenoptera, Apidae, Meliponina) of a colony from Tangará da Serra, Mato Grosso State, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, 33(3), 494-498.
- Lopes, D. M., Fernandes, A., Diniz, D., Scudeler, P. E. S., Foresti, F., Campos, L. A. D. O. (2014). Similarity of heterochromatic regions in the stingless bees (Hymenoptera: Meliponini) revealed by chromosome painting. *Caryologia*, 67(3), 222-226.
- Lopes, D. M., Fernandes, A., Praça-Fontes, M. M., Werneck, H. D. A., Resende, H. C., Campos, L. A. D. O. (2011). Cytogenetics of three *Melipona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Sociobiology*, 58(1), 185-194.
- Lopes, D. M., Pompolo, S. D. G., Campos, L. A. D. O., Tavares, M. G. (2008). Cytogenetic characterization of *Melipona rufiventris* Lepelletier 1836 and *Melipona mondury* Smith 1863 (Hymenoptera, Apidae) by C banding and fluorochromes staining. *Genetics and Molecular Biology*, 31(1), 49-52.
- Maffei, E. M. D., Pompolo, S. D. G., Oliveira Campos, L. A., Petitpierre, E. (2001). Sequential FISH Analysis with rDNA Genes and Ag-NOR Banding in the Lady Beetle *Olla v-nigrum* (Coleoptera: Coccinellidae). *Hereditas*, 135(1), 13-18.
- Mampumbu, A. R. (2002). Análise citogenética da heterocromatina e da NOR em populações de abelhas sem ferrão *Friesella schrottkyi* (FRIESE, 1900) (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Magister Scientiae dissertation*, Unicamp. Campinas. Brazil.
- Martins, C. C. C., Diniz, D., Sobrinho-Scudeler, P. E., Foresti, F., Campos, L. A. O., Costa, M. A. (2013). Investigation of *Partamona helleri* (Apidae, Meliponini) B chromosome origin. An approach by microdissection and whole chromosome painting. *Apidologie*, 44(1), 75-81.

- Martins, C. C. C., Duarte, O. M. P., Waldschmidt, A. M., Alves, R. M. D. O., Costa, M. A. (2009). New occurrence of B chromosomes in *Partamona helleri* (Friese, 1900) (Hymenoptera, Meliponini). *Genetics and Molecular Biology*, 32(4), 782-785.
- Mateus, S., Noll, F. B. (2004). Predatory behavior in a necrophagous bee *Trigona hypogea* (Hymenoptera; Apidae, Meliponini). *Naturwissenschaften*, 91(2), 94-96.
- Menezes, R. S. T., Carvalho, A. F., Correia, J. P. S. O., Silva, T. S., Somavilla, A., Costa, M. A. (2014). Evolutionary trends in the chromosome numbers of swarm-founding social wasps. *Insectes Sociaux*, 61(4), 385-393.
- Michener, C. D. (2000). *The bees of the world* (Vol. 1). JHU Press.
- Milani, D., Cabral-de-Mello, D. C. (2014). Microsatellite organization in the grasshopper *Abracris flavolineata* (Orthoptera: Acrididae) revealed by FISH mapping: remarkable spreading in the A and B chromosomes.
- 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), 125-127.
- Nguyen, P., Sahara, K., Yoshido, A., Marec, F. (2010). Evolutionary dynamics of rDNA clusters on chromosomes of moths and butterflies (Lepidoptera). *Genetica*, 138(3), 343-354.
- Novaes, C. M., Travenzoli, N. M., Ferreira, R. P., Lopes D. M. (2015). Chromosomal mapping using microsatellite probes in two stingless bees species of region Amazon. *Chromosome Research*. (Supplement 1), 130.
- Oda, F. H., Aoki, C., Oda, T. M., Silva, R. A., Felismino, M. F. (2009). Interação entre abelha *Trigona hyalinata* (Lepeletier, 1836) (Hymenoptera: Apidae) e *Aethalion reticulatum* Linnaeus, 1767 (Hemiptera: Aethalionidae) em *Clitoria fairchildiana* Howard (Papilionoideae). *Entomobrasilia*, 2(2), 58-60.
- Palacios-Gimenez, O. M., Cabral-de-Mello, D. C. (2015). Repetitive DNA chromosomal organization in the cricket *Cycloptiloides americanus*: a case of the unusual X1X20 sex chromosome system in Orthoptera. *Molecular Genetics and Genomics*, 290(2), 623-631.
- Pedro, S. R. (2014). The Stingless Bee Fauna In Brazil (Hymenoptera: Apidae). *Sociobiology*, 61(4), 348-354.
- Pompolo S.G., Campos L. A. O. (1995) Karyotypes of two species of stingless bees, *Leurotrigona muelleri* and *Leurotrigona pusilla* (Hymenoptera, Meliponinae). *Revista Brasileira de Genética*, 18, 181-181.
- Pompolo, S. D. G., Takahashi, C. S. (1986). Karyotype of two species of wasps of the genus *Polistes* (Polistinae, Vespidae, Hymenoptera). *Insectes sociaux*, 33(2), 142-148.
- Rasmussen, C., Camargo, J. M. (2008). A molecular phylogeny and the evolution of nest architecture and behavior in *Trigona s.s.* (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Apidologie*, 39(1), 102-118.

- Rasmussen, C., Cameron, S. A. (2007). A molecular phylogeny of the Old World stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) and the non-monophyly of the large genus *Trigona*. *Systematic Entomology*, 32(1), 26-39.
- Rocha, M. P., Pompolo, S. D. G., Dergam, J. A., Fernandes, A., Campos, L. A. D. O. (2002). DNA characterization and karyotypic evolution in the bee genus *Melipona* (Hymenoptera, Meliponini). *Hereditas*, 136(1), 19-27.
- Rocha, M. P., Pompolo, S., Campos, L. A. O., Melo, G. A. R., Santos, I. A. (2003). Citogenética da tribo Meliponini (Hymenoptera, Apidae). *Apoidea Neotropica: homenagem aos*, 90, 311-320.
- Roubik, D. W. (1982). Obligate necrophagy in a social bee. *Science*, 217(4564), 1059.
- Schwarz, H. F. (1948). Stingless Bees (Meliponidae) of the Western Hemisphere. *Lestrimelitta* and the Following Subgenera of *Trigona*, *Paratrigona*, *Swarziana*, *Parapartamona*, *Cephalotrigona*, *Oxytrigona*, *Scaura*, and *Mourella*. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 90, 1-536.
- Silveira, F. A., Melo, G. A., Almeida, E. A. (2002). *Abelhas brasileiras: sistemática e identificação* (p. 253). Belo Horizonte (MG, Brazil): Fernando A. Silveira.
- Travenzoli, N. M., Ferreira, R. P., Novaes, C. M., Lopes D. M. (2015). Molecular cytogenetic demonstrates variation in the repetitive DNA of stingless bees of the genus *Melipona*. *Chromosome Research*. (Supplement1), 131.

**CAPÍTULO 1: Variação intraespecífica revelada pelo mapeamento físico de
sequências de DNA repetitivo nos cromossomos da abelha sem-ferrão
Trigona spinipes (Hymenoptera, Meliponini)**

Resumo

A abelha sem-ferrão *Trigona spinipes* apresenta ampla distribuição na América do Sul. Essa espécie causa danos em culturas agrícolas o que tem levado à redução de suas populações por extermínio de colônias pelos agricultores. Esse trabalho buscou estudar as variações cromossômicas entre as populações *T. spinipes* por meio de técnicas de bandamento clássica, e o mapeamento físico do gene ribossomal 18S e da sequência de DNA repetitivo (GA)₁₅. Para a preparação das lâminas foram utilizados gânglios cerebrais de larvas de 23 colônias provenientes das regiões Sudeste e Sul do Brasil. O número cromossômico de *T. spinipes* foi $2n=34$, sendo um par de cromossomos acrocêntricos totalmente eucromáticos (A^e) e 16 pares pseudoacrocentricos (A^m), ou seja, com heterocromatina distribuída em um dos braços cromossômicos. O gene rDNA 18S foi localizado em quatro pares cromossômicos sendo, três marcações na região terminal do braço menor e uma na região intersticial, logo abaixo da porção terminal. Não foi observada variação entre as populações quanto ao número de cromossomos, distribuição da heterocromatina e número de pares cromossômicos carregando o rDNA 18S. O DNA repetitivo (GA)₁₅ foi mapeado: (i) no braço maior do cromossomo A^e (ii) no braço eucromático de todos cromossomos A^m e (iii) no braço heterocromático de alguns pares A^m . As populações de *T. spinipes* mostraram homogeneidade em suas características citogenéticas, porém foi possível observar polimorfismo na marcação do (GA)₁₅ entre algumas delas. O presente trabalho ressalta a importância do uso das técnicas de citogenética molecular em estudos com populações de espécies que apresentam baixo polimorfismo cromossômico, como as abelhas da tribo Meliponini.

Introdução

A abelha *Trigona spinipes* (Fabricius, 1793) pertence a tribo Meliponini, composta pelas abelhas sem-ferrão. Esta espécie possui ampla distribuição, sendo encontrada na Argentina, Colômbia, Guiana, Paraguai, Peru e no Brasil (Pedro 2014; Camargo e Pedro 2013; Silveira et al 2002). Esta abelha é considerada um polinizador eficiente em culturas como a da manga e da acerola (Giannini et al 2014), entretanto nas de *Citrus*, essas abelhas pode causar dano às flores prejudicando a formação do fruto (Silva et al 1997). Devido a esse hábito, muitos agricultores tentam controlar as populações desta espécie através do extermínio de ninhos, o que reduz suas populações.

A redução nas populações pode acarretar a diminuição da diversidade genética. Assim, estudar as populações buscando medir e/ou verificar variações genéticas são importantes para estratégias de conservação e manejo (Stanimirovic et al 2005, Carvalho e Del-Lama 2015). Nesse sentido, marcadores moleculares e citogenéticos são ferramentas que vem sendo utilizadas em estudos populacionais (Tavares et al 2007, Mariano et al 2008).

A citogenética, ao estudar as variações e características cromossômicas, pode fornecer informações para estudos de filogenia, diversidade e taxonomia (Duarte et al 2009, Dutrillaux e Dutrillaux 2013, Menezes et al 2014). Em estudos populacionais, a citogenética tem revelado polimorfismos que ajudam a entender sobre os processos evolutivos envolvidos na diferenciação das populações (Stanimirovic et al 2005, Mariano et al 2008, Duarte et al 2009).

Poucas espécies de abelhas foram analisadas citogeneticamente a nível populacional (Costa et al 1992, Stanimirovic et al 2005, Duarte et al 2009). Em geral, são usados poucos ninhos, ou poucos indivíduos, para a descrição do cariótipo (Krinski et al 2010, Carvalho e Costa 2011, Miranda et al 2013) e não se tem muita informação sobre a variação cromossômica tanto dentro da mesma colônia quanto entre colônias de regiões diferentes.

Atualmente, além das técnicas de citogenética clássica, ferramentas como o mapeamento de DNA ribossomais e de sequências repetitivas tem revelado informações sobre a organização do genoma em diferentes eucariotos (Cuadrado et al 2008, Ciofi et al 2011, Cuadrado e Jouve 2011, Kavalco et al 2013, Palacios-Gimenez e Cabral-de-Melo 2015). A aplicação dessas técnicas de citogenética molecular pode revelar polimorfismos não observados pelas citogenética clássica em espécies que apresentam uma constância no número diplóide e baixo polimorfismo como no caso de abelhas da tribo Meliponini (Mampumbu 2002, Duarte 2009, Godoy et al 2013).

Espécies com ampla distribuição, por exemplo, *T. spinipes* podem apresentar variações genéticas em diferentes ambientes. Assim, esse trabalho buscou estudar a diversidade cromossômica utilizando como modelo *T. spinipes* devido a sua ampla distribuição e ser uma espécie não utilizada para criação racional. Neste trabalho, citogenética clássica e molecular foram usadas para verificar se existem variações cromossômicas e como estas se distribuem dentro de uma mesma colônia, entre as colônias da mesma localidade e entre ninhos de regiões distintas.

Material e Métodos

Foram coletados favos de cria e indivíduos adultos em um total 23 ninhos de *T. spinipes* provenientes de nove cidades das regiões Sudeste e Sul do Brasil (Figura 1). Indivíduos adultos foram montados e depositados na coleção entomológica do Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e das Coleções Zoológicas das UFMG após a confirmação da espécie.

Foram utilizadas cerca de 30 larvas em último instar, coletadas em cada ninho, para as preparações citogenéticas. O gânglio cerebral de cada larva foi retirado e processado de acordo com Imai et al (1988). As lâminas foram coradas com Giemsa 5% durante 15min.

Para avaliar a localização e distribuição da heterocromatina, foi realizada a técnica de banda C pelo método BSG (hidróxido de bário/citrato de sódio/Giemsa) segundo Sumner (1972) com as seguintes modificações (tratamentos com HCl por 7min e com Ba(OH)₂ à 60°C por 14min).

Foram considerados quatro níveis (individual, intra colonial, entre colônias da mesma localidade e entre colônias de regiões distintas) para verificar como a diversidade cromossômica estava distribuída em *T. spinipes*. Para isso, foram analisadas 10 metáfases do mesmo indivíduo, num segundo momento 10 indivíduos da mesma colônia e 10 indivíduos da mesma localidade. Por último uma análise abrangendo outras populações. Foram fotografadas e analisadas, em média, 10 metáfases por lâmina em microscópio OLYMPUS BX-60 acoplado a um sistema de captura e análise de imagens. Os cromossomos metafásicos foram pareados e classificados segundo Imai (1991).

No mapeamento de DNA ribossomal, as sondas para a região de rDNA 18S foram obtidas por amplificação via PCR, utilizando-se os *primers*: F (5'TCATATGCTTGTCTCAAAGA-3') e R (3'-TCTAATTTTTTCAAAGTAAACGC-5'), desenhados para a espécie de abelha *Melipona quinquefasciata* (Pereira 2006). As sondas de rDNA 18S foram marcadas utilizando-se digoxigenin-11-dUTP (Roche, Mannheim, Germany) durante a amplificação. A reação de PCR foi realizada em um volume de 25 µL [tampão 1X (200 mM Tris-HCl pH 8,4, 500 mM KCl)], 0,75 µL de MgCl₂ (100 mM), os dNTps (1,5 µl de dATP, dCTP e dGTP (2µM), 1,5 µl dTP (2µM) e 0,6 µM dUTP-digoxigenina (2µM), 1,0 µL de cada primer (10µM), 0,2 µL (2.5 U) de Taq polimerase (Phonutria) e 2µL de DNA (100 ng/µl)] de *Trigona spinipes* nas condições de amplificação propostas por Pereira (2006). Os procedimentos da hibridização *in situ* fluorescente (FISH) foram realizados de acordo com Pinkel et al (1986). Para a detecção do sinal, o material foi

incubado com anti-digoxigenina-rodamina (Roche, Mennheim Germany). Ao final as lâminas foram montadas com Antifading contendo DAPI (Fluoroshield com DAPI- SIGMA F6057).

Na localização de sequências de DNA repetitivo foi utilizada a sonda de di-oligonucleotídeo (GA)₁₅. Esta sonda foi testada em *Trigona spinipes* em estudo prévio e se mostrou promissora para estudos populacionais (Ferreira et al 2015). A sonda microssatélite foi marcada com Cy3 na extremidade 5' durante sua síntese pela VBC Biotech (Vienna, Austria). Ao final as lâminas foram montadas com Antifading contendo DAPI (Fluoroshield com DAPI- SIGMA F6057).

Tanto no mapeamento do rDNA 18S quanto no do (GA)₁₅, foram observadas no mínimo de 15 metáfases usando um microscópio de epifluorescência OLYMPUS BX-53 acoplado com câmera OLYMPUS DP e *software* Cell Sens.

Resultados e discussão

O cariótipo de *Trigona spinipes* mostrou-se muito homogêneo em relação ao número cromossômico, quantidade e localização da heterocromatina, não sendo encontrada variação entre as metáfases de um mesmo indivíduo, entre indivíduos de uma mesma colônia e nem entre colônias de uma mesma localidade.

O número diplóide de cromossomos de *T. spinipes* foi $2n=34$ (Fig. 2). Dois trabalhos analisaram essa espécie anteriormente e também encontraram o mesmo número diplóide (Brito e Pompolo 1997, Rocha et al 2003). Outras espécies, *T. branneri*, *T. chanchamayoensis*, *T. cfr. fuscipennis*, *T. hyalinata*, *T. recursa* (Rocha et al 2003, Costa et al 2004, Fernandes et al 2013) apresentam o mesmo número diploide sendo este bem conservado dentro do gênero

Trigona. A exceção é *T. fulviventr*, que apresenta $2n=32$ cromossomos (Domingues et al 2005).

As populações de *T. spinipes*, provenientes das nove localidades analisadas apresentaram fórmula cariotípica $2K= 2A^e + 32 A^M$, não havendo variação morfológica e na distribuição de heterocromatina entre estas populações (Fig 2). No entanto, em comparação com as descrições citogenéticas para a mesma espécie realizada nos trabalhos de Brito e Pompolo (1997) e Rocha et al (2003) algumas diferenças podem ser ressaltadas. No presente trabalho, foi registrada a presença de um par de cromossomos totalmente eucromático (A^e), dado coincidente com amostras da região de Viçosa, MG, porém Rocha et al (2003) não mencionaram esse tipo de cromossomo em amostras também de Viçosa. Esse par pode corresponder ao segundo par apresentado por esses autores em sua Figura 1, o que torna os dois cariótipos mais semelhantes. Em outra descrição citogenética de *T. spinipes* foi encontrado 16 pares de cromossomos metacêntricos (Brito e Pompolo 1997), cromossomos com essa morfologia não foi verificada neste estudo, nem em nenhuma outra descrição para o gênero *Trigona* e nem para outros gêneros de Meliponini (Rocha et al 2003, Costa et al 2004).

A comparação dos cariótipos observados entre as colônias revelou um padrão muito homogêneo em relação ao número cromossômico, morfologia e padrões de distribuição da heterocromatina e região 18S rDNA. Em estudos citogenéticos, polimorfismos numéricos são pouco frequentes em abelhas, e aqueles já registrados sempre estão relacionados à presença de cromossomos supranumerários (Costa et al 1992, Lopes et al 2008). Do mesmo modo, são raras as variações morfológicas cromossômicas como acontece na espécie *Scaptotrigona xanthotricha* na qual foram relatadas diferenças entre colônias da Bahia e de Minas Gerais (Duarte et al 2009). Em outros Hymenoptera como as formigas *Dinoponera lucida* e *Pachycondyla harpax* o polimorfismo numérico é mais frequente entre as populações

(Mariano et al 2008, Velasco et al 2014). Em *Dinoponera lucida* polimorfismo numérico ($2n=106-120$) foi observado entre as populações que ocorrem ao norte do Rio Doce (Norte do Espírito Santo e Sul da Bahia) e ao sul do rio Doce, o isolamento dessas populações durante o Pleistoceno parece explicar as diferenças observadas nos cariótipos (Mariano et al 2008).

No mapeamento da região de rDNA 18S foram marcados quatro pares de cromossomos, em todas as colônias de *T. spinipes* analisadas. Três pares de cromossomos pseudoacrocentricos marcaram na região terminal do braço menor e um par na região intersticial, logo abaixo da porção terminal (Figura 3). Entre as populações de *T. spinipes* não foram verificados polimorfismos de número nem de tamanho dos loci do gene 18S rDNA. Variações no número de pares carregando a NOR foram vistos em *Partamona helleri* (Brito et al 2005) e *S. xanthotricha* (Duarte et al 2009). Por outro lado em *Friesella schrottiki* foram observadas variações de tamanho das regiões NOR entre as populações analisadas (Mambumbu 2002).

Outro tipo de polimorfismo visto em Meliponini foram diferenças no tamanho dos braços heterocromáticos como observado em *Plebeia lucii* (Godoy et al 2013). No entanto essa região também foi marcada pelo CMA₃, sugerindo que esta seja a região organizadora de núcleo, pois regiões CMA₃⁺, em geral coincidem, com as regiões NOR (Brito et al 2005). Dessa forma o polimorfismo mais freqüente em abelhas da tribo Meliponini até o momento foram referentes a variações nas regiões de rDNA.

A sonda de DNA repetitivo (GA)₁₅ marcou na grande maioria regiões de eucromatina (Fig 4 a-i), sendo distribuída da seguinte forma (i) no braço maior do par cromossômico eucromático (A^e) (ii) no braço eucromático de todos os cromossomos pseudoacrocentricos (A^m) e (iii) no braço heterocromático de alguns pares A^m, nas colônias de Raul Soares (Fig 4 b, pares 2 e 3) e de Ribeirão Preto (Fig 4 h, pares 7, 9, 10 e 14).

As regiões de heterocromatina são regiões ricas em DNA repetitivo e seria esperado que a sequência (GA)₁₅ estivesse distribuída nessa região como visto em vertebrados (Ciofi et al 2010). No entanto, o mapeamento físico dessa sequência repetitiva em insetos tem apresentando um padrão diferente, não sendo encontrada relação deste microssatélite com as regiões de heterocromatina. A heterocromatina na espécie de Orthoptera, *Abracris flavolineata* se distribui em apenas um dos braços cromossômicos como acontece em *T. spinipes*. Neste Orthoptera, o sinal da sonda (GA)₁₅ esteve distribuído ao longo do braço eucromático (Milani et al 2014), assim como o verificado neste estudo em *T. spinipes*. Outros trabalhos em abelhas dos gêneros *Melipona* (Travenzoli et al 2015), *Nannotrigona puctata* e *Scaptotrigona bipunctata* (Novaes et al 2015) também verificaram a distribuição do microssatélite (GA)₁₅ nas regiões de eucromatina. Em *A. flavolineata* os autores sugeriram que elementos transponíveis da família *Mariner* estejam relacionados com a distribuição dessas sequencia na eucromatina (Milani et al 2014). Elementos transponíveis da família *Mariner* também já foram identificados em abelhas (Lampe et al 2003) podendo contribuir para o espalhamento dessas sequências nesses Hymenoptera.

Dentre as técnicas analisadas, apenas o mapeamento da sonda de (GA)₁₅ revelou diferenças entre as colônias de *T. spinipes* provenientes de diferentes localidades. Na maioria das localidades as marcações pelo (GA)₁₅ seguiram o padrão geral observado (Fig 4 a, c-d,f-g,i), com marcações na eucromatina. Nas colônias de Raul Soares, Zona da Mata Mineira, além dessas marcações, o microssatélite (GA)₁₅ foram mapeados nas extremidades dos braços heterocromáticos nos pares 2 e 3 (Fig 4 b). Comparando com os resultados da técnica de banda C, essa região não apresenta porções eucromáticas (Fig 2 b).

Uma das colônias coletadas em áreas do Norte de Minas (Fig. 4 e) a marcação nas regiões de eucromatina não formou um bloco homogêneo como visto em outras colônias, podendo ser vistas bandas no segundo par de cromossomos. Nos indivíduos provenientes de

Ribeirão Preto todos os pares cromossômicos foram marcados na região eucromática. Além disso, os pares 7, 9,10 e 14 apresentaram marcações na porção terminal do braço heterocromático (Fig. 4 h). Nessa população o par 11 apresentou marcações terminais em ambas as extremidades e o braço eucromático não foi totalmente marcado (Fig 4 h), um padrão não visto nas outras colônias. Nas amostras de Palotina, oeste do Paraná, foi observado bandas menos conspícuas nos pares 2 e 14 de cromossomos e sinal restrito a porção terminal do braço eucromático nos pares 13 e 17 (Fig. 4 i). As variações observadas entre as populações de *T. spinipes* permitem caracterizar as populações e indicam variações genéticas locais sendo pouco influenciadas pela introdução de colônias nessas áreas, pois *T. spinipes* não é manejada para a criação racional.

Em geral, poucas variações intra-específicas têm sido observadas nos Meliponini e, a maioria delas se referem ao número de cromossomos devido a presença de cromossomos extras (Costa et al, 1992, Lopes et al., 2008; Barth et al. 2011), número de NOR (Duarte et al., 2009) ou tamanho de NOR (Mampumbu, 2002, Krinski et al 2010). Possíveis explicações seriam uma baixa variabilidade ou baixa resolução das técnicas aplicadas. No caso das abelhas sem ferrão, entretanto, parece ser necessário utilizar técnicas que revelem mais detalhes da constituição cromossômica para diferenciar populações e até mesmo algumas espécies (Lopes et al 2014) como observado neste estudo com as variações na localização da sequência repetitiva (GA)₁₅ entre populações.

Embora não tenham sido amostradas populações ao longo de toda a área de distribuição de *T. spinipes*, as colônias analisadas abrangeram uma região ampla que apresentam variações ambientais tanto em relação à altitude como à temperatura. Mesmo assim, para a maioria das características citogenéticas, não foram vistos polimorfismos. O presente trabalho ressalta a importância de se usar técnicas de citogenética molecular em

estudos com populações de espécies que apresentam baixo polimorfismo cromossômico, como as abelhas da tribo Meliponini.

Referências bibliográficas

- 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.
- Brito, R. M., Caixeiro, A. P. D. A., Pompolo, S. D. G., Azevedo, G. G. (2003). Cytogenetic data of *Partamona peckolti* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) by C banding and fluorochrome staining with DA/CMA3 and DA/DAPI. *Genetics and Molecular Biology*, 26(1), 53-57.
- Brito, R.M., Pompolo, S.G. (1997). C:G patterns and fluorochrome staining with DAPI and CMA3, in *Trigona spinipes* (Jurine,1807) (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Brazilian Journal of Genetics* 20:62.
- Camargo J.M.F., Pedro, S.R.M. (2013). Meliponini Lepeletier, 1836. In Moure, J. S., Urban, D., Melo, G. A. R. (Orgs). Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region [versão online]. <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. (Acesso em 04 Julho 14)
- 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.
- Carvalho, A. F., Del Lama, M. A. (2015). Predicting priority areas for conservation from historical climate modelling: stingless bees from Atlantic Forest hotspot as a case study. *Journal of Insect Conservation*, 1-7.
- Cioffi, M. B., Kejnovsky, E., Bertollo, L. A. C. (2011). The chromosomal distribution of microsatellite repeats in the genome of the wolf fish *Hoplias malabaricus*, focusing on the sex chromosomes. *Cytogenetic and Genome Research*, 132(4), 289-296.
- Costa M. A.; Pompolo S.G.; Campos L.A.O. (1992). Supernumerary chromosomes in *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Revista Brasileira de Genética*. 15: 801-806.
- 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.
- Cuadrado, A., Cardoso, M., Jouve, N. (2008). Physical organisation of simple sequence repeats (SSRs) in Triticeae: structural, functional and evolutionary implications. *Cytogenetic and Genome Research*, 120(3-4), 210-219.

- Cuadrado, A., Jouve, N. (2011). Novel simple sequence repeats (SSRs) detected by ND-FISH in heterochromatin of *Drosophila melanogaster*. *BMC Genomics*, 12(1), 205.
- Domingues, A. M. T., Waldschmidt, A. M., Andrade, S. E., Andrade-Souza, V., Alves, R. M. D. O., Silva Junior, J. C. D., Costa, M. A. (2005). Karyotype characterization of *Trigona fulviventris* Guérin, 1835 (Hymenoptera, Meliponini) by C banding and fluorochrome staining: Report of a new chromosome number in the genus. *Genetics and Molecular Biology*, 28(3), 390-393.
- Duarte, O. M. P., Martins, C. C. C., Waldschmidt, A. M., Costa, M. A. (2009). Occurrence of multiple nucleolus organizer regions and intraspecific karyotype variation in *Scaptotrigona xanthotricha* Moure (Hymenoptera, Meliponini). *Genetics and Molecular Research*, 8(3), 831-839.
- Dutrillaux, B., Dutrillaux, A. M. (2013). A South American origin of the genus *Dynastes* (Coleoptera: Scarabaeidae: Dynastinae) demonstrated by chromosomal analyses. *Cytogenetic and Genome Research*, 141(1), 37-42.
- Fernandes, A., Barth, A., Sampaio, W. S. (2013). Caracterização citogenética da espécie *Trigona chanchamayoensis* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) encontrada no cerrado brasileiro. *Evolução e Conservação da Biodiversidade*, 4(2), 63-67.
- Ferreira, R. P., Novaes, C. M., Travenzoli, N. M., Lopes D. M. (2015). Intraspecific variation revealed by chromosomal mapping of microsatellite in stingless bee *Trigona spinipes*. *Chromosome Research*. (Supplement 1), 130.
- Giannini, T. C., Boff, S., Cordeiro, G. D., Cartolano Jr, E. A., Veiga, A. K., Imperatriz-Fonseca, V. L., Saraiva, A. M. (2014). Crop pollinators in Brazil: a review of reported interactions. *Apidologie*, 46(2), 209-223.
- 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.
- Imai, H. T. (1991). Mutability of constitutive heterochromatin (C-bands) during eukaryotic chromosomal evolution and their cytological meaning. *Japanese Journal of Genetic*, 66(5), 635-661.
- Imai, H. T., Taylor, R. W., Crosland, M. W., & Crozier, R. H. (1988). Modes of spontaneous chromosomal mutation and karyotype evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis. *Japanese Journal of Genetic*, 63(2), 159-185.
- Kavalco, K. F., Pazza, R., de Oliveira Brandão, K., de Almeida-Toledo, L. F. (2013). Biogeographic patterns in the chromosomal distribution of a satellite DNA in the banded tetra *Astyanax fasciatus* (Teleostei: Characiformes). *Organisms Diversity & Evolution*, 13(1), 67-76.
- Krinski, D., Fernandes, A., Rocha, M. P., Pompolo, S. D. G. (2010). Karyotypic description of the stingless bee *Oxytrigona cf. flaveola* (Hymenoptera, Apidae, Meliponina) of a colony

from Tangará da Serra, Mato Grosso State, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, 33(3), 494-498.

Lampe, D. J., Witherspoon, D. J., Soto-Adames, F. N., Robertson, H. M. (2003). Recent horizontal transfer of mellifera subfamily mariner transposons into insect lineages representing four different orders shows that selection acts only during horizontal transfer. *Molecular Biology and Evolution*, 20(4), 554-562.

Lopes, D. M., Fernandes, A., Diniz, D., Scudeler, P. E. S., Foresti, F., Campos, L. A. D. O. (2014). Similarity of heterochromatic regions in the stingless bees (Hymenoptera: Meliponini) revealed by chromosome painting. *Caryologia*, 67(3), 222-226.

Lopes, D. M., Fernandes, A., Praça-Fontes, M. M., Werneck, H. D. A., Resende, H. C., Campos, L. A. D. O. (2011). Cytogenetics of three *Melipona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Sociobiology*, 58(1), 185-194.

Lopes, D. M., Pompolo, S. D. G., Campos, L. A. D. O., Tavares, M. G. (2008). Cytogenetic characterization of *Melipona rufiventris* Lepelletier 1836 and *Melipona mondury* Smith 1863 (Hymenoptera, Apidae) by C banding and fluorochromes staining. *Genetics and Molecular Biology*, 31(1), 49-52.

Mampumbu, A. R. (2002). Análise citogenética da heterocromatina e da NOR em populações de abelhas sem ferrão *Friesella schrottkyi* (FRIESE, 1900) (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Magister Scientiae dissertation, Unicamp. Campinas. Brazil*.

Mariano, C. D. S. F., Pompolo, S. D. G., Barros, L. A. C., Mariano-Neto, E. D. U. A. R. D. O., Campiolo, S., Delabie, J. H. C. (2008). A biogeographical study of the threatened ant *Dinoponera lucida* Emery (Hymenoptera: Formicidae: Ponerinae) using a cytogenetic approach. *Insect Conservation and Diversity*, 1(3), 161-168.

Menezes, R. S. T., Carvalho, A. F., Correia, J. P. S. O., Silva, T. S., Somavilla, A., Costa, M. A. (2014). Evolutionary trends in the chromosome numbers of swarm-founding social wasps. *Insectes Sociaux*, 61(4), 385-393.

Milani, D., Cabral-de-Mello, D. C. (2014). Microsatellite organization in the grasshopper *Abracris flavolineata* (Orthoptera: Acrididae) revealed by FISH mapping: remarkable spreading in the A and B chromosomes. *Plos One* 9: e97956

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), 125-127.

Novaes, C. M., Travenzoli, N. M., Ferreira, R. P., Lopes D. M. (2015). Chromosomal mapping using microsatellite probes in two stingless bees species of region Amazon. *Chromosome Research*. (Supplement 1), 130.

Palacios-Gimenez, O. M., Cabral-de-Mello, D. C. (2015). Repetitive DNA chromosomal organization in the cricket *Cycloptiloides americanus*: a case of the unusual X1X20 sex chromosome system in Orthoptera. *Molecular Genetics and Genomics*, 290(2), 623-631.

Pedro, S. R. (2014). The Stingless Bee Fauna In Brazil (Hymenoptera: Apidae). *Sociobiology*, 61(4), 348-354.

Pereira, J. O. P. (2006). Diversidade genética da abelha sem ferrão *Melipona quinquefasciata* baseada no seqüenciamento das regiões ITS1 parcial e 18S do DNA ribossômico nuclear (Doctoral dissertation, Tese de Doutorado. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará. 142p.

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.

Rocha, M. P., Pompolo, S., Campos, L. A. O., Melo, G. A. R., Santos, I. A. (2003). Citogenética da tribo Meliponini (Hymenoptera, Apidae). *Apoidea Neotropica: homenagem aos*, 90, 311-320.

Schwarz, HF 1932. The genus *Melipona*. The type genus of Meliponidae or stingless bees. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 63: 231-459).

Silva, M. M., Buckner, C. H., Picanço, M., Cruz, C. D. (1997). Influência de *Trigona spinipes* Fabr.(Hymenoptera: Apidae) na polinização do maracujazeiro amarelo. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 26(2), 217-221.

Silveira, F. A., Melo, G. A., Almeida, E. A. (2002). *Abelhas brasileiras: sistemática e identificação* (p. 253). Belo Horizonte (MG, Brazil): Fernando A. Silveira

Stanimirovic, Z., Stevanovic, J., Andjelkovic, M. (2005). Chromosomal diversity in *Apis mellifera carnica* from Serbia. *Apidologie*, 36(1), 31-42.

Sumner, A. T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*, 75(1), 304-306.

Tavares, M. G., Dias, L. A. D. S., Borges, A. A., Lopes, D. M., Busse, A. H. P., Costa, R. G., Campos, L. A. D. O. (2007). Genetic divergence between populations of the stingless bee urucu amarela (*Melipona rufiventris* group, Hymenoptera, Meliponini): is there a new *Melipona* species in the Brazilian state of Minas Gerais?. *Genetics and Molecular Biology*, 30(3), 667-675.

Travanzoli, N. M., Ferreira, R. P., Novaes, C. M., Lopes D. M. (2015). Molecular cytogenetic demonstrate variation in the repetitive DNA of stingless bees of the genus *Melipona*. *Chromosome Research*. (Supplement 1), 131.

Velasco, Y. A. M., Delabie, J. H. C., Costa, M. A., Lacau, S., Mariano, C. D. S. F. (2014). Studies on the Karyotype of the Ant *Pachycondyla harpax* (Formicidae: Ponerinae: Ponerini) in Southern Bahia, Brazil. *Florida Entomologist*, 97(3), 1049-1055.

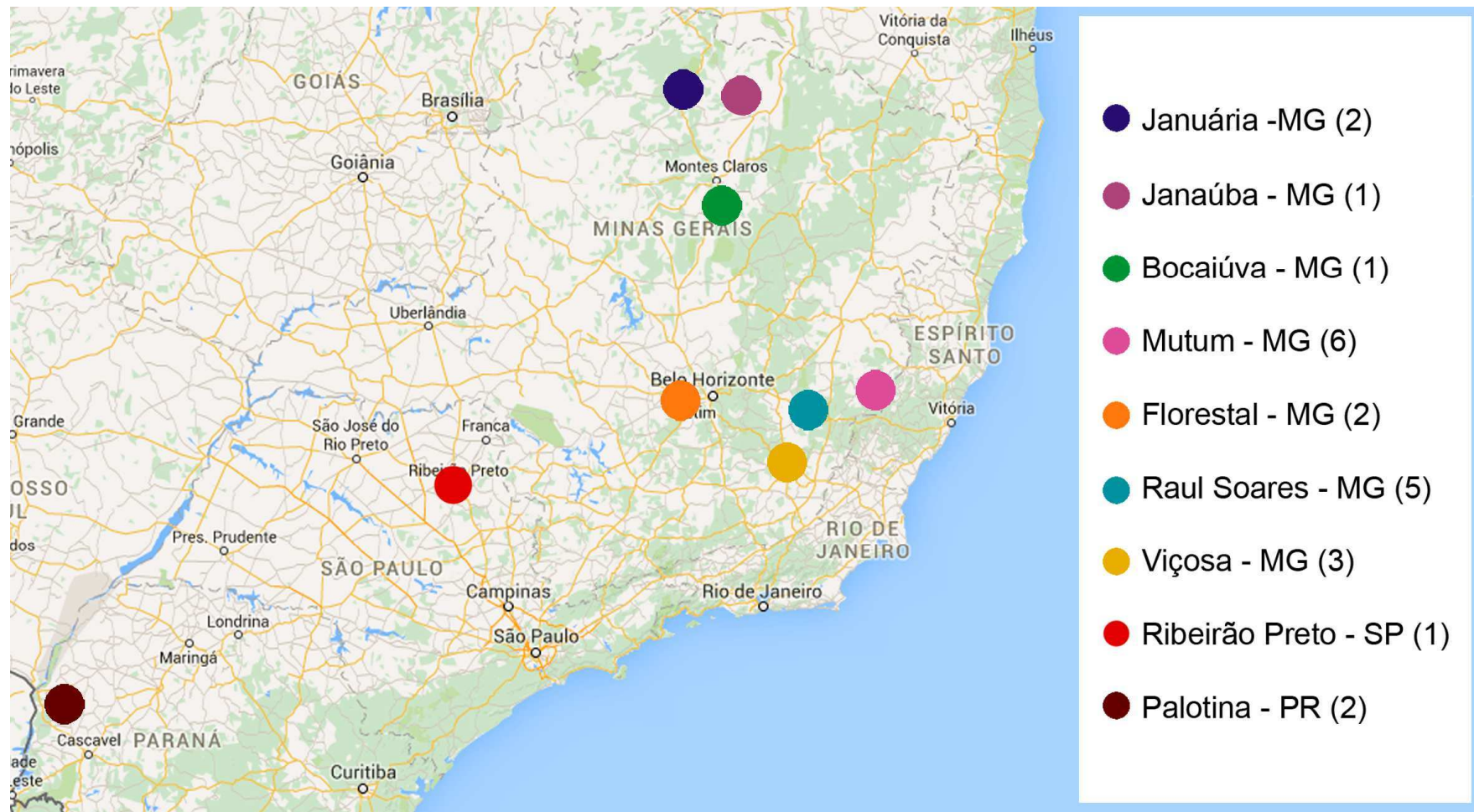


Figura 1. Localização das populações de *Trigonas spinipes* contempladas neste estudo. O número de colônia amostras são indicadas entre parênteses.

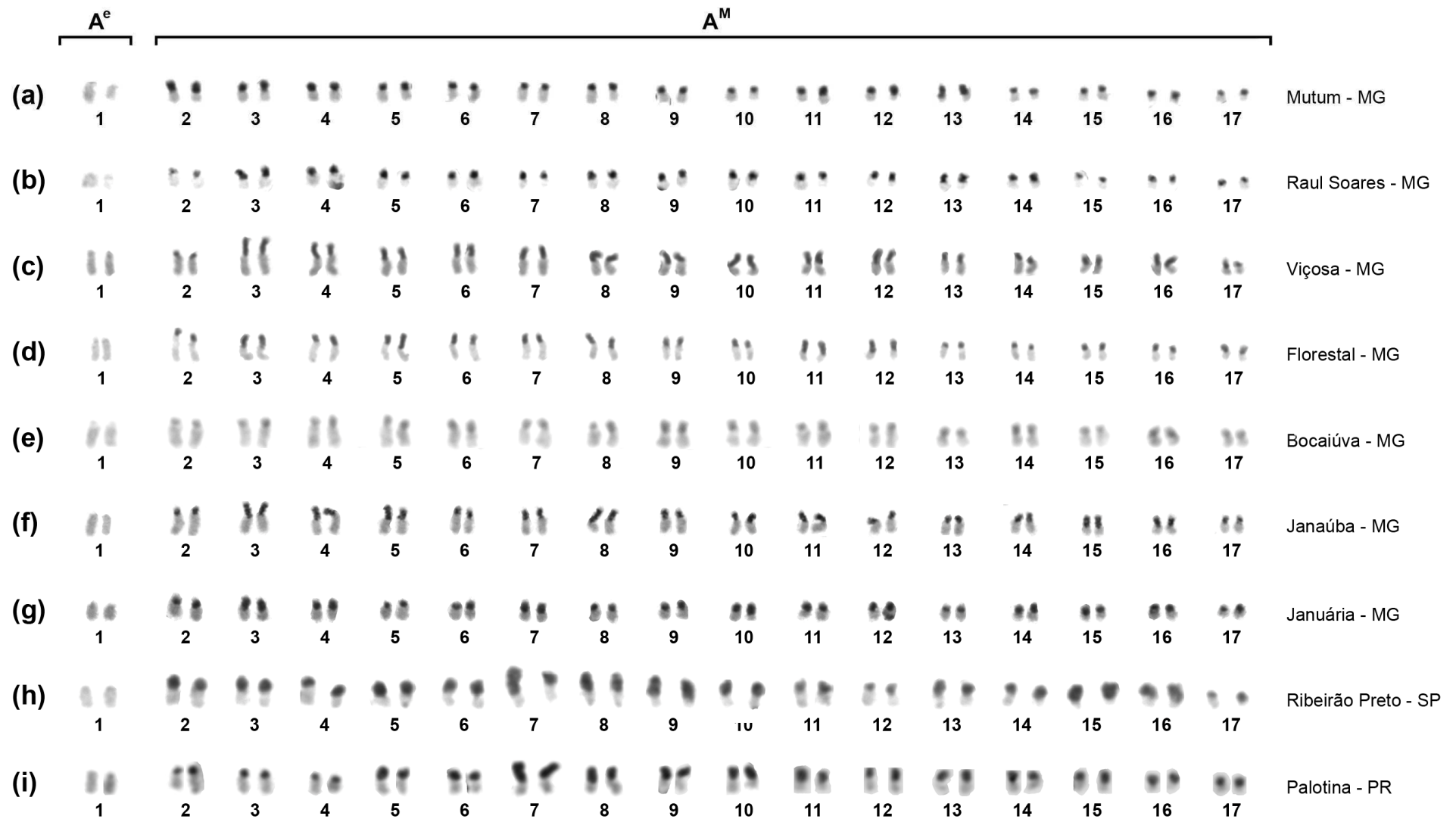


Figura 2. Bandamento C das nove populações de *Trigonas spinipes*. Escala 5 μ m. Morfologias segundo Imai (1991): acrocêntrico totalmente eucromático (A^e) e pseudoacrocêntrico (A^m).

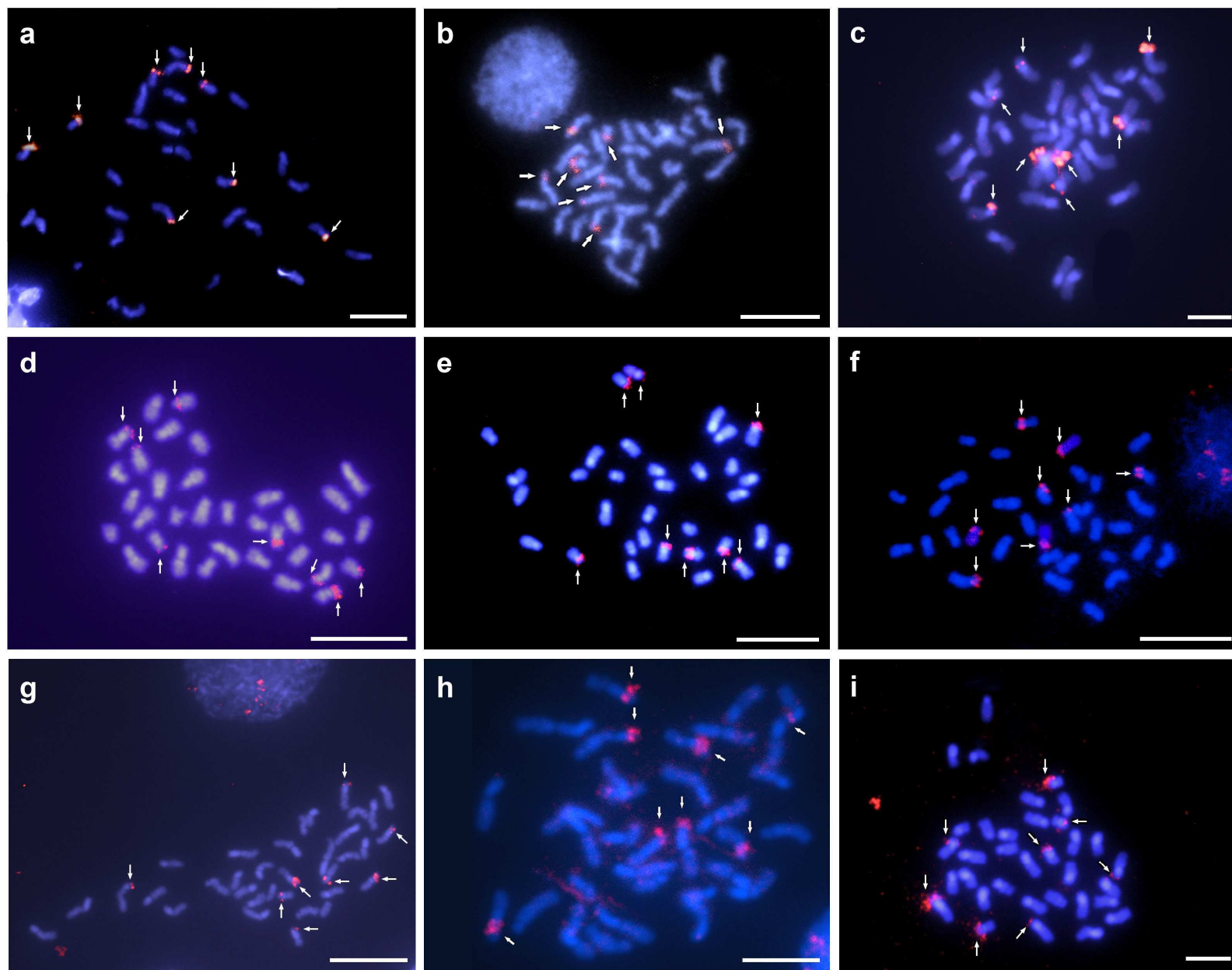


Figura 3. Mapeamento do DNA ribossomal 18S nas nove populações de *Trigona*. (a) Mutum /MG, (b) Raul Soares /MG, (c) Viçosa /MG, (d) Florestal /MG, (e) Bocaiúva /MG, (f) Janaúba /MG, (g) Januária /MG, (h) Ribeirão Preto /SP, (i) Palotina, PR. Barras: 5µm.

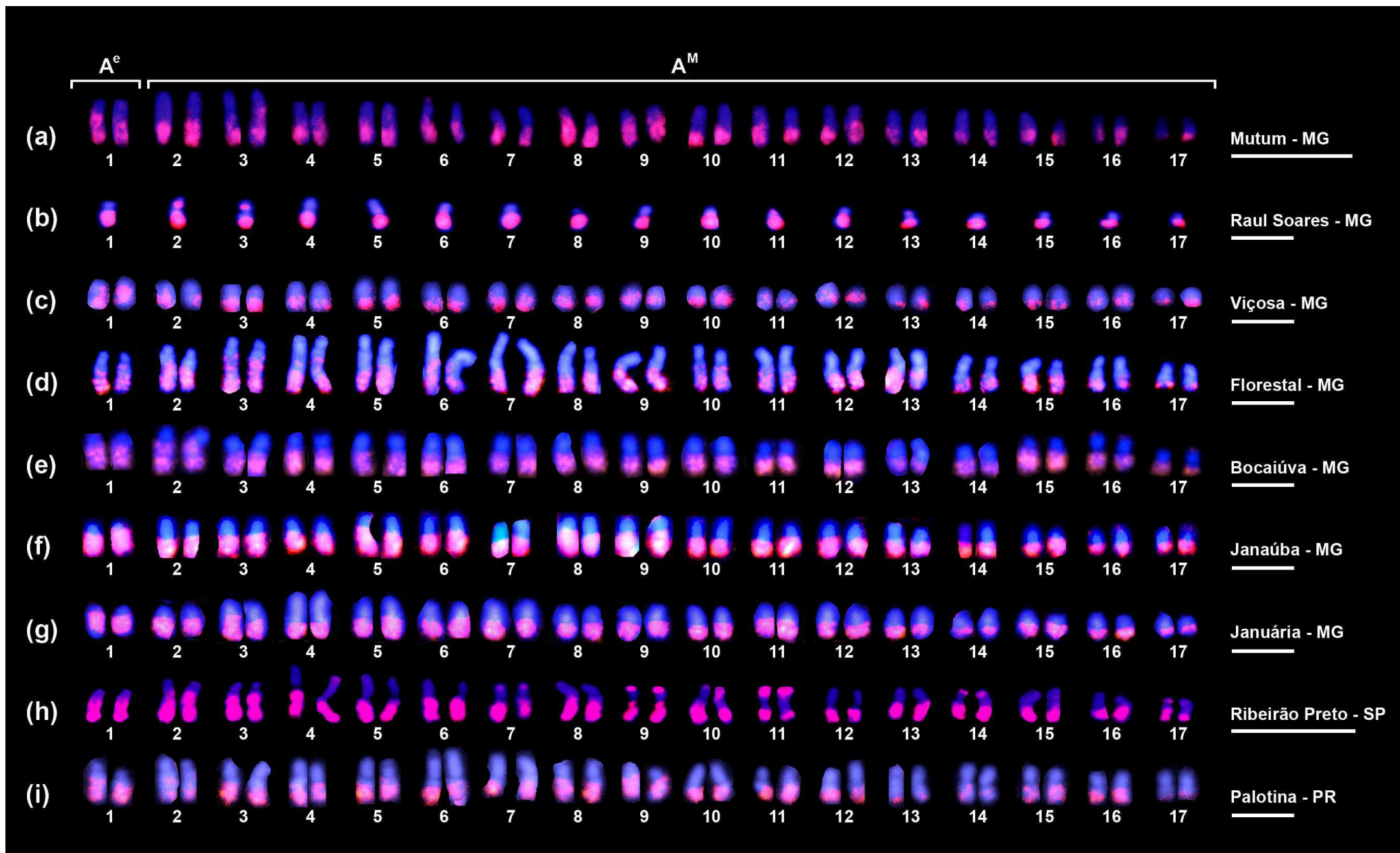


Figura 4. Mapeamento do microssatelite $(GA)_{15}$ nas nove populações de *Trigona spinipes*. Escala: (a-h) 10 μm (b-g,i) 5 μm .

**CAPÍTULO 2: Citogenética comparativa de cinco espécies do gênero
Trigona Jurine 1807 (Hymenoptera, Meliponini)**

Resumo

A citogenética comparativa permite através de suas técnicas de bandamento clássica e molecular entender sobre a evolução do genoma em diversos organismos. Assim, neste estudo foi feita uma descrição citogenética de cinco espécies do gênero *Trigona* (*Trigona pallens*, *T. williana*, *T. hypogea*, *T. truculenta* e *Trigona* sp. grupo “*fuscipennis*”) numa abordagem comparativa entre elas. Todas as espécies apresentaram o número cromossômico $2n=34$ e um dos braços cromossômicos heterocromático na maior parte dos cromossomos. *Trigona pallens*, *T. williana*, e *T. truculenta* apresentaram cromossomos acrocêntricos totalmente eucromáticos, também encontrados em outras espécies do gênero. Essa morfologia foi ausente em *Trigona* sp1 grupo “*fuscipennis*” e *T. hypogea*. O sítios de rDNA 18S variaram entre as espécies sendo localizados em um a quatro pares cromossômicos. Porém, em todas as espécies essa região esteve presente no braço heterocromático. Tanto o número diploide quanto a distribuição da heterocromatina foi semelhante ao encontrado para outras espécies do gênero descritas citogeneticamente reforçando a homogeneidade dessas características no gênero. Por outro lado o posicionamento do gene rDNA variou entre as espécies constituindo um marcador promissor para o entendimento da evolução do cariótipo em *Trigona* e em outros Meliponini.

Introdução

As abelhas sem-ferrão do gênero *Trigona* que ocorrem na região Neotropical formam um grupo monofilético (Costa et al 2003, Rasmussem e Cameron 2009). No Brasil, o gênero possui uma ampla distribuição abrangendo quase todo o território nacional (Silveira et al 2002). As espécies do gênero são consideradas polinizadoras de culturas como manga e acerola, e de plantas nativas (Nogueira-Couto e Peraro 2000, Lattaro e Malerbo-Souza 2006, Giannini et al 2014), embora em culturas de *Citrus*, essas abelhas possam causar injúrias nas flores (Silva et al 1997).

Estudos citogenéticos têm sido usados como ferramenta para o entendimento da filogenia, mecanismos de especiação e diferenças entre populações em diversos grupos de Hymenoptera (Pompolo e Takahashi 1986, Duarte et al 2009, Menezes et al 2014). A citogenética comparativa pode auxiliar no entendimento das relações entre as espécies do gênero *Trigona*, complementando os estudos de filogenia do grupo baseando nas características cromossômicas das diferentes espécies.

São reconhecidas 32 espécies para o gênero (Camargo e Pedro 2013, Pedro 2014) e destas, apenas sete apresentam algum registro citogenético: *Trigona recursa* Smith, 1863, *Trigona* aff. *fuscipennis* Friese, 1900; *Trigona fulviventris* Guérin, 1844; *Trigona chanchamayoensis* Schwarz, 1948; *Trigona branneri* Cockerell, 1912; *Trigona spinipes* e *Trigona hyalinata* (Rocha et al 2003; Costa et al 2004; Domingues et al 2005). As espécies do gênero apresentam um número diploide igual a 34 cromossomos, exceto em *T. fulviventris* ($2n=32$) (Domingues et al 2005).

Nas últimas décadas, o mapeamento físico dos genes de DNA ribossomal (rDNA) tem sido bastante aplicado em estudos sobre a evolução do cariótipo em diversas ordens de insetos: Coleoptera (Cabral-de-Melo et al 2010; Cabral-de-Melo et al 2011a,b), Diptera (Rafael et al 2003, 2006), Orthoptera (Cabreto et al 2008 , Grzywacz et al 2014), Hemiptera

(Nokkala et al 2007; Grozeva et al 2011), Lepidoptera (Nguyen et al 2010). Nas abelhas da tribo Meliponini foram realizados estudos de localização física do rDNAs apenas nas espécies de *Friesella schrottkyi* (Mampumbu 2002), *Melipona compressipes* (Rocha et al 2002), *Partamona helleri* e *Partamona seridoensis*, (Brito et al 2005), *Nannotrigona puctata*, *Paratamona* sp. e *Scaptotrigona bipuctata* (Godoy 2014) sendo os outros gêneros pouco estudados, incluindo o gênero *Trigona*.

As informações disponíveis sobre a citogenética das espécies de *Trigona*, têm se apoiado em descrições e técnicas de bandamento da citogenética clássica (Brito e Pompolo 1997, Rocha et al 2003, Costa et al 2004; Domingues et al 2005). As informações fornecidas por esses métodos não permitiram esclarecer ou entender com clareza as relações entre os grupos de espécies do gênero. Dessa forma, a abordagem da citogenética molecular, como o mapeamento físico de genes pela técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH), pode incrementar as informações citogenéticas até o momento disponíveis para as espécies do gênero.

A análise comparativa dos resultados obtidos pelas técnicas de bandamentos clássicas e do mapeamento de genes ribossomais tem fornecido informações sobre a organização e evolução do genoma em diversos organismos auxiliando em estudos de filogenia e sistemática (Loreto et al 2008, Cabral-de-Melo et al 2010, Supiwong et al 2013, Grywacz et al 2014). Com esse intuito, este estudo descreveu e comparou através de técnicas de citogenética clássica e molecular cinco espécies de *Trigona* de ocorrências no Brasil.

Material e Métodos

Neste estudo foram utilizadas as seguintes espécies: *T. pallens*, *T. williana*, *T. hypogea*, *T. truculenta* coletadas no município de Altamira- Pará (3°22'18,99"S /

51°56'25,74" W), *Trigona* sp. grupo "*fuscipennis*" proveniente de Florestal- Minas Gerais (21° 10' 40" S /47° 48' 36" W). Os indivíduos adultos foram montados, identificados pelo prof. Fernando Silveira da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e depositados na coleção do Museu Regional de Entomologia da Universidade Federal de Viçosa (Apiário Central/UFV) e na Coleção Zoológica da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os números de registro dos espécimes encontram-se na tabela 1.

Cromossomos metafásicos foram obtidos a partir do gânglio cerebral de 30 larvas pós-defecantes de cada espécie e processados de acordo com a técnica desenvolvida por Imai et al (1988). A coloração convencional foi realizada com Giemsa 5%. A heterocromatina foi identificada pela técnica de bandamento C desenvolvida por Sumner (1972) com as seguintes modificações (tratamentos com 0,2M HCl por 6 min e 5% Ba (OH)₂ à 60 °C por 14 min). Foram analisadas, em média, 15 metáfases por lâmina em microscópio OLYMPUS BX-60 acoplado a um sistema de captura e análise de imagens. Os cromossomos metafásicos foram pareados e classificados baseando na localização da heterocromatina, como sugerido por Imai (1991).

As sondas das regiões de rDNA 18S foram obtidas por amplificação via PCR, utilizando-se os primers F(5'-GTCATATGCTTGTCTCAAAGA -3') e R(3'-TCTAATTTTTTCAAAGTAAACGC -5'), desenhados para a espécie de abelha *Melipona quinquefasciata* (Pereira 2006). As sondas de rDNA 18S foram marcadas utilizando-se digoxigenin-11-dUTP (Roche, Mannheim, Germany) durante a amplificação. Os procedimentos do FISH foram realizados de acordo com Pinkel et al (1986). Para a detecção do sinal, o material foi incubado com antidigoxigenina-rodamina (Roche, Mannheim Germany). Ao final as lâminas foram montadas com Antifading contendo DAPI (Fluoroshield com DAPI- SIGMA F6057). Foram analisadas, em média, 15 metáfases por lâmina em um fotomicroscópio de epifluorescência OLYMPUS BX-53.

Resultados e Discussão

O número cromossômico observado nas espécies *Trigona hypogea*, *T. pallens*, *T. truculenta*, *T. williana*, e *Trigona* sp. grupo “*fuscipennis*” foi o mesmo, $2n=34$ (Figs 1 e 2). Assim como visto em vários gêneros da tribo Meliponini, o número cromossômico parece ser constante para as seis espécies de *Trigona* descritas citogeneticamente na literatura (Rocha et al 2002, Costa et al 2004, Fernandes et al 2013). A única exceção no gênero é *T. fulviventris*, $2n=32$, em que a redução do número diploide seria resultado de uma fusão cromossômica (Domingues et al. 2005). A constância do número diploide tem sido observada para os gêneros *Frieseomelitta*, $2n=30$ (Rocha et al 2003, Carvalho e Costa 2011), *Scaptotrigona*, $2n=34$ (Rocha et al 2003, Duarte et al 2009), e *Plebeia*, $2n= 34$ (Rocha et al 2003, Godoy et al 2013). Diferenças numéricas foram encontradas em *Partamona* (Costa et al 1992, Martins et al 2009), *Melipona* (Lopes et al 2008) e *Tetragonisca* (Barth et al 2011), no entanto, estas diferenças estavam relacionadas à presença de cromossomos supranumerários. No gênero *Melipona*, além da presença de cromossomos Bs, uma variação no número diplóide foi encontrada para a espécie *Melipona seminigra merrillae* (Francini et al 2011).

Com base no padrão de distribuição da heterocromatina, os cromossomos das cinco espécies foram majoritariamente pseudoacrocêntricos, ou seja, um dos braços cromossômicos é totalmente heterocromático (Fig. 1). Na tabela 1 está indicada a fórmula cariotípica das espécies deste estudo. Os tipos cromossômicos e as frequências encontradas nas espécies foram 81% pseudoacrocêntricos (A^m), 8% pseudoacrocêntricos com heterocromatina na região centromérica, (A^{mc}), seguido de 6% de cromossomos acrocêntricos (A) e 5% de acrocêntricos totalmente eucromáticos (A^e). Em *T. pallens* e *T. williana* foi observada coloração mais forte em alguns pares A^m (Fig 1 f-g). A principal hipótese sobre evolução cariotípica do grupo sugere eventos de fissão cêntrica, seguidas de crescimento “*in tandem*” da heterocromatina como forma de estabilizar as regiões teloméricas resultantes dessas fissões

(Imai et al 1988), o que justificaria a predominância de cromossomos dos tipos A^m e A^{mc} no cariótipo de vários gêneros das abelhas da tribo Meliponini (Rocha et al 2003, Godoy et al 2013).

As espécies *T. pallens* e *T. williana* apresentaram um par A^e (Fig. 1f, g) enquanto *T. truculenta*, dois pares (Fig. 1j). Cariótipos com a morfologia A^e foram registrados para outras espécies do gênero: *T. chanchamayoensis*, *T. fulviventris*, *T. recursa*, *T. branneri*, *T. hyalinata* e *T. spinipes* (Brito e Pompolo 1997, Costa et al 2004, Domingues et al 2005, Ferreira et al 2015), o que sugere uma homologia desse cromossomo entre as espécies do gênero *Trigona* (Costa et al 2004). *Trigona hypogea* e *Trigona* sp1 grupo “*fuscipennis*” não apresentaram cromossomos A^e (Fig.1 h,i). Dentre as *Trigonas* estudadas essas duas espécies apresentam hábitos alimentares diferenciados das demais. A espécie *T. hypogea* juntamente com *T. crassipes* e *T. necrophila* estocam proteína animal que é utilizada na alimentação das larvas, ao contrário das outras espécies do gênero que coletam pólen (Camargo e Roubik 1991, Mateus e Noll 2004). As espécies do grupo “*fuscipennis*” coletam secreções açucaradas excretadas por insetos da ordem Hemiptera (Carvalho 2004). Outras abelhas da tribo Meliponini e outras espécies de *Trigona* também apresentam essa interação mutualística, mas de forma facultativa enquanto nas espécies do grupo “*fuscipennis*” essa interação é obrigatória (Carvalho 2004, Rasmussen e Camargo 2008, Oda et al 2009). Tanto os hábitos alimentares quanto as diferenças dos dados citogenéticos em *T. hypogea* e *Trigona* sp. grupo “*fuscipennis*” corroboram com a proposta filogenética que colocam esses grupos em clados diferentes das demais espécies do gênero (Rasmussen e Camargo 2008, Rasmussen e Camerom 2010) sugerindo modos diferentes de eliminação de heterocromatina.

O cariótipo da espécie *Trigona. sp* grupo “*fuscipennis*” foi semelhante, ao encontrado para outra espécie do grupo descrita para o estado de Minas Gerais. As duas espécies assemelham-se, tanto em número quanto morfologia cromossômica, embora haja uma

distância de cerca de 600 km entre os locais de coleta. Os dados citogenéticos deste trabalho sugerem se tratar da mesma espécie encontrada por Rocha et al (2003). O grupo “*fuscipennis*” constitui um conjunto de espécies ainda não descritas, sendo consideradas como *T. fuscipennis* apenas os espécimes com distribuição do México ao oeste do Equador (Camargo e Pedro 2013). No entanto, existem espécies de ocorrência em outros países da América do Sul que fazem parte desse grupo (Camargo e Pedro 2013). Deste modo uma revisão taxonômica do grupo torna-se necessária para entender as relações neste complexo de espécies.

As informações sobre mapeamento físico da região rDNA 18S nas espécies de *Trigona* deste estudo e em outras abelhas da tribo Meliponini disponíveis na literatura estão resumidos na Tabela 2. Tanto em *Trigona* quanto nos outros Meliponini encontramos variações no número e na localização das marcações de rDNA 18S (Tabela 2). *T. pallens* e *T. williana* (Fig. 2 a, b) apresentaram apenas um par de cromossomos marcado na região intersticial do braço curto do par cromossômico. *T. hypogea* e *Trigona* sp grupo “*fuscipennis*” tiveram dois pares marcados sendo um par na região intersticial e outro par na região subterminal (Fig. 2c,d) e, em *T. truculenta* quatro pares foram marcados, sendo dois na região intersticial e dois na região subterminal (Fig 2e).

O gene rDNA 18S mapeado nos Meliponini *Friesella schrottkyi*, *Melipona compressipes*, *Nannotrigona punctata*, *Sacaptotrigona bipunctata* (Maffei et al 2001, Mampumbu e Pompolo 2000, Rocha et al 2002, Brito et al 2005, Godoy 2014) mostra distribuição na região terminal do braço longo em um par de cromossomos. Nas espécies do gênero *Partamona*, o número de pares marcados varia de um a quatro, sendo que em todos os casos os *loci* rDNA estão localizados na região terminal do braço cromossômico longo. As espécies de *Trigona*, no entanto, apesar de apresentarem o mesmo número diploide mostram variação no número e na localização dos genes de rDNA tanto entre as espécies do gênero quanto em comparação com outros Meliponini. A localização do gene rDNA 18S próximo a

regiões de heterocromatina foi registrada para outras ordens de insetos sendo sugerido que a ação elementos transponíveis, a recombinação ectópica nessas regiões de heterocromatina poderiam explicar o espalhamento dos *loci* rDNA sem alteração do número cromossômico (Nguyen et al 2010, Cabral-de-Melo 2011, Grzywacz et al 2014).

Este estudo além de ampliar as informações citogenéticas do gênero *Trigona*, reforça a homogeneidade das espécies em relação ao conjunto diploide e a distribuição da heterocromatina. A variação interespecífica encontrada no mapeamento do gene ribossomal e a associação desse gene às regiões de heterocromatina ressaltam a importância dos rDNA como marcadores citogenéticos no entendimento da evolução do cariótipo no gênero *Trigona* e em outros Meliponini.

Referências Bibliográficas

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.

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.

Brito, R.M., Pompolo, S.G. (1997). C:G patterns and fluorochrome staining with DAPI and CMA3, in *Trigona spinipes* (Jurine,1807) (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Braz J Genet* 20:62.

Cabral-de-Mello, D. C., de Moura, R. D. C., de Souza Melo, A., Martins, C. (2011a). Evolutionary dynamics of heterochromatin in the genome of *Dichotomius* beetles based on chromosomal analysis. *Genetica*, 139(3), 315-325.

Cabral-de-Mello, D. C., Moura, R. C., Martins, C. (2010). Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the beetle *Dichotomius geminatus* provides the first evidence for an association of 5S rRNA and histone H3 genes in insects, and repetitive DNA similarity between the B chromosome and A complement. *Heredity*, 104(4), 393-400.

Cabral-de-Mello, D. C., Oliveira, S. G., de Moura, R. C., Martins, C. (2011b). Chromosomal organization of the 18S and 5S rRNAs and histone H3 genes in Scarabaeinae coleopterans: insights into the evolutionary dynamics of multigene families and heterochromatin. *BMC genetics*, 12(1), 88.

Cabrero, J., López-León, M. D., Teruel, M., Camacho, J. P. M. (2009). Chromosome mapping of H3 and H4 histone gene clusters in 35 species of acridid grasshoppers. *Chromosome research*, 17(3), 397-404.

Camargo J. M. F., Pedro, S.R.M. (2013). Meliponini Lapeletier, 1836. In Moure, J. S., Urban, D., Melo, G. A. R. (Orgs). Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region [versão online]. <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. (Acesso em 04 Julho 14).

Camargo, J. M., Roubik, D. W. (1991). Systematics and bionomics of the apoid obligate necrophages: the *Trigona hypogea* group (Hymenoptera: Apidae; Meliponinae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 44(1), 13-39.

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.

Carvalho, R. G. D. L. (2004). Sobre a biologia e associação de *Trigona* sp. n. (Hymenoptera: Apidae, Apinae, Meliponini) com hemipteros (Aetalionidae e Membracidae) que excretam líquidos açucarados (Doctoral dissertation, FFCLRP/USP).

Costa M. A.; Pompolo S.G.; Campos L.A.O. (1992). Supernumerary chromosomes in *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Revista Brasileira de Genética*. 15: 801-806.

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.

Domingues, A. M. T., Waldschmidt, A. M., Andrade, S. E., Andrade-Souza, V., Alves, R. M. D. O., Silva Junior, J. C. D., Costa, M. A. (2005). Karyotype characterization of *Trigona fulviventris* Guérin, 1835 (Hymenoptera, Meliponini) by C banding and fluorochrome staining: Report of a new chromosome number in the genus. *Genetics and Molecular Biology*, 28(3), 390-393.

Duarte, O. M. P., Martins, C. C. C., Waldschmidt, A. M., Costa, M. A. (2009). Occurrence of multiple nucleolus organizer regions and intraspecific karyotype variation in *Scaptotrigona xanthotricha* Moure (Hymenoptera, Meliponini). *Genetics and Molecular Research*, 8(3), 831-839.

Fernandes, A., Barth, A., Sampaio, W. S. (2013). Caracterização citogenética da espécie *Trigona chanchamayoensis* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) encontrada no cerrado brasileiro. *Evolução e Conservação da Biodiversidade*, 4(2), 63-67.

Ferreira, R. P., Novaes, C. M., Travenzoli, N. M., Lopes D. M. (2015). Intraspecific variation revealed by chromosomal mapping of microsatellite in stingless bee *Trigona spinipes*. *Chromosome Research*. (Supplement 1), 130.

- Francini, I. B., Gross, M. C., Nunes-Silva, C. G., Carvalho-Zilse, G. A. (2011). Cytogenetic analysis of the Amazon stingless bee *Melipona seminigra merrillae* reveals different chromosome number for the genus. *Scientia Agricola*, 68(5), 592-593.
- Giannini, T. C., Boff, S., Cordeiro, G. D., Cartolano Jr, E. A., Veiga, A. K., Imperatriz-Fonseca, V. L., Saraiva, A. M. (2014). Crop pollinators in Brazil: a review of reported interactions. *Apidologie*, 46(2), 209-223.
- 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.
- Grozeva, S., Kuznetsova, V. G., Anokhin, B. A. (2011). Karyotypes, male meiosis and comparative FISH mapping of 18S ribosomal DNA and telomeric (TTAGG) n repeat in eight species of true bugs (Hemiptera, Heteroptera). *Comparative cytogenetics*, 5(4), 355.
- Grzywacz, B., Chobanov, D. P., Maryńska-Nadachowska, A., Karamysheva, T. V., Heller, K. G., Warchałowska-Śliwa, E. (2014). A comparative study of genome organization and inferences for the systematics of two large bushcricket genera of the tribe Barbitistini (Orthoptera: Tettigoniidae: Phaneropterinae). *BMC evolutionary biology*, 14(1), 48.
- Imai, H. T. (1991). Mutability of constitutive heterochromatin (C-bands) during eukaryotic chromosomal evolution and their cytological meaning. *Japanese Journal of Genetic*, 66(5), 635-661.
- Imai, H. T., Taylor, R. W., Crosland, M. W., Crozier, R. H. (1988). Modes of spontaneous chromosomal mutation and karyotype evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis. *Japanese Journal of Genetic*, 63(2), 159-185.
- Lattaro, L. H., & Malerbo-Souza, D. T. (2006). Polinização entomófila em abóbora caipira, *Cucurbita mixta* (Cucurbitaceae). *Acta Scientiarum. Agronomy*, 28(4), 563-568.
- Lopes, D. M., Pompolo, S. D. G., Campos, L. A. D. O., Tavares, M. G. (2008). Cytogenetic characterization of *Melipona rufiventris* Lepeletier 1836 and *Melipona mondury* Smith 1863 (Hymenoptera, Apidae) by C banding and fluorochromes staining. *Genetics and Molecular Biology*, 31(1), 49-52.
- Loreto, V., Cabrero, J., López-León, M. D., Camacho, J. P. M., & de Souza, M. J. (2008). Comparative analysis of rDNA location in five Neotropical gomphocerine grasshopper species. *Genetica*, 132(1), 95-101.
- Maffei, E. M. D., Pompolo, S. D. G., Oliveira Campos, L. A., Petitpierre, E. (2001). Sequential FISH Analysis with rDNA Genes and Ag-NOR Banding in the Lady Beetle *Olla v-nigrum* (Coleoptera: Coccinellidae). *Hereditas*, 135(1), 13-18.
- Mampumbu, A. R. (2002). Análise citogenética da heterocromatina e da NOR em populações de abelhas sem ferrão *Friesella schrottkyi* (FRIESE, 1900) (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Magister Scientiae dissertation, Unicamp. Campinas. Brazil*.

- Mampumbu, A. R., Pompolo, S. G. (2000). Localização da região organizadora de nucléolo por hibridização in situ na abelha sem ferrão *Friesella schrottkyi* (Friese, 1900) (Hymenoptera: Apidae: Meliponini), na região de Viçosa, Minas Gerais. *Genetics and Molecular Biology*, 23(Supplement 3), 1-20.
- Martins, C. C. C., Duarte, O. M. P., Waldschmidt, A. M., Alves, R. M. D. O., Costa, M. A. (2009). New occurrence of B chromosomes in *Partamona helleri* (Friese, 1900)(Hymenoptera, Meliponini). *Genetics and Molecular Biology*, 32(4), 782-785.
- Mateus, S., Noll, F. B. (2004). Predatory behavior in a necrophagous bee *Trigona hypogea* (Hymenoptera; Apidae, Meliponini). *Naturwissenschaften*, 91(2), 94-96.
- Menezes, R. S. T., Carvalho, A. F., Correia, J. P. S. O., Silva, T. S., Somavilla, A., Costa, M. A. (2014). Evolutionary trends in the chromosome numbers of swarm-founding social wasps. *Insectes Sociaux*, 61(4), 385-393.
- Nguyen, P., Sahara, K., Yoshido, A., Marec, F. (2010). Evolutionary dynamics of rDNA clusters on chromosomes of moths and butterflies (Lepidoptera). *Genetica*, 138(3), 343-354.
- Nogueira-Couto, R.H.; Peraro, D.T. (2000). Polinização entomófila em abóbora menina brasileira precoce (*Cucurbita mixta* Pang.). In: Congresso Brasileiro de Apicultura, 13., Florianópolis. Anais. Florianópolis, (CD-ROM).
- Nokkala, C., Kuznetsova, V., Grozeva, S., Nokkala, S. (2007). Direction of karyotype evolution in the bug family Nabidae (Heteroptera): New evidence from 18S rDNA analysis. *European Journal of Entomology*, 104(4), 661.
- Pedro, S. R. (2014). The Stingless Bee Fauna In Brazil (Hymenoptera: Apidae). *Sociobiology*, 61(4), 348-354.
- Pereira, J. O. P. (2006). Diversidade genética da abelha sem ferrão *Melipona quinquefasciata* baseada no seqüenciamento das regiões ITS1 parcial e 18S do DNA ribossômico nuclear (Doctoral dissertation, Tese de Doutorado. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará. 142p.
- Pinkel, D., Straume, T., Gray, J. W. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(9), 2934-2938.
- Pompolo, S. D. G., Takahashi, C. S. (1986). Karyotype of two species of wasps of the genus *Polistes* (Polistinae, Vespidae, Hymenoptera). *Insectes sociaux*, 33(2), 142-148.
- Rafael, M. S., Santos Jr, I. P., Tadei, W. P., Carvalho, K. A., Recco-Pimentel, S. M., Sallum, M. AM., Forattini, O. P. (2006). Cytogenetic study of *Anopheles albitarsis* (Diptera: Culicidae) by C-banding and in situ hybridization. *Hereditas*, 143(2006), 62-67.
- Rafael, M. S., Tadei, W. P., Recco-Pimentel, S. M. (2003). Location of ribosomal genes in the chromosomes of *Anopheles darlingi* and *Anopheles nuneztovari* (Diptera, Culicidae) from the Brazilian Amazon. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98(5), 629-635.

- Rasmussen C., Camargo J.M.F. (2008). A molecular phylogeny and the evolution of nest architecture and behavior in *Trigona* s.s. (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Apidologie* 39,102–118
- 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. D. G., Dergam, J. A., Fernandes, A., Campos, L. A. D. O. (2002). DNA characterization and karyotypic evolution in the bee genus *Melipona* (Hymenoptera, Meliponini). *Hereditas*, 136(1), 19-27.
- Rocha, M. P., Pompolo, S., Campos, L. A. O., Melo, G. A. R., Santos, I. A. (2003). Citogenética da tribo Meliponini (Hymenoptera, Apidae). *Apoidea Neotropica: homenagem aos*, 90, 311-320.
- Schwarz, HF 1932. The genus *Melipona*. The type genus of Meliponidae or stingless bees. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 63: 231-459.
- Silva, M. M., Buckner, C. H., Picanço, M., Cruz, C. D. (1997). Influência de *Trigona spinipes* Fabr.(Hymenoptera: Apidae) na polinização do maracujazeiro amarelo. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 26(2), 217-221.
- Silveira, F. A., Melo, G. A., Almeida, E. A. (2002). *Abelhas brasileiras: sistemática e identificação* (p. 253). Belo Horizonte (MG, Brazil): Fernando A. Silveira
- Sumner, A. T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental cell research*, 75(1), 304-306.

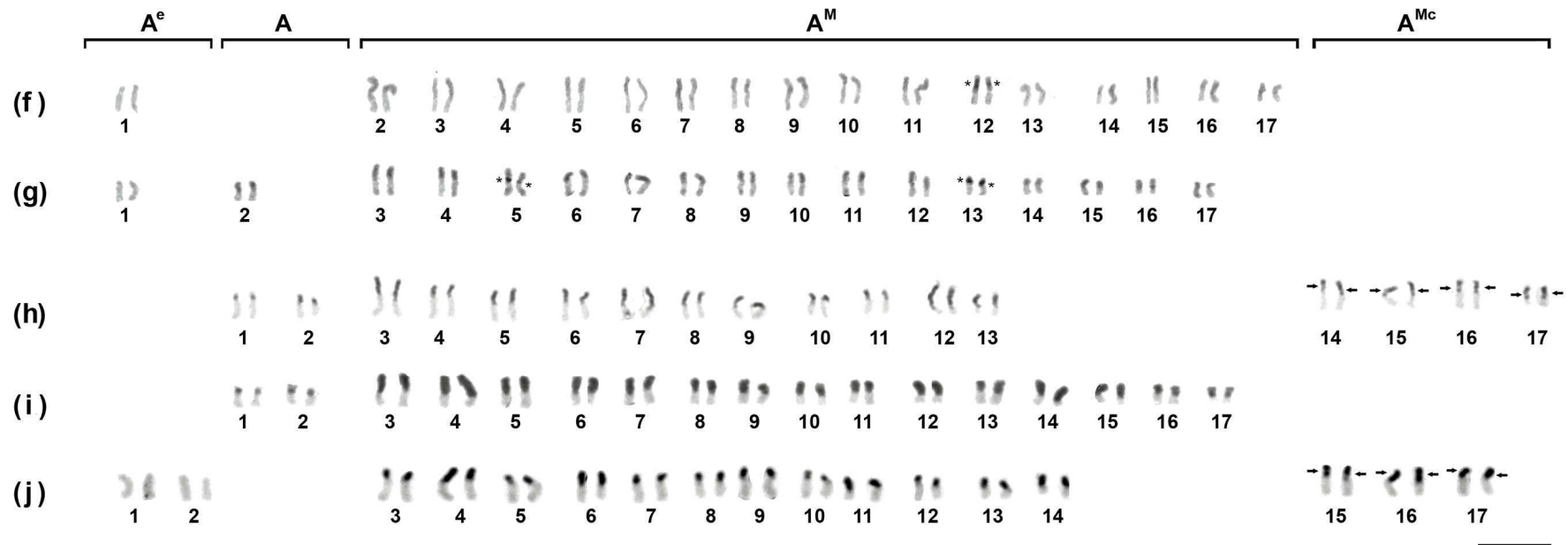
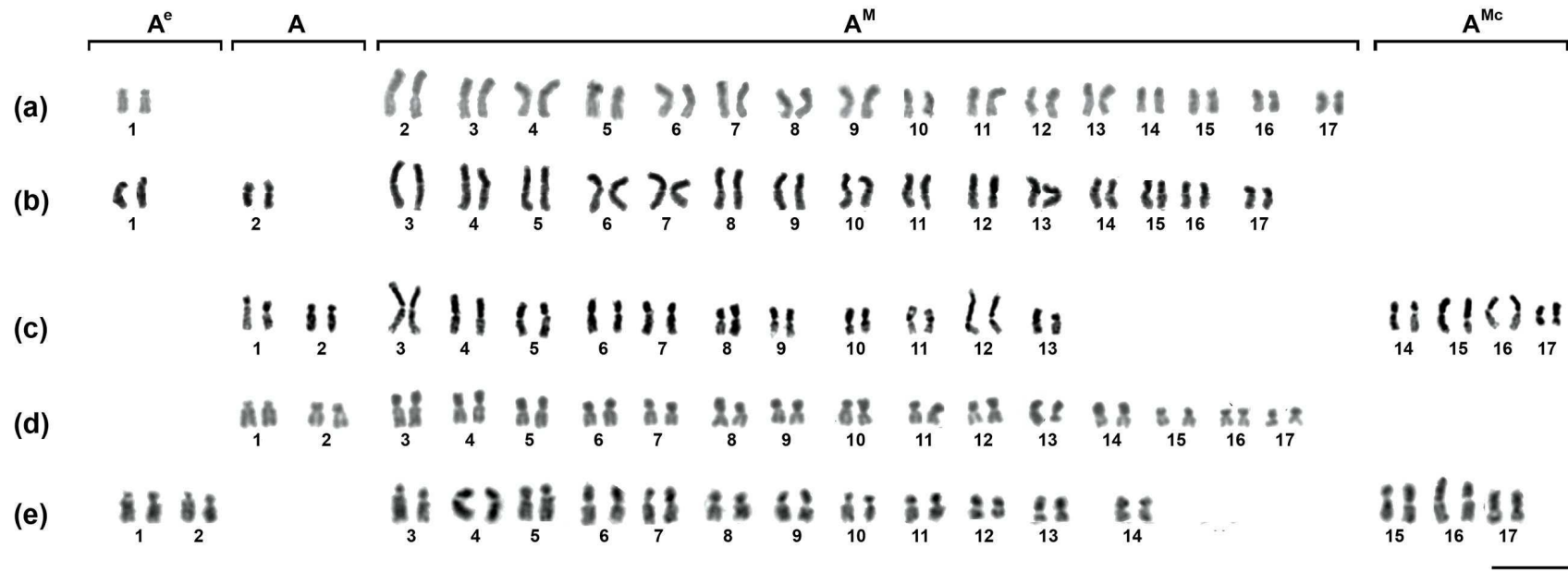
Tabela 1. Morfologia cromossômica e número de registro na cinco espécies do gênero *Trigona*. Tipo de cromossomos segundo Imai (1991): A: acrocêntrico, A^c: acrocêntrico totalmente eucromáticos, A^m: pseudoacrocêntricos, A^{mc}: pseudoacrocêntrico com cromatina pericentromérica.

Espécies	Morfologia Cromossômicas					Número de registro
	2n	A ^c	A	A ^m	A ^{mc}	
<i>T. pallens</i>	34	2	-	32	-	UFMG-IHY-1403740
<i>T. williana</i>	34	2	2	30	-	UFMG-IHY-1403739
<i>T. hypogea</i>	34	-	2	24	8	UFMG-IHY-1403738
<i>T. truculenta</i>	34	4	-	24	6	UFMG-IHY-1403736
<i>Trigona</i> sp. grupo " <i>fuscipennis</i> "	34	-	4	30	-	-

Tabela 2. Mapeamento do rDNA 18S nas espécies de abelhas Meliponini. São mostrados o número de pares portando o gene e localização do rDNA 18S.

Espécies	Número de pares cromossômico contendo rDNA	Localização no cromossomo do rDNA	Referências
<i>Friesella schrottkyi</i>	1	intersticial/ porção subtelomérica do braço heterocromático	Mampumbu 2002
<i>Melipona compressipes</i>	1	porção terminal do braço longo	Rocha et al 2002
<i>Nannotrigona punctata</i>	1	porção terminal do braço heterocromático	Godoy 2014
<i>Partamona helleri</i>	3 a 4	posição terminal do braço longo	Brito et al 2005
<i>Partamona seridoensis</i>	4	posição terminal do braço longo	Brito et al 2005
<i>Partamona</i> sp.	1	posição terminal do braço heterocromático	Godoy 2014
<i>Plebeia</i> sp.	1	par metacêntrico	Maffei et al 2001
<i>Sacaptotrigona bipunctata</i>	1	posição terminal do braço heterocromático	Godoy 2014
<i>Trigona truculenta</i>	4	intersticial/ porção subterminal do braço heterocromático	neste estudo
<i>Trigona hypogea</i>	2	intersticial/ porção subterminal do braço heterocromático	neste estudo
<i>Trigona pallens</i>	1	posição intersticial do braço heterocromático	neste estudo
<i>Trigona</i> sp. "fucipennis" grupo	2	intersticial/ porção subterminal do braço heterocromático	neste estudo
<i>Trigona spinipes</i>	4	intersticial/ porção subterminal do braço heterocromático	Ferreira et al 2015
<i>Trigona williana</i>	1	posição intersticial do braço heterocromático	neste estudo

Figura 1. Cariótipo das cinco espécies de *Trigona* segundo coloração convencional (a-e) e submentidos ao bandamento C (f-j). *Trigona pallens* (a-f), *T. williana* (b-g), *T. hypogea* (c-h), *Trigona* sp grupo “*fuscipennis*” (d-i) e *T. truculenta* (e-j). Morfologia dos cromossomos segundo Imai (1991): acrocêntrico totalmente eucromático (A^c), acrocêntrico (A), pseudoacrocentrico (A^m) e pseudoacrocêntrico com heterocromatina pericentromérica (A^{mc}). O asterisco (*) indicam regiões mais fortemente coradas pela banda C nas espécies *T. pallens* e *T. williana* em alguns pares A^m . As setas indicam a região centromérica dos cromossomos A^{mc} .



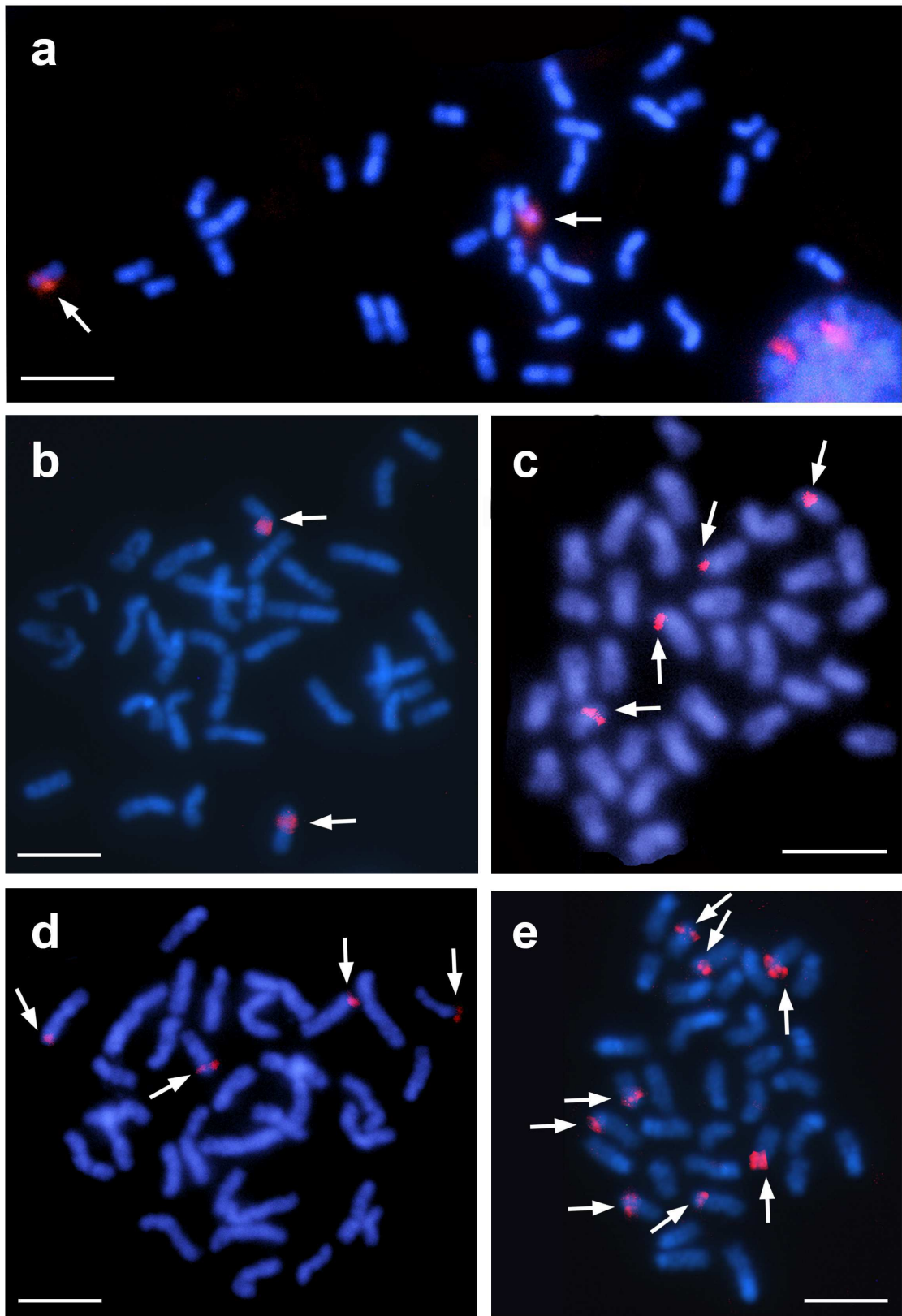


Figura 2. Mapeamento do DNA ribossomal 18S nas cinco espécies de *Trigona*: (a) *T. pallens* (b) *T. williana* (c) *T. hypogea* (d), *Trigona* sp grupo “*fuscipennis*”, (e) *T. truculenta*. Barras: 5 μ m.

CAPÍTULO 3: Heterocromatina, organização cromossomal do rDNA 18S e de sequência de DNA repetitivo: marcadores citogenéticos para o estudo de evolução cariotípica do gênero *Trigona* Jurine, 1807

Resumo

As propostas de filogenia molecular posicionam o gênero *Trigona* como grupo-irmão de *Cephalotrigona*, e separam as espécies de *Trigona* em dois grupos, A e B. As informações citogenéticas disponíveis para o gênero *Trigona* mostram um número diplóide constante ($2n=34$). Este estudo relacionou as características citogenéticas do gênero *Trigona* com as propostas de filogenia, buscando marcadores citogenético que permitissem inferir sobre a evolução cromossômica ocorridas do gênero. Foram medidas as quantidades de heterocromatina e mapeados o gene ribossomal 18S e sequência de DNA repetitivo $(GA)_{15}$ nas espécies de *Trigona*. As espécies do gênero compartilham um cromossomo acrocêntrico totalmente eucromático (A^e) e a distribuição do microssatélite $(GA)_{15}$ somente no braço maior do par A^e reforça a hipótese de homologia deste cromossomo entre elas. A quantidade de heterocromatina foi diferente entre os grupos, nas espécies do grupo A, a proporção de heterocromatina foi inferior a 30% ($\bar{x} = 24,27 \pm 1,62\%$) e no grupo B, os valores foram superiores a isso ($\bar{x} = 30,46 \pm 4,34\%$). O mapeamento do gene rDNA 18S mostrou variações na posição e no número de marcações (1 a 4 pares marcados). A comparação entre os marcadores citogenéticos avaliados entre os gêneros *Cephalotrigona* e os dois grupos de *Trigona* sugere um processo de eliminação da heterocromatina envolvendo as regiões NOR. Nas espécies que compõem o grupo A, esta hipótese é reforçada pela menor quantidade de heterocromatina e apenas um par portando a região NOR. Em contrapartida, as espécies incluídas no grupo B apresentam diferenças nas características citogenéticas (quantidades de heterocromatina, presença do cromossomo A^e e variações no número desse cromossomo entre populações e entre as espécies, variações no número e no posicionamento da região NOR) e, são mais semelhantes às características citogenéticas registradas para *Cephalotrigona*.

Introdução

Segundo Michener (2000), o gênero *Trigona lato sensu* é um dos maiores e mais amplamente distribuídos táxons de Meliponini. Baseado em caracteres morfológicos esse autor agrupa no gênero *Trigona s.l.* tanto as espécies da região Neotropical quanto as da região Indo-Malásia/Australiana.

Rasmussem e Cameron (2007) utilizando dados moleculares e ampliando o número de espécies amostradas na região Neotropical em seus trabalhos de filogenia, mostraram que *Trigona s.l.* não forma um grupo monofilético como sugerido por Michener (2000). Esses autores sugerem considerar como pertencente ao gênero *Trigona* apenas as espécies da região Neotropical, que corresponde a *Trigona stricto sensu* de Michener (2000). As propostas de filogenia molecular usando genes nucleares e mitocondriais posicionam o gênero *Trigona* como grupo-irmão de *Cephalotrigona* (Rasmusen et al 2010) e separam as espécies de *Trigona s.s* em dois grandes grupos que eles denominaram de A e B (Rasmusen e Camargo 2008).

Atualmente são reconhecidas 32 espécies para *Trigona s.s.* (Camargo e Pedro 2013). No Brasil, o gênero possui uma ampla distribuição abrangendo quase todo o território nacional (Silveira et al. 2002) e suas espécies compartilham entre outros caracteres morfológicos, a presença de mandíbula com quatro ou cinco dentes e uma área sedosa na porção interna do basitarso posterior (Michener, 2000; Silveira et al 2002).

Os estudos citogenéticos de várias espécies de abelhas da tribo Meliponini, na qual está inserido o gênero *Trigona*, apontam a fissão como o principal mecanismo atuante na evolução do cariótipo das espécies dessa tribo (Rocha et al 2003). As informações citogenéticas disponíveis para o gênero *Trigona* mostram um número

diplóide constante ($2n=34$) no gênero (Rocha et al 2003, Costa et al 2004, Ferreira et al 2015 capítulo 2), variação no número de cromossomos foi registrada apenas para *T. fulviventris*, $2n=32$ (Domingues et al. 2005). As espécies do gênero compartilham um cromossomo acrocêntrico totalmente eucromático (Costa et al 2004, Ferreira 2015 capítulo 2). Cromossomos com esta morfologia não foram mencionados em descrições citogenéticas em outros gêneros de abelhas da tribo Meliponini. Esse fato sugere uma homologia deste cromossomo no gênero *Trigona* (Costa et al 2004).

As técnicas de bandamento clássicas e a localização de genes ribossomais pela técnica de hibridação *in situ* fluorescente têm sido usadas como ferramenta para revelar rearranjos cromossômicos entre as espécies, para entendimento dos mecanismos de especiação e das relações filogenéticas em diversas ordens de insetos (Noor et al 2001, Brown et al 2004, Cabral-de-Melo et al 2010, Nguyen et al 2010, Menezes et al 2013).

Assim, este estudo relacionou as características citogenéticas encontradas no gênero *Trigona* com as propostas de filogenia, buscando marcadores citogenéticos que permitam inferir sobre a evolução cromossômica ocorrida neste gênero.

Material e Métodos

Neste estudo, foram reunidas informações sobre as características citogenéticas das espécies do gênero *Trigona* disponíveis na literatura (Tabela 1). Neste estudo foram incluídas ainda amostras das populações das espécies *T. recursa* e *T. hyalinata* (Tab. 1). Foram usados três parâmetros para avaliar a relação entre as espécies do gênero (i) distribuição e quantidade de heterocromatina, (ii) localização e número de marcações para o rDNA 18S e (iii) distribuição do microsatélite (GA)₁₅.

As espécies para as quais não existiam dados de Banda C, esta foi feita segundo Summer (1972) com modificações (Tab. 2). Para avaliar se a heterocromatina presente

nos cromossomo de *T. pallens* e *T. williana* apresentava constituição diferencial, como mencionado por Ferreira (2015, capítulo 2), alterações nos tempos de depurinação e hidrólise foram feitas na técnica de banda C (tabela 2).

A partir dos resultados de banda C, foi calculada a proporção de heterocromatina nos cromossomos das espécies. A quantidade de heterocromatina foi medida com o programa Image ProPlus®. Para isso, foi medida a área total de todos os cromossomos (C). O mesmo foi feito para a área ocupada pela heterocromatina (H) evidenciada pela técnica de banda C. Em seguida foi calculada a proporção de heterocromatina no cariótipo das espécies através da fórmula: $Ph = (H.C^{-1}) \cdot 100$, onde Ph representa a proporção ocupada pela heterocromatina, H a área ocupada pela heterocromatina em todos os cromossomos e C a área total de todos os cromossomos.

Para as análises estatísticas, os dados expressos em porcentagens foram transformados em raiz quadrada do arcosseno como sugerido por Zar (2010). Todos os dados foram testados quanto à normalidade pelo teste Kolmogorov-Smirnov. Foi realizado um Teste T para avaliar se quantidade de heterocromatina era diferente entre esses grupos A e B segundo divisão de Rasmussen e Camargo (2008). Para o teste foi adotado o nível de significância de 95% (Zar 2010).

Mapaeamento do *rDNA 18S*

As sondas das regiões de rDNA 18S foram obtidas por amplificação via PCR, utilizando-se os primers F(5'-GTCATATGCTTGTCTCAAAGA -3') e R(3'-TCTAATTTTTTCAAAGTAAACGC -5'), desenhados para a espécie de abelha *Melipona quinquefasciata* (Pereira 2006). As sondas de rDNA 18S foram marcadas utilizando-se digoxigenin-11-dUTP (Roche, Mannheim, Germany) durante a

amplificação. A reação de PCR foi realizada de acordo com Ferreira (2015 capítulo 1) nas condições de amplificação propostas por Pereira (2006).

Os procedimentos da FISH (Hibridização *in situ* fluorescente) foram realizados de acordo com Pinkel et al (1986). Para a detecção do sinal, o material foi incubado com anti-digoxigenina-rodamina (Roche, Mennheim Germany). Ao final as lâminas foram montadas com Antifading contendo DAPI (Fluoroshield com DAPI- SIGMA F6057). Foram analisadas, em média, 15 metáfases por lâmina em um fotomicroscópio de epifluorescência OLYMPUS BX-53 e software CellSens Dimensions.

Microsatélites

Foi usada a sonda de di-oligonucleotídeo (GA)₁₅. A sonda do microsatélite foi marcado com Cy3 na extremidade 5' durante sua síntese pela VBC Biotech (Vienna, Austria). Ao final as lâminas foram montadas com Antifading contendo DAPI (Fluoroshield com DAPI- SIGMA F6057). No mínimo de 15 metáfases foram observadas usando um microscópio Olympus BX 53F equipados com filtros WU (330-385nm) para DAPI e WG (510-550nm) para Cy3 com câmera monocromática e software CellSens Dimensions.

Resultados

O número diplóide foi constante entre as espécies do gênero, $2n=34$. As fórmulas cariotípicas obtidas nas espécies contempladas neste estudo e literatura estão descritas na tabela 1. As espécies *T. hyalinata* e *T. recursa* avaliadas neste estudo apresentaram diferenças em relação aos dados de literatura (Tab. 1). *T. hyalinata* não apresentou cromossomos eucromáticos (Fig 1 a) os quais foram registrados na maioria

das espécies de *Trigona* avaliadas até momento. *T. recursa* apresentou dois cromossomos acrocêntricos totalmente eucromáticos, A^e , e dois pares de cromossomos pseudoacrocêntricos com heterocromatina pericentromérica, A^{mc} (fig. 1b).

As principais morfologias cromossômicas encontradas nas espécies foram acrocêntricos (A), acrocêntricos totalmente eucromáticos (A^e), pseudoacrocêntricos (A^m), pseudoacrocêntricos com heterocromatina pericentromérica (A^{mc}), metacêntricos (M), metacêntricos totalmente heterocromático (M^h). Os principais tipos cromossômicos foram do grupo acrocêntricos (A^m , A, A^{mc} e A^e) e representaram 93% das morfologias encontradas, 7% são representados por cromossomos do grupo dos metacêntricos (M). Os cromossomos do tipo A^m (72%) e A (15%) são os mais frequentes entre as espécies de *Trigona*. Cromossomos A^e (4%) foram observados na maioria das espécies do gênero excetuando nas espécies *Trigona* sp. grupo “*fuscipennis*”, *T. hypogea* (Ferreira 2015 capítulo 2) e *T. hyalinata* deste estudo.

As espécies *T. pallens* e *T. williana* apresentaram padrões diferentes de heterocromatina revelados pela técnica de bandamento C quando esta foi feita utilizando-se tempos diferentes em cada etapa (Tabela 2, Fig. 2). Tempos maiores nas etapas de depuração e hidrólise deste DNA depurinado revelaram marcações mais fortes em apenas alguns cromossomos e também na região centromérica. (Fig 2b-c,e-f), não sendo visto o padrão de cromossomos pseudoacrocêntricos comumente encontrados. Nas demais espécies estudadas, mudanças nos tempos nessas etapas da técnica de banda C não revelaram diferenças na heterocromatina (Fig 2 a,d).

Considerando a proposta filogenética sugerida por Rasmusen e Camargo (2008), as espécies analisadas no presente trabalho foram agrupadas da seguinte forma: no grupo A, as espécies *T. chachamayoensis*, *T. williana*, *T. pallens* e *T. fulfiventris*, e no grupo B as espécies *T. recursa*, *T. hypogea*, *T. branneri*, *T. spinipes*, *T. hyalinata*, *T. sp.*

grupo “*fuscipennis*” e *T. truculenta*. No grupo A os valores de heterocromatina foram inferiores a 30% ($\bar{x} = 24,27 \pm 1,62\%$) e no grupo B, os valores foram superiores a isso ($\bar{x} = 30,46 \pm 4,34\%$). Pelo teste T esses dois grupos são significativamente diferentes em relação à quantidade de heterocromatina ($t = -2,73$; $df = 13$; $p < 0,05$).

O mapeamento do gene rDNA 18S mostrou variações na posição e no número de marcações. As espécies *T. pallens* e *T. williana* apresentaram marcações na região intersticial do braço curto em apenas um par de cromossomos (Fig. 3 a, b). *T. hypogea* e *Trigona* sp grupo “*fuscipennis*” tiveram dois pares marcados, sendo um par na região intersticial e outro par na região subterminal (Fig. 3c-d). Nas espécies *T. recursa* e *T. hyalinata* o gene rDNA 18S foi mapeado em três pares, sendo um par na região intersticial e em dois pares na região subteloamérica do braço heterocromático (Fig. 3e-f). Em *T. spinipes* foram marcados um par na região intersticial e três pares na região subterminal (Fig 3g). A espécie *T. truculenta* apresentou quatro pares marcados sendo dois na região intersticial e dois na região subterminal (Fig 3h).

De modo geral, nas espécies o sinal produzido pela sonda (GA)₁₅ foi observado, preferencialmente, em regiões eucromáticas (Fig 4), sendo distribuído da seguinte forma: (i) no braço maior do par cromossômico eucromático (A^e), (ii) no braço eucromático de todos os cromossomos pseudoacrocêntricos (A^m) e, (iii) disperso no braço heterocromático de *T. pallens* dos pares 3, 8 e 9 (Figura 4a). *T. hypogea* não apresentou marcações para a sonda (GA)₁₅.

Discussão

Avaliação das características citogenéticas

As diferentes espécies do gênero *Trigona* apresentam o mesmo número cromossômico ($2n = 34$), com uma única exceção sendo observada em *Trigona*

fulviventris (Domingues et al 2005). O padrão de distribuição do microssatélite (GA)₁₅ foi semelhante na maioria das espécies e mostrou-se mais efetivo para separar populações como em *Trigona spinipes* (Ferreira 2015 capítulo 1) que as espécies do mesmo gênero. Resultados similares foram vistos em peixes da família Bagridae em que o microssatélite (GA)₁₅ foi mapeado nas regiões teloméricas dos cromossomos das nove espécies do mesmo gênero avaliadas no trabalho (Supiwong et al 2014). Uma diferença marcante foi vista em *T. hypogea*, em que não foi observada nenhuma marcação, o que pode refletir um caminho evolutivo diferente das outras espécies do gênero.

A quantidade de heterocromatina foi significativamente diferente entre os grupos das espécies de *Trigona*, se mostrando um bom parâmetro para comparação entre as espécies do gênero. Em abelhas do gênero *Melipona*, este mesmo parâmetro foi usado para separar as espécies em dois grupos, um com alto e outro com baixo conteúdo de heterocromatina (Rocha e Pompolo 1998, Rocha et al 2002).

Nas espécies *T. williana* e *T. pallens* o braço heterocromático parece ter uma composição diferenciada, dado as alterações observadas na heterocromatina e dispersão da sonda (GA)₁₅ nessa região em alguns pares cromossômicos de *T. pallens*. Outra espécie *T. fulviventris*, pertencente ao grupo-irmão de *T. pallens* (Rasmussen e Camargo 2008), também apresenta o braço heterocromático mais fortemente marcado pela banda C em um par de cromossomos (Domingues et al 2005). Braços heterocromáticos apresentando coloração diferencial foram observados no gênero *Partamona* (Miranda 2012). Uma hipótese para explicar essa diferença no braço heterocromático seria uma matriz menos compacta da heterocromatina nesse braço devido à interação entre as lisinas metiladas de suas histonas (Grewal and Jia 2007), o que poderia estar acontecendo nesse grupo em *Trigona*. Outra hipótese seria que a inativação dessa região com a formação de heterocromatina, nas duas espécies avaliadas, essa nova

heterocromatina que estaria se formando seria mais sensível à variações nas etapas da técnica de Banda C.

Uma característica marcante entre as espécies de *Trigona* aqui avaliadas foi a presença de um cromossomo acrocêntrico totalmente eucromático (A^c). Essa morfologia não foi mencionada em nenhuma outra espécie de Meliponini (Rocha et al 2003, Miranda et al 2013). Além disso, Costa et al (2004) sugerem uma homologia deste cromossomo entre as espécies de *Trigona*, o que torna esse cromossomo um potencial marcador citogenético para o gênero. A distribuição do microssatélite (GA)₁₅ somente no braço maior do par A^c em todas as espécies aqui avaliadas reforça a hipótese de homologia deste cromossomo no gênero *Trigona*.

O número de pares portando o rDNA 18S variou entre as espécies avaliadas. Por outro lado, polimorfismos deste gene não foram observados entre as populações de *T. spinipes* (Ferreira 2015 capítulo 1). Em Orthoptera, espécies do gênero *Poecilimon* e *Rhammatocerus* apresentam variação interespecífica nos loci de rDNA 18S (Loreto et al 2008, Grzywacz et al 2014), contudo, em espécies do gênero *Isophya* da mesma tribo, foram observadas variações intraespecíficas desse gene ribossomal (Grzywacz et al 2011). O mapeamento de genes ribossomais em diferentes organismos pode revelar variações entre populações ou entre espécies. No gênero *Trigona*, análises populacionais usando o mapeamento do rDNA não revelou polimorfismos, porém o mapeamento desse gene se mostrou mais promissor em comparações entre as espécies do gênero ao mostrar variações numéricas e no seu posicionamento nos braços cromossômicos.

A localização do gene rDNA 18S próximo às regiões de heterocromatina em *Trigona* assim como em outras ordens de insetos sugerem que a ação de elementos transponíveis ou a recombinação ectópica nessas regiões de heterocromatina poderiam

explicar o espalhamento dos loci rDNA sem alteração do número cromossômico (Nguyen et al 2010, Cabral-de-Melo 2011, Grzywacz et al 2014).

Marcadores citogenéticos e filogenia molecular

Considerando a proposta de filogenia molecular para o gênero *Trigona* (Rasmussen e Camargo 2008), as espécies analisadas no presente trabalho foram agrupadas da seguinte forma: no grupo A, as espécies *T. chachamayoensis*, *T. williana*, *T. pallens* e *T. fulviventris*, e no grupo B as espécies *T. recursa*, *T. hypogea*, *T. branneri*, *T. spinipes*, *T. hyalinata*, *Trigona sp* grupo *fuscipennis* e *T. truculenta*. Esses dois grupos foram comparados em relação às variações na quantidade de heterocromatina, ao cromossomo A^e e localização do rDNA 18S.

A proposta filogenética molecular sugerida para as abelhas da tribo Meliponini coloca o gênero *Cephalotrigona* como grupo-irmão de *Trigona* (Rasmussen e Cameron 2010). As espécies de *Cephalotrigona* descritas citogeneticamente apresentam número cromossômico $2n=34$, assim como a maioria das espécies de *Trigona*. Nas descrições citogenéticas do gênero *Trigona*, cromossomos do tipo A^e foram encontrados na maioria das espécies e em *Cephalotrigona* essa morfologia não foi registrada. Em *Cephalotrigona femorata* e em *Cephalotrigona capitata* foram observadas três marcações CMA₃⁺ (Miranda et al 2013, Rocha et al 2003) essas marcações correspondem a regiões organizadoras de nucléolo (NOR) em abelhas (Brito et al 1997, Maffei et al 2001).

Uma comparação entre *Cephalotrigona* e os dois grupos de *Trigona* sugere a ocorrência de eliminação da heterocromatina, sendo esse processo mais acentuado no grupo A que no grupo B, tal evento provavelmente ocorreu durante a separação desses dois grandes grupos envolvendo perdas de heterocromatina nas regiões NOR. Nas

espécies que compõem o grupo A, esta hipótese é reforçada pela menor quantidade de heterocromatina e apenas um par cromossômico portando a região NOR. Em contrapartida, as espécies incluídas no grupo B são mais polimórficas (quantidade de heterocromatina, presença do cromossomo A^e e variações no número desse cromossomo entre populações e entre as espécies, variações no número e no posicionamento da região NOR) e apresentam características citogenéticas mais próximas de *Cephalotrigona*.

Contudo, o evento que levou a eliminação da heterocromatina pode ter ocorrido bem no início da separação dos dois grupos de *Trigona* e nas espécies do grupo A, um ciclo de heterocromatinização pode estar ocorrendo. Um evidência que reforça essa hipótese seria a coloração diferencial dos braços heterocromáticos revelada pela técnica de Banda C e dispersão da sonda (GA)15 nessa região em alguns pares cromossômicos. Baseando-se nessas evidências, as alterações morfológicas proposta pela Teoria da Interação Mínima (Imai et al 1988) para explicar o crescimento de heterocromatina em Meliponini (Rocha et al 2003) pode representar processos mais dinâmicos e rápidos na história evolutiva dos grupos de *Trigona*.

Referências Bibliográficas

Brito, R.M., Pompolo, S.G. (1997). C:G patterns and fluorochrome staining with DAPI and CMA3, in *Trigona spinipes* (Jurine, 1807) (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Braz J Genet* 20:62.

Brown, K. M., Burk, L. M., Henagan, L. M., Noor, M. A. (2004). A test of the chromosomal rearrangement model of speciation in *Drosophila pseudoobscura*. *Evolution*, 58(8), 1856-1860.

Cabral-de-Mello, D. C., de Moura, R. D. C., de Souza Melo, A., & Martins, C. (2011a). Evolutionary dynamics of heterochromatin in the genome of *Dichotomius* beetles based on chromosomal analysis. *Genetica*, 139(3), 315-325.

Cabral-de-Mello, D. C., Oliveira, S. G., de Moura, R. C., Martins, C. (2011b). Chromosomal organization of the 18S and 5S rRNAs and histone H3 genes in

Scarabaeinae coleopterans: insights into the evolutionary dynamics of multigene families and heterochromatin. *BMC genetics*, 12(1), 88.

Camargo J.M.F., Pedro, S.R.M. (2013). Meliponini Lepeletier, 1836. In Moure, J. S., Urban, D., Melo, G. A. R. (Orgs). Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region [versão online]. <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. (Acesso em 04 Julho 14)

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.

Domingues, A. M. T., Waldschmidt, A. M., Andrade, S. E., Andrade-Souza, V., Alves, R. M. D. O., Silva Junior, J. C. D., Costa, M. A. (2005). Karyotype characterization of *Trigona fulviventris* Guérin, 1835 (Hymenoptera, Meliponini) by C banding and fluorochrome staining: Report of a new chromosome number in the genus. *Genetics and Molecular Biology*, 28(3), 390-393.

Fernandes, A., Barth, A., Sampaio, W. S. (2013). Caracterização citogenética da espécie *Trigonachanchamayoensis* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) encontrada no cerrado brasileiro. *Evolução e Conservação da Biodiversidade*, 4(2), 63-67.

Ferreira R. (2015). Análise citogenética de abelhas do gênero *Trigona* Jurine, 1807 (Hymenoptera: Meliponini). *Doctor Scientiae dissertation, UFV. Viçosa. Brazil*.

Grewal, S. and Jia, S. (2007) Heterochromatin revisited. *Nature*, 8 (1) 35-46.

Grzywacz, B., Chobanov, D. P., Maryńska-Nadachowska, A., Karamysheva, T. V., Heller, K. G., Warchałowska-Śliwa, E. (2014). A comparative study of genome organization and inferences for the systematics of two large bushcricket genera of the tribe Barbitistini (Orthoptera: Tettigoniidae: Phaneropterinae). *BMC evolutionary biology*, 14 (1), 48.

Grzywacz, B., Maryńska-Nadachowska, A. N. N. A., Chobanov, D. P., Karamysheva, T., Warchałowska-Śliwa, E. (2011). Comparative analysis of the location of rDNA in the Palaearctic bushcricket genus *Isophya* (Orthoptera: Tettigoniidae: Phaneropterinae). *European Journal of Entomology*, 108(4), 509.

Hoshihara, H., Imai, H. (1993). Chromosome evolution of bees and wasps (Hymenoptera, Apocrita) on the basis of C-banding pattern analyses. *Japanese Journal of Genetics*, 61(3), 465-492.

Imai, H. T. (1991). Mutability of constitutive heterochromatin (C-bands) during eukaryotic chromosomal evolution and their cytological meaning. *Japanese Journal of Genetics*, 66(5), 635-661.

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 Genetics*, 63(2), 159-185.

- Loreto, V., Cabrero, J., López-León, M. D., Camacho, J. P. M., de Souza, M. J. (2008). Comparative analysis of rDNA location in five Neotropical gomphocerine grasshopper species. *Genetica*, 132(1), 95-101.
- Maffei, E. M. D., Pompolo, S. D. G., Oliveira Campos, L. A., Petitpierre, E. (2001). Sequential FISH Analysis with rDNA Genes and AgNOR Banding in the Lady Beetle *Olla v nigrum* (Coleoptera: Coccinellidae). *Hereditas*, 135(1), 13-18.
- Menezes R.S.T., Silva T.M., Carvalho A.F., Andrade-Souza V., Silva J.G. and Costa M.A. 2013. Numerical and structural chromosome variation in the swarm-founding wasp *Metapolybia decorata* Gribodo 1896 (Hymenoptera, Vespidae). *Genetica* 141: 273–280.
- Michener, C. D. (2000). *The bees of the world* (Vol. 1). JHU Press.
- 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), 125-127.
- Nguyen, P., Sahara, K., Yoshido, A., Marec, F. (2010). Evolutionary dynamics of rDNA clusters on chromosomes of moths and butterflies (Lepidoptera). *Genetica*, 138(3), 343-354.
- Noor, M. A., Grams, K. L., Bertucci, L. A., Reiland, J. (2001). Chromosomal inversions and the reproductive isolation of species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(21), 12084-12088.
- Praça-Fontes, M. M., Fernandes, A., Werneck H., Campos, L.A.O., Drummond, M., Lopes, D. M. (2010) Contribuição ao estudo citogenético de espécies do gênero *Trigona* (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). In: Anais do IX Encontro sobre Abelhas. Ribeirão Preto.
- Rasmussen, C., & Cameron, S. A. (2007). A molecular phylogeny of the Old World stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) and the non-monophyly of the large genus *Trigona*. *Systematic Entomology*, 32(1), 26-39.
- Rasmussen, C., Camargo, J. M. (2008). A molecular phylogeny and the evolution of nest architecture and behavior in *Trigona* species (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Apidologie*, 39(1), 102-118.
- 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. D. G. (1998). Karyotypes and heterochromatin variation (C-bands) in *Melipona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Genetics and Molecular Biology*, 21(1).

Rocha, M. P., Pompolo, S. D. G., Dergam, J. A., Fernandes, A., Campos, L. A. D. O. (2002). DNA characterization and karyotypic evolution in the bee genus *Melipona* (Hymenoptera, Meliponini). *Hereditas*, 136(1), 19-27.

Rocha, M. P., Pompolo, S., Campos, L. A. O., Melo, G. A. R., Santos, I. A. (2003). Citogenética da tribo Meliponini (Hymenoptera, Apidae). *Apoidea Neotropica: homenagem aos*, 90, 311-320.

Silveira, F. A., Melo, G. A., Almeida, E. A. (2002). *Abelhas brasileiras: sistemática e identificação* (p. 253). Belo Horizonte (MG, Brazil): Fernando A. Silveira

Sumner, A. T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental cell research*, 75(1), 304-306.

Supiwong, W., Liehr, T., Cioffi, M. B., Chaveerach, A., Kosyakova, N., Pinthong, K., Tanomtong, A. (2014). Chromosomal evolution in naked catfishes (Bagridae, Siluriformes): A comparative chromosome mapping study. *Zoologischer Anzeiger*, 253(4), 316-320.

Zar, J.H. (2010) *Biostatistical analysis*. Prentice-Hall, New Jersey

Tabela 1. Descrição das fórmulas cariotípicas, medidas de quantidade de heterocromantina e número de regiões organizadoras de nucléolo (NOR) nas espécies do gênero *Trigona*.

Espécies	Clados*	2n	Morfologia cromossômicas						Localidades	Referência
			A	A ^e	A ^m	A ^{mc}	M	M ^{ht}		
<i>T. chanchamayosensis</i>	A	34	18	2	12	-	-	2	Cuiabá, MT	Costa et al 2004
<i>T. chanchamayosensis</i> **	A	34	-	-	-	-	-	-	Tangará da Serra, MT	Fernandes et al 2013
<i>T. fulviventris</i>	A	32	2	2	26	-	2	-	Pedra Branca, BA	Domingues et al 2005
<i>T. pallens</i>	A	34	-	2	32	-	-	-	Altamira, PA	neste estudo
<i>T. pallens</i> **	A	34	-	-	-	-	-	-	Urbano Santos/MA	Praça-Fontes et al 2010
<i>T. williana</i>	A	34	2	2	30	-	-	-	Altamira, PA	neste estudo
<i>T. branneri</i>	B	34	14	2	16	-	-	2	Cuiabá, MT	Costa et al 2004
<i>T. hyalinata</i>	B	34	4	2	28	-	-	-	Cuiabá, MT	Costa et al 2004
<i>T. hypogea</i>	B	34	6	-	20	8	-	-	Altamira, PA	neste estudo
<i>T. recursa</i> **	B	34	4	-	30	-	-	-	Luislândia, MG	Rocha et al 2003
<i>T. recursa</i>	B	34	12	2	18	-	-	2	Cuiabá, MT	Costa et al 2004
<i>T. spinipes</i> **	B	34	6	-	28	-	-	-	Viçosa, MG	Rocha et al 2003
<i>T. truculenta</i>	B	34	-	4	24	6	-	-	Altamira, PA	neste estudo
<i>T. aff fuscipennis</i> **	B	34	4	-	30	-	-	-	Cônego Marinho, MG	Rocha et al 2003
<i>Trigona hyalinata</i>	B	34	4	-	30	-	-	-	Palotina PR, Januária. MG	neste estudo
<i>Trigona recursa</i>	B	34	2	2	30	-	-	-	Lontra MG, Januária MG	neste estudo
<i>Trigona</i> sp grupo " <i>fuscipennis</i> "	B	34	4	-	30	-	-	-	Florestal, MG	neste estudo
<i>Trigona spinipes</i>	B	34	6	2	26	-	-	-	várias (MG, PR, SP)	Ferreira 2015 cap 1
<i>Trigona spinipes</i> **	B	34	-	2	-	-	32	-	Viçosa, MG	Brito e Pompolo 1997

(*) Segundo Rasmusen e Camargo (2008). (**) figura com técnica de banda C não disponível.

Tabela 1. Cont.

Espécies	Clados*	Quantidade de heterocromatina (%)	Regiões organizadoras de núcleo (rDNA ou CMA3 ⁺)	Referência
<i>T. chanchamayosensis</i>	A	26,40	1	Costa et al 2004
<i>T. chanchamayosensis</i> **	A	-	1	Fernandes et al 2013
<i>T. fulviventris</i>	A	22,58	1	Domingues et al 2005
<i>T. pallens</i>	A	24,50	1	neste estudo
<i>T. pallens</i> **	A	-	-	Praça-Fontes et al 2010
<i>T. williana</i>	A	23,60	1	neste estudo
<i>T. branneri</i>	B	23,96	4	Costa et al 2004
<i>T. hyalinata</i>	B	32,40	-	Costa et al 2004
<i>T. hypogea</i>	B	36,46	2	neste estudo
<i>T. recursa</i>	B	-	-	Rocha et al 2003
<i>T. recursa</i>	B	29,20	-	Costa et al 2004
<i>T. spinipes</i>	B	-	-	Rocha et al 2003
<i>T. truculenta</i>	B	30,54	4	neste estudo
<i>T. aff fuscipennis</i>	B	-	-	Rocha et al 2003
<i>Trigona hyalinata</i>	B	28,30/ 29,00	3	neste estudo
<i>Trigona recursa</i>	B	25,50/ 27,80	3	neste estudo
<i>Trigona</i> sp grupo " <i>fuscipennis</i> "	B	37,60	2	neste estudo
<i>Trigona spinipe</i>	B	34,40	4	Ferreira 2015 cap 1
<i>Trigona spinipes</i> **	B	-	4	Brito e Pompolo 1997

(*) Segundo Rasmusen e Camargo (2008). (**) figura com técnica de banda C não disponível.

Tabela 2. Descrição dos tempos usados na técnica de banda-C*.

Etapas da técnica de Banda C	Atuação	Tempos 1	Tempos 2
Tratamento com ácido diluído (HCl 0,2M)	depuração do DNA	6 min	7 min
Tratamento com hidróxido de bário Ba(OH) ₂	hidrólise do DNA depurinado	14 min	14 min 30s
Lavagem em solução salina (2X SSC)	extração do DNA hidrolisado	2 min	2 min

*Etapas da técnica de bandamento C segundo Sumner (1972).

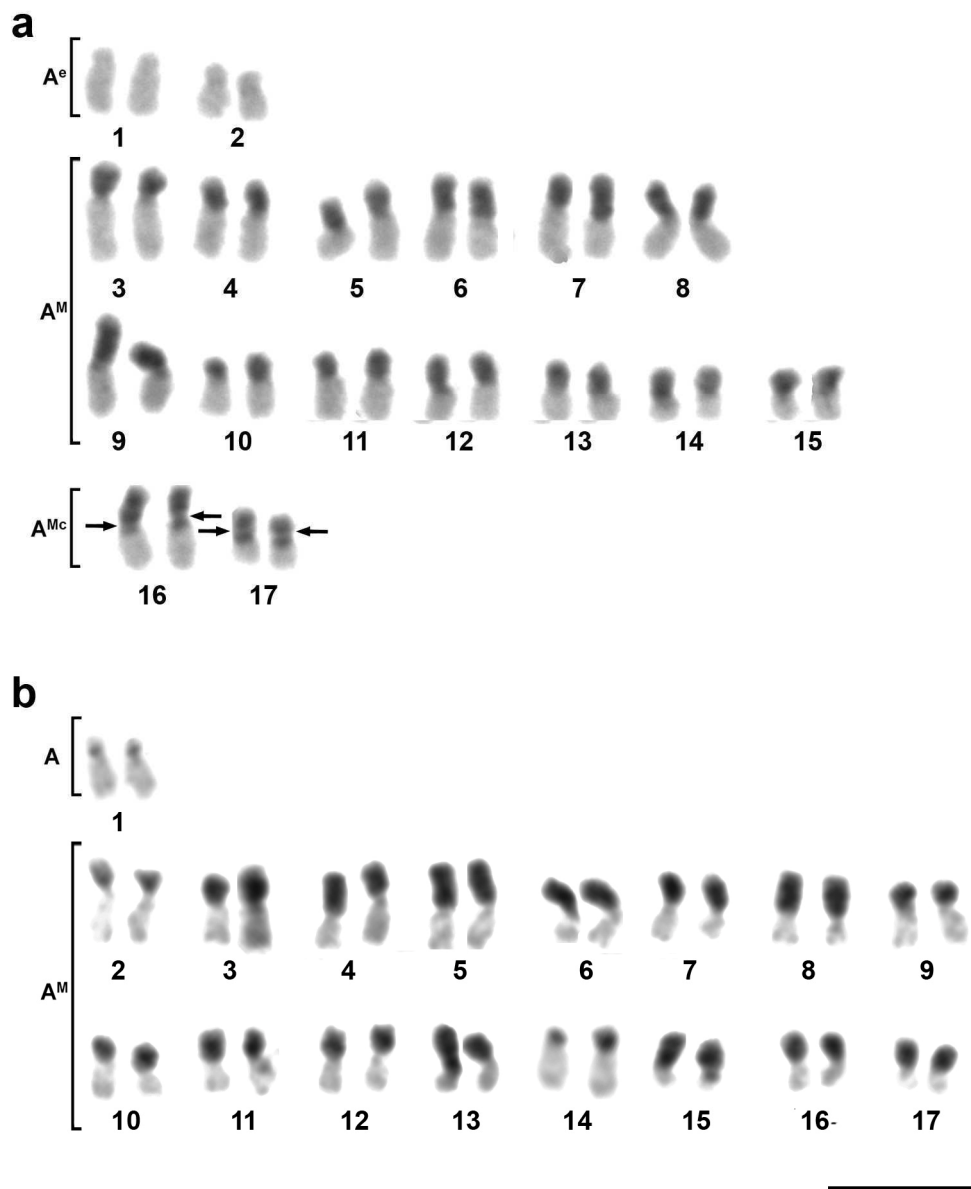


Figura 1. Cariótipo de *Trigona recursa* (a) e *T. hyalinata* (b) submetidos ao bandamento C. Escala: 5 μ m. Morfologia dos cromossomos segundo Imai (1991): acrocêntrico totalmente eucromático (A^e), acrocêntrico (A), pseudoacrocêntrico (A^m) e pseudoacrocêntrico com heterocromatina pericentromérica (A^{mc}). As setas indicam a região centromérica dos cromossomos A^{mc} .

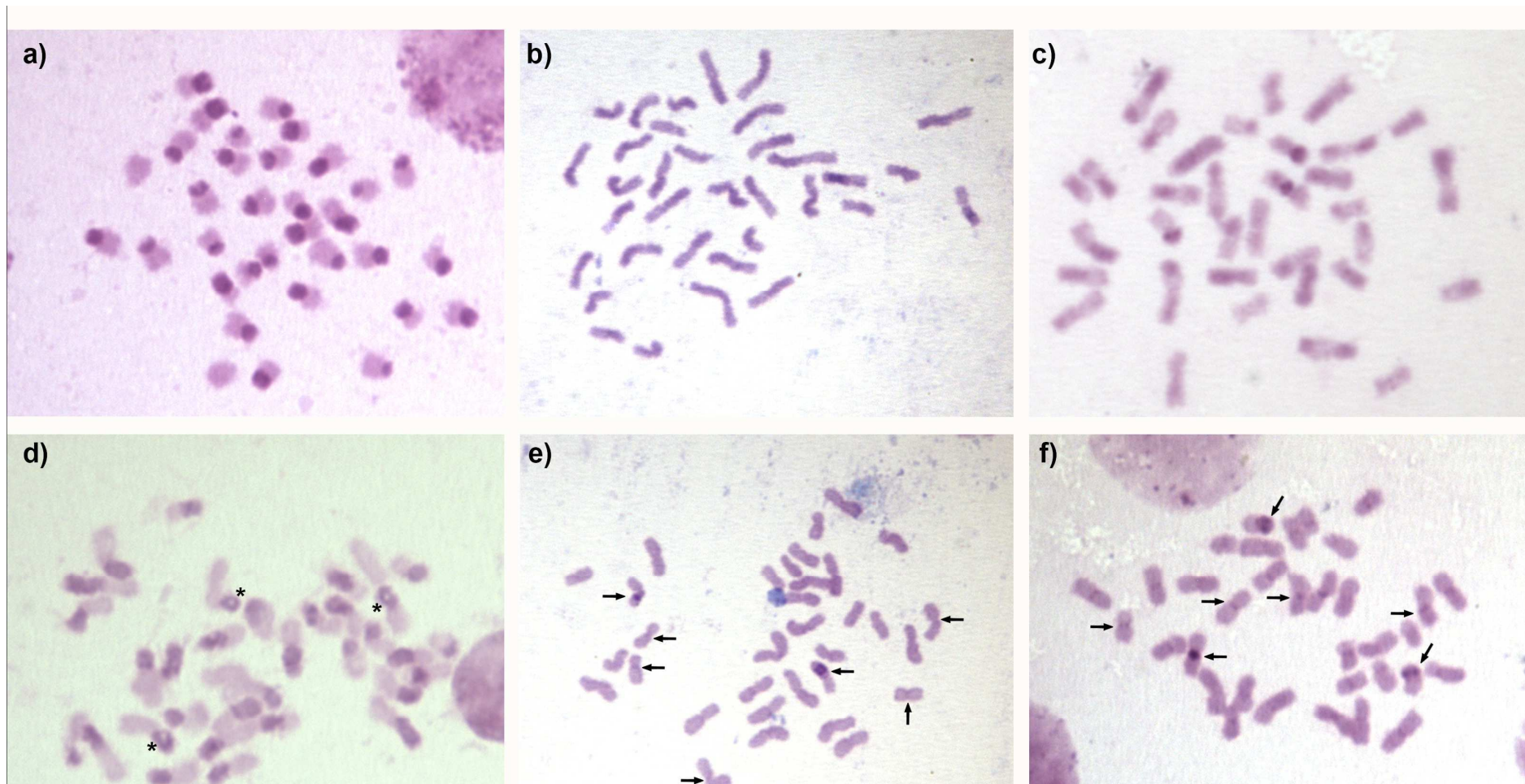


Figura 2. Métafasas de três espécies de *Trigona* submetidas à técnica de banda C nos tratamentos 1 (a-c) e tratamento 2 (d-f). *T. spinipes* (a,d), *Trigona pallens* (b,e), *T. williana* (c,f). (*) indicam locais de degradação na heterocromatina no tratamento com aumento nos tempos de depurinação e hidrólise. Setas indicam bandas mais fortes após aumentos nos tempos de depurinação e hidrólise (Tratamento 2).

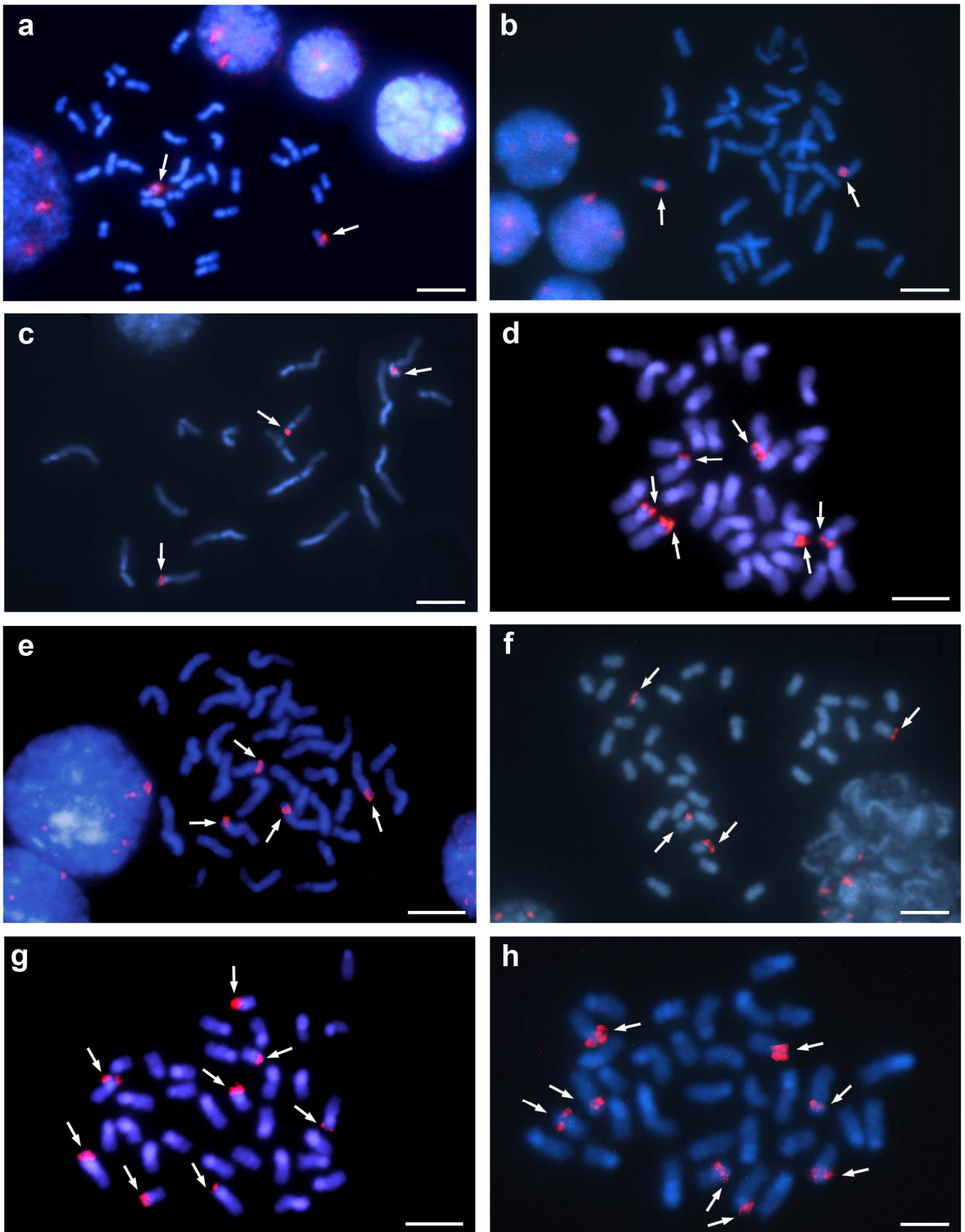


Figura 3. Mapeamento do DNA ribossomal 18S nas oito espécies de *Trigona*: (a) *T. pallens* (b) *T. williana* (c) *T. recursa* (d) *T. hyalinata*, (e) *Trigona* sp. grupo “*fuscipennis*”, (f) *T. hypogea*, (g) *T. spininipes*, (h) *T. truculenta*. Escala: 5µm.

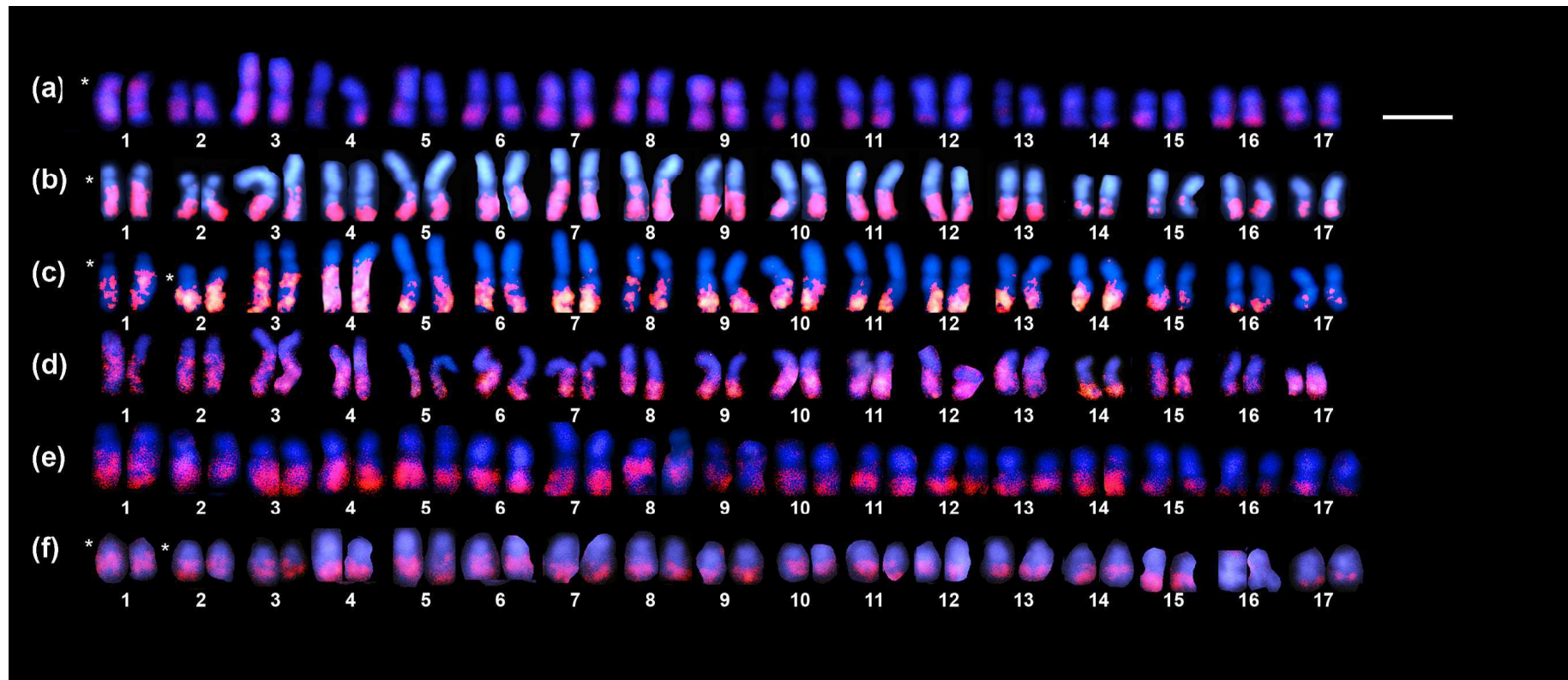


Figura 4. Mapeamento do DNA repetitivo $(GA)_{15}$ nas seis espécies de *Trigona*: (a) *T. pallens* (b) *T. williana* (c) *T. recursa* (d), *Trigona* sp. grupo “*fuscipennis*”, (e) *T. hyalinata* (f) *T. truculenta*. (*) Cromossomos acrocêntricos totalmente euromáticos, A^c. Escala: 5µm.

CONCLUSÃO GERAL

As informações obtidas neste estudo:

- Reforçam a homogeneidade no número diplóide entre as espécies do gênero *Trigona*, e permite diferenciá-las quanto a suas características citogenéticas (morfologia dos cromossomos, qualidade de heterocromatina, presença/ausência de cromossomos acrocêntricos eucromáticos, localização do rDNA 18S);
- Em relação aos marcadores citogenéticos, o microssatélite (GA)₁₅ mostrou-se mais efetivo para separar populações que as espécies do mesmo gênero. Em contrapartida a localização do rDNA 18S foi mais variável entre as espécies,
- Demonstram a importância de se usar técnicas de citogenética molecular em estudos populacionais de espécies que apresentam baixo polimorfismo cromossômico como é o caso das abelhas da tribo Meliponini.