

DENISE DE CASTRO GODOY

**CARACTERIZAÇÃO CARIOTÍPICA DE CINCO ESPÉCIES DE MELIPONINI DA
REGIÃO AMAZÔNICA**

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

VIÇOSA - MINAS GERAIS

2014

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

T

G588c
2014

Godoy, Denise de Castro, 1984-

Caracterização cariotípica de cinco espécies de Meliponini da Região Amazônica / Denise de Castro Godoy. – Viçosa, MG, 2014.

vi, 47f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Denilce Meneses Lopes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.42-47.

1. Abelhas - Citogenética. 2. Meliponini. 3. *Scaptotrigona bipunctata*. 4. *Nannotrigona punctata*. 5. Amazônia.

I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

CDD 22. ed. 595.799098113

DENISE DE CASTRO GODOY

**CARACTERIZAÇÃO CARIOTÍPICA DE CINCO ESPÉCIES DE MELIPONINI DA
REGIÃO AMAZÔNICA**

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

APROVADA: 18 de julho de 2014.

Ana Maria Waldschmidt

Tânia Maria Fernandes Salomão

Denilce Meneses Lopes
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

À UFV e os órgãos financiadores (Capes, CNPq e Fapemig) pelos recursos fornecidos para a realização desse trabalho.

Ao programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal.

À Prof^a. Denilce Meneses Lopes pela orientação e apoio durante todos esses anos.

À Prof^a. Silvia das Graças Pompolo por me acolher no Laboratório de Citogenética de Insetos.

Ao Prof. Lúcio Antônio de Oliveira Campos pelos ensinamentos que foram muito além de conhecimentos científicos.

Aos colegas de laboratório pela convivência e aprendizados. À Renata sempre disposta a ajudar.

Aos amigos do apiário, pelo refúgio oferecido, pelo companheirismo e pelo ambiente agradável que aliviaram um pouco os momentos de tensão.

À minha mãe, que mesmo que eu duvide do meu futuro e de minha capacidade sempre esteve ao meu lado dando forças e fazendo tudo que lhe fosse possível para que eu concluísse essa etapa da minha vida.

Ao meu irmão e a Ana, pelo companheirismo e apoio incondicional e por terem contribuído para a minha formação como pessoa.

Aos meus tios Maria do Carmo e Waldemar por me acolherem como filha.

Aos meus amigos, que sempre foram minha segunda família e que mesmo distantes continuam parte extremamente importante na minha vida.

À Camila, por tantos anos de amizade e por mostrar que irmãos vão muito além de laços genéticos.

Ao Ríudo Paiva, reconhecido no Guarujá como o melhor citogeneticista do Brasil, que com sua alma de poeta sempre consegue transformar situações banais em cenas de novela. Pela amizade e pela ajuda e apoio em todos os momentos desse trabalho.

À Kiki, pelo carinho e amizade profundos e incondicionais e por estar sempre ao meu lado, fazendo de tudo para tornar meus dias melhores e ao Morfeu, por me mostrar que gatos também podem ser cachorros.

À juventude de Viçosa, Kiki e Ramon, por mostrar que afinidades acontecem e por se tornarem, do dia para a noite pessoas indispensáveis na minha vida, Talitta pela amizade, pelo carinho e por sempre me manter com os pés no chão, Camila, Maira e Paula, pela amizade recente e promissora.

Aos meus amigos da época da graduação que mesmo distantes continuam parte extremamente importante na minha vida e que agora espalham suas juventudes pelo Brasil.

Aos meus cachorros, por me amarem incondicionalmente.

Às muitas abelhas que perderam suas vidas em nome da ciência.

E a todos que, de alguma forma, contribuíram para que este dia chegasse.

RESUMO

GODOY, Denise de Castro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho, 2014.
Caracterização cariotípica de cinco espécies de Meliponini da Região Amazônica. Orientador: Denilce Meneses Lopes.

A Amazônia abriga a maior floresta tropical do mundo e concentra uma enorme diversidade de plantas e animais, sendo muitas endêmicas. A construção de hidrelétricas, o desmatamento e o avanço da fronteira agrícola tem representado ameaças à biodiversidade local. As abelhas são muito sensíveis a perturbações ambientais e, portanto, demandam um esforço específico de preservação. Os Meliponini constituem uma tribo da família Apidae amplamente distribuída nas regiões tropicais e subtropicais do hemisfério sul. Neste trabalho foram estudadas citogeneticamente cinco espécies, pertencentes a quatro gêneros de Meliponini, coletadas na Amazônia: *Nannotrigona punctata*, *Scaptotrigona bipunctata*, *Partamona* sp, *Frieseomelitta* sp1 e *Frieseomelitta* sp2 através de técnicas clássicas e moleculares, visando ampliar o conhecimento sobre esses organismos. O número cromossômico encontrado para todos os gêneros foi o mesmo previamente reportado para outras espécies dos mesmos gêneros. As fórmulas cariotípicas obtidas foram $2K=6A^e+6A^{ae}+8A^i+10A^M+2A^{Mi}+2M^{it}$ em *Nannotrigona punctata*, $2K=16A+4A^{ec}+14A^M$ em *Scaptotrigona bipunctata*, $2k=2A+30A^M+2M$ em *Partamona* sp. e $2K=4A^e+2A^i+20A^M+4M+2M^{ct}$ para ambas as espécies de *Frieseomelitta*. O número de marcações obtidas pelo corante base-específico CMA₃ não foi coincidente com o número de marcações observadas para o rDNA 18S obtidos pela técnica de FISH, exceto para a espécie *N. punctata*, em que foram obtidas duas marcações CMA₃⁺ e duas marcações rDNA 18S. Em *S. bipunctata* e *Partamona* sp. foram encontradas seis marcações CMA₃⁺ e duas marcações rDNA 18S. Através da comparação dos dados citogenéticos obtidos e pela correlação destes com os padrões de distribuição das espécies *N. punctata* e *S. bipunctata* foi possível observar padrões que nos ajudam a entender a importância de preservação dessa área, já que características vistas em espécies dessa região podem ser perdidas caso sejam extintas por causas naturais ou antrópicas.

ABSTRACT

GODOY, Denise de Castro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2014.
Karyotypic characterization of five species of Meliponini from Amazon rainforest. Adviser: Denilce Meneses Lopes.

The Amazon rainforest is the world's largest tropical rainforest and concentrates a huge diversity of plants and animals, with many endemic. The construction of dams, the deforestation and the expansion of agricultural frontiers has represented threats to local biodiversity. Bees and wasps are key components of communities and for being very sensitive to environmental disturbances, require a specific preservation effort. The stingless bees are a tribe of the Apidae family widely distributed in tropical and subtropical regions of the southern hemisphere. In this work, five species, belonging to four genera of Meliponini collected in the Amazon, were cytogenetically studied: *Nannotrigona punctata*, *Scaptotrigona bipunctata*, *Partamona* sp, *Frieseomelitta* sp1 e *Frieseomelitta* sp2 using classical and molecular techniques, aiming to increase knowledge about these organisms. The chromosome number for all genera was the same previously reported for other species of the same genera. Karyotypic formulas obtained were $2K=6A^e+6A^{ae}+8A^i+10A^M+2A^{Mi}+2M^{it}$ to *Nannotrigona punctata*, $2K=16A+4A^{ec}+14A^M$ to *Scaptotrigona bipunctata*, $2k=2A+30A^M+2M$ to *Partamona* sp. and $2K=4A^e+2A^i+20A^M+4M+2M^{ct}$ for both species of *Frieseomelitta*. The number of CMA₃ labelling sites obtained were not coincident with the number of markings observed for the 18S rDNA obtained by FISH technique, except for the species *N. punctata*, in which two CMA₃⁺ markings and two 18S rDNA markings were found. By comparing the cytogenetic data and the correlation of these with the distribution patterns of the species *N. punctata* and *S. bipunctata* it was possible to observe patterns that help us understand the importance of preserving this area.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Biodiversidade Amazônica e Conservação	1
1.2. Meliponíneos	2
1.4. Nomenclatura e Classificação Cromossômica.....	7
1.5. Técnicas de Bandeamento	8
1.5.1. Banda C	9
1.5.2. Fluorocromos.....	10
1.5.3. Região 18S e FISH.....	11
1.6. Evolução cromossômica	12
2. OBJETIVO	15
2.1. Objetivos específicos.....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1. Material biológico	16
3.2. Obtenção dos cromossomos metafásicos	16
3.3. Coloração Convencional.....	17
3.4. Banda C.....	17
3.5. Fluorocromos.....	17
3.6. FISH (Fluorescent <i>in situ</i> Hybridization).....	18
3.7. Obtenção e Captura de Imagens	20
3.8. Classificação dos Cromossomos	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1. Caracterização cariotípica	22
4.2. Evolução cromossômica	35
4.3. Citogenética e Biodiversidade	38
5. CONCLUSÕES.....	41
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

1. INTRODUÇÃO

1.1. Biodiversidade Amazônica e Conservação

A Amazônia é caracterizada pela área coberta pela floresta tropical úmida que ocupa cerca de sete milhões de km² na América do Sul e se estende por nove países: Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana, Guiana Francesa, Peru, Suriname e Venezuela. No Brasil abrange os estados do Acre, Amapá, Amazonas, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e parte do Tocantins, Maranhão e Goiás, representando cerca de 61% do território nacional. A Amazônia abriga a maior floresta tropical do mundo e concentra uma enorme diversidade de plantas e animais, sendo muitas endêmicas, com um número ainda longe de ser precisado (IBGE, 2011).

O conceito de biodiversidade foi criado por Wilson em 1986 e diz respeito não apenas à riqueza de espécies, mas também à variação genética dentro de uma população, variações em níveis taxonômicos, bem como variações em funções ecológicas. Uma das causas da redução da biodiversidade é o desmatamento, de maneira direta, pela destruição da mata, e indireta ao provocar a fragmentação da floresta, gerando ilhas de mata isoladas que acabam por reduzir o fluxo gênico entre as populações (Lovejoy, 1980, citado por Morato, 2000, p429).

A construção de hidrelétricas, o desmatamento e o avanço da fronteira agrícola tem representado ameaças à biodiversidade local. As obras da Usina Hidrelétrica Belo Monte, no Rio Xingu, tem sido foco de conflitos devido à magnitude e natureza dos impactos causados, principalmente pela inundação de áreas com vegetação e florestas nativas. Porém, espera-se que os resultados favoráveis sejam maiores que os danos, gerando energia e melhor distribuição de água em quantidade e qualidade (Fearnside, 2006). Assim, medidas preservacionistas e compensatórias devem ser implementadas visando a redução dos impactos causados pela construção das barragens.

Uma dessas medidas tem sido a condução de operações de resgate de fauna e flora que realizam expedições aos locais de futuro desmatamento. Os animais resgatados são levados para bases construídas com esse propósito no interior da

floresta e, posteriormente, transferidos para áreas seguras. Os animais resgatados, segundo dados divulgados pela empresa responsável pela construção da usina são, predominantemente, répteis, anfíbios e mamíferos. A base de resgate conta, também, com um programa específico para a preservação de insetos, principalmente abelhas (Belo Monte, 2011).

As abelhas e vespas são componentes fundamentais das comunidades e, por serem muito sensíveis a perturbações ambientais, demandam um esforço específico de preservação. As abelhas são diretamente dependentes das flores para obtenção de alimento e outros recursos, enquanto que várias plantas dependem exclusivamente da polinização por abelhas para sua reprodução (Evans e Eberhard, 1970 citado por Morato, 2002 pag430; Michener, 2007).

1.2. Meliponíneos

As abelhas são insetos pertencentes à ordem Hymenoptera, juntamente com as formigas e as vespas. As abelhas são importantes polinizadores de culturas e da vegetação natural, além de algumas espécies produzirem substâncias úteis, como mel e cera (Michener, 2007).

No Brasil, as abelhas são muito estudadas nos mais variados aspectos de sua biologia. Porém, este conhecimento ainda é pequeno e muita coisa ainda precisa ser elucidada (Silveira, 2002).

A subfamília Apinae (família Apidae) é um grupo muito diversificado, com ampla distribuição mundial, podendo ser encontrada em todos os continentes. Treze de suas 17 tribos são encontradas no Brasil (Silveira, 2002). Uma dessas tribos, conhecida como Meliponini, reúne as abelhas indígenas sem ferrão.

Os meliponíneos são abelhas encontradas em todas as regiões tropicais do mundo e subtropicais do hemisfério sul (Figura 1) (Silveira, 2002). São conhecidas como “abelhas indígenas sem ferrão” por apresentarem o ferrão atrofiado (Kerr et al., 2001). Geralmente constroem seus ninhos em cavidades pré-existent, como ocos de árvores e ninhos abandonados (Silveira, 2002). Todas as espécies são eusociais, apresentam ninhos perenes, sobreposição de gerações, castas bem

definidas e, geralmente, apenas uma rainha. As células de cria são organizadas tanto em cachos como em favos, sendo essa uma característica espécie específica.

Em muitas regiões da América tropical, os meliponíneos são as abelhas mais frequentes e desempenham um papel principal na polinização de espécies de plantas nativas (Michener, 2007). Muitas espécies são, ainda, utilizadas como polinizadores de culturas, apresentando, dessa forma, um importante papel econômico. Devido à sua grande relevância ecológica e comercial, estas espécies devem ser preservadas, entretanto muitas delas estão sendo dizimadas seja pelas queimadas, desmatamento, uso incorreto e indiscriminado de agrotóxicos e/ou coleta predatória do mel (Kerr et al., 2001).

Até o momento foram descritos 33 gêneros de meliponíneos Neotropicais compreendendo entre 350 e 400 espécies (Camargo e Pedro, 2013), porém, acredita-se que este número seja bem maior.

No presente trabalho, cinco espécies de Meliponini, pertencentes a quatro gêneros, foram estudadas, sendo elas, *Nannotrigona punctata*, *Scaptotrigona bipunctata*, *Partamona* sp, *Frieseomelitta* sp1 e *Frieseomelitta* sp2.

O gênero *Nannotrigona* compreende dez espécies com ocorrência do México ao sul do Brasil (Figura 2). São abelhas sociais de pequeno porte e bastante mansas. Costumam construir ninhos em favos em cavidades de árvores e uma característica singular é a construção de entradas grandes para seus ninhos, fato incomum para abelhas de pequeno porte (Michener, 2007).

O gênero *Scaptotrigona* possui 22 espécies conhecidas ocorrendo na região Neotropical das Américas Central e do Sul e no México (Figura 2). Os indivíduos desse gênero são um dos Meliponini de maior porte e podem chegar a medir 7 mm. Essas abelhas constroem ninhos em favo em cavidades de grandes árvores (Michener, 2007).

Para o gênero *Partamona* já foram descritas 32 espécies, encontradas desde o México até o Brasil (Camargo e Pedro, 2013) (Figura 2). São abelhas grandes e agressivas que habitam regiões muito diversas sendo algumas espécies bem adaptadas a ambientes antrópicos. Constroem ninhos, com células de cria em favo em uma grande variedade de locais, sendo estes ninhos muito característicos, por apresentarem estruturas para entrada e saída das abelhas muito elaboradas e ornamentadas (Pedro e Camargo, 2003).

Já no gênero *Frieseomelitta* são conhecidas 16 espécies, distribuídas na região Neotropical da América do Sul e Central e México (Figura 2). São abelhas sociais, agressivas e possuem a característica peculiar de depositar própolis sobre suas colônias. Constroem ninhos em ocos de árvores e em alguns casos em grandes raízes mortas, com favos de cria mais frequentemente agrupados em cachos (Michener, 2007).

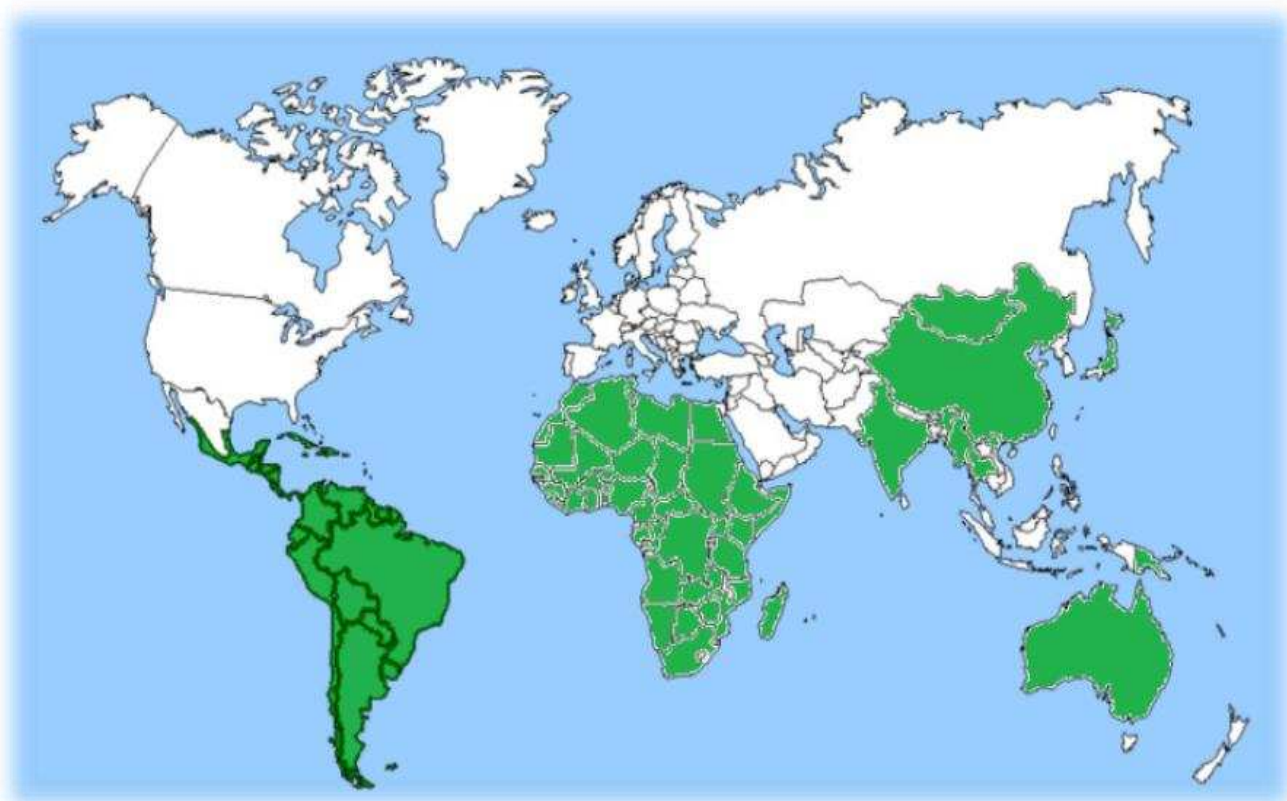


Figura 1. Representação da distribuição geográfica dos Meliponini no mundo. Destaque em verde para a região neotropical. (Imagem retirada de Souza, 2010).

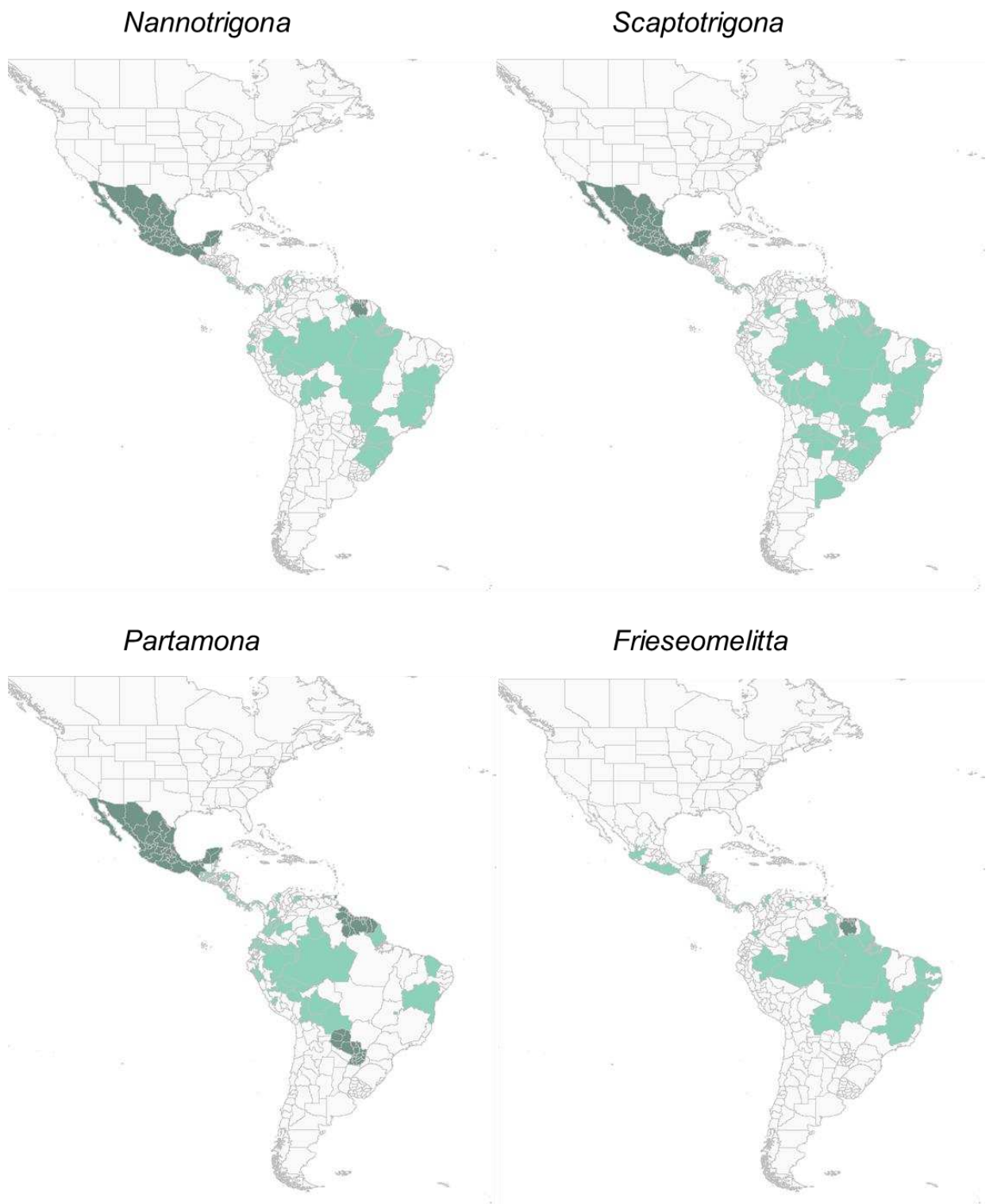


Figura 2. Distribuição geográfica dos gêneros estudados no presente trabalho. (Imagem retirada de Camargo e Pedro, 2013).

1.3. Citogenética em Meliponini

Os primeiros trabalhos com cromossomos datam de 1875, quando Strasburger publicou descrições claras e detalhadas de cromossomos mitóticos. Estes trabalhos formaram as bases dos atuais estudos sobre cromossomos. Apenas no início da década de 1880, o termo cromossomo foi criado. Com a redescoberta dos trabalhos de Mendel, no início do século XX, foi percebido que o comportamento dos cromossomos em uma célula em divisão era exatamente o que se esperava para explicar as teorias propostas por Mendel. Dessa forma, os cientistas perceberam que os cromossomos continham as unidades genéticas, os genes, responsáveis pela transmissão dos caracteres herdáveis. Surgia aí, a partir da união entre a citologia e a genética, uma nova ciência, a citogenética. (Sumner, 2003)

A citogenética compreende os estudos relativos ao cromossomo no que diz respeito à sua morfologia, organização, função e evolução. Ela tem sido uma ferramenta amplamente utilizada na sistemática, na separação de espécies morfológicamente semelhantes e na filogenia de diversos grupos de indivíduos (Guerra, 1988).

Até a década de 80 a principal forma de se obter cromossomos metafásicos em Meliponini era através da técnica de esmagamento, que permitia apenas a obtenção do número cromossômico. Porém, em 1988, a técnica de secagem ao ar, desenvolvida por Imai e colaboradores, permitiu a melhor visualização dos cromossomos e aplicação de técnicas, como bandeamentos, que permitem melhores resultados na diferenciação dos cromossomos, que vão além da simples determinação do número cromossômico.

Em 1986, com a descoberta por Pinkel et al. e Cremer et al. da hibridização *in situ* fluorescente (FISH) utilizando sondas não radioativas, a citogenética começou a se desenvolver para um novo campo, o da citogenética molecular. O FISH contornava o problema da resolução limitada dos resultados obtidos utilizando-se apenas técnicas de citogenética clássica.

Dentre os insetos, a ordem Hymenoptera é uma das ordens que despertam grande interesse na área da citogenética. Estudos citogenéticos iniciais da tribo Meliponini foram realizados por Kerr (1948) com abelhas do gênero *Melipona*.

Atualmente, dos 33 gêneros de meliponíneos Neotropicais, 24 são conhecidos citogeneticamente e as informações se limitam basicamente ao número cromossômico e fórmula cariotípica, com poucos trabalhos na área da citogenética molecular.

O número cromossômico obtido para as espécies de meliponíneos descritas citogeneticamente até o momento varia entre $n=8$ e $n=17$, sendo $n=17$ o número mais comum, presente em um maior número de espécies (revisão em Rocha et al., 2003).

Dentre os gêneros estudados no atual trabalho, foram descritas citogeneticamente apenas duas espécies de *Nannotrigona* (Hoshiba e Imai, 1993; Rocha et al., 2003), cinco de *Scaptotrigona* (Tarelho, 1973; Hoshiba e Imai, 1993; Rocha et al., 2003) e onze do gênero *Partamona* (Tarelho, 1973; Brito et al., 1997, 2003 e 2005; Brito-Ribon et al. 1999; Martins et al., 2009). Todas essas espécies apresentaram número cromossômico $2n=34$, sendo que no gênero *Partamona* foram observados, cromossomos supranumerários em *P. helleri* (Costa et al., 1992) e em *P. cupira* (Marthe et al., 2010). Já no gênero *Frieseomelitta*, sete espécies tiveram seu cariótipo descrito, e o número cromossômico encontrado para todas elas foi $2n=30$ (Rocha et al., 2003; Carvalho e Costa, 2011).

1.4. Nomenclatura e Classificação Cromossômica

Para classificação dos cromossomos podem ser utilizadas diferentes metodologias. Para abelhas a classificação comumente se dá conforme critérios propostos por Imai em 1991 e revistos por Hoshiba e Imai em 1993 para melhor adequação aos processos observados em abelhas e vespas. A classificação leva em consideração a morfologia dos cromossomos e a localização dos blocos de heterocromatina visualizados pela técnica de Banda C (Figura 3).

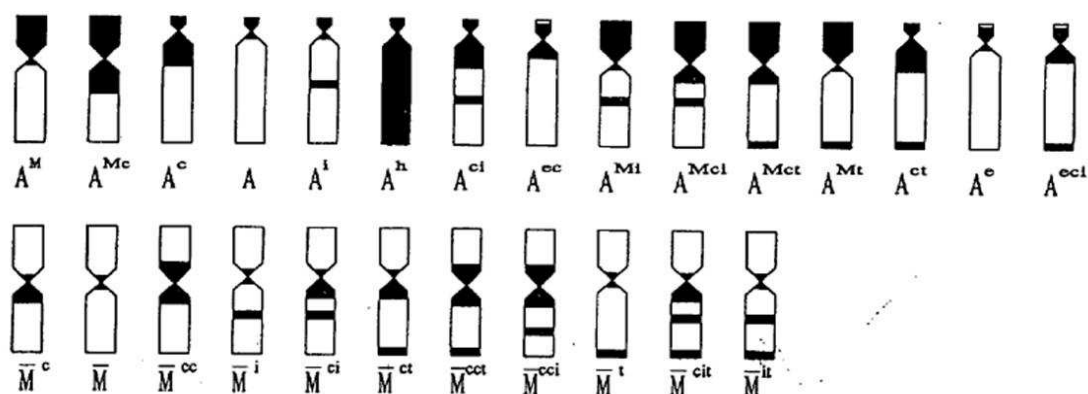


Figura 3. Representação esquemática dos cromossomos mais comumente observados em abelhas e vespas, proposto por Hoshiba e Imai, 1993 (Imagem retirada de Hoshiba e Imai, 1993).

1.5. Técnicas de Bandeamento

As técnicas para análise citogenética se baseiam na obtenção de cromossomos metafásicos já que nessa fase os cromossomos se encontram no maior nível de compactação e individualização. Para melhor observação dos cromossomos devem ser utilizadas substâncias antimitóticas, como a colchicina, que se ligam às proteínas que formam o fuso mitótico e impedem a sua polimerização, fazendo com que o processo de divisão celular seja interrompido e os cromossomos permaneçam condensados (Guerra, 1988).

Os primeiros trabalhos com citogenética se limitavam apenas à identificação e contagem do número cromossômico. A partir do desenvolvimento de técnicas de bandeamento foi possível mostrar a existência de regiões diferentes e constantes nos cromossomos, que em muitos casos refletem a composição das bases do DNA (Sumner, 2003).

O surgimento dessas técnicas auxiliou na caracterização, separação e pareamento dos cromossomos homólogos, além de permitir a detecção de pequenas variações estruturais auxiliando no detalhamento das transformações que ocorreram em grupos de espécies próximas, com cariótipos muito semelhantes (Guerra, 1988).

Dessa forma, à medida que técnicas de coloração e de bandeamento foram surgindo, a estrutura e a função cromossômica puderam ser estudadas de forma mais eficiente, promovendo um avanço na citogenética.

1.5.1. Banda C

O conceito de heterocromatina foi inicialmente definido por Heitz em 1928 como a cromatina que, diferentemente do restante da cromatina, permanece condensada durante todo o ciclo celular, não sofrendo ciclos de condensação-descondensação (Sumner, 2003)

A heterocromatina apresenta pouca ou nenhuma atividade gênica, até mesmo pelo alto nível de condensação, que impede a transcrição e são regiões constituídas por sequências altamente repetitivas organizadas em tandem. (Guerra, 1998). Possui localização centromérica preferencial, o que serviu para dar o nome à técnica. Entretanto, ela pode ser encontrada em outras regiões ou em quase toda a extensão do cromossomo. Percebe-se então que a quantidade de heterocromatina pode variar entre as espécies e mesmo dentro da própria espécie (Sumner, 2003).

A heterocromatina é dividida em duas classes, a heterocromatina constitutiva, que permanece condensada durante todo o ciclo celular em todas as células do organismo e que apresenta baixa atividade gênica e a heterocromatina facultativa, frequentemente associada à cromossomos sexuais cuja atividade é regulada por mecanismos epigenéticos (Sumner, 2003).

Classificações mais atuais definem a heterocromatina não apenas pelo nível de condensação ou pela baixa atividade genica, mas também pelas suas propriedades de coloração diferencial por técnicas de bandeamento e pelos tipos de proteínas associadas ao DNA que contém.

A técnica de banda C foi desenvolvida nos anos 70, consiste, basicamente, no tratamento da lâmina contendo o material com um ácido forte, geralmente o ácido clorídrico, que depurina e desnatura o DNA e posterior tratamento com uma solução alcalina, NaOH ou Ba(OH)₂, que hidrolisa o DNA depurinado. As lâminas são, então, incubadas em solução salina aquecida e o DNA fragmentado é extraído dos cromossomos. O DNA da heterocromatina é menos removido, talvez por apresentar

uma associação mais forte com proteínas ou pela sua natureza mais compacta. As lâminas são então lavadas e coradas com Giemsa. Os blocos escuros que surgem são as regiões de heterocromatina (Sumner, 2003).

1.5.2. Fluorocromos

Fluorocromos são corantes capazes de se ligar a pares de base específicos e que, ao serem excitados por uma fonte de luz, emitem fluorescência, dependendo do comprimento de onda absorvido. São capazes de se ligarem a regiões específicas do DNA e desta forma evidenciam a natureza e a constituição molecular dessas regiões (Sumner, 2003).

A primeira técnica de bandeamento usando fluorocromos foi realizada por Sumner em 1990 usando o fluorocromo quinacrina mostarda. Atualmente, os fluorocromos são divididos em duas classes, os que possuem afinidade por bases AT, como o DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole), Quinacrina, Hoechst 33258 e os específicos para GC, CMA3 (Cromomicina A3), Mitramicina, Actinomicina D (Menezes, 1997). Para serem observados os cromossomos, deve ser utilizado um microscópio de epifluorescência composto de fonte luminosa, lentes de aumento adequadas e jogos de filtro capazes de filtrar a luz de determinados comprimentos de onda.

Brito e colaboradores, em 2003, observaram em *Partamona peckolti* correlação entre regiões coradas pelo CMA₃ e regiões organizadoras de nucléolo (NORs). Essa correlação já foi observada em alguns insetos, inclusive em outros Meliponini (Rocha e Pompolo, 1998; Caixeiro, 2003; Mampumbu, 2002; Rocha et al., 2002). Como a localização dessas regiões utilizando a técnica de Ag-NOR proposta por Howell e Black (1980) não apresenta bons resultados para os Meliponini, tendo sido obtido apenas para um número muito reduzido de espécies, o uso de fluorocromos apresenta uma alternativa viável para a identificação das NORs em abelhas sem ferrão.

1.5.3. Região 18S e FISH

A região organizadora do nucléolo é a maior e mais conspícua região nuclear. A razão para o nucléolo e as NOR serem tão proeminentes é o fato que esta é a região nuclear responsável produção e processamento do RNA ribossomal, necessário para toda a síntese proteica da célula. Os genes ribossômicos estão presentes em cópias múltiplas, mesmo em organismos com genomas muito pequenos (Sumner, 2003).

Estes genes estão organizados nos eucariotos em duas distintas famílias, ambas compostas de um grande número de cópias arranjadas em série no genoma. As unidades de transcrição da primeira família inclui os maiores genes 18S, 5.8S e 28S, que constituem as regiões organizadoras de nucléolo. A segunda família compreende o gene que codifica o rRNA 5S localizado independente dos demais rRNAs. Estas duas famílias são transcritas por polimerases distintas (Drouin e Moniz de Sá, 1995).

Os genes ribossomais consistem em uma unidade básica repetitiva, geralmente rica em pares de base GC (Miller, 1981), composta por espaçadores intergênicos, que não são transcritos, e os genes ribossômicos de fato, separados por espaçadores internos, que são transcritos. A porção dos genes que é transcrita apresenta alta homologia em espécies diferentes, porém, a região espaçadora intergênica, maior componente da unidade repetitiva, é bastante variável, até mesmo por serem regiões que não estão sob ação de forças de seleção (Sumner, 2003). Por essa razão, sondas desenvolvidas para organismos muito diferentes podem ser inespecíficas.

No final da década de 60, Gall e Pardue descreveram pela primeira vez a hibridização *in situ* (ISH) utilizando sondas radioativas de DNA repetitivo em preparações citogenéticas utilizando sequencias 5S, 18S e 28S em *Drosophila*. Em 1986 Pinkel et al. e Cremer et al. reportaram a hibridação fluorescente *in situ* (FISH) usando sondas não radioativas.

O FISH (Fluorescent *in situ* Hybridization) é uma técnica citogenética utilizada para a localização de sequências específicas de DNA por meio de sondas marcadas com fluoróforos que se ligam a regiões alvo nos cromossomos.

A técnica de FISH consiste no anelamento específico de uma sonda de oligonucleotídeos marcados (fluorescência, radiação) com sequências de ácido nucléico nos cromossomos da espécie que está sendo analisada, possibilitando a detecção de sequências específicas de DNA de cromossomos metafásicos e núcleos interfásicos (Beatty et al., 2002). Essa técnica permite que sequências alvo de DNA possam ser localizadas e que o genoma inteiro de uma espécie, cromossomos inteiros, sub-regiões cromossômicas ou sequências de cópia única possam ser avaliadas, dependendo da complexidade da sonda usada e da combinação de sequências específicas.

As sondas podem ser obtidas a partir de DNA de sequências únicas, DNA repetitivo (satélite e telômero), sequências loco-específicas obtidas por amplificação pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), grandes sequências de DNA genômico clonadas em vetores, bandas cromossômicas, sequências braço específicas e cromossomos inteiros obtidos por microdissecção (Beatty et al., 2002). A marcação destas sondas pode ser realizada de maneira direta, usando nucleotídeos marcados, ou de maneira indireta, usando moléculas repórteres, que se ligam aos nucleotídeos e emitem fluorescência (Sumner, 2003).

As regiões de rDNA variam de espécie para espécie em número e localização, por isso são úteis como marcadores cromossômicos e fornecem importantes evidências sobre a evolução do genoma em níveis moleculares e cromossômicos (Fontana et al., 2003).

1.6. Evolução cromossômica

Em 1972, Kerr e Silveira, na tentativa de explicar os processos envolvidos na evolução cariotípica dos Meliponini, sugeriram a Teoria da Poliploidia, em que os números cromossômicos observados para as abelhas sem ferrão seriam fruto da poliploidização de um cariótipo $2n=8$. Porém, essa teoria não explicava o que estaria ocorrendo em Meliponini porque a poliploidia implicaria no aumento do tamanho do genoma nas espécies com maior número cromossômico se comparado com as com menor número, além de não explicar as variações cromossômicas e a presença de heterocromatina observada em várias espécies (Tavares et al. 2010).

A Teoria da Interação Mínima, proposta por Imai em 1986 para formigas foi sugerida por Pompolo em 1992, como um possível modelo para a evolução cariotípica dos Meliponini. De acordo com essa teoria, cariótipos ancestrais apresentariam cromossomos maiores e em menor número que, com o tempo, se tornariam menores e mais numerosos através de ciclos de rearranjos, como fissões e inversões pericêntricas. Esse aumento do número cromossômico seria vantajoso por reduzir as interações entre os cromossomos, que poderiam causar alterações deletérias.

A fissão de um cromossomo metacêntrico (M), que resultaria em redução do número cromossômico, apresenta um novo problema já que os cromossomos telocêntricos (T) formados apresentam instabilidade telomérica. Diferentes organismos apresentam diferentes mecanismos para solucionar o problema da instabilidade telomérica (Imai, 1991).

Hoshiba e Imai (1993) realizaram um extenso trabalho com abelhas e vespas com o objetivo de entender como a evolução cariotípica teria ocorrido nestes organismos e concluíram que nos Hymenoptera a instabilidade é solucionada pelo crescimento em tandem de heterocromatina na região de quebra, o que leva à formação de cromossomos acrocêntricos e, posteriormente, pseudoacrocêntricos (com um dos braços inteiramente heterocromático) (Figura 4). Apesar de esta ser considerada a principal via de alterações cromossômicas ocorridas durante a evolução dos Meliponini, outros tipos de cromossomos podem ter se originado conforme proposto pela rede de alterações cromossômicas apresentadas por esses autores (Figura 5). Hoshiba e Imai (1993) propõem que a alta instabilidade telomérica seja, portanto, responsável pela marcada presença de cromossomos pseudoacrocêntricos em cariótipos com alto número cromossômico nos Hymenoptera.

Assim, o aumento do número de espécies analisadas citogeneticamente permitirá um melhor conhecimento das características cromossômicas dessa tribo, fundamental para o entendimento dos processos que levaram às mudanças no cariótipo do grupo.

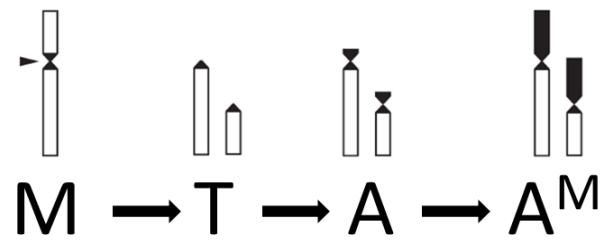


Figura 4. Principal via proposta por Hoshiba e Imai (1993) para explicar a evolução do cariótipo em abelhas e vespas. M: metacêntrico, T: telocêntrico, A: acrocêntrico, A^M : pseudoacrocêntrico. (Imagem adaptada de Hoshiba e Imai, 1993).

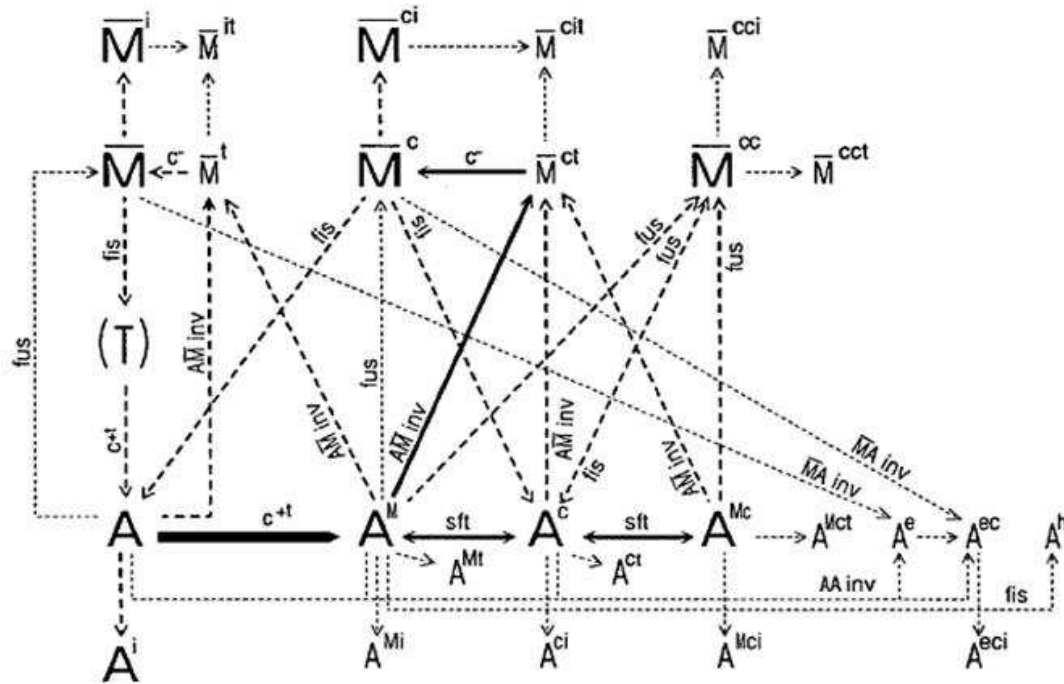


Figura 5. Rede de alterações cromossômicas baseada na frequência dos tipos de cromossomos observados em abelhas e vespas por Hoshiba e Imai (1993). (Imagem retirada de Hoshiba e Imai, 1993).

2. OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi caracterizar citogeneticamente cinco espécies de abelhas da Amazônia pertencentes aos gêneros *Nannotrigona*, *Scaptotrigona*, *Partamona* e *Frieseomelitta*, visando dessa forma ampliar o conhecimento citogenético de espécies dos gêneros estudados que ocorrem na Amazônia.

2.1. Objetivos específicos

- Avaliar o número cromossômico e a distribuição da heterocromatina por meio de coloração convencional e banda C;
- Avaliar a composição da cromatina baseado em fluorofóros base-específicos (CMA₃/DAPI);
- Localizar regiões de rDNA 18S nas espécies estudadas;
- Discutir aspectos da evolução cariotípica nessas espécies com base nos dados obtidos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material biológico

Cinco espécies de Meliponini compreendidos em quatro gêneros foram coletadas e disponibilizadas para amostragem na Amazônia em maio de 2013. As colônias foram transferidas para o meliponário da base de resgate da Usina Hidrelétrica de Belo Monte em Altamira-PA e mantidas em caixas de criação racionais de Meliponini. Foram retiradas cerca de 20 larvas de cada colônia para análise citogenética e indivíduos adultos foram coletados, montados e posteriormente identificados.

As abelhas foram identificadas até gênero para *Partamona* sp., *Frieseomelitta* sp1. e sp2. e até espécie para *Nannotrigona punctata* e *Scaptotrigona bipunctata* utilizando chaves propostas na literatura e confirmadas por um especialista. Os espécimes se encontram depositados na coleção do Museu Regional de Entomologia da Universidade Federal de Viçosa, Apiário Central.

3.2. Obtenção dos cromossomos metafásicos

As lâminas foram confeccionadas na base de resgate onde foi coletado o material biológico e armazenadas em geladeira para posterior análise.

Os cromossomos metafásicos foram obtidos conforme metodologia de Imai et al. (1988) a partir de gânglios cerebrais de larvas no estágio de defecação.

As larvas foram dissecadas e os gânglios cerebrais extraídos e colocados em solução de colchicina 0,005% e citrato de sódio 1% por cerca de meia hora para todas as espécies. Todos os indivíduos dissecados eram fêmeas, portanto não foram observadas metáfases de machos neste trabalho.

Após esse tempo, os gânglios foram transferidos para uma lâmina, macerados para romper as células e lavados com uma série de fixadores: Fixador 1

(ácido acético, etanol e água 3:3:4), Fixador 2 (ácido acético e etanol 1:1) e Fixador 3 (ácido acético puro).

3.3. Coloração Convencional

O material biológico nas lâminas foi corado com solução de Giemsa e tampão Sörensen (0,06 M, pH 6,8) 4%, por 30 minutos e em seguida lavadas em água corrente e deixadas secar à temperatura ambiente.

3.4. Banda C

A metodologia empregada foi baseada em Sumner (1972), com modificações, e encontra-se descrita a seguir:

- Incubação das lâminas em solução de Ácido Clorídrico (HCl) 0,2 M por 6 minutos.
- Lavagem rápida em água destilada.
- Tratamento com solução de Hidróxido de Bário 5% a 60 °C por 9 minutos.
- Lavagem em HCl 0,2 M por cerca de 30 segundos.
- Lavagem rápida em água destilada.
- Lavagem com 2x SSC (Citrato de Sódio: Cloreto de Sódio) pH 7,0 a 60 °C em banho-maria por 12 minutos.
- Lavagem em água destilada.
- Deixar secar naturalmente.
- Coloração com solução de Giemsa em tampão Sörensen (0,06 M, pH 6,8) 8% por 20 minutos à temperatura ambiente.

3.5. Fluorocromos

A coloração DA/DAPI/CMA₃ (distamicina/4'-6-diamidino-2-phenylindole/cromomicina A₃) seguiu as recomendações de Schweizer (1980).

- Colocar sobre o material 150 µl de solução de distamicina (0,3 mg/ml), cobrir com uma lamínula e deixar por 15 minutos no escuro.
- Retirar a lamínula e lavar a lâmina em água corrente.
- Mergulhar a lâmina em solução tampão McIlvaine por 15 minutos e deixar secar.
- Mergulhar a lâmina em solução DAPI (0,3 µg/ml) por 15 minutos no escuro.
- Lavar a lâmina em água corrente.
- Mergulhar a lâmina em solução tampão McIlvaine por 15 minutos e deixar secar.
- Colocar sobre o material 150 µl de solução de cromomicina A₃ (0,5 mg/ml), cobrir com lamínula e deixar por 60 minutos no escuro. Retirar a lamínula e lavar a lâmina em água corrente.
- Mergulhar a lâmina em solução tampão McIlvaine por 15 minutos.
- Após secar ao ar, montar com solução de sacarose e manter guardada no escuro à temperatura ambiente por 15 dias, ou por 7 dias a 37° C em estufa.

3.6. FISH (Fluorescent *in situ* Hybridization)

As sondas das regiões de rDNA 18S foram obtidas por amplificação via PCR utilizando-se *primers* de rDNA 18S, 18SF1 (5'GTCATATGCTTGTCTCAAAGA3') e 18SR1 (3'TCTAATTTTTTCAAAGTAAACGC5') para a espécie *Scaptotrigona bipunctata* e 18SF2 (5'TAATTCCAGCTCCAATAG3') e 18SR2 (3'CCACCCATAGAATCAAGA5') para a espécie *Nanotrigona punctata* e *Partamona* sp., obtidos para a abelha sem ferrão *Melipona quinquefasciata* (Pereira, 2006) e amplificados em DNA de *Melipona*. A marcação foi realizada pelo método indireto utilizando-se nucleotídeos marcados com digoxigenina durante a amplificação.

A metodologia empregada de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) em cromossomos metafásicos, baseou-se em Pinkel et al. (1986) com modificações. A metodologia encontra-se descrita a seguir:

- Lavar as lâminas em tampão PBS 1x durante 5 minutos em temperatura ambiente.
- Desidratar as lâminas em série alcoólica (gelada) 70, 85 e 100%, 5 minutos cada (secar).

- Incubar as lâminas em 100 µl de RNase (0,4% RNase/2x SSC) a 37° C por 1 hora em câmara úmida com água milli-Q.
- Lavar 3X por 5 min em 2xSSC e depois durante 5 min em PBS 1X.
- Incubar as lâminas por 10 min em solução de pepsina 0,005% (em 10mM HCl) a 37° C.
- Lavar em PBS 1x durante 5 minutos (agitando) à temperatura ambiente.
- Fixar em formaldeído 1% em PBS 1X/50mM MgCl₂ durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Lavar em PBS 1x por 5 minutos (agitando).
- Desidratar as lâminas em série alcoólicas (70, 85, 100 %) por 5 minutos cada. Simultaneamente a isso, desnaturar a solução de hibridação a 100 °C por um período de 10 minutos e passá-la imediatamente ao gelo. A solução de hibridação consiste em 200 µl Formamida (50% de Formamida), 80 µl Sulfato de Dextrano 50%, 40 µl de 20x SSC, 80 µl de H₂O, aos quais serão adicionados 1 µg de sonda.
- Desnaturar o DNA cromossômico com formamida 70% em 2x SSC a 70 °C por 5 minutos.
- Desidratar o material em série alcoólica 70, 85 e 100% durante 5 minutos cada.
- Preparar uma câmara úmida a 37 °C. Montar cada lâmina com 50 µl de solução de hibridação, cobrir com lamínula, colocar na câmara úmida e deixar *overnight* numa estufa a 37 °C.
- No dia seguinte, lavar 2 vezes em formamida 15%/0,2x SSC pH 7.0 a 42 °C por 10 minutos.
- Lavar as lâminas 3 vezes em 0,1x SSC a 60 °C, por 5 minutos cada (agitando).
- Lavar durante 5 minutos em solução de Tween 0,5%/4x SSC, ambiente.
- Incubar as lâminas em tampão 5% NFDM (no fat dry milk) /4x SSC por 15 minutos.
- Lavar 2 vezes por 5 minutos cada com Tween 0,5%/4x SSC, temperatura ambiente.
- Incubar as lâminas com 100 µl do mix (5 µl Anti digoxi rodamina + 995 µl NFDM) durante 1 hora em câmara úmida e escura, a temperatura ambiente.
- Lavar 3 vezes por 5 minutos com Tween 0,5%/4x SSC, ambiente.
- Desidratar em álcool 70, 85 e 100%, 5 minutos cada (secar); em seguida, montar as lâminas com solução de DAPI + Antifading (Vectashield Mounting Medium with DAPI, 1,5µg/ml), colocar 40 µl da mistura e cobrir com lamínula. Guardar no escuro.

3.7. Obtenção e Captura de Imagens

Para cada uma das técnicas acima descritas, foram analisadas cerca de 5 lâminas e, em média, 20 células metafásicas por lâmina em um microscópio OLYMPUS BX-60, acoplado a um equipamento fotográfico, sob objetiva de imersão e um analisador de imagens.

As lâminas preparadas pela coloração convencional e pela técnica de Banda C foram analisadas ao microscópio de luz, as imagens capturadas e posteriormente analisadas.

Lâminas coradas com fluorocromos (CMA₃ e DAPI) foram analisadas em fotomicroscópio de epifluorescência, utilizando-se os filtros de excitação de 450-480nm (CMA₃) e de 330-385nm (DAPI).

Os Programas Corel Photo-Paint[®] e CorelDraw[®] (versão 12, Corel Corporation, 2003) e Image Pro Plus[™] (versão 4.5, Media Cybernetics, 2001) foram utilizados para medição, análise das imagens e montagem dos kariótipos.

3.8. Classificação dos Cromossomos

Os cromossomos foram classificados segundo os critérios propostos por Imai (1991) e revistos por Hoshiba e Imai (1993). Os tipos de cromossomos observados e os nomes a eles dados são mostrados na Figura 6 para melhor entendimento dos resultados que serão posteriormente apresentados.

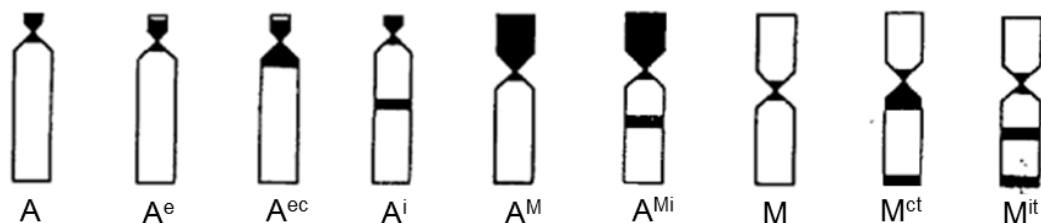


Figura 6. Representação dos tipos cromossômicos observados no trabalho. A: acrocêntrico, A^e: acrocêntrico eucromático, A^{ec}: acrocêntrico eucromático com

heterocromatina na região centromérica, Ai: acrocêntrico com heterocromatina na região intersticial, A^M: pseudoacrocêntrico, A^{Mi}: pseudoacrocêntrico com heterocromatina na região intersticial, M: metacêntrico, M^{ct}: metacêntrico com heterocromatina centromérica e terminal M^{it}: metacêntrico com heterocromatina intersticial e terminal. (Adaptado de Hoshiba e Imai, 1993).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização cariotípica

Nannotrigona punctata

O número cromossômico observado para a espécie *Nannotrigona punctata* foi $2n=34$. Este número coincide com o obtido por Hoshiba e Imai (1993) e Rocha e colaboradores (2003) para *Nannotrigona testaceicornis* e por Rocha e colaboradores (2003) para *Nannotrigona* sp. Apesar do pequeno número de espécies com citogenética conhecida, o número cromossômico foi constante no gênero como visto em outros Meliponini.

A fórmula cariotípica obtida, levando em consideração a morfologia e a distribuição da heterocromatina nos cromossomos, evidenciada pela banda C, foi $2K=6A^e+6A^e+8A^i+10A^M+2A^{Mi}+2M^{it}$ (Figuras 7A e 7B).

Foram visualizadas bandas na região intersticial de cromossomos acrocêntricos, regiões eucromáticas na porção terminal de alguns cromossomos, bem como cromossomos metacêntricos (Figuras 7B e 7C). Assim como observado no presente trabalho, em um estudo realizado por Hoshiba e Imai (1993) com a espécie *N. testaceicornis*, foram encontrados, predominantemente, cromossomos pseudoacrocêntricos e acrocêntricos, enquanto Rocha et al. (2003) demonstraram apenas a presença de cromossomos pseudoacrocêntricos e acrocêntricos em outras espécies do gênero estudadas.

Na coloração por fluoróforos base-específicos, foram observadas duas marcações $CMA_3^+/DAPI^-$ na região terminal do braço heterocromático (Figuras 8A e 8B). A localização do rDNA 18S coincidiu com a marcação CMA_3^+ (Figuras 8A e 8C). A coloração com DAPI nas metáfases pré-tratadas para a FISH mostrou que em alguns cromossomos a região pericentromérica foi $DAPI^+$ (Figura 8D). Também nas espécies do gênero *Nannotrigona* avaliadas por Rocha et al. (2003), o número de marcações CMA_3 foi variável, tendo sido observados apenas dois cromossomos

marcados pelo CMA_3^+ na porção terminal de *N. testaceicornis* e três cromossomos marcados em *Nannotrigona sp*

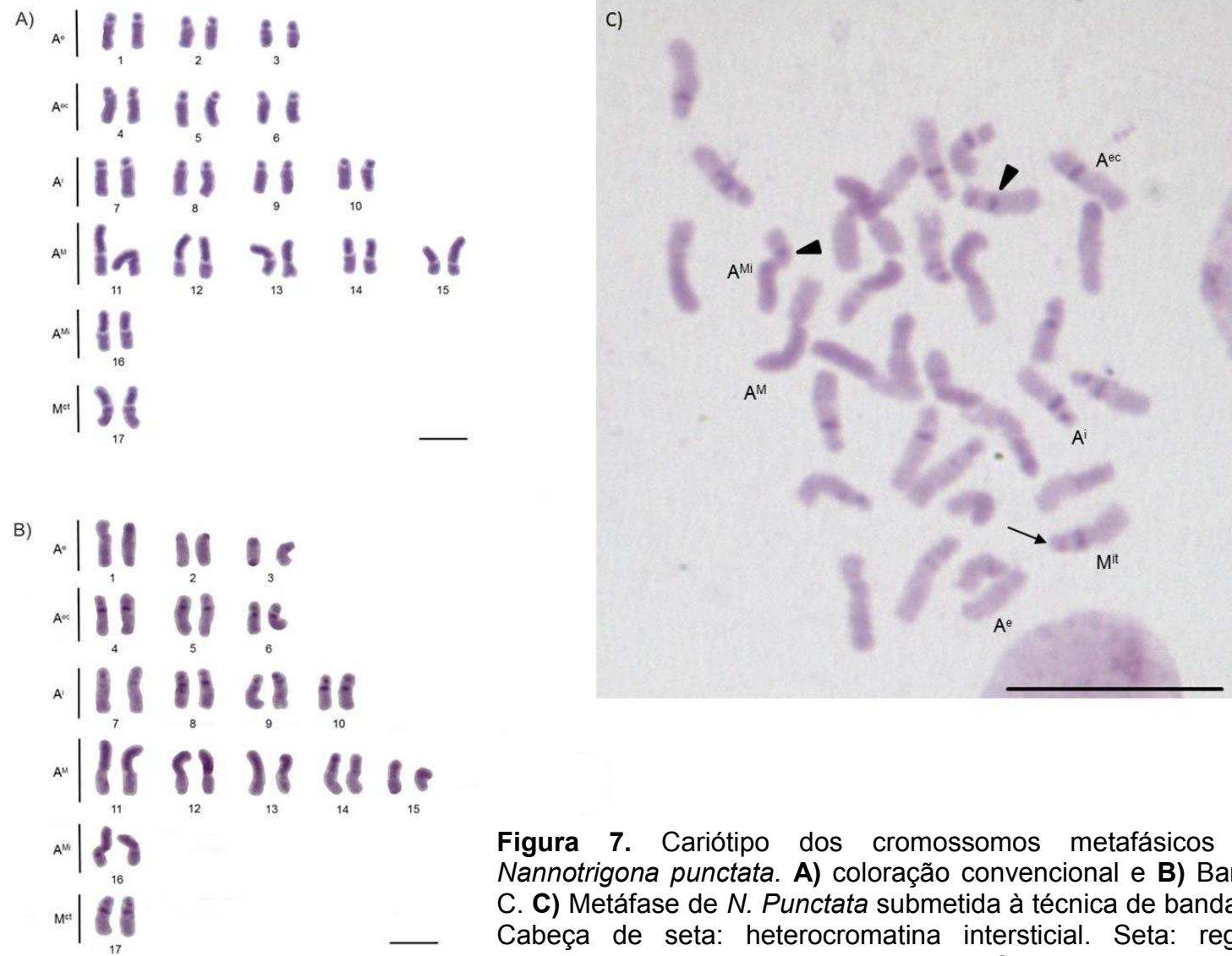


Figura 7. Cariótipo dos cromossomos metafásicos de *Nannotrigona punctata*. **A)** coloração convencional e **B)** Banda C. **C)** Metáfase de *N. Punctata* submetida à técnica de banda C. Cabeça de seta: heterocromatina intersticial. Seta: região eucromática terminal. A e B: barra=5µm; C: barra 10µm.

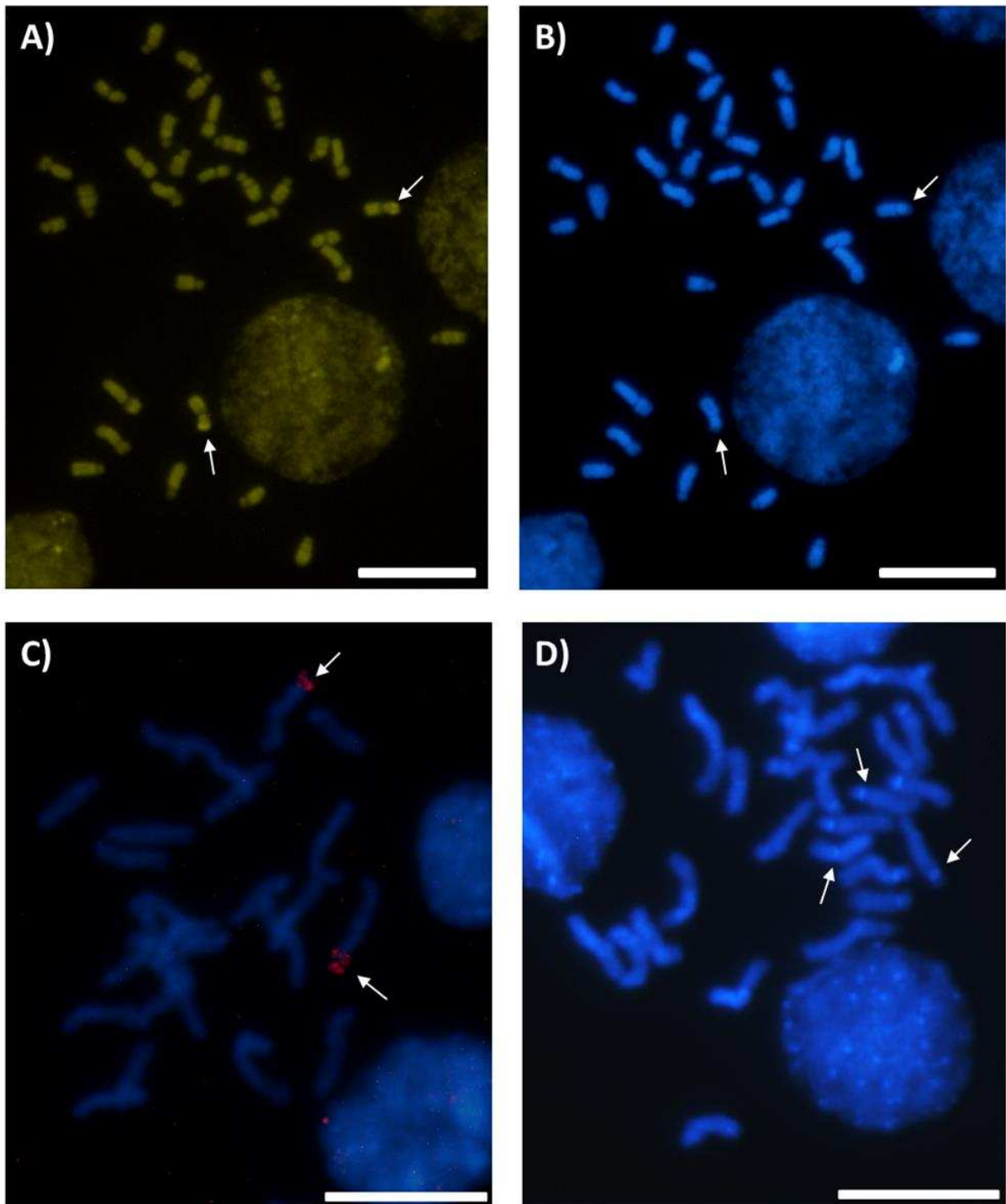


Figura 8. Fluorocromos e FISH em *Nannotrigona punctata*. **A)** e **B)** Fluorocromos: CMA₃ **(A)**, setas apontam regiões CMA₃⁺; DAPI **(B)**, setas apontam regiões DAPI⁺. **C)** FISH evidenciando a região rDNA 18S (setas), cromossomos corados com DAPI. **D)** Coloração com DAPI nas metáfases pré-tratadas para a FISH, setas indicam regiões pericentroméricas DAPI⁺. A e B: barra=5µm; C e D: barra 10µm.

Scaptotrigona bipunctata

O número cromossômico diploide observado em *Scaptotrigona bipunctata* foi 34 para todas as metáfases analisadas, mesmo número observado para *S. postica*, *S. barrocoloradensis*, *S. depilis*, *S. xanthotricha* *Scaptotrigona* sp. (Tarelho, 1973; Hoshiba e Imai, 1993; Rocha et al., 2003; Duarte et al., 2009).

A fórmula cariotípica foi $2K=16A+4A^{ec}+14A^M$. Uma diferença em relação às outras espécies descritas para o gênero *Scaptotrigona* foi a presença de cromossomos acrocêntricos eucromáticos com uma região heterocromática na porção centromérica (A^{ec}) (Figuras 9A e 9B). Os cromossomos da espécie são predominantemente acrocêntricos, variando a porção de heterocromatina presente no braço heterocromático.

Os pares de cromossomos pseudoacrocêntricos 11, 12 e 13 apresentaram um padrão diferente no braço heterocromático, onde as regiões terminais aparecem fracamente marcadas pela banda C (Figura 9B). Em trabalhos com outras espécies de Meliponini, esse padrão já havia sido observado para *Partamona* (Brito et al., 2005; Miranda, 2012). Domingues et al. (2005) na espécie *Trigona fulviventris*, também chamam atenção para a coloração diferencial nas regiões de heterocromatina. Brito et al. (2005) estudaram as espécies *P. helleri* e *P. seridoensis* aplicando a técnica de bandeamento GTG de acordo com Seabright (1971) e mostraram que a heterocromatina nas regiões pericentroméricas dessas espécies apresenta uma composição diferente daquela presente na porção distal dos braços de alguns pares cromossomos dessas espécies. Uma hipótese que poderia explicar essa variação é que essa região corresponda à heterocromatina com constituição ou nível de compactação diferente e constitui um aspecto a ser estudado visto que a adição de heterocromatina é um fator importante na evolução cariotípica de Meliponini.

Na coloração por fluorocromos, foram observadas seis marcações CMA3⁺ na porção terminal do braço heterocromático (Figura 10A), enquanto que o restante desse braço mostrou-se DAPI⁺ (Figura 10B).

Pela técnica de FISH foi verificado um par marcado na porção terminal do braço heterocromático (Figura 10C). Ao contrário de *Nannotrigona punctata* o número de marcações evidenciado pela FISH e pelo CMA3⁺ em *S. bipunctata* não foi

coincidente (Figuras 10A e 10C). Resultado semelhante foi verificado em *Scaptotrigona xantotricha* onde o número de marcações NOR⁺ detectados por Ag-NOR não foi coincidente com o número de marcações CMA₃⁺, o que demonstra que nem sempre essas regiões são coincidentes (Duarte et al., 2009). Mandrioli et al. (2001) observaram sítios NOR positivos à prata e à hibridização com sondas rDNA 45S que apresentaram-se negativos ao CMA₃ no peixe *Gobius niger*. Portanto, apesar da relação entre o número de regiões CMA₃⁺/Ag-NOR⁺/FISH ser verdadeira para muitas espécies, mais estudos são necessários para confirmar a correspondência ou não dessas regiões em *S. bipunctata*.

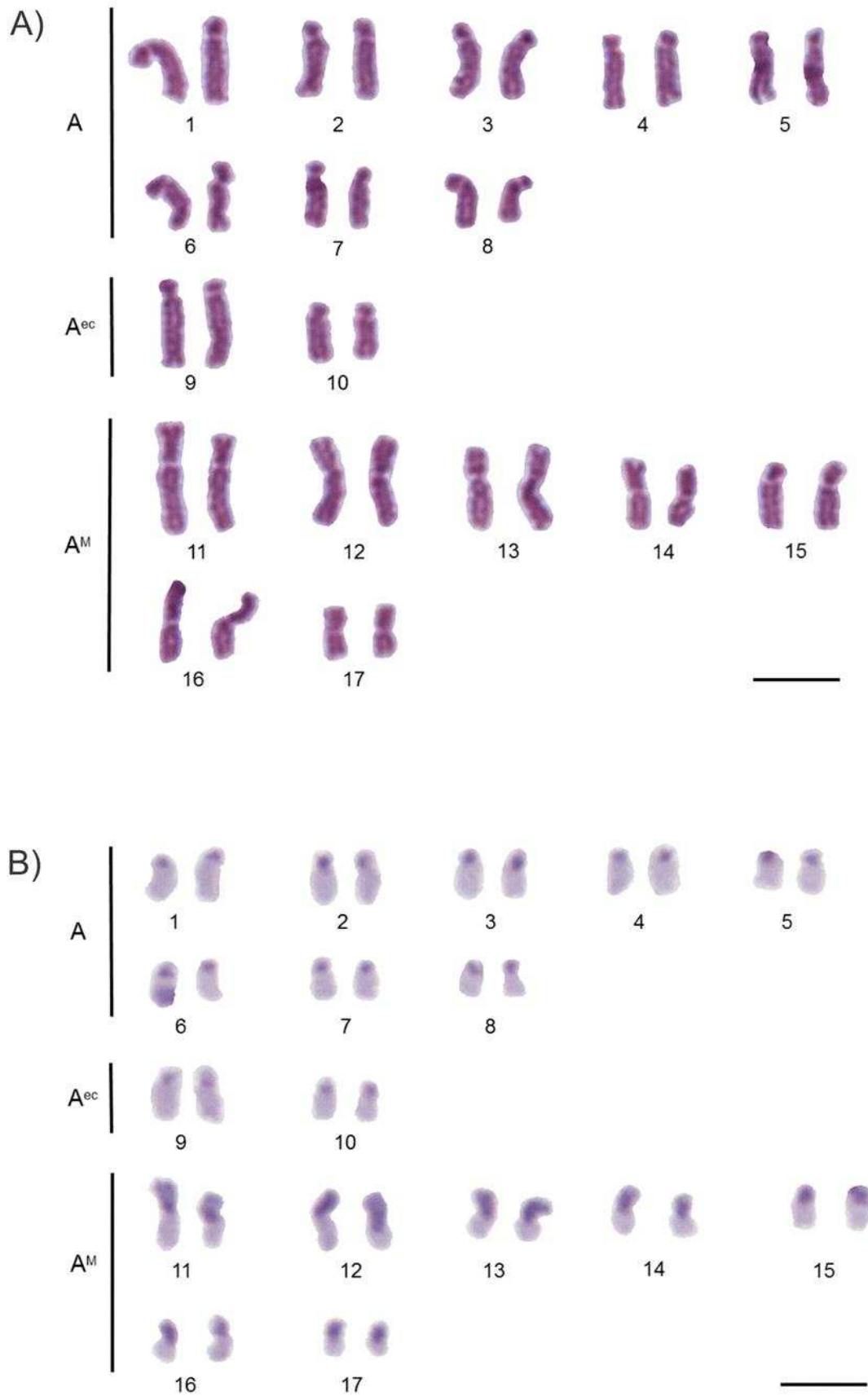


Figura 9. Cariótipo dos cromossomos metafásicos de *Scaptotrigona bipunctata*. **A)** coloração convencional e **B)** Banda C. Barra = 5μ

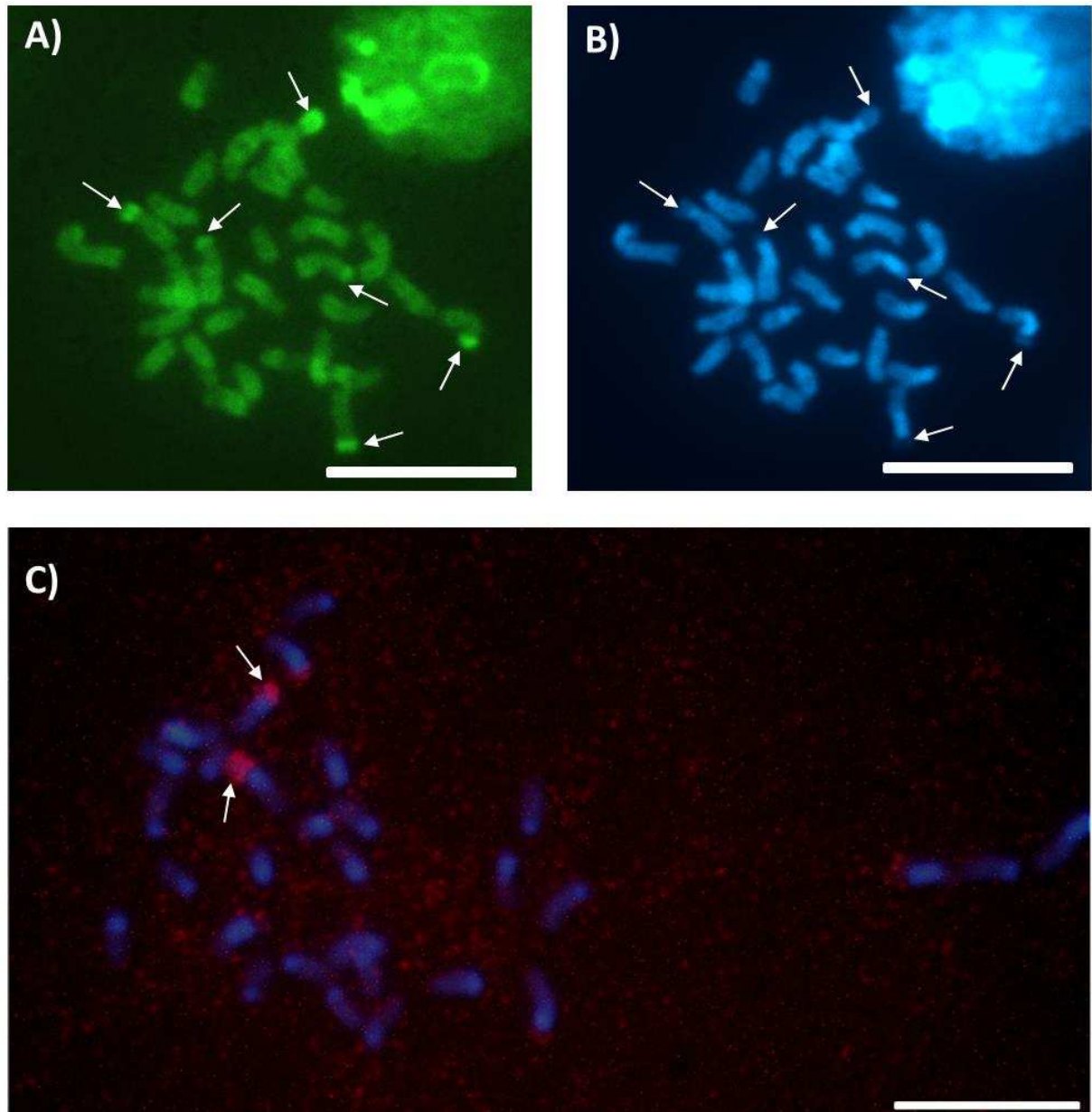


Figura 10. Fluorocromos e FISH em *Scaptotrigona bipunctata*. **A)** e **B)** Fluorocromos: CMA₃ (**A**), setas apontam regiões CMA₃⁺/DAPI⁻; DAPI (**B**), setas apontam regiões DAPI⁻/CMA₃⁺. **C)** FISH evidenciando a região rDNA 18S (setas). Barra 10μm.

***Partamona* sp.**

Foram observados 34 cromossomos para todas as células metafásicas diploides analisadas. Esse é um dos gêneros de Meliponini com maior número de espécies com informações citogenéticas. Dentre as 32 espécies conhecidas, onze já foram analisadas e apresentam o mesmo número cromossômico. Uma característica marcante nesse gênero é a presença de cromossomos B, os quais já foram observados em *P. helleri* (Costa et al., 1992, Brito et al., 1997, Tosta et al. 1998, Martins et al., 2009), *P. cupira* (Marthe et al, 2010) e também *P. rustica*, e *P. criptica* por meio de marcador molecular (Miranda, 2012). No entanto, não foi verificada a presença de cromossomos supranumerários na espécie de *Partamona* analisada nesse trabalho, ou pelo menos nessa população.

A fórmula cariotípica obtida foi $2k=2A+30A^M+2M$ (Figuras 11A e 11B). Esse padrão, com alto número de cromossomos pseudoacrocêntricos, parece ser comum em *Partamona* considerando que já foi observado em *P. helleri* (Brito, 1998), *Partamona* sp. (Brito-Ribon et al. 1999), *P. peckolti* (Brito et al. 2003), *P. seridoenses* (Brito et al, 2005), *P. nhambiquara* e *P. chapadicola* (Lopes, 2011). Porém, Martins et al. (2014) estudando populações de *P. helleri* verificaram apenas a ocorrência de cromossomos metacêntricos.

Seis marcações CMA₃⁺/DAPI foram visualizadas em *Partamona* sp., todas em regiões terminais dos cromossomos. Comparando estes dados com os de trabalhos anteriores observa-se um número variável de marcações CMA₃ positivas entre as espécies bem como intraespecificamente no gênero *Partamona* (Brito et al., 2005; Marthe et al., 2010; Martins et al., 2014), inclusive marcações em cromossomos supranumerários (Marthe et al., 2010; Martins et al., 2014)

Assim, como o número de marcações CMA₃⁺, o número de NORs em *Partamona* parece ser bem variável. Apenas dois cromossomos apresentaram marcação para a região rDNA 18S utilizando a técnica de FISH (Figura 12C). Brito et al. (2005) observaram sete marcações em *P. seridoensis* e reportaram ainda, uma variação intraespecífica para *P. helleri*, em que uma das colônias estudadas apresentou seis enquanto a outra oito cromossomos marcados. Martins et al. (2014) estudando *P. helleri* observaram quatro marcações para o rDNA 45S e ainda algumas marcações nos cromossomos Bs dessa espécie.

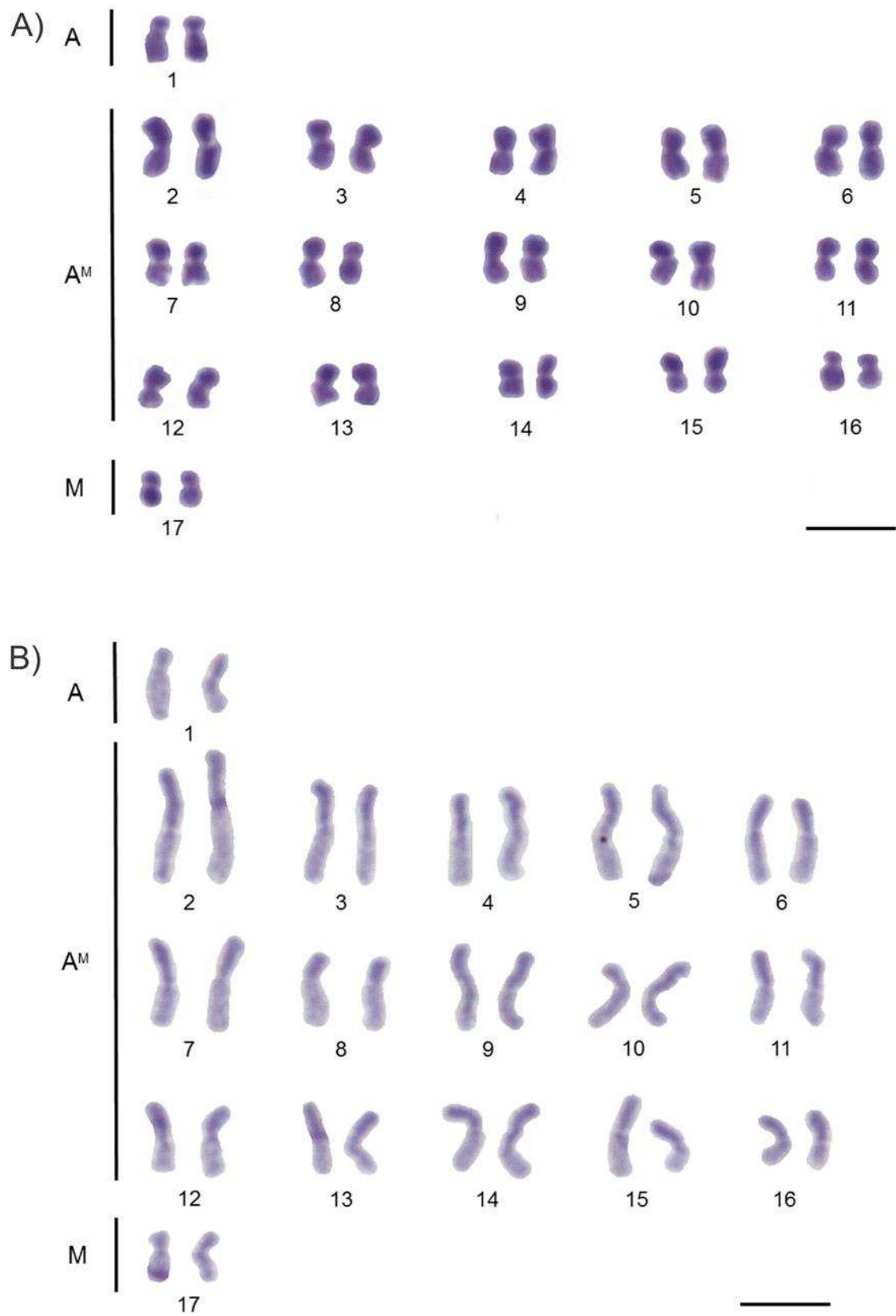


Figura 11. Cariótipo dos cromossomos metafásicos de *Partamona* sp.. **A)** coloração convencional e **B)** Banda C. Barra = 5μ

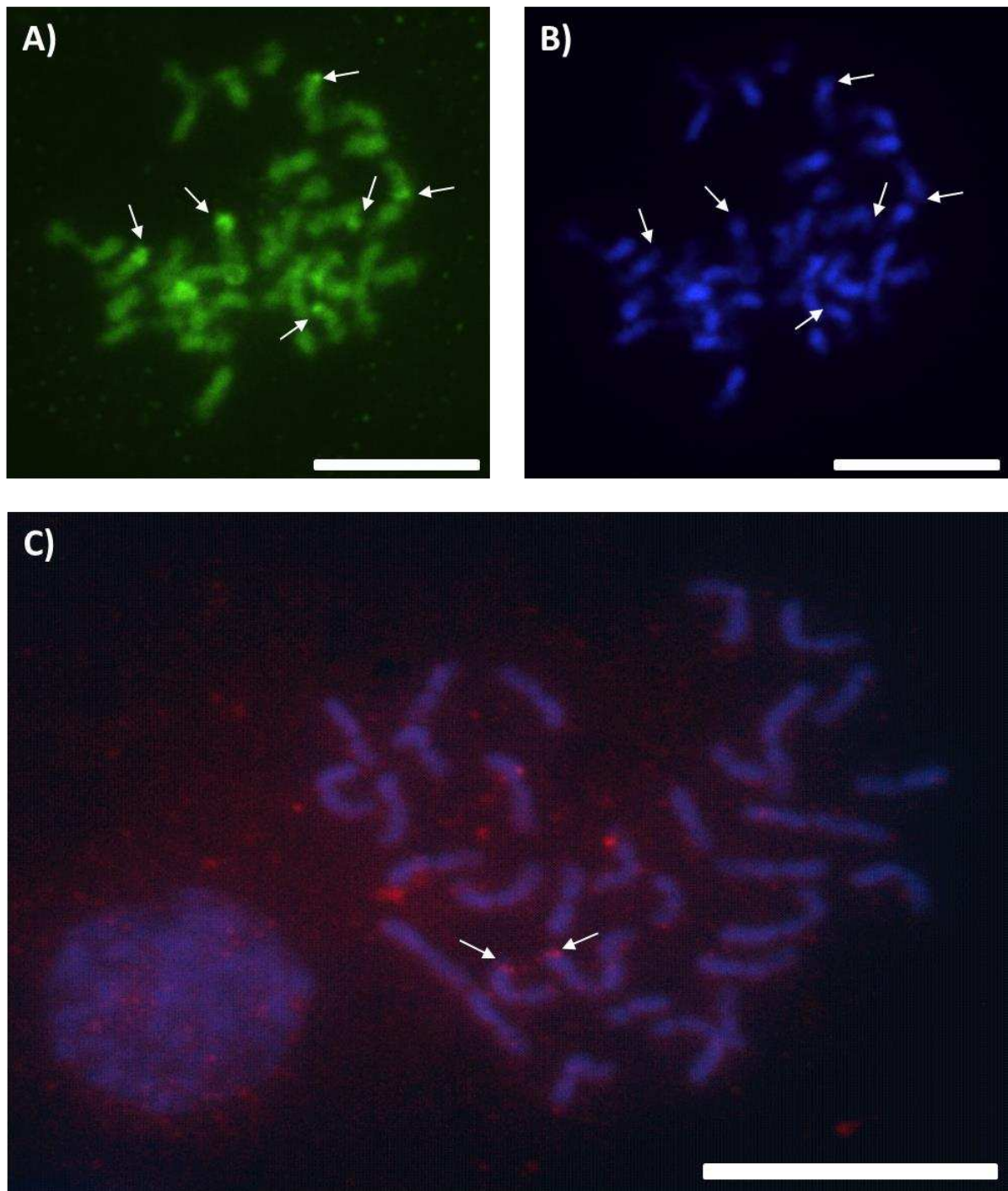


Figura 12. Fluorocromos e FISH em *Partamona* sp.. **A)** e **B)** Fluorocromos: CMA₃ (**A**), setas apontam regiões CMA₃⁺/DAPI⁻; DAPI (**B**), setas apontam regiões DAPI⁻/CMA₃⁺. **C)** FISH evidenciando a região rDNA 18S (setas). Barra 10μm.

***Frieseomelitta* sp.**

As duas espécies do gênero *Frieseomelitta* analisadas neste trabalho apresentaram número cromossômico $2n=30$, coincidindo com o observado para as demais espécies de *Frieseomelitta* que tiveram seu cariótipo descrito. Esse número cromossômico não é comum entre os Meliponini, tendo sido observado apenas em outros três gêneros, *Duckeola* (Kerr, 1972), *Geotrigona* (Rocha et al., 2003) e *Leurotrigona* (Pompolo e Campos, 1995). Destes quatro gêneros, apenas *Duckeola* apresenta uma estreita relação filogenética com o gênero *Frieseomelitta* (Rasmussen e Cameron, 2010), além de serem morfolologicamente muito semelhantes.

A fórmula cariotípica obtida para ambas espécies foi $2K=4A+20A^M+4M+2M^{ct}$ (fig. 13A e 13B). O alto número de cromossomos pseudoacrocêntricos foi consistente com os resultados previamente reportados no gênero, exceto para *F. trichoceratta* (Costa (2003), citado por Carvalho e Costa, 2011), em que foi observado um número alto de cromossomos acrocêntricos.

As espécies de *Frieseomellita* avaliadas nesse estudo mostraram fórmula cariotípica similar. A conservação da fórmula cariotípica também foi observada nas espécies *F. dispar*, *F. francoi*, *F. varia*, *F. doederleini*, *F. languida*. Assim como encontrado no presente trabalho, Carvalho e Costa (2011) observaram em *F. dispar* e *F. francoi* dois pares de cromossomos metacêntricos com cromatina terminal. Além disso, essa morfologia parece corresponder ao décimo par cromossômico em *F. varia* e ao nono par em *F. doederleini* observados por Rocha et al. (2003). Segundo Imai (1991), cromossomos dessa morfologia seriam produtos de inversões pericêntricas de um ancestral acrocêntrico.

Não foi possível observar marcações de fluorocromos (CMA₃ e DAPI) e FISH devido à qualidade das preparações.

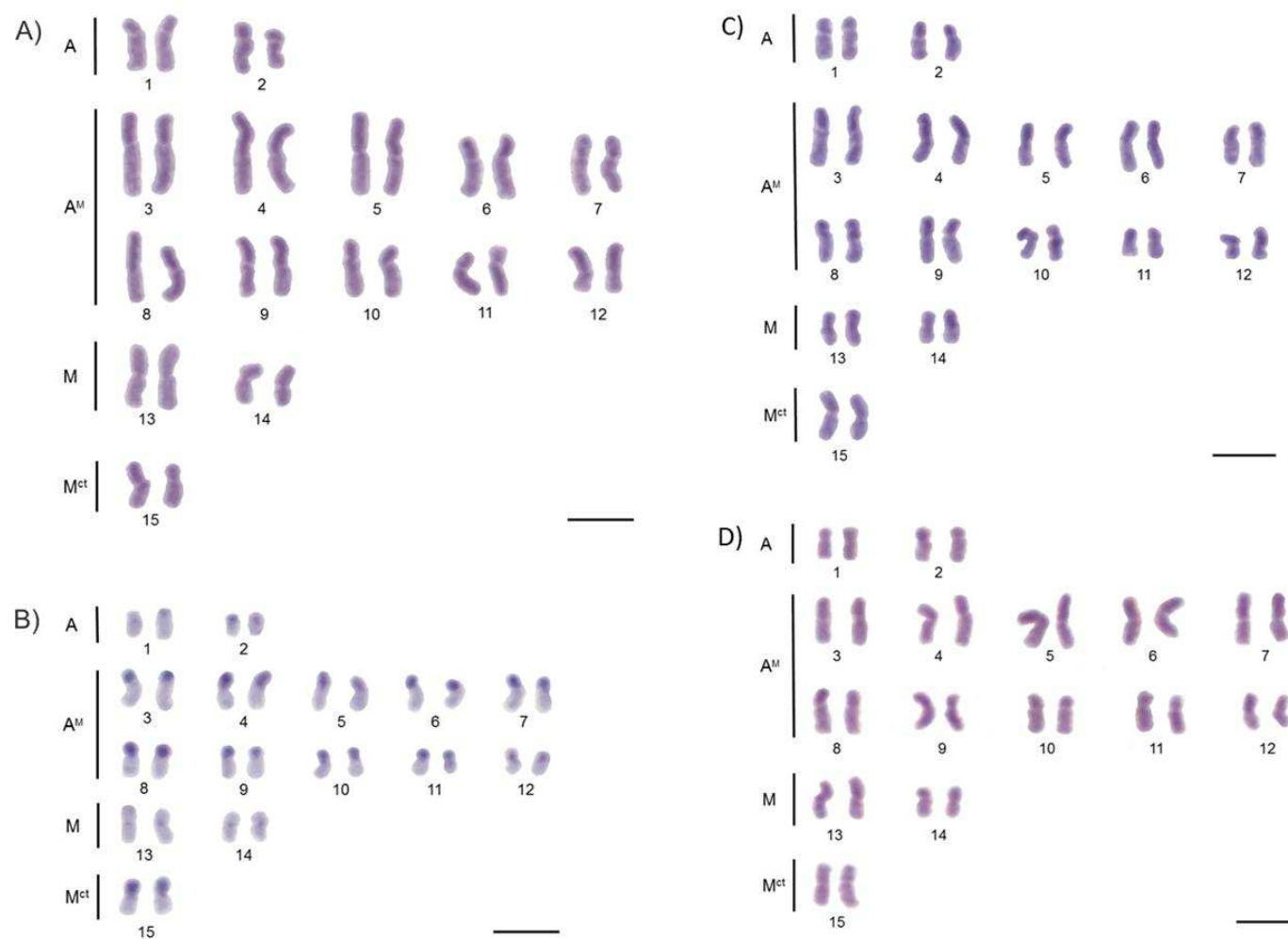


Figura 11. Cariótipo dos cromossomos metafásicos de *Partamona* sp.. **A)** coloração convencional e **B)** Banda C. Barra = 5μ

4.2. Evolução cromossômica

O número cromossômico observado nesse trabalho para as espécies *Nannotrigona punctata*, *Scaptotrigona bipunctata* e *Partamona* sp. foi $2n=34$, um número comum observado nos Meliponini (Rocha et al., 2003). Já as duas espécies de *Frieseomelitta* estudadas (sp1 e sp2), apresentaram $2n = 30$ cromossomos, que é um número menos frequente entre as abelhas sem ferrão Neotropicais, tendo sido descrito apenas nos gêneros *Duckeola* (Kerr, 1972), *Geotrigona* (Pompolo e Campos, 1995), *Celetrigona* (Maurício et al, 2012; Tarelho, 1973) e *Leurotrigona* (Rocha et al., 2003).

De acordo com a filogenia proposta por Rasmussen e Cameron (2010), os Meliponini Neotropicais inicialmente divergiram em dois clados, separando *Trigonisca sensu lato* (Clado *Trigonisca s.l.*), que compreende os gêneros *Dolichotrigona*, *Trigonisca*, *Celetrigona* e *Leurotrigona*, do restante dos meliponíneos. Posteriormente houve uma segunda separação entre *Melipona sensu lato* (*Melipona s.l.*) e os demais Meliponini (chamado no presente trabalho de Clado 3) (figura 14).

A Teoria da Interação Mínima, proposta por Imai (1986) e adaptada para abelhas e vespas (Hoshiba e Imai, 1993) propõe que os cariótipos hoje observados nos Meliponinni seriam derivados de eventos de fissão ocorridos em um ancestral com baixo número cromossômico e posterior acúmulo de heterocromatina. Esses eventos levariam ao aumento do número de cromossomos e ao surgimento de braços heterocromáticos.

O cariótipo da maioria dos gêneros de meliponíneos parece ter evoluído de acordo com essa teoria (Rocha et al., 2003). Porém, os dados citogenéticos do gênero *Melipona* não corroboram com essa explicação para a evolução cromossômica do gênero, já que possuem baixo número de cromossomos ($n=9$ e $2n=18$), sendo que a maioria possui morfologia metacêntrica, diferentemente dos pseudoacrocêntricos observados predominantemente no restante da tribo. Além disso, apresentam distribuição da heterocromatina muito diferente do esperado segundo a teoria proposta por Imai. (Rocha, 2002). Assim, os processos envolvidos na evolução cromossômica de *Melipona* parecem ter sido diferente dos outros meliponíneos Neotropicais, o que pode ser reforçado pela filogenia proposta por

Rasmussen e Cameron (2010), visto que as espécies de *Melipona* estão agrupadas em um ramo a parte (Figura 14).

Dentro do Clado 3 estão incluídas espécies de vários gêneros, que estão distribuídos em toda região a Neotropical. O número cromossômico $2n=34$ é uma característica compartilhada pela maioria das espécies desse clado para as quais já foram realizados estudos citogenéticos. Isso sugere que esse caráter, possivelmente, é mais antigo e as variações numéricas observadas em alguns gêneros são devidas a rearranjos ocorridos mais recentemente. Algumas exceções no número cromossômico são observadas nos gêneros *Lestrimelitta* ($n=14$, $2n=28$; Tarelho, 1973 e Rocha et al., 2003), *Duckeola* ($n=15$; Kerr, 1969), *Frieseomelitta* ($n=15$, $2n=30$; Tarelho, 1973; Rocha et al., 2003 e Carvalho e Costa, 2011), *Parapartamona* ($n=16$, $2n=32$; Bravo e Arcos, 1991) e *Geotrigona* ($n=17$, $n=15$; Tarelho, 1973 e Rocha et al., 2003). Outros gêneros, como *Tetragonisca* (Barth et al., 2010) e *Partamona* (Costa et al., 1992; Marthe et al., 2010) apresentam variações numéricas as quais estão relacionadas com a presença de cromossomos supranumerários. Para todos os indivíduos analisados no presente trabalho, o número cromossômico determinado coincidiu com o já reportado para outras espécies dos mesmos gêneros o que mostra que é a manutenção do número cromossômico dentro de cada gênero é comum. Uma exceção foi observada no gênero *Trigona* (Domingues, 2005), em que a espécie *Trigona fulviventrís* apresenta 32 cromossomos enquanto o restante do gênero possui 34.

A espécie *Nannotrigona punctata* apresentou cromossomos com morfologias muito distintas das obtidas para o gênero por Rocha e colaboradores em 2003. *Scaptotrigona bipunctata* apresentou padrão com menos variações na morfologia se comparada às demais espécies descritas do gênero (Tarelho, 1973; Hoshiba e Imai, 1993; Rocha et al., 2003), tendo como único destaque dois pares cromossômicos com morfologia distinta das descritas anteriormente (A^{ec}). Apesar da constância no número cromossômico entre e dentro dos gêneros, as morfologias cromossômicas são variadas, sendo comum que cariótipos de espécies do mesmo gênero sejam bastante diferentes, principalmente em relação à quantidade e distribuição da heterocromatina. Isso foi observado em *Partamona* (Brito-Ribon et al., 1999; Marthe et al., 2010), *Tetragonisca* (Barth et al., 2011), *Plebeia* (Godoy et al., 2013) e *Cephalotrigona* (Miranda et al., 2013), além de casos em que ocorrem polimorfismos intraespecíficos como visto em *Plebeia* por Caixeiro (1999) e Godoy et al. (2013).

A espécie *Partamona* sp. apresentou cromossomos com morfologia predominantemente acrocêntrica e pseudoacrocêntrica e apenas um par metacêntrico. Dentro do gênero *Partamona* já foram observadas muitas diferenças na morfologia dos cromossomos (Brito, 1998; Brito-Ribon et al., 1999; Brito et al. 2003; Brito et al, 2005; Marthe et al., 2010) em que algumas espécies apresentam cromossomos predominantemente metacêntricos com heterocromatina pericentromérica enquanto que outras espécies apresentam cromossomos acrocêntricos e pseudoacrocêntricos, com deposição de heterocromatina em um dos braços.

Para o gênero *Frieseomelitta*, as duas espécies estudadas apresentaram muita similaridade com os cariótipos descritos por Carvalho e Costa em 2011, porém apresentaram diferenças significativas das encontradas por Rocha e colaboradores em 2003.

Essas diferenças nas morfologias cromossômicas refletem os processos envolvidos na evolução cariotípica destes organismos, que podem estar ocorrendo de maneira diferente dentro de cada gênero. Dessa forma, a ampliação do número de espécies citogeneticamente estudadas contribuirá para o melhor entendimento da evolução de cada gênero, permitindo a construção de uma possível hipótese sobre o caminho evolutivo nos Meliponini, já que a Teoria da Interação Mínima proposta por Imai parece não se aplicar da mesma forma a todos os membros dessa tribo.

Com base nos dados obtidos através do uso de fluorocromos pode-se perceber que a cromatina apresenta composição diferencial, tendo sido possível observar bandas nos cromossomos, que evidenciam regiões ricas em GC ($\text{CMA}_3^+/\text{DAPI}^-$) e regiões ricas em AT ($\text{CMA}_3^-/\text{DAPI}^+$). Da mesma forma, a heterocromatina, o padrão de bandas base-específico também foi diferente nas espécies avaliadas em relação a outras espécies dentro do gênero. Isso ressalta a importância de rearranjos dentro de cada gênero.

Nas espécies em que foi possível identificar a região dos genes do 18S rDNA, o número de marcações da FISH foi diferente do encontrado para o CMA_3 . Contudo, apenas uma análise mais refinada dessa região e da morfologia do cromossomo onde ela se encontra, permitirá o estabelecimento de uma possível correspondência entre as regiões marcadas pela FISH com as regiões CMA_3 positivas. O mapeamento físico da região rDNA 18S no gênero *Partamona* já foi

realizado por Brito et al. (2005), enquanto que para os gêneros *Nannotrigona* e *Scaptotrigona* os dados do FISH desse trabalho são inéditos.

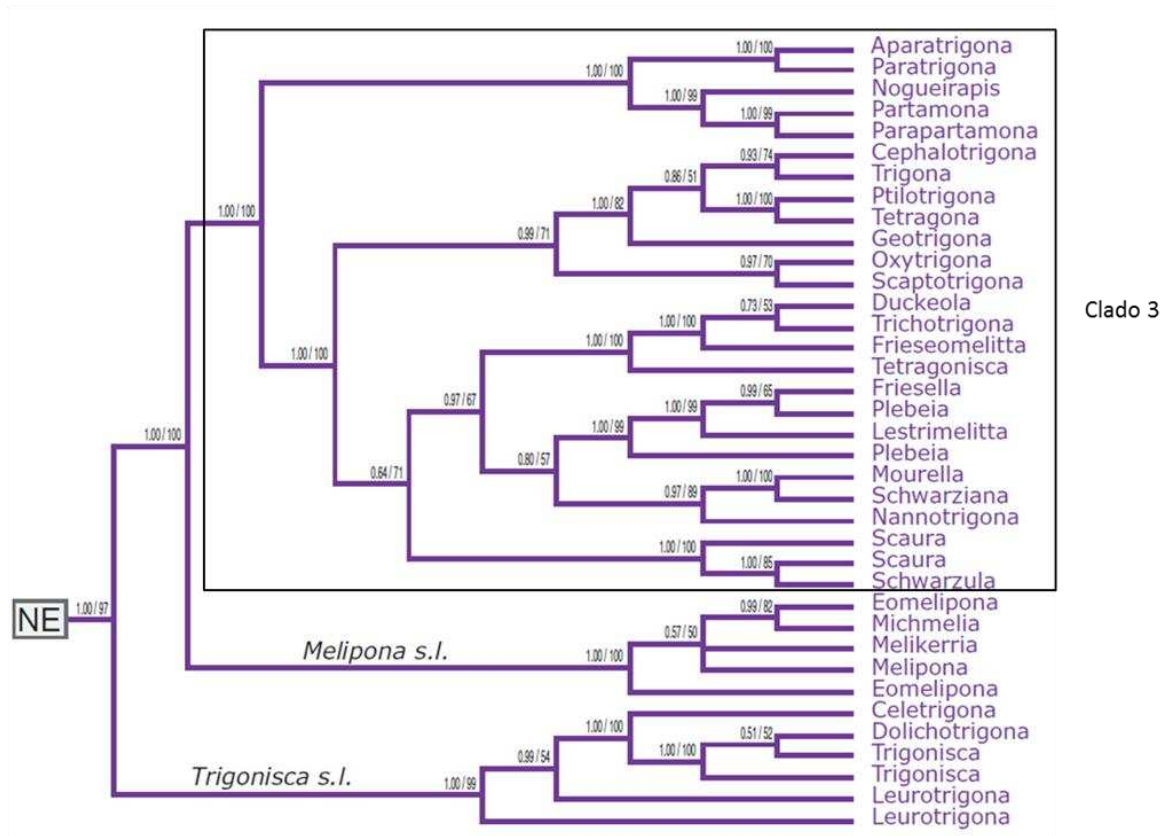


Figura 14. Filogenia dos Meliponini do novo mundo proposta por Rasmussen e Cameron (2010). (Imagem adaptada de Rasmussen e Cameron, 2010)

4.3. Citogenética e Biodiversidade

A região amazônica possui uma das maiores biodiversidades com elevado número de espécies restritas a esse bioma. Portanto, o conhecimento acerca dessa região poderá auxiliar na preservação de varias espécies.

Nesse trabalho foram avaliadas cinco espécies de Meliponini. Apenas duas puderam ser identificadas a nível de espécie. As outras três apresentaram

caracteres que não se enquadravam nas chaves taxonômicas disponíveis, e, possivelmente são espécies ainda não descritas (Silveira, comunicação pessoal).

Diversos gêneros de Meliponini apresentam similaridade no que se refere ao número cromossômico. Tal padrão parece independente da distribuição geográfica e bioma em que as espécies são encontradas, visto que mesmo espécies pertencentes a regiões morfoclimáticas distantes apresentam o mesmo número cromossômico (Rocha et., 2003, Rocha et al., 2002, Miranda et al., 2013). Porém, outras características como padrão de distribuição de heterocromatina, composição da cromatina, número de NORs podem variar tanto intra quanto inter espécies, conforme visto nesse trabalho. Isso pode refletir alterações e rearranjos que estejam ocorrendo em nível específico ou de gênero. Nesse sentido espécies com distribuição mais restrita podem reter uma variabilidade genética, que não é vista em outras espécies do gênero encontradas em outras regiões.

Comparando as duas espécies identificadas taxonomicamente *Nannotrigona punctata* e *Scaptotrigona bipunctata* podemos observar padrões citogenéticos que ajudam a entender a importância da preservação da região amazônica e da biodiversidade como um todo.

A espécie *Scaptotrigona bipunctata* apresenta uma ampla distribuição abrangendo áreas pertencentes a diferentes biomas (Camargo e Pedro 2013). Os dados citogenéticos obtidos nesse estudo e comparados com os de outras espécies deste gênero (Rocha et al., 2003) mostram que os cariótipos possuem muita similaridade, com predominância de cromossomos do tipo A e A^M, embora variações possam ser encontradas. Duarte et al. (2009) estudando populações de *S. xanthotricha* da região nordeste e sudeste, observaram diferenças na composição cariótica, como a presença de cromossomos metacêntricos e a ocorrência de múltiplas regiões NOR entre as populações. Esses cromossomos metacêntricos encontrados por Duarte et al. (2009) também foi encontrado em uma população da região de Piranga (MG) por Rocha et al., 2003. Deste modo, espécies com ampla distribuição podem apresentar variações associadas a adaptações locais, porém algum mecanismo leva a homogeneidade de seu cariótipo ao longo de sua distribuição.

A espécie *Nannotrigona punctata*, por outro lado, apresenta uma distribuição restrita à região amazônica, ao contrário da espécie *Nannotrigona testaceicornis* cuja distribuição abrange a região sudeste e sul do Brasil (Camargo e Pedro 2013).

Essas duas espécies apresentam morfologias cromossômicas muito diferentes, como a presença de bandas intersticiais observadas em alguns cromossomos de *N. punctata* e não observadas por Rocha et al. (2003) em *N. testaceicornis*.

Outro exemplo que demonstra a importância da conservação da biodiversidade encontrada na região Amazônica é observado no gênero *Melipona*. Dentre as 17 espécies analisadas citogeneticamente, *Melipona seminigra* é a única que apresenta variação no número cromossômico, $n=11$, $2n=22$ (Francini et al., 2002) enquanto o restante das espécies apresenta número diploide muito conservado com $n=18$ (Rocha et al., 2002).

Assim, características vistas em espécies dessa região podem ser perdidas caso sejam extintas por causas naturais ou antrópicas. Dessa forma, o conhecimento acerca da variabilidade dessa região pode auxiliar estudos de conservação.

5. CONCLUSÕES

O número cromossômico das cinco espécies analisadas foi constante quando comparada com o reportado para outras espécies dos respectivos gêneros.

Características como a distribuição da heterocromatina, número de marcações CMA3 e de rDNA 18S refletem diferenças entre as espécies, demonstrando a importância de outros rearranjos, não somente fissão, na evolução cariotípica em Meliponini, visto que o número cromossômico permanece o mesmo.

As espécies de Meliponini estudadas de distribuição restrita à Amazônia apresentam composição cariotípica bastante diferente das espécies com ampla distribuição, reforçando a importância da preservação desta área e da ampliação de estudos de citogenética, de variabilidade genética e de ecologia das abelhas encontrados nessa região.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARTH, A.; FERNANDES, A.; POMPOLO, S.; COSTA, M. 2010. Occurrence of B-chromosomes in *Tetragonisca* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Meliponini): a new contribution to the cytotaxonomy of the genus. *Genetics and Molecular Biology*, 34(1):77-79.
- BEATTY, B.; MAI, S.; SQUIRE, J.A. 2002. FISH. Toronto: Oxford University Press, 255 p.
- BELO MONTE. 2011. Disponível em: <http://blogbelomonte.com.br/novo/2011/08/08/obras-em-belo-monte-incluem-resgate-de-animais-e-vegetais-e-pesquisa-de-sitios-arqueologicos/>. Acessado em 28/06/2014.
- BRAVO, F.; ARCOS, L. 1991. O cariótipo das espécies de *Parapartamona* (Schwarz) (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) e comentários sobre a sistemática do gênero. *Revista Brasileira de Entomologia* 35(4):755-759.
- BRITO, R. M.; COSTA, M. A.; POMPOLO, S. G. 1997. Characterization and distribution of supernumerary chromosomes in 23 colonies of *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Brazilian Journal of Genetics*, 20(2):185-188.
- BRITO, R. M. 1998. Caracterização citogenética de duas espécies do gênero *Partamona*, Schwarz 1939 (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa.
- BRITO, R. M.; CAIXEIRO, A. P. A.; POMPOLO, S. G.; AZEVEDO, G. C. 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*, vol.26, n.1, pp. 53-57.
- BRITO, R. M.; POMPOLO, S. G.; MAGALHAES, M. F. M.; BARROS, E. G.; SAKAMOTO-HOJO, E. T. 2005. Cytogenetic characterization of two *Partamona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) by fluorochrome staining and localization of 18S r DNA clusters by FISH. *Cytologia*, v. 70, p. 373-380.
- BRITO-RIBON, R. M.; MIYAZAWA, C. S.; POMPOLO, S. G. 1999. First Karyotype Characterization of four Species of *Partamona* (Fries, 1980) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) in Mato Grosso State - Brazil. *Cytobios*, 100:19-26.
- CAIXEIRO, A. P. A.; POMPOLO, S. G. 1999. Caracterização citogenética da heterocromatina constitutiva e sua implicação na evolução do cariótipo do gênero *Plebeia* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). *Genetics and Molecular Biology*, 22(3):31-32.
- CAIXEIRO, A. P. A.; BRITO, R. M.; POMPOLO, S. G.; AZEVEDO, G. G. 2003. Cytogenetic data of *Partamona peckolti* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) by C banding and fluorochrome staining with DA/CMA₃ and DA/DAPI. *Genetics and Molecular Biology*, Ribeirão Preto, v. 26, n.1, p. 53-57.

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 - online version. Available at <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Accessed Jul/14/2014.

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):237-9.

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.

CREMER, T.; LANDEGENT, J.; BRÜCKNER, A.; SCHOLL, H. P.; SCHARDIN, M.; HAGER, H. D.; DEVILLE, P.; PEARSON, P.; VAN DER PLOEG, M. 1986. Detection of chromosome aberrations in the human interphase nucleus by visualization of specific target DNAs with radioactive and non-radioactive *in situ* hybridization techniques: diagnosis of trisomy 18 with probe L1.84. Human Genetics, 74(4):346–352.

DOMINGUES, A. M. T.; WALDSCHMIDT A. M.; ANDRADE, S. E.; ANDRADE-SOUZA, V.; ALVES, R. M. O.; SILVA J. J. C.; COSTA, M. A. 2005. Karyotype characterization of *Trigona fulviventrtris* Guérin, 1835 (Hymenoptera, Meliponini) by C banding and fluorochrome staining: Report of a new chromosome number in the genus. Genetics and Molecular Biology, 28:390–393.

DROUIN, G.; MUNIZ-DE-SÁ, M. 1995. The concerted evolution of 5S ribosomal genes linked to the repeat units of other multigene families. Molecular Biology and Evolution, 12:481-493.

DUARTE, O. M. P.; MARTINS, C. C. C.; WALDSCHMIDT, A. M.; COSTA, M. A. 2009. Occurrence of multiple NORs and intraspecific karyotype variation in *Scaptotrigona xanthotricha* Moure (Hymenoptera, Meliponini). Genetics and Molecular Research, v. 8, p. 831-839.

FEARNSIDE, P. M. 2006. Dams in the Amazon: Belo Monte and Brazil's Hydroelectric Development of the Xingu River Basin. Environmental Management, 38(1):16-27.

FONTANA, F.; LANFREDI, M.; CONGIU, L.; LEIS, M.; CHICCA, M.; ROSSI, M. 2003. Chromosomal mapping of 18S–28S and 5S rRNA genes by two-colour fluorescent *in situ* hybridization in six sturgeon species. Genome, 46: 473–477.

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 agrícola, 68(5): pp. 592-593.

GALL, J. G.; PARDUE, M. L. 1969. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 63:378–383.

GODOY, D. C.; FERREIRA, R. P.; LOPES, D. M. 2013. Chromosomal Variation and Cytogenetics of *Plebeia lucii* and *P. phrynostoma*. *Florida Entomologist* 96(4)

GUERRA, M. S. 1988. Introdução à Citogenética Geral. Guanabara Koogan, Pernambuco, 139 p.

HOSHIBA, H.; IMAI, H. T. 1993. Chromosome evolution of bees and wasps (Hymenoptera, Apocrita) on the basis of C-banding pattern analyses. *Japanese Journal of Entomology*, 61: 465-492.

HOWELL W. M.; BLACK, D. A. 1980. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, 36:1014-1015.

IBGE. 2011. Geoestatísticas de recursos naturais da Amazônia Legal : 2003/ IBGE, Coordenação de Recursos Naturais e Estudos Ambientais. Rio de Janeiro, 249p.

IMAI, H. T.; MARUYAMA, T.; GOJOBORI T.; INOUE , Y.; CROZIER, R. H. 1986. Theoretical bases for karyotype evolution. The minimum-interaction hypothesis. *American Naturalist*, 128: 900-920.

IMAI, H. T.; TAYLOR, R. W.; CROSLAND, M. W. J.; CROZIER, R. H. 1988. Modes of spontaneous evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis. *Japanese Journal of Genetics*, 63: 159-185.

IMAI. H. T. 1991. Mutability of constitutive heterochromatin (Cbands) during eukaryotic chromosomal evolution and their cytological meaning. *Japanese Journal of Genetics*, 66:635-661.

KERR, W. E. 1948. Estudos sobre o gênero *Melipona*. *Anais da E. S. A. "Luiz de Queiroz"*, 5: 182-276

KERR W. E.; SILVEIRA Z. V. 1972. Karyotypic evolution of bees and corresponding taxonomic implications. *Evolution*, 26:197–202.

KERR, W. E.; CARVALHO, G. A.; NASCIMENTO, V. M. 1996. *Abelha Uruçu. Biologia, Manejo e Conservação. Coleção Manejo da Vida Silvestre*, v. 2. Fundação Acangaú, Belo Horizonte, 143 pp.

KERR, W. E. ; CARVALHO, G. A.; SILVA, A. C.; ASSIS, M. G. P. 2001. Aspectos pouco mencionados da biodiversidade amazônica. *Parcerias Estratégicas*, Brasília - DF, n. 12, p. 20-41.

LOPES, D. M.; FERNANDES, A.; CAMPOS, L. A. O. 2011. Descrição cariotípica de *Partamona nhambiquara* e *Partamona chapadicola* (Hymenoptera, Meliponini) por

técnicas convencionais e moleculares. Anais da Segunda Reunião Brasileira de Citogenética, Águas de Lindóia.

MAMPUMBU, A. R. 2002. Análise citogenética da heterocromatina e da NOR em populações de abelhas sem ferrão *Friesella schrottkyi* (FRIESE, 1900) (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). Dissertação de Mestrado, Unicamp, Campinas.

MANDRIOLI, M.; MANICARDI, G. C.; MACHELLA, N.; CAPUTO, V. 2001. Molecular and cytogenetic analysis of the goby *Gobius niger* (Teleostei, Gobiidae). Genetica 110:73–78.

MARTHE, J. B.; POMPOLO, S. G.; CAMPOS, L. A. O.; SALOMÃO, T. M. F.; TAVARES, M. G. 2010. Cytogenetic characterization of *Partamona cupira* (Hymenoptera, Apidae) by fluorochromes. Genetics and Molecular Biology, 33(2): 253–255.

MARTINS, C. C. C.; DUARTE, O. M. P.; WALDSCHMIDT, A. M.; ALVES, R. M. O.; COSTA, M. A. 2009. New occurrence of B chromosomes in *Partamona helleri* (Friese, 1900) (Hymenoptera, Meliponini). Genetics and Molecular Biology, 32(4), 782-785.

MARTINS, C. C. C.; WALDSCHMIDT, M. O.; COSTA, M. A. 2014. Unprecedented record of ten novel B chromosomes in the stingless bee *Partamona helleri* (Apidae, Meliponini). Apidologie, 45(4), pp 431-439.

MAURÍCIO, B. S. S.; FERREIRA, R. P.; LOPES. 2012. Karyotypic description of the stingless bee *Celetrigona longicornis* (Friese, 1903) by c-banding. Anais do X Encontro sobre Abelhas, Ribeirão Preto, p319.

MENEZES, M. B. F. 1997. Caracterização citogenética e análise da heterocromatina constitutiva em *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Meliponinae). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil.

MICHENER, C.D. 2007. The Bees of the World, 2nd Ed. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, 953 pp.

MILLER, O. L. Jr. 1981. The nucleolus, chromosomes, and visualization of genetic activity. The Journal of Cell Biology, 91(3 Pt 2):15s-27s.

MIRANDA, A. F. 2002. Estudos citogenéticos e moleculares do gênero *Partamona*: filogenia e cromossomo B. Tese de doutorado, Universidade Federal de Viçosa, 60p.

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.

MORATO, E. F.; CAMPOS, L. A. O. 2000. Efeitos da fragmentação florestal sobre vespas e abelhas solitárias em uma área da Amazônia Central. Revista brasileira de Zoologia, 17(2):429-444.

PEDRO, S. R. M.; CAMARGO, J. M. F. 2003. Meliponini Neotropicais: o gênero *Partamona* Schwarz, 1939 (Hymenoptera, Apidae). Revista Brasileira de Entomologia, 47(supl. 1): 1-117.

PEREIRA, J. O. 2006. Diversidade genética da abelha sem ferrão *Melipona quinquefasciata* baseada no seqüenciamento das regiões ITS1 parcial e 18S do DNA ribossômico nuclear. Tese de doutorado, Universidade Federal do Ceará, 141p.

PINKEL, D., STRAUME, T., GRAY, J.W. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. Proceedings of the National Academy of Sciences, 83: 2934-2938.

POMPOLO S. G. 1992. Estudos citogenéticos em meliponinae. Naturalia, (Special Issue):62–66.

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: 181-184.

RASMUSSEN, C.; CAMERON, S.A. 2010. Global stingless bee phylogeny supports ancient divergence, vicariance, and long distance dispersal. Biological Journal of the Linnean Society, 99:206–232.

ROCHA M. P.; POMPOLO S. G. 1998. Karyotypes and heterochromatin variation in *Melipona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) Genetics and Molecular Biology, 21:41–45.

ROCHA M. P.; POMPOLO S. G.; DERGAM J. A.; FERNANDES, A.; CAMPOS, L. A. O. 2002. DNA characterization and karyotypic evolution in the bee genus *Melipona* (Hymenoptera, Meliponini) Hereditas, 136:19–27.

ROCHA, M. P.; POMPOLO, S. G.; CAMPOS L. A. O. 2003. Citogenética da tribo Meliponini (Hymenoptera, Apidae). In: Melo, G. A. R. and Santos, I. A. (eds) Apoidea Neotropica: Homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure. UNESCO, Criciúma, pp 311-320.

SCHWEIZER D. 1980. Simultaneous fluorescent staining of R bands in a specific heterochromatin regions (DA/DAPI - bands) in human chromosomes. Cytogenetics and Cell Genetics, 27: 190-193.

SEABRIGHT, M. A. 1971. A rapid banding technique for human chromosomes. The Lancet, 971-72.

SILVEIRA F. A.; MELO, G. A. R.; ALMEIDA, E. A. B. 2002. Abelhas Brasileiras. Sistemática e Identificação. Fundação Araucária, Belo Horizonte, 253 pp.

SOUZA, M. T. 2010. Identificação molecular de abelhas sem ferrão da Amazônia. Dissertação de mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

SUMNER, A. T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*, 75: 304-306.

SUMNER, A. T. 2003. *Chromosomes: organization and function*. London, Blackwell Publishing, 287p.

TARELHO, Z. V. S. 1973. *Contribuição ao estudo citogenético dos Apoidea*. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, vii+112p.

TAVARES, M. G.; CARVALHO, C. R.; SOARES, F. A. F. 2010. Genome size variation in *Melipona* species (Hymenoptera: Apidae) and sub-grouping by their DNA content. *Apidologie*, 41:636-64.

TOSTA, V. C.; WALDSCHMIDT, A. M.; BRITO, R. M.; POMPOLO, S. G.; SALOMÃO, T. M. F.; BARROS, E. G.; CAMPOS, L. A. O. 1998. Marcadores moleculares RAPD ligados à presença de cromossomos supranumerários em *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae). *Genetics and Molecular Biology*, 21, suppl.: 83. 44° Congresso Nacional de Genética, Águas de Lindóia, Brazil.