
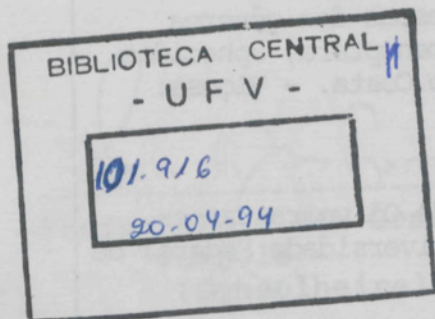


MARCO ANTONIO COSTA

UFV	BIBLIOTECA BBT	OBRA RG000728519
	CLASSIFICACAO T 591.87322 / C837e / 1994	
TITULO Estudos citogeneticos em vespas dos genero		
		
101916 BBT		

ESTUDOS CITOGENETICOS EM VESPAS DOS GENEROS *Microstigmus* E
Spilomena (HYMENOPTERA, SPHECIDAE, PEMPREDONINAE)



Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como Parte das Exigências do Curso de Genética e Melhoramento, para a Obtenção do Título de "Magister Scientiae"

T
591.87322
C837e
1994
4.2

VIÇOSA

MINAS GERAIS - BRASIL

JULHO DE 1994

DOAÇÃO

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

Costa, Marco Antônio, 1965-
C837e Estudos citogenéticos em vespas dos gêneros
1994 *Microstigmus* e *Spilomena* (Hymenoptera, Sphecidae,
Pemphredoninae)/Marco Antônio Costa. - Viçosa:
UFV, 1994.
75p. : il.

Orientador: Lúcio Antônio de Oliveira Campos.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

1. Vespas - Citogenética. 2. Vespas - Morfologia
dos cromossomos. 3. Vespas - Filogenia. 4. Inse-
tos - Citogenética. 5. Citogenética. I. Universi-
dade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD. 18.ed. 591.87322

CDD. 19.ed. 591.87322

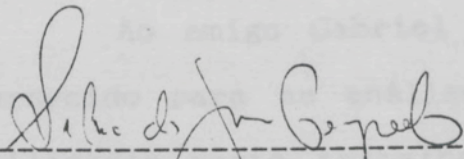
MARCO ANTONIO COSTA

ESTUDOS CITOGENETICOS EM VESPAS DOS GENEROS *Microstigmus* E
Spilomena (HYMENOPTERA, SPHECIDAE, PEMPHREDONINAE)

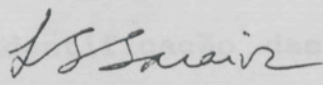
AGRADECIMENTOS

Tese Apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como Parte das
Exigências do curso de Genética e
Melhoramento, para Obtenção do
Titulo de "Magister Scientiae".

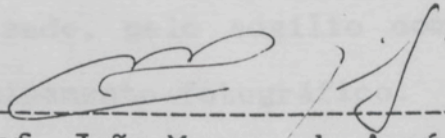
APROVADA: 21 de dezembro de 1993.



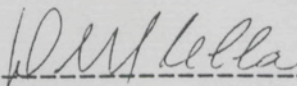
Prof. Silvia das Graças
Pompolo
(Conselheira)



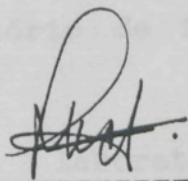
Prof. Luiz Sérgio Saraiva
(Conselheiro)



Prof. João Marcos de Araújo



Profa. Doralice Maria Cella



Prof. Lúcio Antônio de Oliveira Campos
(Orientador)

Aos amigos Priscilla, Paulo, Adriano, Júlio e José Maurício, pelo auxílio com o computador durante o período de digitação do texto.

Ao técnico José Estêvão, pela colaboração na parte de laboratório.

Aos demais membros da banca examinadora, Profa. Doralice Maria Cella, Prof. Luiz Sérgio Saraiva e Prof. João Marcos Araújo, pelas críticas e apresentadas.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização deste curso.

Aos órgãos financiadores CNPq e FAPEMIG, pelo

suporte. Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho. Agradeço particularmente:

Ao Prof. Lucio Antonio de Oliveira Campos, pela orientação e pelo apoio durante a realização deste trabalho.

A Profa. Silvia das Graças Pompolo pela orientação, pelo incentivo e pela amizade.

Ao amigo Gabriel Augusto R. de Melo pelo material fornecido para as análises e a identificação das espécies utilizadas neste trabalho e, também, pelo convívio e pela amizade.

Ao Prof. Eldo Antonio Monteiro da Silva, pela amizade, pelo auxílio com as fotografias e fornecimento do equipamento fotográfico.

A Prof. Aristéia Alves de Azevedo, por ter permitido a utilização do laboratório de fotografia e pelo convívio amigável.

Aos amigos do laboratório de genética, pela colaboração e amizade.

Aos amigos Priscila, Paulo, Adriano, Júlio e José Maurício, pelo auxílio com o computador durante o período de digitação da tese.

Ao técnico José Estêvão, pela colaboração na parte de laboratório.

Aos demais membros da banca examinadora, Profa. Doralice Maria Cella, Prof. Luiz Sérgio Saraiva e Prof. João Marcos Araújo, pelas críticas e sugestões apresentadas.

A Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização deste curso.

Aos órgãos financiadores CNPq e FAPEMIG, pelo fornecimento de bolsa e auxílio financeiro.

Viçosa, 18 de junho de 1985.

Entre os anos de 1982 e 1984 cursou o segundo grau na Central de Ensino e Desenvolvimento Agrário de Florestal (CEDAF), onde obteve formação como técnico em Agropecuária.

Em 1985 ingressou na Universidade Federal de Viçosa, onde obteve formação superior, tendo colado grau em janeiro de 1991 como Bacharel em Biologia.

Em março de 1991 iniciou o curso de mestrado em Genética e Melhoramento pela Universidade Federal de Viçosa. Após ter cumprido todas as exigências para obtenção do título de "Magister Scientiarum" defendeu sua tese em 21 de dezembro de 1993.

CONTÉUDO
BIOGRAFIA

	Página
EXTRATO	viii
MARCO ANTONIO COSTA, nasceu em Viçosa-MG em 19 de junho de 1965.	8
Entre os anos de 1982 e 1984 cursou o segundo grau na Central de Ensino e Desenvolvimento Agrário de Florestal (CEDAF), onde obteve formação como técnico em Agropecuária.	
Em 1986 ingressou na Universidade Federal de Viçosa, onde obteve formação superior, tendo colado grau em janeiro de 1991 como Bacharel em Biologia.	17
Em março de 1991 iniciou o curso de mestrado em Genética e Melhoramento pela Universidade Federal de Viçosa. Após ter cumprido todas as exigências para obtenção do título de "Magister Scientiae" defendeu sua tese em 21 de dezembro de 1993.	18
3.4.2. <i>Spilopsanus mansus</i>	18
3.4.3. <i>Spilopsanus alii</i>	19
3.5. <i>Microstigma</i> Grupo <i>xylicola</i>	19
3.5.1. <i>Microstigma viaticum</i>	19

Página

3.5.2. <i>Microstigmus xylicola</i>	20
3.6. <i>Microstigmus ayersii</i>	20
3.7. <i>Microstigmus</i> Grupo <i>hirstoni</i>	21
3.7.1. <i>Microstigmus</i> cfr. <i>hirstoni</i>	21
3.8. <i>Microstigmus</i> N458	21
3.9. <i>Microstigmus</i> Grupo GARM6	22
CONTEUDO	
3.9.1. <i>Microstigmus</i> N379	22
3.9.2. <i>Microstigmus</i> GARM15	22
3.9.3. <i>Microstigmus</i> GARM6	23
3.10. <i>Microstigmus</i> GARM11	23
EXTRATO	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL E METODOS	8
2.1. Coleta do Material	8
2.2. Obtenção dos Cromossomos Mitóticos	9
2.3. Banda C	12
2.4. Adaptações na Técnica de Banda C	13
3. RESULTADOS	15
3.1. <i>Spilomena</i> GARM2	17
3.2. <i>Spilomena</i> GARM5	17
3.3. <i>Spilomena</i> - Grupo <i>brasiliensis</i>	18
3.3.1. <i>Spilomena brasiliensis</i>	18
3.4. <i>Spilomena</i> Grupo <i>alini</i>	18
3.4.1. <i>Spilomena</i> GARM4	18
3.4.2. <i>Spilomena</i> Manaus	19
3.4.3. <i>Spilomena alini</i>	19
3.5. <i>Microstigmus</i> Grupo <i>xylicola</i>	19
3.5.1. <i>Microstigmus similis</i>	19

Página

	Página
3.5.2. <i>Microstigmus xylicola</i>	20
3.6. <i>Microstigmus myersi</i>	20
3.7. <i>Microstigmus</i> Grupo <i>hingstoni</i>	21
3.7.1. <i>Microstigmus</i> cfr. <i>hingstoni</i>	21
3.8. <i>Microstigmus</i> N458	21
3.9. <i>Microstigmus</i> Grupo GARM6	22
3.9.1. <i>Microstigmus</i> N379	22
3.9.2. <i>Microstigmus</i> GARM15	22
3.9.3. <i>Microstigmus</i> GARM6	23
3.10. <i>Microstigmus</i> GARM11	23
3.11. <i>Microstigmus</i> Grupo <i>wagneri</i>	23
3.11.1. <i>Microstigmus</i> GARM9	23
3.11.2. <i>Microstigmus</i> GARM3	24
3.12. <i>Microstigmus</i> Grupo <i>bicolor</i>	24
3.12.1. <i>Microstigmus</i> GARM2	24
3.12.2. <i>Microstigmus nigrophtalmus</i>	25
3.13. <i>Microstigmus</i> Grupo <i>luederwaldti</i>	25
3.13.1. <i>Microstigmus arlei</i>	25
3.13.2. <i>Microstigmus luederwaldti</i>	26
3.13.3. <i>Microstigmus</i> N390	26
3.14. <i>Microstigmus</i> Grupo <i>nigrifex</i>	26
3.14.1. <i>Microstigmus</i> N465	26
3.14.2. <i>Microstigmus</i> cfr. <i>nigrifex</i>	27
3.14.3. <i>Microstigmus</i> N411	27
3.15. <i>Microstigmus</i> N449	27
3.16. <i>Microstigmus</i> N570	28
3.17. <i>Microstigmus</i> N564	28
3.18. <i>Microstigmus brasiliensis</i>	28

3.19. <i>Microstigmus</i> Grupo <i>lobifex</i>	29
3.19.1. <i>Microstigmus</i> N439	29
3.19.2. <i>Microstigmus</i> N487	29
3.19.3. <i>Microstigmus</i> cfr. <i>lobifex</i>	29
3.19.4. <i>Microstigmus</i> N632	30
3.19.5. <i>Microstigmus</i> GARM4	30
2.20. <i>Microstigmus</i> Grupo <i>theridii</i>	31
4. DISCUSSÃO	41
4.1. Variação Interespecífica do Número Cromossômico	41
4.2. Evolução do Cariótipo em <i>Spilomena</i> e <i>Microstigmus</i> com Base na Hipótese da Interação Mínima (IMAI et al., 1986)	47
5. RESUMO E CONCLUSOES	66
BIBLIOGRAFIA	70

EXTRATO

COSTA, Marco Antônio, M. S., Universidade Federal de Viçosa, julho de 1994. **Estudos Citogenéticos em Vespas dos Gêneros *Microstigmus* e *Spilomena* (Hymenoptera, Sphecidae, Pemphredoninae)**. Professor Orientador: Lúcio Antonio de Oliveira Campos. Professores Conselheiros: Silvia das Graças Pompolo e Luiz Sérgio Saraiva

Microstigmus e *Spilomena* são pequenas vespas com tamanho variando de 3 a 5 mm de comprimento. *Microstigmus* tem distribuição restrita à região neotropical e *Spilomena* é cosmopolita.

O presente trabalho teve como objetivo determinar o número e a morfologia dos cromossomos em diferentes espécies de *Microstigmus* e *Spilomena* bem como estabelecer as relações filogenéticas entre elas com base na variação cariotípica encontrada.

Foram analisadas 36 espécies de *Microstigmus* e 6 espécies de *Spilomena*, tendo sido evidenciada uma grande variação no número cromossômico nestes dois gêneros. A distribuição destes números foi bimodal, com moda em $n=3$ e 5. Setenta e quatro por cento das espécies apresentaram $n \geq 5$. Estas observações levaram à sugestão de que um número

cromossômico baixo seja ancestral para o grupo em estudo. Os números maiores ou próximos teriam derivado dele, principalmente por rearranjos do tipo Robertsoniano.

Com base na variação numérica encontrada, foi possível dividir as espécies em três grupos cariotípicos. O grupo I foi mais heterogêneo, com n variando de 3 a 8 e contendo as espécies mais primitivas de *Microstigmus* e *Spilomena*. O grupo II foi mais homogêneo em torno de números elevados ($n=7$ a 11), porém com dois valores menores ($n=4$ e 5) e contendo espécies intermediárias de *Microstigmus*. O grupo III foi mais homogêneo em torno de números baixos ($n=3$ a 5) e contendo as espécies mais derivadas de *Microstigmus*.

A abordagem sobre a evolução do cariótipo foi mais difícil nos grupos I e II do que no grupo III, onde as mudanças numéricas e morfológicas foram menores e menos freqüentes.

O número de espécies estudadas ainda é pequeno para se discutir com mais segurança a evolução cariotípica nestas vespas. Um maior acúmulo de dados citogenéticos, incluindo novas espécies de *Microstigmus* e *Spilomena* poderá fornecer uma melhor definição para o esquema filogenético existente e também para o melhor entendimento da evolução do cariótipo no material em estudo.

(EVANS e WEST-EBERHARD, 1970; WILSON, 1971; MATTHEWS, 1965, 1991; MELO e CAMPOS, 1993), que apresenta um comportamento social primitivo, podendo ser encontradas até 16 adultos convivendo no ninho desta espécie (MATTHEWS e STARR, 1954).

Os Sphecidae, segundo BOHART e MENKE (1976) apresentam uma grande diversidade morfológica e são

1. INTRODUÇÃO

Microstigmus portensis à subfamília Pemphredoninae e tribo Pemphredonini (BOHART e MENKE, 1976). A subfamília Pemphredoninae, segundo levantamento de BOHART e MENKE (1976)

A ordem Hymenoptera, constituída por formigas, abelhas e vespas, apresenta uma grande diversidade de padrões de vida, nichos ocupados e evolução de formas sociais (CROZIER, 1977), o que a torna um interessante grupo para estudos de diversos aspectos da biologia. Um outro aspecto interessante desta ordem é o sistema de determinação de sexo por haplodiploidia, no qual os machos se desenvolvem a partir de ovos não-fecundados, através de um tipo de partenogênese haplóide ou arrenotoquia (KERR, 1952, 1969; CROZIER, 1977; CRUZ-LANDIM, 1984).

A família Sphecidae inclui 8000 espécies de vespas distribuídas em 226 gêneros (BOHART e MENKE, 1976). Trata-se de um grande grupo de vespas predadoras de aranhas e várias ordens de insetos.

O comportamento social das vespas é limitado quase que inteiramente à família Vespidae (WILSON, 1971). A maioria das vespas da família Sphecidae apresenta comportamento solitário, com exceção de *Microstigmus comes*

(EVANS e WEST-EBERHARD, 1970, WILSON, 1971, MATTHEWS, 1968, 1991, MELO e CAMPOS, 1993), que apresenta um comportamento eusocial primitivo, podendo ser encontrados até 18 adultos convivendo no ninho desta espécie (MATTHEWS e STARR, 1984)

Os Sphecidae, segundo BOHART e MENKE (1976) apresentam uma grande diversidade morfológica e são divididos em 11 subfamílias. Os gêneros *Spilomena* e *Microstigmus* pertencem à subfamília Pemphredoninae e tribo Pemphredonini (BOHART e MENKE, 1976): A subfamília Pemphredoninae, segundo levantamento de BOHART e MENKE (1976), reunia 715 espécies em 28 gêneros. Os dados apresentados por MELO (1993), juntamente com os de FINNAMORE (1987) e ANTROPOV (1992), elevam estes números para 30 gêneros e um total de 850 espécies.

O gênero *Spilomena* apresenta uma ampla distribuição geográfica, com cinco espécies neárticas, 22 paleárticas, quatro orientais, nove australianas e três neotropicais (BOHART e MENKE, 1976; ANTROPOV 1991). O gênero *Microstigmus* é restrito à região neotropical e possui 22 espécies descritas (RICHARDS, 1972; ANTROPOV, 1992; MELO, 1992; MELO e EVANS, 1993). No entanto pelo menos dez espécies novas de *Spilomena* e cerca de 40 de *Microstigmus* já foram encontradas, porém ainda não foram descritas (BOHART e MENKE, 1976; WEST-EBERHARD, 1977; Melo, dados não-publicados)

Tanto *Microstigmus* quanto *Spilomena* são pequenas vespas com 3 a 5 mm de comprimento (RICHARDS, 1972; WEST-EBERHARD, 1977).

BOHART e MENKE (1976) apresentam a tribo Pempredonini dividida em três subtribos: Pempredonina, Amnoplanina e Stigmina. *Spilomena* e *Microstigmus* foram colocados próximos a *Xysma* e *Arpactophilus* e distantes dos gêneros *Carinostigmus*, *Stigmus* e *Paracabro* na subtribo Stigmina.

MENKE (1989) propõe a separação destes quatro primeiros gêneros numa nova subtribo, *Spilomenina*, permanecendo os três últimos na subtribo Stigmina.

Microstigmus e *Spilomena* diferem basicamente pelo número de células submarginais (*Spilomena* apresenta duas células e *Microstigmus* apenas uma [BOHART e MENKE, 1976]) e pelo contorno da borda inferior do clipeo (MELO, 1993). De acordo com MELO (1990), a célula submarginal única em *Microstigmus* representa a fusão das duas células pela perda do segmento Rs que as dividia. No mesmo trabalho, o autor apresenta evidências de que o gênero *Microstigmus* teria se originado de um grupo neotropical de *Spilomena*. *Spilomena* é cosmopolita, enquanto que *Microstigmus* está restrito à região neotropical. As *Spilomena* do grupo *alini* são as que mais se aproximam de *Microstigmus* por compartilharem com este um conjunto de denticulos agrupados na depressão do tergo VII dos machos, caráter não encontrado em outros grupos de *Spilomena* (MELO, 1993).

Estudos diversos em Sphecidae, particularmente na subfamília Pempredoninae, onde há ocorrência de comportamento social, devem ser intensificados. Isto se torna ainda mais relevante quando se considera a hipótese de que abelhas tenham surgido a partir de um ancestral

pertencente à família Sphecidae (MICHENER, 1974) com base em caracteres morfológicos.

Investigações sobre evolução cariotípica em Hymenoptera têm recebido especial atenção nos trabalhos de IMAI et al. (1977; 1986; 1988). Estes autores sugerem que a evolução do cariótipo tem sido moldada pela seleção a favor do aumento do número cromossômico nas espécies, com conseqüente diminuição do tamanho dos mesmos. Um modelo para evolução do cariótipo nos eucariotos foi proposto por IMAI et al. (1986), ao qual chamou de hipótese da interação mínima. Esta hipótese implica que, nos eucariotos, os cariótipos tendem a se desenvolver no sentido de minimizar os riscos genéticos resultantes de mutações cromossômicas deletérias, como a translocação recíproca. Estas translocações são mais freqüentes em cariótipo com baixos números cromossômicos e menos freqüentes em cariótipos com números elevados. Isto foi interpretado como sendo devido à maior interação ocorrida entre os cromossomos em cariótipos com números baixos, onde estes tendem a ser maiores. A hipótese sugere, portanto, que rearranjos que levam à diminuição do tamanho dos cromossomos, como a fissão cêntrica, seriam adaptativos, uma vez que reduziriam estas interações. Conseqüentemente, cariótipos mais numerosos tenderiam a ter cromossomos menores e maior quantidade de telocêntricos e acrocêntricos resultantes das fissões. As fissões cêntricas se caracterizam por converter cromossomos meta e submetacêntricos em telocêntricos menores, os quais podem ser convertidos em meta e submetacêntricos por inversão pericêntrica ou crescimento em tandem de

heterocromatina constitutiva (C.T.H.C). A eliminação de heterocromatina (E.H.C) também pode ocorrer durante rearranjos como fusão cêntrica e inversão pericêntrica, com perda de braços heterocromáticos.

Os estudos citogenéticos, enfocando análises cariotípicas nos Hymenoptera, têm obtido progressos com o implemento de técnicas simples e relativamente rápidas, que permitem boa visualização dos cromossomos, como a técnica de IMAI et al. (1988). O bandeamento cromossômico tem também se constituído numa importante ferramenta, principalmente para os estudos de evolução de cariótipo. Nos estudos de filogenia, trata-se de um caráter a mais que, junto a vários outros, como análises de enzimas e morfologia, pode ajudar a solucionar problemas diversos (SUMNER, 1990).

Dados citogenéticos em vespas têm sido raros. Até 1975, segundo HOSHIBA et al. (1989), apenas cinco espécies da subfamília Polistinae (Vespidae) tinham seus números cromossômicos conhecidos, embora este autor não tenha incluído entre estas a espécie *Polistes hebraeus*, com $n=9$, determinado por MISRA e SRIVASTAVA (1971). Estudos posteriores desenvolvidos nesta subfamília mostraram considerável variação no número cromossômico em nível de subgênero ($n=6-34$), sugerindo que a evolução do cariótipo neste grupo não tem sido conservativa (HUNG et al., 1981; HOSHIBA e ONO, 1984; HOSHIBA, 1985, 1986; POMPOLO e TAKAHASHI, 1986, 1987, 1990a, 1990b). Já na subfamília Vespinae (Vespidae) há maior semelhança cariotípica entre os seus membros, que apresentam números mais uniformes ($n=25$ a 26) (HOSHIBA et al., 1989).

Em Formicidae, os estudos citogenéticos já acumularam dados de mais de 500 espécies (IMAI et al., 1988). Nesta família foi registrado n variando de 1 a 47 (IMAI et al. 1990). O número cromossômico $n=1$ só havia sido registrado no nematóide *Parascaris univalens* ($2n=2$) (GODAY et al. 1985). CROSLAND et al. (1988) encontraram evidências citogenéticas de que a espécie de formiga *Myrmecia pilosula* seria um complexo de espécies irmãs, por ter apresentado n variando de 1 a 16. Os gêneros *Myrmecia* e *Nothomyrmecia* juntos englobam toda a extensão de variação de números cromossômicos nos Hymenoptera e a maior parte da extensão na classe Insecta, que apresenta poucos números maiores que o de *Nothomyrmecia* ($n=47$) registrados até o momento (IMAI et al., 1990).

Nas vespas, o menor número cromossômico encontrado, $n=3$, foi registrado primeiramente por HUNG (1986), em *Brachymeria intermedia* (Chalcididae), e o maior, $n=34$, em *Mischocyttarus* sp (Vespidae), registrado por POMPOLO e TAKAHASHI (1990a).

O acúmulo de dados citogenéticos em Formicidae tem permitido grandes avanços nos estudos de evolução do cariótipo nos Hymenoptera.

Nas abelhas os números cromossômicos parecem mais uniformes nos maiores gêneros ou mesmo tribos. Por exemplo, $n=9$ em *Melipona* (KERR, 1948, 1972; HOSHIBA, 1988); $n=16$ em Apini (FAHRENHORST, 1977 a,b); $n=17-18$ na maioria dos Trigonini (KERR, 1969, 1972; TARELHO, 1973). Na tribo Trigonini foi também registrada pela primeira vez a

ocorrência de cromossomos B nas abelhas, em *Partamona cupira* (COSTA et al. 1992).

Em vespas da família Sphecidae poucas espécies têm seus números cromossômicos conhecidos. Estudos citogenéticos em vespas do gênero *Microstigmus* foram publicados pela primeira vez por COSTA et al. (1993), com dados de três espécies. Estas espécies são incluídas no presente estudo.

O presente trabalho teve como objetivos:

1. Determinar o número e a morfologia dos cromossomos em diferentes espécies de *Microstigmus* e *Spilomena*;
2. Estabelecer as relações filogenéticas entre as espécies estudadas, com base na variação cariotípica numérica e morfológica.

A maior parte do material utilizado foi obtido de ninhos coletados por G.A.R. de Melo durante o período em que este desenvolveu coletas para o estudo das relações filogenéticas, com base em caracteres morfológicos e taxinômicos, nestas vespas. Os ninhos foram coletados em áreas de mata nas regiões de Manaus (AM), Vicosas (MG), Pedra do Anta (MG), Araponga (MG), Governador Valadares (MG), Marilândia (MG), Domingos Martins (ES), Guarapari (ES), Vargem Alta (ES), Joinville (SC) e Guaraçatuba (MG). As larvas foram retiradas dos ninhos após serem levadas para um laboratório ou ao próprio local de coleta, quando não era possível transportá-las e foram colocadas em tubos Eppendorf. Aquelas que não haviam atingido a fase de prepupa foram mantidas nestes tubos, à temperatura ambiente, até

atingirem a fase desejada. Para a identificação das espécies foram coletados adultos dos ninhos de várias espécies, bem como, o número de ninhos e indivíduos analisados estão sumarizados no Quadro 1. Por se tratar, na sua maioria, de espécies novas, ainda não descritas, muitas foram identificadas com números e códigos adotados de acordo com Melo (1990, 1993).

2.2. Obtenção dos Grupos de Espécies

2. MATERIAIS E METODOS

2.1. Coleta do Material

A maior parte do material utilizado foi obtido de ninhos coletados por G.A.R de Melo durante o período em que este desenvolveu coletas para o estudo das relações filogenéticas com base em caracteres morfológicos e isozimáticos, nestas vespas. Os ninhos foram coletados em áreas de mata nas regiões de Manaus (AM), Viçosa (MG), Pedra do Anta (MG), Araponga (MG), Governador Valadares (MG), Marliéria (MG), Domingos Martins (ES), Guarapari (ES), Vargem Alta (ES), Joinville (SC) e Guaraciaba (MG). As larvas foram retiradas dos ninhos após serem levados para um laboratório ou no próprio local de coleta, quando não era possível transportá-los e foram colocadas em tubos Ependorf. Aquelas que não haviam atingido a fase de prepupa foram mantidas nestes tubos, à temperatura ambiente, até

atingirem a fase desejada. Para a identificação das espécies foram coletados adultos dos ninhos. As espécies, bem como, o número de ninhos e indivíduos analisados estão sumariados na Quadro 1. Por se tratar, na sua maioria, de espécies novas, ainda não-descritas, muitas foram identificadas com números e códigos adotados de acordo com MELO (1990; 1993).

2.2. Obtenção dos Cromossomos Mitóticos

Para Obtenção dos cromossomos mitóticos utilizou-se gânglio cerebral e ou gônadas de larvas de *Microstigmus* e *Spilomena* na fase de prepupa. A técnica utilizada para preparação das lâminas foi a de IMAI et al. (1988), descrita a seguir:

- (1) Dissecar o órgão, isto é, gânglio cerebral ou gônada, em solução colchicina-hipotônica 0,005% (0,5 ml de solução de colchicina a 0,1% / 9,5 ml de solução de citrato de sódio a 1%) com o uso de estiletos, removendo o máximo possível de corpo gorduroso e membranas epiteliais (no caso de gânglio cerebral);
- (2) Transferir o órgão para uma cubeta contendo solução colchicina-hipotônica e deixar por uma hora e meia a duas horas à temperatura ambiente;
- (3) Transferir o material para uma lâmina limpa, com o uso de uma pipeta de Pasteur;
- (4) Incliná-la a 10 a 20 graus para escorrer o excesso de solução hipotônica;
- (5) Com a lâmina ainda inclinada aplicar várias gotas de fixador I (ác. acético glacial 3ml/etanol 3ml/água destilada

QUADRO 1 - Números de Ninhos (No/ninhos), Sexo (M = Macho; F = Fêmeas) e Origem das Espécies de *Microstigmus* e *Spilomena* Analisadas

Espécie	Grupo	No/ninhos	M	F	Origem
M. MA0145	<i>theridii</i>	1	-	1	Manaus (AM)
M. MA0146	"	1	1	1	"
M. MA0154	"	1	-	1	"
M. N407	"	1	1	2	"
M. N408	"	1	-	1	"
M. spJ	"	2	1	1	"
M. N419	"	1	-	1	"
M. N421	"	1	-	1	"
M. N422	"	1	1	3	"
M. N428	"	1	-	2	"
M. spH	"	5	1	4	"
M. N442	"	1	1	-	"
M. N443	"	1	-	1	"
M. N450	"	1	1	-	"
M. spG	"	1	1	2	"
M. spB	"	1	-	1	"
M. spD	"	1	-	1	"
M. spF	"	1	2	-	"
M. N463	"	1	1	-	"
M. spL	"	2	-	4	"
M. N497	"	1	-	1	"
M. <i>brasiliensis</i>	-	9	4	6	Vic
M. N390	<i>luederwaldti</i>	1	-	1	Manaus
M. <i>arlei</i>	"	7	4	4	Vic
M. <i>luederwaldti</i>	"	3	1	2	Vic, Arap Join
M. N465	<i>nigrifex</i>	2	-	2	Manaus
M. N411	"	1	-	1	"
M. cfr <i>nigrifex</i>	"	3	1	2	"
M. <i>nigrophthalmus</i>	<i>bicolor</i>	9	5	7	Vic
M. GARM2	"	4	-	4	Vic
M. GARM4	<i>lobifex</i>	4	2	3	Vic, Ped
Marl, Gov. Manaus	M. cfr <i>lobifex</i>	"	"	2	1 1
M. N487	"	2	-	3	"
M. N439	"	1	-	1	"
M. N632	"	1	1	-	Dom
M. cfr <i>hingstoni</i>	<i>hingstoni</i>	1	-	1	Manaus
M. N458	-	1	1	-	"
M. GARM3	<i>wagneri</i>	2	-	2	Vic
M. GARM9	"	4	1	4	Vic, Gua, Guap, Var
M. GARM6	GARM6	2	1	2	Vic
M. GARM15	"	2	1	2	Vic
M. N379	"	1	-	1	Arap
M. GARM11	-	1	-	1	Vic
M. N564	-	1	1	-	Manaus

Continua...

QUADRO 1, Cont.

Espécie	Grupo	No/ninhos	M	F	Origem
M. N570	-	1	-	1	Manaus
M. N449	-	1	-	1	"
M. <i>myersi</i>	-	3	2	2	Vic
M. <i>xylicola</i>	<i>xylicola</i>	4	2	5	"
M. <i>similis</i>	"	1	1	-	"
S. GARM2	-	2	1	1	Vic
S. <i>alini</i>	<i>alini</i>	4	2	3	"
S. GARM4	"	2	1	4	"
S. MANAUS	"	1	1	-	Manaus
S. <i>brasiliensis</i>	<i>brasiliensis</i>	1	1	-	Vic
S. GARM5	"	2	-	2	"

Vic - Viçosa (MG)

Marl - Marliéria (MG)

Gua - Guaraciaba (MG)

Dom - Domingos Martins (ES)

Var - Vargem Alta (ES)

Arap - Araponga (MG)

Gov. - Gov. Valadares (MG)

Ped - Pedra do Anta (MG)

Guap - Guarapari (ES)

Join - Joinville (SC)

4ml; recém-preparado) sobre o material e pela superfície da lâmina;

(6) Remover o máximo de fixador I, pela extremidade da lâmina, com uso de papel-filtro;

(7) Adicionar uma a duas gotas do fixador I diretamente sobre o órgão, observando a lâmina sob microscópio estereoscópico. Após cerca de 15 segundos, dissociar rapidamente o órgão utilizando estiletes;

(8) Adicionar duas gotas de fixador II (1:1 etanol acético: ác. acético glacial 2ml/etanol 2ml; recém preparado) no centro da lâmina, antes que seque o fixador I;

(9) Remover o fixador I, que se move para as margens da lâmina ao ser substituído pelo fixador II, com papel-filtro.

O fixador II irá cobrir toda superfície (a menos que a

lâmina esteja com resíduos oleosos) e irá evaporar gradualmente;

(10) Adicionar duas gotas do fixador III (ác. acético glacial puro) no centro do macerado de células. Remover o fixador II, que se move para as bordas da lâmina com papel-filtro;

(11) Corar com solução de Giemsa e tampão Sörensen 0,06M (pH 6.8), na proporção de 1:30, respectivamente, por 20 minutos, após a secagem das lâminas ao ar por 24 horas.

2.3. Banda C

A técnica de banda C utilizada foi a de SUMNER(1972), com pequenas modificações segundo POMPOLO e TAKAHASHI (1990b), descrita a seguir. A lâmina de três dias, preparada de acordo com a técnica descrita acima até o passo

(10) foi submetida ao seguinte tratamento:

(1)- Tratamento com solução de HCl 0,2N, à temperatura ambiente, por tempo variável (2 a 4 minutos).

- Lavagem rápida em água destilada.

(2)- Tratamento com solução de Ba(OH)₂ a 5%, à 60 °C em banho-maria, por tempo variável (5 a 9 minutos).

- Lavagem rápida em HCl 0,2N para remover o excesso de bário.

- Lavagem rápida em água destilada.

(3)- Tratamento da lâmina, em 2XSSC, à 60 °C em banho-maria, por tempo variável (6 a 11 minutos).

- Lavagem rápida em água destilada.

(4)- Coloração da lâmina com Giemsa-tampão fosfato 0,06M a 8% (pH 6,8), por 15 minutos.

2.4. Adaptações na Técnica de Banda C

Microstigmus e *Spilomena* possuem ninhos pouco populosos, tendo sido encontrados poucos indivíduos por ninho na fase de prepupa, ou seja, na fase adequada para o estudo citogenético. Foram raros os casos em que se encontrou mais de três larvas na fase adequada, e para muitas das espécies foi possível analisar apenas um indivíduo. Para aproveitar ao máximo este material escasso, foram testadas pequenas adaptações na técnica de banda C, descrita acima, tendo-se obtido êxito em alguns casos para se utilizar lâminas já coradas e analisadas pela técnica de IMAI et al. (1988). Estas adaptações consistiram em:

- remover o óleo de imersão das lâminas em banho de xilol puro;
- lavar a lâmina em água corrente.
- descorar a lâmina em HCl 0,2N (o tempo no HCl deve ser contado para a obtenção de banda C. Geralmente alguns segundos são suficientes);
- Submeter a lâmina ao tratamento de banda C descrito acima.

Outra adaptação que trouxe alguns resultados positivos foi ressubmeter a lâmina ao tratamento de banda C, para melhorar a visibilidade do padrão de bandas quando, no

primeiro tratamento os tempos testados não foram suficientes.

As lâminas das espécies coletadas em Manaus, utilizadas para banda C, tinham mais de sete dias de idade, tempo superior ao descrito na técnica. No entanto obteve-se resultados satisfatórios também neste caso.

Foram analisadas um mínimo de dez metáfases em cada lâmina. As melhores foram selecionadas para serem fotografadas em fotomicroscópio Zeiss, com filme AGFA COPEX Pan AHU e posterior montagem dos cariótipos. A montagem foi feita na ordem decrescente do tamanho dos cromossomos. As barras que aparecem nas figuras representam 10 μ m.

Microstigmus brasiliensis Melo 1992, *Microstigmus ludewaldti* Richards 1972, *M. nigropthalmus* Melo 1992, *M. nyesi* Turner 1928, *M. xylicola* Melo & Evans 1993, *M. similis* Melo & Evans 1993, *M. arlei* Richards 1972, *Spilomena alini* Antropov 1991 e *S. brasiliensis* Antropov 1991. As demais constituem espécies novas. As espécies do grupo *Microstigmus* são separadas pela análise da estrutura da cabeça (MELO, 1993). O Quadro 2 traz os números cromossômicos e fórmulas kariotípicas para cada espécie analisada.

As figuras foram organizadas seguindo-se a ordem apresentada no ferrugem da Figura 20 (No item 4. Discussão), mostrando-se da mais primitiva para a mais derivada. O mesmo padrão é seguido na ordem da citação abaixo. Estora em alguns casos tenha sido difícil determinar

QUADRO 2 - Números cromossômicos (n, 2n) e fórmula cariotípica haplóide (K) encontrados nas espécies de *Microstigmus* e *Spilomena* estudadas.

Espécie	Grupo	No cromossômico		Fórmula cariotípica haplóide (K)
		n	2n	
<i>M. theridii</i>			10	5A
<i>M. brasiliensis</i>			10	5A
<i>M. nigrophtalmus</i>			10	5A
<i>M. myersi</i>		5	10	5A
<i>M. xylicola</i>			10	5A
<i>M. similis</i>		5	10	5A
<i>M. arlei</i>			10	5A
<i>M. alini</i>			10	5A

3. RESULTADOS

Foram analisadas um total de 42 espécies de *Microstigmus* e *Spilomena*, que puderam ser separadas taxonomicamente. Destas, apenas 9 já foram descritas: *Microstigmus brasiliensis* Melo 1992, *Microstigmus luederwaldti* Richards 1972, *M. nigrophtalmus* Melo 1992, *M. myersi* Turner 1929, *M. xylicola* Melo & Evans 1993, *M. similis* Melo & Evans 1993, *M. arlei* Richards 1972, *Spilomena alini* Antropov 1991 e *S. brasiliensis* Antropov 1991. As demais constituem espécies novas. As espécies do grupo *theridii* só puderam ser separadas pela análise do padrão de isozimas (MELO, 1993). O Quadro 2 traz os números cromossômicos e fórmulas cariotípicas para cada espécie analisada.

As figuras foram organizadas seguindo-se a ordem apresentada no fenograma da Figura 20 (No item 4. Discussão), mostrando-se da mais primitiva para a mais derivada. O mesmo padrão é seguido na ordem da citação abaixo. Embora em alguns casos tenha sido difícil determinar

QUADRO 2 - Números cromossômicos (n, 2n) e fórmula cariotípica haplóide (K) encontrados nas espécies de *Microstigmus* e *Spilomena* estudadas

Espécie	Grupo	Número cromossômico		Fórmula cariotípica haplóide (K)
		n	2n	
M. MA0145	<i>theridii</i>	-	10	5A
M. MA0146	"	5	10	5A
M. MA0154	"	-	10	5A
M. N407	"	5	10	5A
M. N408	"	-	10	5A
M. spJ	"	5	10	5A
M. N419	"	-	10	5A
M. N421	"	-	10	5A
M. N422	"	5	10	5A
M. N428	"	-	10	5A
M. spH	"	5	10	5A
M. N442	"	5	-	5A
M. N443	"	-	10	5A
M. N450	"	5	-	5A
M. spG	"	5	10	5A
M. spB	"	-	10	5A
M. spD	"	-	10	5A
M. spF	"	5	-	5A
M. N463	"	5	-	5A
M. spL	"	-	10	5A
M. N497	"	-	10	5A
M. <i>brasiliensis</i>	-	5	10	5A
M. N390	<i>luederwaldti</i>	-	6	3M-SM
M. <i>arlei</i>	"	3	6	2M-SM+1T
M. <i>luederwaldti</i>	"	3	6	3M-SM
M. N465	<i>nigrifex</i>	-	6	2M-SM+1A
M. N411	"	-	8	2M-SM+2A
M. <i> CFR. nigrifex</i>	"	3	6	3M-SM
M. <i>nigrophthalmus</i>	<i>bicolor</i>	7	14	7M-SM
M. GARM2	"	-	10	5M-SM
M. GARM4	<i>lobifex</i>	4	8	1M-SM+3T
M. <i> CFR. lobifex</i>	"	3	6	2M-SM+1T
M. N487	"	-	10	2M-SM+3T
M. N439	"	-	10	1M-SM+4A-T
M. N632	"	4	-	4M-SM
M. <i> CFR. hingstoni</i>	<i>hingstoni</i>	-	20	7M-SM+3A-T
M. N458	-	4	-	4M-SM
M. GARM3	<i>wagneri</i>	-	18	9M-SM
M. GARM9	"	9	18	9M-SM
M. GARM6	GARM6	7	14	7M-SM
M. GARM15	"	7	14	7M-SM
M. N379	"	-	20	10M-SM

Continua...

QUADRO 2, Cont.

Espécie	Grupo	No cromossômico		Fórmula cariotípica haplóide (K)
		n	2n	
<i>M. GARM11</i>	-	11	-	8M-SM+3A-T
<i>M. N564</i>	-	4	-	1M-SM+3T
<i>M. N570</i>	-	-	6	3M-SM
<i>M. N449</i>	-	-	6	2M-SM+1A
<i>M. myersi</i>	-	8	16	8M-SM
<i>M. xylicola</i>	<i>xylicola</i>	3	6	3M-SM
<i>M. similis</i>	"	4	-	3M-SM+1A
<i>S. GARM2</i>	-	3	6	3M-SM
<i>S. alini</i>	<i>alini</i>	6	12	3M-SM+2A+1T
<i>S. GARM4</i>	"	3	6	3M-SM
<i>S. Manaus</i>	"	-	10	4M-SM+1T
<i>S. brasiliensis</i>	<i>brasiliensis</i>	5	-	3M-SM+2A
<i>S. GARM5</i>	"	-	16	2M-SM+2A+4T

a morfologia dos cromossomos, pôde-se determinar o número com precisão.

3.1. *Spilomena* GARM2

Entre as espécies de *Spilomena* estudadas, esta é provavelmente a de origem mais antiga (MELO, 1990). As Figuras 1A e 1B mostram o cariótipo de fêmea com $2n=6$ e o de macho com $n=3$, respectivamente. Os três pares são do tipo Meta-Submetacêntricos (M-SM), decrescentes em tamanho.

3.2. *Spilomena* GARM5

Foi analisado pouco material desta espécie. A preparação não apresentou muita nitidez em nível da

morfologia para alguns cromossomos. A Figura 2B mostra o cariótipo de fêmea com $2n=16$ cromossomos. Os pares 1 e 2 são cromossomos telocêntricos e diferentes em tamanho. O par 3 é do tipo M-SM, ligeiramente menor que o par 2. Na ordem decrescente de tamanho, o par 4 é telocêntrico, os 5 e 6 acrocêntricos, o 7 telocêntrico e o 8 um pequeno M-SM.

3.3. *Spilomena* - Grupo *brasiliensis*

3.3.1. *Spilomena brasiliensis*

Foi a única espécie analisada deste grupo. A análise foi feita em apenas um indivíduo macho. O cariótipo haplóide (Figura 2A) apresenta $n=5$ cromossomos. Os pares 1 a 3 são do tipo M-SM e decrescentes em tamanho e os pares 4 e 5 acrocêntricos com tamanhos ligeiramente diferentes.

3.4. *Spilomena* Grupo *alini*

Este grupo reúne as espécies de *Spilomena* relacionadas a *S. alini* (Melo não publicado). Foram estudadas citogeneticamente três espécies deste grupo:

3.4.1. *Spilomena* GARM4

O cariótipo diplóide é apresentado na Figura 3C. Este é constituído de três pares do tipo M-SM, que decrescem ligeiramente em tamanho.

3.4.2. *Spilomena Manaus*

Esta foi a única espécie de *Spilomena* coletada na região de Manaus. Somente foi analisado um indivíduo fêmea. O cariótipo diplóide apresentou $2n=10$ cromossomos (Figura 3B). Os pares 1 e 2 são do tipo M-SM diferentes em tamanho. O par 3 é telocêntrico e os pares 4 e 5 são pequenos M-SM, ligeiramente diferentes em tamanho.

3.4.3. *Spilomena alini*

Esta espécie apresentou $n=6$ e $2n=12$ cromossomos. A Figura 3A mostra cariótipo de macho com $n=6$. Os pares 1, 2 e 5 são do tipo M-SM, o 3 é telocêntrico, o 4 acrocêntrico e o 6 é um acrocêntrico de tamanho diminuto. Há um decréscimo gradual no tamanho dos cromossomos, com exceção do 6.

3.5. *Microstigmus* Grupo *xylicola*

As espécies deste grupo foram consideradas por MELO (1993) como as mais primitivas entre os *Microstigmus*. Foram analisadas citogeneticamente duas espécies deste grupo:

3.5.1. *Microstigmus similis*

A Figura 4B mostra o cariótipo de macho com $n=4$ cromossomos. Estes parecem pequenos quando comparados com a outra espécie do mesmo grupo, *M. xylicola*, mas há que se considerar a diferença no grau de condensação dos

cromossomos. Os pares 1, 2 e 3 são constituídos por cromossomos do tipo M-SM, ligeiramente decrescentes em tamanho. O par 4, devido ao elevado grau de condensação, se apresenta como uma pequena mancha, assemelhando-se a um acrocêntrico. A quantidade de material analisado foi pequena, impossibilitando a obtenção de uma metáfase de melhor qualidade.

3.5.2. *Microstigmus xylicola*

O cariótipo de macho é constituído de três cromossomos do tipo M-SM. O de fêmea, com $2n=6$, é mostrado na Figura 4A. Os cromossomos são grandes e diferem pouco em tamanho. O bandeamento C evidenciou a presença de heterocromatina pericentromérica em quantidade variável de um par para outro (Figura 4 C e D). Neste caso o conteúdo de heterocromatina foi maior nos braços longos que nos curtos. Foi também maior nos menores pares cromossômicos. A metáfase submetida ao tratamento de banda C, apresentada na Figura 4D, mostra os cromossomos de *M. xylicola* com mais semelhança de tamanho com os de *M. similis*.

3.6. *Microstigmus myersi*

O cariótipo desta espécie é constituído de cromossomos M-SM relativamente grandes e com pequena diferença de tamanho. Os machos apresentam $n=8$ e as fêmeas $2n=16$ cromossomos. A Figura 5 mostra o cariótipo haplóide corado convencionalmente.

3.7. *Microstigmus* Grupo *hingstoni*

Agrupa espécies relacionadas a *M. hingstoni*.

3.7.1. *Microstigmus* cfr. *hingstoni*

Esta foi a única espécie coletada do grupo *hingstoni*. Apresentou $2n=20$ cromossomos. Entre as espécies coletadas na região de Manaus, esse foi o maior número encontrado. O cariótipo de fêmea, apresentado na Figura 6, é constituído de cromossomos pequenos do tipo M-SM. Nos menores pares (8, 9 e 10) foi difícil determinar a morfologia, pois os cromossomos se apresentam como pequenas manchas, podendo ser acrocêntricos ou telocêntricos. Nesta espécie foi analisado somente um indivíduo.

3.8. *Microstigmus* N458

Esta espécie, coletada na região de Manaus, agrupada com as demais espécies do grupo *hingstoni*. Esta espécie, como várias outras ainda não-identificadas ou descritas, está, aqui, denominada de acordo com o código do ninho. A Figura 7 mostra o cariótipo de macho desta espécie, com $n=4$ cromossomos. A má qualidade das metáfases na preparação cromossômica impossibilitou uma boa visualização da morfologia dos cromossomos. Entretanto, a diferença de coloração entre braços permite a localização do centrômero e a determinação da morfologia do tipo M-SM para os pares 1, 2 e 4. O par 3 deixou dúvidas por ter se corado mais homoganeamente ao longo de todo o cromossomo. Esta diferença de coloração pode ser devido à presença de

heterocromatina nos braços mais corados. As regiões de heterocromatina, geralmente mais compactadas que as de eucromatina na metáfase, coram-se mais fortemente. Sendo assim, o par 3 pode ter um grande conteúdo de heterocromatina ao longo de ambos os braços, enquanto que os demais apresentam-na nos braços curtos. Os cromossomos nesta espécie são grandes e muito semelhantes no tamanho e na morfologia.

3.9. *Microstigmus* Grupo GARM6

Este grupo é constituído por espécies relacionadas a *Microstigmus* GARM6. Foram analisadas citogeneticamente três espécies:

3.9.1. *Microstigmus* N379

Esta espécie, coletada na região de Manaus, apresentou também $2n=20$ cromossomos. Morfologicamente todos os pares são do tipo M-SM, ligeiramente decrescentes em tamanho. A Figura 8C mostra o cariótipo de fêmea com $2n=20$ cromossomos.

3.9.2. *Microstigmus* GARM15

Coletada na região de Viçosa, esta espécie do grupo GARM6 apresentou $n=7$ e $2n=14$ cromossomos. Todos os pares são do tipo M-SM (tendendo para a morfologia subtelocêntrica nos

maiores pares, de 1 a 5). A Figura 8B mostra o cariótipo de fêmea com $2n=14$ cromossomos.

3.9.3. *Microstigmus* GARM6

O cariótipo desta espécie assemelha-se bastante ao da espécie *M. GARM15*, com $n=7$ e $2n=14$ cromossomos. Os pares de 1 a 7 são de morfologia do tipo M-SM (a maioria tendendo para subtlocêntrica nos maiores pares), sendo que o par 2 é um metacêntrico (Figura 8A).

3.10. *Microstigmus* GARM11

Esta espécie foi coletada na região de Araponga, MG, e, entre todas as espécies analisadas, foi a que apresentou maior número cromossômico, com $n=11$. Apresentou cromossomos pequenos do tipo M-SM nos pares de 1 a 8. Os pares de 9 a 11 são do tipo acro e telocêntricos. Na Figura 9 é apresentado o cariótipo de macho com $n=11$.

3.11. *Microstigmus* Grupo *wagneri*

Reúne espécies relacionadas a *Microstigmus wagneri*.

Foram analisadas 2 espécies deste grupo:

3.11.1. *Microstigmus* GARM9

A Figura 10B e 10C mostram o cariótipo de Fêmea com $2n=18$ e o de macho com $n=9$ respectivamente. Os cromossomos

desta espécie são relativamente grandes e diferem pouco em tamanho. Quanto à morfologia, os pares de 1 a 9 são do tipo M-SM.

3.11.2. *Microstigmus* GARM3

Nesta espécie os cromossomos são também relativamente grandes e morfologicamente se assemelham bastante a *M. GARM9*. Os pares de 1 a 9 são do tipo M-SM. O par 1, um submetacêntrico, apresenta uma região de constrição secundária bem evidente no braço curto. O par 3, de forma um pouco menos evidente, apresenta também uma constrição secundária. Os cromossomos decrescem ligeiramente em tamanho. A Figura 10A mostra um cariótipo de fêmea com $2n=18$ cromossomos.

3.12. *Microstigmus* Grupo *bicolor*

Reúne espécies relacionadas a *Microstigmus bicolor*.

Duas espécies deste grupo foram analisadas citogeneticamente:

3.12.1. *Microstigmus* GARM2

O número diplóide determinado para esta espécie foi 10. Os cromossomos são grandes do tipo M-SM. Os pares 1 a 4 diferem pouco em tamanho, enquanto que o par 5 é um pouco menor, se diferenciando dos demais. O par 4 apresenta o braço longo um pouco mais corado em relação ao braço curto e

aos demais cromossomos do cariótipo. A Figura 11B mostra o cariótipo de fêmea com $2n=10$ cromossomos.

3.12.2. *Microstigmus nigrophtalmus*

O número cromossômico determinado para esta espécie foi $n=7$ nos machos e $2n=14$ nas fêmeas. Quanto a morfologia, os pares de 1 a 7 são do tipo M-SM, com ligeiro decréscimo no tamanho. O cariótipo de macho com $n=7$ é apresentado na Figura 11A.

3.13. *Microstigmus* Grupo *luederwaldti*

Reúne espécies relacionadas taxonomicamente a *Microstigmus luederwaldti*. Foram estudadas citogeneticamente três espécies deste grupo.

3.13.1. *Microstigmus arlei*

Esta espécie apresentou $n=3$ e $2n=6$ cromossomos. Os pares 1 e 2 são do tipo M-SM grandes e diferindo ligeiramente em tamanho. O par 3 é telocêntrico e mede cerca da metade do tamanho dos dois primeiros. A técnica de banda C evidenciou heterocromatina restrita à região pericentromérica em todos os cromossomos. A Figura 12C mostra o cariótipo de fêmea com $2n=6$ cromossomos e a Figura 12D, o padrão de banda C em metáfase de macho com $n=3$.

3.13.2. *Microstigmus luederwaldti*

Esta espécie apresentou número haplóide $n=3$ e o diplóide $2n=6$. A Figura 12B mostra o cariótipo de fêmea. Os três pares de cromossomos são do tipo M-SM e há um ligeiro decréscimo no tamanho. Pela técnica de banda C verificou-se que, além da heterocromatina pericentromérica em todos os pares, o terceiro par apresenta todo o braço curto heterocromático (Figura 12E).

3.13.3. *Microstigmus* N390

A descrição do cariótipo desta espécie foi feita somente com base na coloração convencional, sendo semelhante à espécie anterior. Com $2n=6$ cromossomos, os pares apresentam um ligeiro decréscimo no tamanho e são todos do tipo M-SM (Figura 12A).

3.14. *Microstigmus* Grupo *nigrifex*

Agrupa as espécies de *Microstigmus* relacionadas a *Microstigmus nigrifex*.

3.14.1. *Microstigmus* N465

Foi determinado para esta espécie o número diplóide $2n=6$ cromossomos. Os pares 1 e 2 são do tipo M-SM e o par 3 acrocêntrico. Há uma pequena diferença de tamanho entre os pares. O cariótipo de fêmea é mostrado na Figura 13C.

3.14.2. *Microstigmus cfr. nigrifex*

Esta espécie apresentou $n=3$ e $2n=6$ cromossomos ligeiramente decrescentes em tamanho. Os cromossomos são todos do tipo M-SM. O par 1 apresenta uma região de constrição secundária pouco evidente próxima à extremidade do braço longo. (Figura 13B).

3.14.3. *Microstigmus* N411

Nesta espécie foi determinado o número diplóide $2n=8$ cromossomos. Os pares 1 e 2 são do tipo M-SM, diferentes em tamanho. Os pares 3 e 4 são acrocêntricos e apresentam diferença de tamanho (Figura 13A).

As espécies seguintes são relacionadas ao grupo *theridii*, tendo sido classificadas por Melo (dados não publicados) como pertencentes ao Grande grupo *theridii* (Gr. *gr. theridii*).

3.15. *Microstigmus* N449

Esta espécie apresentou $2n=6$ cromossomos. Os pares 1 e 2 são do tipo M-SM com pequena diferença de tamanho. O par 3 é acrocêntrico e menor que os pares anteriores (Figura 14D).

3.16. *Microstigmus* N570

Esta espécie apresentou $2n=6$ cromossomos, como mostra a Figura 14C. Os cromossomos são grandes e se apresentam volumosos em todas as metáfases observadas. Quanto à morfologia, os três pares são do tipo M-SM. O par 2 apresenta uma constrição secundária proeminente no braço longo, que chega a confundir-se com um centrômero. A diferença de tamanho entre os pares é pequena.

3.17. *Microstigmus* N564

Foi determinado nesta espécie o número haplóide $n=4$ cromossomos. o par 1 é do tipo M-SM. Já os pares 2, 3 e 4 são telocêntricos diferentes em tamanho. Os pares 2 e 3 apresentaram-se fortemente corados na região do centrômero (Figura 14B).

3.18. *Microstigmus brasiliensis*

Para esta espécie determinou-se os números cromossômicos $n=5$ e $2n=10$. O cariótipo haplóide é constituído de 5 cromossomos acrocêntricos, com variação de tamanho. O primeiro par difere dos demais pelo seu maior tamanho. Os pares 2,3 e 4,5 são bastante semelhantes entre si. A Figura 14A mostra o cariótipo de macho com $n=5$. A técnica de banda C evidenciou que a heterocromatina pericentromérica se estende ao longo de todo o braço curto de todos os pares (Figura 14E).

3.19. *Microstigmus* Grupo *lobifex*

Agrupa espécies relacionadas a *Microstigmus lobifex*.

3.19.1. *Microstigmus* N439

O pouco material analisado para esta espécie permitiu, basicamente, determinar o número cromossômico. A Figura 15C mostra o cariótipo de fêmea com $2n=10$ cromossomos. Apesar da difícil visualização, aparenta morfologia acrocêntrica ou telocêntrica nos pares 1 a 4 e M-SM no par 5. Há um decréscimo gradativo no tamanho.

3.19.2. *Microstigmus* N487

O número diplóide encontrado foi $2n=10$ cromossomos. Os pares 1 e 2 são do tipo M-SM muito semelhantes entre si. Os pares 3, 4 e 5 são telocêntricos de tamanho menor. O par 3 é um pouco maior do que os dois seguintes, que se assemelham mais em tamanho. O par 2 apresenta diferença de coloração entre braços, sendo o braço longo mais corado que o curto (Figura 15B). A técnica de banda C evidenciou que este braço fortemente corado é, na verdade, heterocromático (Figura 15D).

3.19.3. *Microstigmus* cfr. *lobifex*

Esta espécie apresentou $n=3$ e $2n=6$ cromossomos. Os pares 1 e 2 são do tipo M-SM, com variação de tamanho. O par

3 é telocêntrico bem menor que os primeiros. A Figura 15A mostra o cariótipo de macho com $n=3$ cromossomos.

3.19.4. *Microstigmus* N632

O número haplóide determinado para esta espécie foi $n=4$ cromossomos. Os cromossomos são do tipo M-SM diferindo em tamanho. O cariótipo com a coloração convencional apresenta braço longo mais fortemente corado nos pares 2, 3 e 4 (Figura 16B). A análise de cromossomos prometafásicos (Figura 16D) não deixa dúvidas de que isso se deve à maior condensação da heterocromatina que constitui estes braços, ou seja, são totalmente heterocromáticos.

3.19.5. *Microstigmus* GARM4

Na análise citogenética desta espécie obteve-se o número haplóide $n=4$ e diplóide $2n=8$. O par 1 é um submetacêntrico grande. Os pares 2, 3 e 4 são telocêntricos menores e variam em tamanho, semelhante a *M.* N564. Estes telocêntricos, na preparação convencional, apresentam-se mais corados na região do centrômero. Na Figura 16C os resultados de banda C, nesta espécie, evidenciaram a presença de pequena quantidade de heterocromatina pericentromérica nos cromossomos 1, 3 e 4 e uma grande quantidade no cromossomo 2, a qual se estende até a região mediana do cromossomo.

3.20. *Microstigmus* Grupo *theridii*

A este grupo pertencem as espécies relacionadas a *Microstigmus theridii*. As espécies deste grupo apresentaram um grande homogeneidade cariotípica entre elas e também com *Microstigmus brasiliensis*. Não foi detectada diferença numérica, morfológica e nem quanto ao padrão de banda C entre estas espécies. Nas Figuras 17 e 18 são apresentados os cariótipos das espécies que foram submetidas ao bandeamento C neste grupo, mostrando esta homologia. Assim, como em *M. brasiliensis*, o primeiro par difere dos demais pelo seu tamanho maior e os pares 2,3 e 4,5 são semelhantes entre si. A heterocromatina está presente na região pericentromérica em todos os cromossomos e se estende ao longo dos braços curtos nos cinco pares de cromossomos.

FIGURA 2 - A) *Spiloseus brasiliensis* - Cariótipo de Macho com n=8. B) *S. GABO* - Cariótipo de fêmea com 2n=16 Cromossomos.

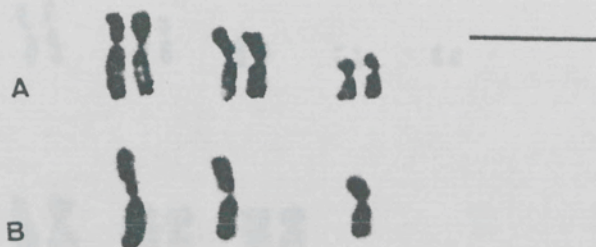


FIGURA 1 - *Spilomena* GARM2 A) Cariótipo de Fêmea com $2n=6$ e B) de Macho com $n=3$ Cromossomos.

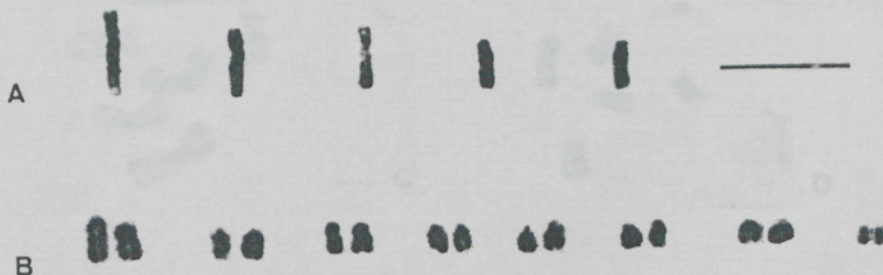


FIGURA 2 - A) *Spilomena brasiliensis* - Cariótipo de Macho com $n=5$. B) *S. GARM5* - Cariótipo de Fêmea com $2n=16$ Cromossomos.

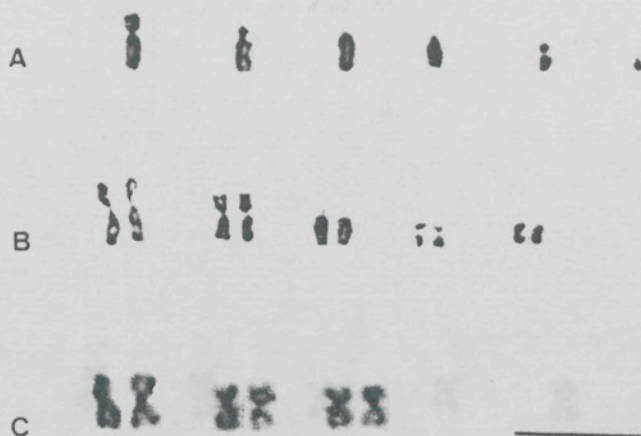


FIGURA 3 - *Spilomena* gr. *Alini* - A) Cariótipo de Macho de *S. alini* com $n=6$, B) de Fêmea de *S. Manaus* com $2n=10$ e C) de Fêmea de *S. GARM4* com $2n=6$ Cromossomos.

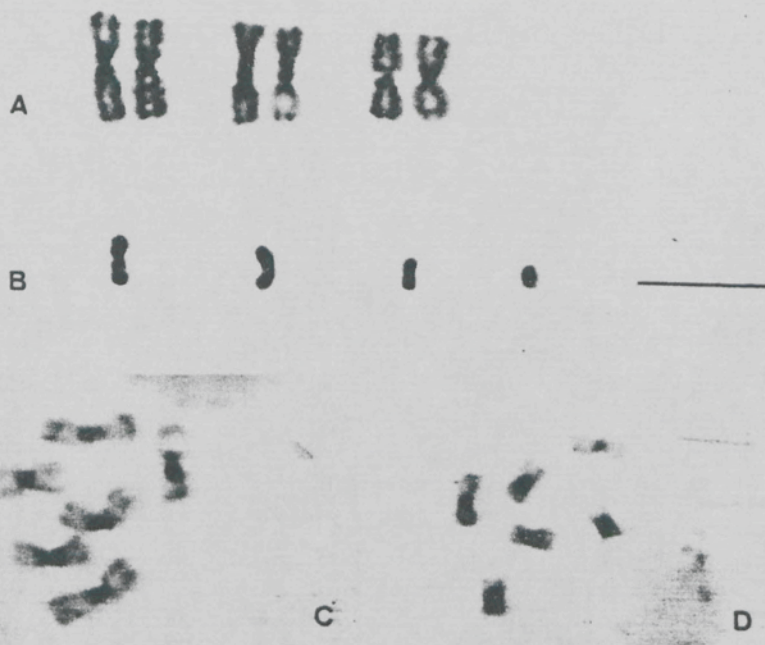


FIGURA 4 - *Microstigmus* gr. *xylicola* - A) Cariótipo de Fêmea de *M. xylicola* com $2n=6$ e B) de Macho de *M. similis* com $n=4$ Cromossomos. C e D) Metáfases Bandeadas de *M. xylicola* em Diferentes Graus de Condensação.

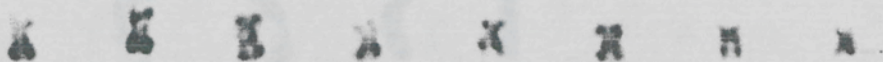


FIGURA 5 - *Microstigmus myersi* - Cariótipo de Macho com $n=8$ Cromossomos.

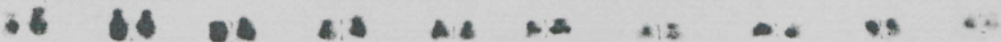


FIGURA 6 - *Microstigmus gr. hingstoni* - Cariótipo de Fêmea de *M. cfr. hingstoni* com $2n=20$ Cromossomos.



FIGURA 7 - *Microstigmus* N458 - Cariótipo de Macho com $n=4$ Cromossomos.

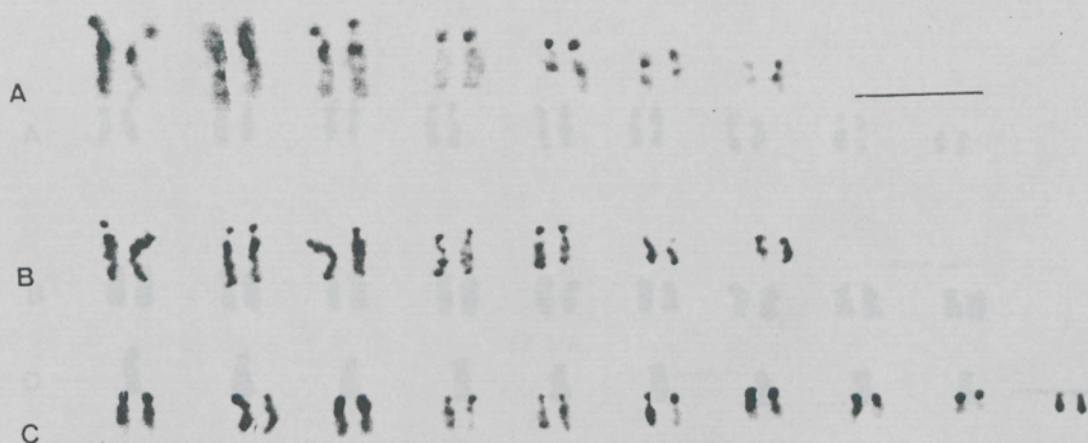


FIGURA 8 - *Microstigmus* gr. GARM6 - A) Cariótipo de Fêmea de *M.* GARM6 com $2n=14$, B) de Fêmea de *M.* GARM15 com $2n=14$ e C) de Fêmea de *M.* N379 com $2n=20$ Cromossomos.

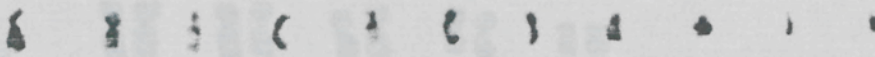


FIGURA 9 - *Microstigmus* GARM11 - Cariótipo de Macho com $n=11$ Cromossomos.

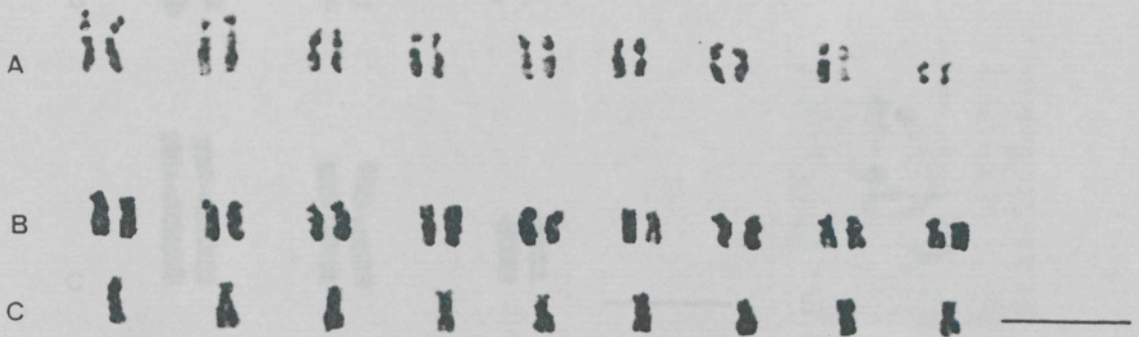


FIGURA 10 - *Microstigmus* gr. *wagneri* A) Cariótipo de Fêmea de *M.* GARM3 com $2n=18$. B e C) Cariótipos de Fêmea e Macho de *M.* GARM9, com $2n=18$ e $n=9$, Respectivamente.

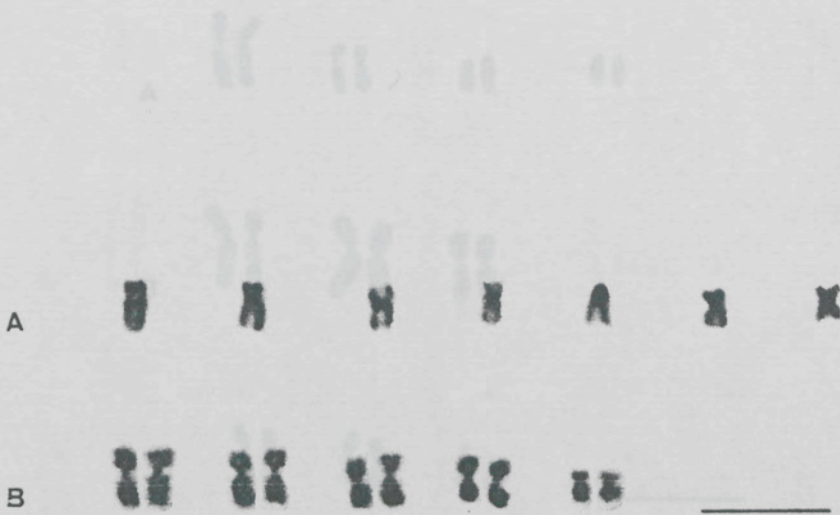


FIGURA 11 - *Microstigmus* gr. *bicolor* A) Cariótipo de Macho de *M. nigrophtalmus* com $n=7$ e B) de Fêmea de *M. GARM2* com $2n=10$ Cromossomos.

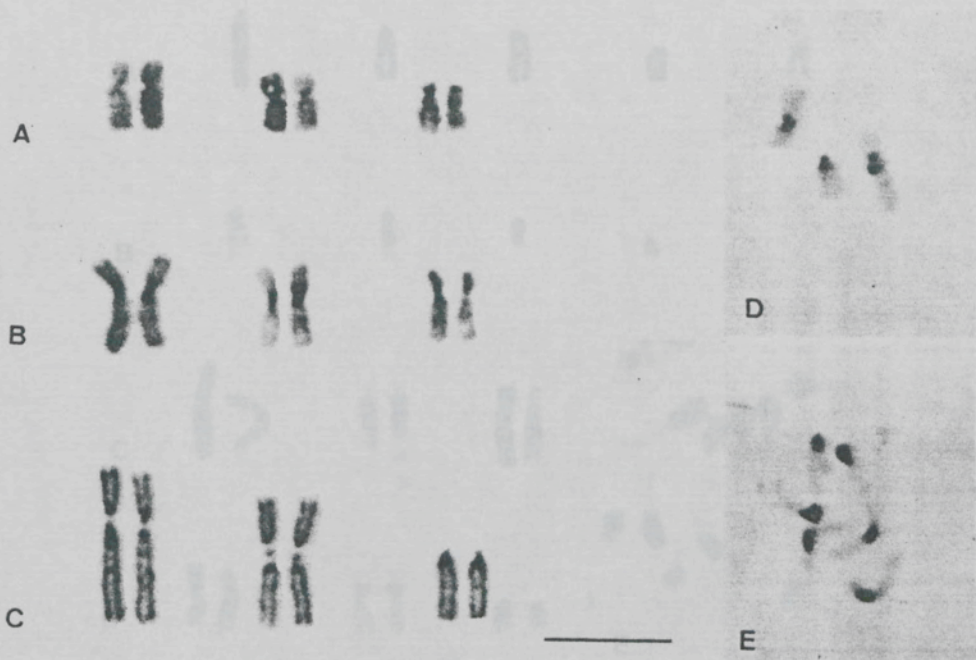


FIGURA 12 - *Microstigmus* gr. *luederwaldti* - Cariótipos de Fêmeas com $2n=6$ Cromossomos, A) *M. N390*, B) *M. luederwaldti* e C) *M. arlei*. Banda C em metáfase Ganglionar de D) Macho de *M. arlei* e E) de Fêmea de *M. luederwaldti*.

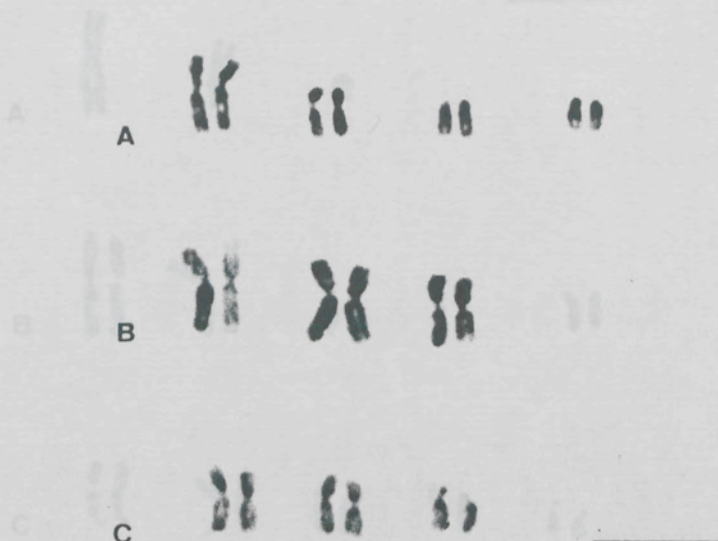


FIGURA 13 - *Microstigmus* gr. *nigrifex* A) Cariótipo de Fêmea de M. N411 com $2n=8$, B) de Fêmea de *M. cfr. nigrifex*, com $2n=6$ e C) de Fêmea de M. N465 com $2n=6$ Cromossomos.

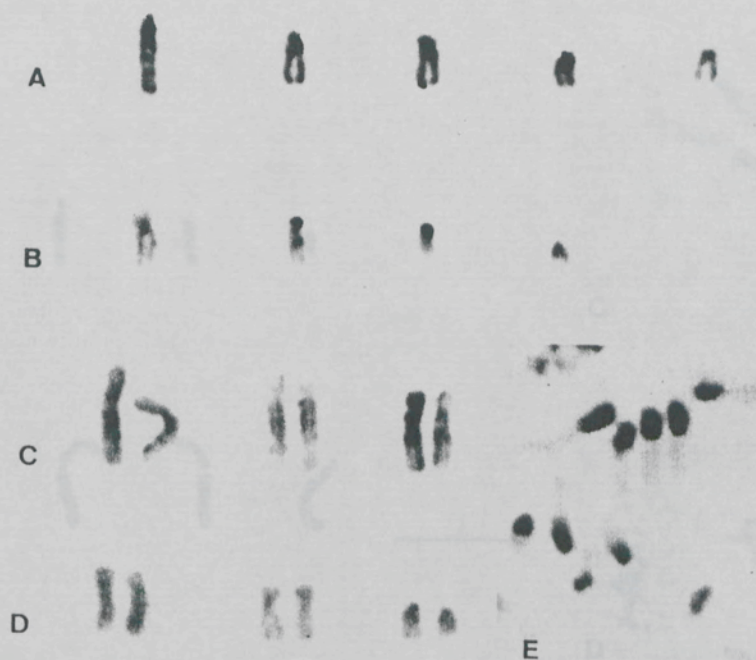


FIGURA 14 - Cariótipos de A) Macho de *Microstigmus brasiliensis* com $n=5$, B) Macho de M. N564 com $n=4$ Cromossomos, C) Fêmea de M. N570 com $2n=6$ e D) Fêmea de M. N449 com $2n=6$ Cromossomos. E) Banda C em Metáfase de Fêmea de *M. brasiliensis* com $2n=10$.

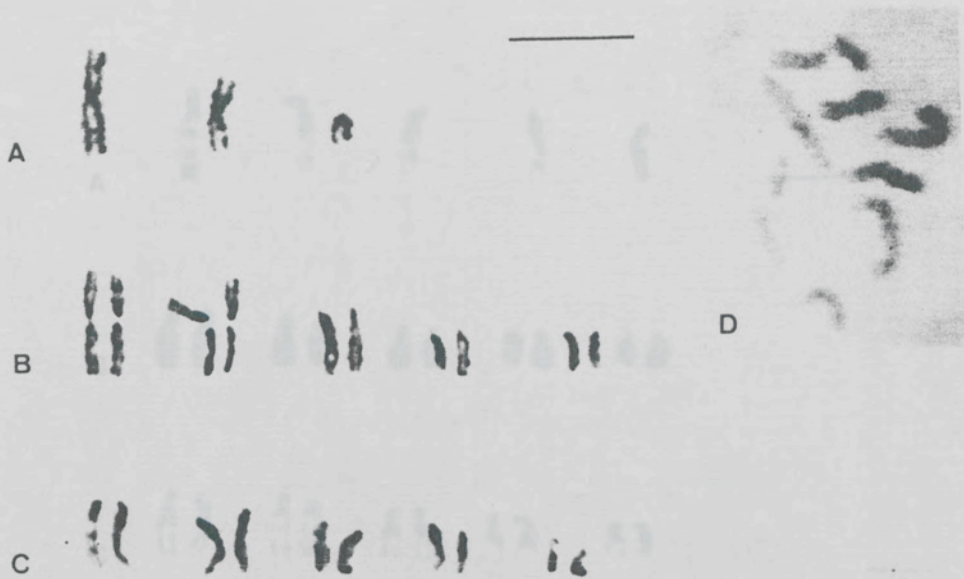


FIGURA 15 - *Microstigmus* gr. *lobifex* A) Cariótipo de Macho de *M. cfr. lobifex* com $n=3$, B) de Fêmea de *M. N487* com $2n=10$ e C) de Fêmea de *M. N439* com $2n=10$. D) Banda C em Metáfase Ganglionar de Fêmea de *M. N487* com $2n=10$ Cromossomos.

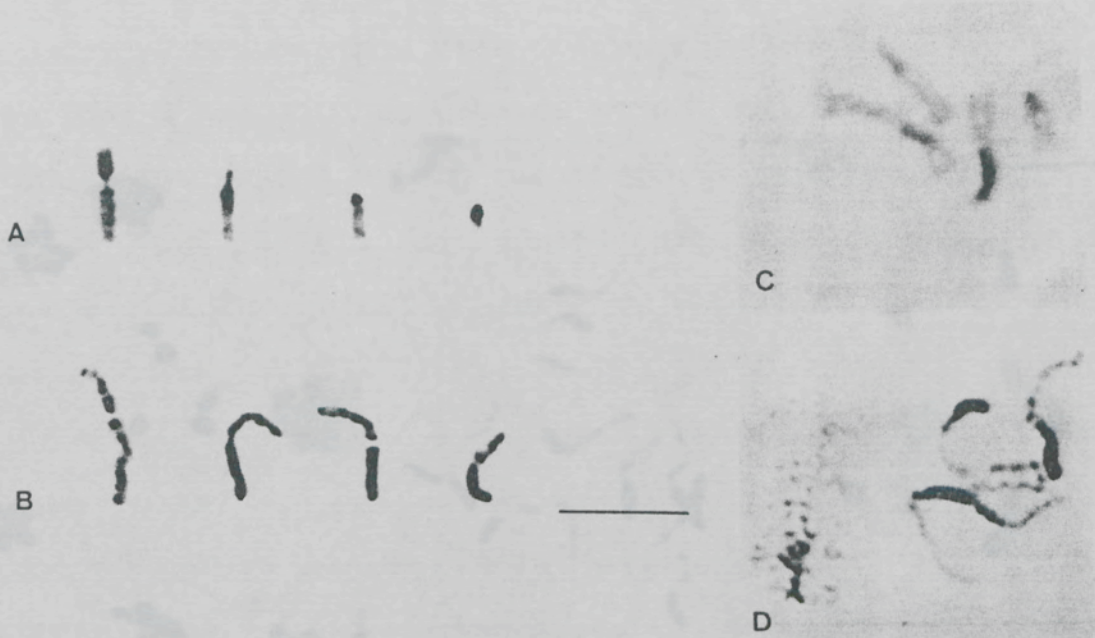


FIGURA 16 - Cariótipos de Machos com $n=4$ Cromossomos. A) *Microstigmus* GARM4 e B) *M. N632*. C) Banda C em Metáfase de Macho de *M. GARM4* com $n=4$. D) Padrão de Heteropicnose Apresentado nos Cromossomos com Coloração Convencional em *M. N632*.



FIGURA 17 - *Microstigmus* gr. Theridii A) Cariótipo de Macho de *M. N407* com $n=5$, B) de Fêmea de *M. spG* com $2n=10$ e C) de Fêmea de *M. spH* com $2n=10$ Cromossomos.

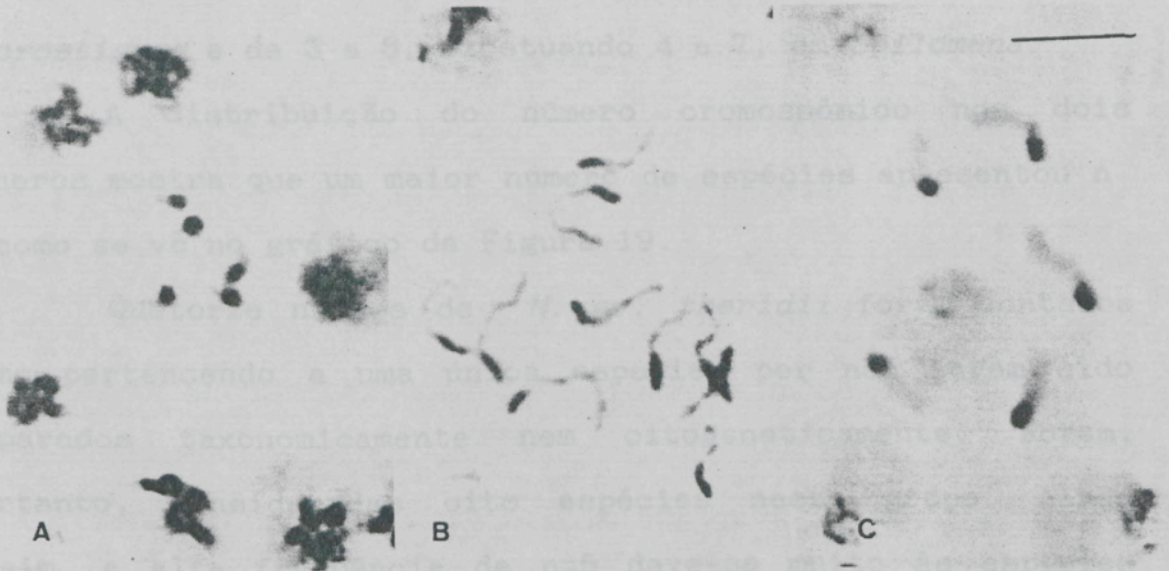


FIGURA 18 - Banda C em Metáfases Ganglionares de A) *M. N407* com $n=5$, B) *M. spG* com $2n=10$ e C) *M. spH* com $n=5$ Cromossomos.



4. DISCUSSÃO

4.1. Variação Interespecífica do Número Cromossômico

O estudo realizado em 36 espécies de *Microstigmus* e 6 de *Spilomena* evidenciou uma grande variação no número cromossômico dentro dos dois gêneros. O número haplóide variou de 3 a 11, excetuando $n=6$, não encontrado em *Microstigmus* e de 3 a 8, excetuando 4 e 7, em *Spilomena*.

A distribuição do número cromossômico nos dois gêneros mostra que um maior número de espécies apresentou $n=5$ como se vê no gráfico da Figura 19.

Quatorze ninhos de *M. gr. theridii* foram contados como pertencendo a uma única espécie, por não terem sido separados taxonomicamente nem citogeneticamente. Foram, portanto, consideradas oito espécies neste grupo. Ainda assim, a alta frequência de $n=5$ deve-se muito às espécies deste grupo, que apresentou grande constância no número e na morfologia cromossômica. A alta frequência de números

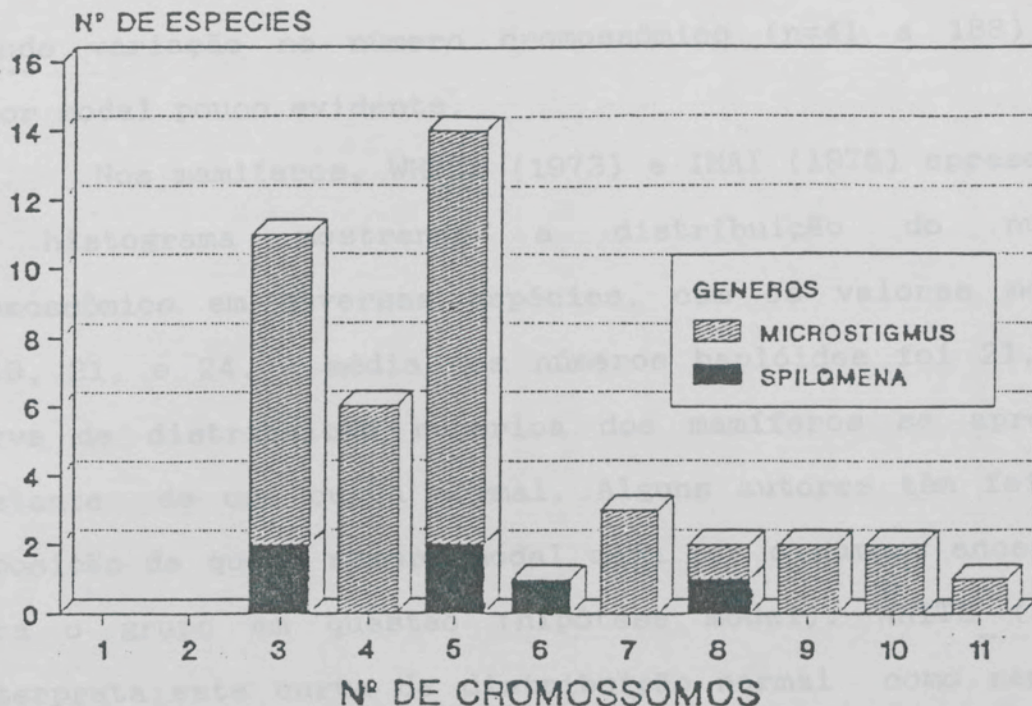


FIGURA 19 - Histograma da Distribuição dos Números Cromossômicos Haplóides em *Microstigmus* e *Spilomena*, Mostrando a Distribuição Bimodal ($n=3$ e $n=5$) com Antimoda em $n=4$.

cromossômicos em torno de valores baixos como $n=3$ e 5 é um fato pouco comum entre os insetos.

De acordo com WHITE (1973), o número haplóide na maioria das espécies animais se distribuem entre 6 e 20. Números abaixo e acima destes valores são raros, exceto em alguns poucos grupos. O que se observa para os mais diferentes grupos taxonômicos é que a distribuição do número cromossômico apresenta um valor modal em torno do qual se distribuem a grande maioria das espécies, sendo os valores extremos os de menor freqüência. Uma exceção é apresentada por WHITE (1973), citando dados de FASTEN (1918), e de NIIYAMA (1959, 1962, 1966) em Crustáceos, que apresentam uma

grande variação no número cromossômico ($n=41$ a 188) com valor modal pouco evidente.

Nos mamíferos, WHITE (1973) e IMAI (1975) apresentam um histograma mostrando a distribuição do número cromossômico em diversas espécies, com os valores modais $n=19$, 21 , e 24 . A média dos números haplóides foi $21,8$. A curva de distribuição numérica dos mamíferos se aproxima bastante de uma curva normal. Alguns autores têm feito a suposição de que o número modal deva ser o número ancestral para o grupo em questão (hipótese modal). WHITE (1973) interpreta esta curva de distribuição normal como sendo a média de aumento no número cromossômico por fissão tão freqüente na filogenia dos mamíferos quanto a de diminuição deste número por fusão. Já aqueles grupos que tivessem a curva desviada para a esquerda seriam interpretados como sendo aqueles onde estariam ocorrendo mais fusões do que dissociações e vice-versa.

Outros histogramas apresentados por WHITE (1973) mostraram sempre o mesmo padrão, no que se refere a ocorrência de um ou mais valores modais, em torno do qual se distribuem a maioria dos números cromossômicos encontrados no grupo, em Heteroptera Pentatomidae (valor modal $n=7$), Lepidoptera (valores modais $n=30$ e 31), Mollusca (três valores modais, $n=13$, 18 e 29), Aracnida (aranhas - valores modais $n=13$ e 15) e também em pássaros (valor modal $n=40$).

Em Hymenoptera foi encontrado n variando de 1 a 47 nas formigas (IMAI et al. 1977, 1986, 1988, 1990). A distribuição é bimodal ($n=10$ e 15) com antimoda em $n=12$ e 13 (IMAI et al. 1984, 1988).

IMAI et al. (1977) discutem três hipóteses para a evolução do cariótipo em formigas com base na variação numérica dos cromossomos, considerando três possíveis ancestralidades para o número haplóide. Na hipótese 1, as espécies primordiais tiveram números cromossômicos elevados e os cariótipos tenderam para números menores ao longo da evolução (hipótese da fusão). Na hipótese 2, o número ancestral foi baixo e tenderam a aumentar (hipótese da fissão). Na hipótese 3, o número modal teria sido o número ancestral, ocorrendo variação numérica em ambos os sentidos (hipótese modal).

Os dados encontrados em insetos e mesmo em mamíferos levaram IMAI et al. (1977) à conclusão de que seria menos provável que a evolução dos eucariotos tenha começado com um número elevado de cromossomos com posterior redução. Desta forma têm mais suporte a hipótese da fissão e a hipótese modal.

Dada a ocorrência de números cromossômicos duplicados em espécies taxonomicamente relacionadas, a evolução do cariótipo por poliploidização tem sido sugerida em alguns casos (IMAI, 1969; CROZIER, 1975). A hipótese da fissão está mais de acordo com os dados encontrados em formigas, (IMAI et al., 1977). No entanto a hipótese modal não difere operacionalmente desta, portanto, estas duas hipóteses não são mutuamente exclusivas.

Estudos citogenéticos em abelhas (KERR, 1952, 1969; KERR & SILVEIRA, 1972; TARELHO, 1973) levantaram evidências de eventos de poliploidia ocorrendo no grupo. As abelhas, apresentam distribuição bimodal do número haplóide, com pico

em $n=8$ e 9 e $n=17$ e 18 . A maioria das espécies apresentam número cromossômico em torno do maior valor modal. O aumento do número cromossômico nas abelhas ocorreu primeiro por poliploidia e, secundariamente, por rearranjos do tipo Robertsoniano (TARELHO, 1973).

Considerando estas observações, pressupõe-se que nas abelhas os rearranjos Robertsonianos devem ter sido mais freqüentes após ter ocorrido a duplicação do número cromossômico, uma vez que a variação numérica foi maior em torno de $n=18$.

Para vespas sociais da família Vespidae, POMPOLO (1988) agrupou dados de 50 espécies num histograma, mostrando as freqüências de distribuição dos números cromossômicos com pico em $n=25$ e o número haplóide variando de 6 a 34. O número $n=34$ é o maior encontrado na família Vespidae (POMPOLO & TAKAHASHI, 1990b). O que se observa é que além do pico em $n=25$ há pelo menos dois outros com freqüência menor em $n=16-17$ e $n=32$.

O número haplóide varia extremamente na subfamília Polistinae ($n=6-34$), sendo mais uniforme na subfamília Vespinae (POMPOLO, 1988; HOSHIBA et al. 1989)

Os membros da subfamília Vespinae assemelham-se mais entre si cariotipicamente do que os da Polistinae. Nestes Vespinae notou-se além de uma estabilidade em nível numérico, também em nível morfológico (HOSHIBA et al., 1989).

A estabilidade no número cromossômico foi registrada também entre os Symphyta da família Tenthredinidae. Esta é a maior família dos Symphyta, com mais de 5000 espécies conhecidas. Os dados de citogenética de 201 espécies (NAITO,

1982) mostraram o número haplóide variando de $n=5-22$. O número modal 10 foi registrado em 83 espécies, sendo 65 delas pertencendo a apenas dois gêneros. Além disso, 30 espécies apresentaram $n=9$, 23 apresentaram $n=8$ e 16 $n=7$. Portanto, 76% das espécies apresentaram n variando entre 7 e 10, números próximos ao valor modal.

NAITO (1982) acredita se aplicar, neste caso, a hipótese modal, sendo o valor modal ancestral para o grupo e a variação em torno deste número devido principalmente a rearranjos Robertsonianos. Embora a hipótese da fissão argumente em favor do aumento do número cromossômico, a fusão cêntrica neste grupo também certamente ocorreria. O número modal apresenta uma certa correlação com caracteres primitivos em nível de algumas subfamílias. Por outro lado, algumas espécies com números cromossômicos menores parecem ser especializadas, considerando caracteres morfológicos. Foi então sugerido que estes números menores fossem analisados como sendo derivados de números modais menores, em nível de cada linha filética (no, caso em nível de subfamílias).

Em *Spilomena* e *Microstigmus*, que são dois gêneros estreitamente relacionados dentro da subfamília Pemphredoninae, o que ocorre é, de alguma forma, semelhante aos Tenthredinidae, porém com uma distribuição bimodal (moda em $n=3$ e 5). A associação do valor modal à ancestralidade do grupo é também possível de ser feita para os dois gêneros em estudo. Os números $n=3$ e 5 são os mais freqüentes tanto em *Spilomena* quanto em *Microstigmus* (Figura 19), apesar de em *Spilomena* terem sido analisadas apenas seis espécies.

Segundo MELO (1993), *Spilomena* é o gênero mais antigo e o grupo *alini* das *Spilomena* teria originado o gênero *Microstigmus*. Este se aproxima das *Spilomena* por meio do grupo *xylicola*. *M. xylicola* pode ser considerada uma espécie primitiva dentro do gênero (ver fenograma na Figura 20) e apresenta $n=3$.

Spilomena GARM2, a espécie mais primitiva em estudo apresentou $n=3$, assim como *S. GARM4* e *M. xylicola*. De forma semelhante à família Tenthredinidae, aqui também encontramos números mais elevados dentro de um grupo primitivo, como $n=8$ em *S. GARM5*. O segundo valor modal, $n=5$, embora presente em *S. brasiliensis*, é encontrado também entre as espécies mais derivadas de *Microstigmus*, uma vez que foi o único número encontrado em todo o grupo *theridii*.

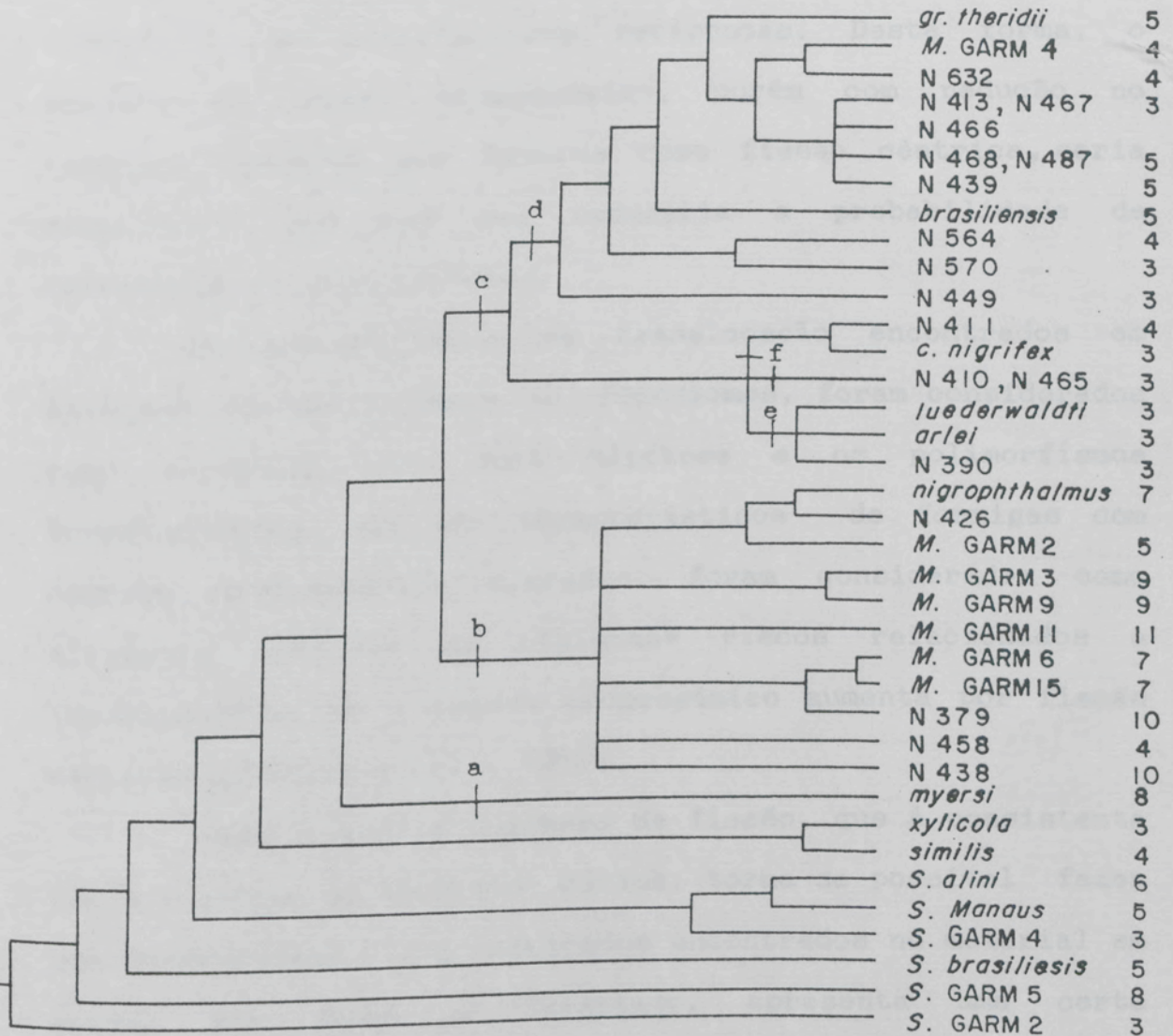
A sugestão de se analisar grupos menores separadamente (como no caso de subfamílias de Tenthredinidae) (NAITO, 1982) e considerando também a variação na morfologia dos cromossomos, juntamente com uma hipótese para a evolução do cariótipo, talvez seja a melhor maneira de se compreender a evolução do cariótipo com a complexidade encontrada no material em estudo.

4.2. Evolução do Cariótipo em *Spilomena* e *Microstigmus* com Base na Hipótese da Interação Mínima (IMAI et al., 1986).

O fenograma para os gêneros *Spilomena* e *Microstigmus* feito por MELO (1993), complementada com dados do presente

estudo (Figura 20), pode ser dividido em três grupos cariotípicos distintos, com base nos números cromossômicos. Grupo I - que reúne as espécies de *S. GARM2* até *M. xylicola* com valores de n (= 3, 8, 5, 3, 5, 6, 4, 3) mostrando uma maior heterogeneidade numérica. Grupo II - que reúne espécies dos ramos de *Microstigmus* (*Spilostigmus*) e *Microstigmus* (*Trichostigmus*) (ver fenograma), com valores de n (= 8, 10, 4, 10, 7, 7, 11, 9, 9, 5, 7) mais homogêneos em torno de números mais elevados (de 7-11) e apenas dois números baixos (4 e 5). Grupo III - que pega todo o ramo de *Microstigmus* (*Microstigmus*) com valores de n (= 3, 3, 3, 3, 3, 4, 3, 3, 4, 5, 5, 5, 3, 4, 4, 5 x oito espécies) mais homogêneos em torno de números menores (de 3 a 5). Esta característica da distribuição numérica é uma evidência de que eventos ocorridos na evolução contribuíram diferentemente para evolução do cariótipo nestes três grupos cariotípicos.

IMAI et al. (1977, 1984, 1988), utilizando dados de mais de 500 espécies de formigas, dividiu-as em dois grupos: Espécies com $n \leq 12$ (números baixos) e espécies com $n > 12$ (números elevados). Esta divisão baseou-se no fato de que polimorfismos de translocação apareciam preferencialmente no primeiro grupo, enquanto que polimorfismos Robertsonianos ocorriam mais no segundo. IMAI et al. (1986) propõem uma hipótese para evolução do cariótipo em eucariotos, a hipótese da interação mínima. Esta hipótese estabelece que a evolução do cariótipo nos eucariotos tem sido em grande parte moldada pela seleção no sentido de reduzir a ocorrência de mutações cromossômicas não-adaptativas,



a) *M. (Spilostigmus)* b) *Microstigmus (Trichostigmus)* c) *M. (Microstigmus)* d) *M. Gr. gr. theridii* e) grupo *luederwaldti* f) grupo *nigrifex*.

FIGURA 20 - Fenograma das relações entre várias espécies de *Microstigmus* e *Spilomena* com base em caracteres morfológicos e isozimáticos (Melo, 1990 e 1993) e complementada com números cromossômicos haplóides (presente trabalho).

como a translocação recíproca. As formas de evolução do cariótipo seriam estabelecidas pelo balanço entre o tamanho do genoma e volume nuclear no paquíteno. Quanto maior fosse esta razão, mais freqüentemente os cromossomos iriam interagir e conseqüentemente maior seria probabilidade de ocorrência de translocações recíprocas. Desta forma, o aumento do número cromossômico, porém com redução no tamanho, causados por fatores como fissão cêntrica, seria adaptativo, uma vez que reduziria a probabilidade de ocorrência de translocações.

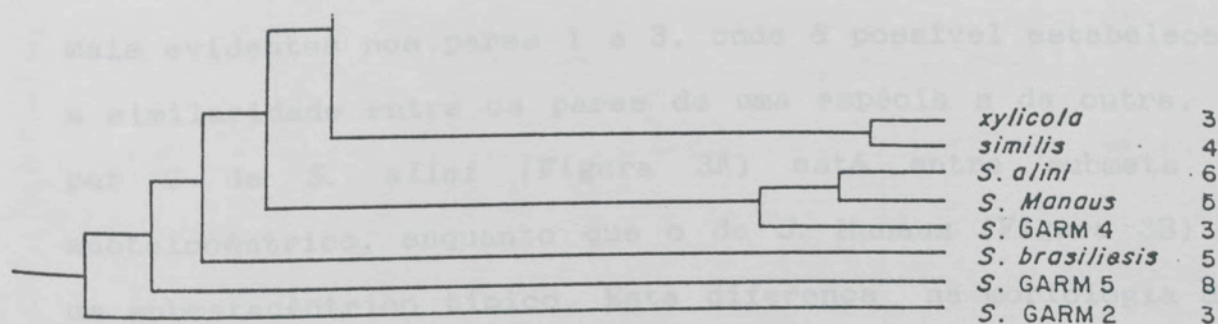
Os polimorfismos de translocação encontrados em formigas com baixo número de cromossomos, foram considerados como evidência para esta hipótese e os polimorfismos Robertsonianos, que são característicos de formigas com números cromossômicos elevados, foram considerados como altamente efetivos em minimizar riscos relacionados a translocações, se o número cromossômico aumenta por fissão cêntrica (HOSHIBA et al., 1989).

Considerando a hipótese da fissão, que é consistente com a hipótese da interação mínima, torna-se possível fazer uma interpretação dos resultados encontrados no material em estudo que, como já levantado, apresenta uma certa complexidade. Além de rearranjos do tipo Robertsonianos (fissão e fusão cêntricas), certamente outras formas de alteração do número e, ou, morfologia cromossômica, como inversão pericêntrica, crescimento em tandem de heterocromatina constitutiva (C.T.H.C), eliminação de heterocromatina constitutiva (E.H.C) e, talvez, poliploidia

foram importantes na evolução do cariótipo em *Spilomena* e *Microstigmus*.

Discutiremos, a seguir, os resultados encontrados dentro de cada grupo cariotípico.

Grupo cariotípico I (*S. GARM2* - *M. xylicola*, ver fenograma da Figura 20, reproduzido abaixo):



O grupo cariotípico I, como foi mostrado apresenta uma grande heterogeneidade numérica e também morfológica. O fato de *Spilomena* GARM2 (Figura 1), uma espécie primitiva, ter apresentado $n=3$ e ser este um número modal, pode ser uma evidência de que este tenha sido o número ancestral deste grupo. O cariótipo de *S. GARM5* (Figura 2) apresentou cromossomos telocêntricos e acrocêntricos, e um n elevado para este grupo. Isso pode ser uma evidência de ocorrência de fissões cêntricas. No cariótipo ancestral, onde provavelmente predominaram cromossomos meta e submetacêntricos e em menor número, rearranjos do tipo fissão cêntrica teriam ocorrido, produzindo os telocêntricos e acrocêntricos encontrados e aumentando o número cromossômico, com conseqüente diminuição no tamanho dos mesmos.

As espécies *Spilomena* GARM4, *S. Manaus* e *S. alini* (grupo *alini* - Figura 3) e *Microstigmus similis* e *M. xylicola* (grupo *xylicola*) (Figura 4) compõem outro subgrupo interessante dentro do grupo I. *S. GARM4* apresenta $n=3$ (M-SM) com cromossomos grandes, semelhantes aos *M. xylicola*. *S. Manaus* e *S. alini* possuem cariótipos diferentes de *S. GARM4*, porém com semelhanças entre si. Estas semelhanças são mais evidentes nos pares 1 e 3, onde é possível estabelecer a similaridade entre os pares de uma espécie e da outra. O par 2 de *S. alini* (Figura 3A) está entre submetacêntrico e subtelocêntrico, enquanto que o de *S. Manaus* (Figura 3B) é um submetacêntrico típico. Esta diferença na morfologia do par 2 deve ter se originado a partir de uma inversão pericêntrica ocorrida num dos dois sentidos (SM-ST = SM). Para os demais pares é mais arriscado fazer maiores afirmações sem dados citogenéticos mais refinados, como padrão de banda C por exemplo, mas nota-se alguma semelhança entre os pares 5 das duas espécies.

Existem semelhanças cariotípicas entre *S. GARM4* e *M. xylicola*, tanto no número quanto na morfologia dos cromossomos. Isto reforça a hipótese de MELO (1993) de que o gênero *Microstigmus* teria se originado do grupo *alini* de *Spilomena*. *Microstigmus xylicola* é considerada uma espécie primitiva dentro do gênero e se aproxima também cariotipicamente do grupo *alini*, pelo menos através de uma das espécies aqui estudadas, *S. GARM4*. Esta semelhança em nível cariotípico, no entanto, não implica em maior semelhança morfológica com esta espécie do que com outras do grupo *alini*. O que se pode sugerir é que o número

cromossômico do ancestral, que por um lado deu origem aos do grupo *alini* e por outro aqueles do grupo *xylicola*, deve ter tido $n=3$ (SM-M) do tipo encontrado nestas espécies, ou seja, constitui esta uma forma conservada de cariótipo. Dentro do grupo *xylicola* (Figura 4) existem algumas semelhanças em nível de morfologia cromossômica. Os pares 1, 2, e 3 são do tipo M-SM em ambas as espécies. Os cariótipos apresentados na Figura 4 A e B apresentam uma considerável diferença de tamanho, o que levanta dúvidas sobre a homologia entre estes cromossomos. No entanto na metáfase com banda C, apresentada na Figura 4 D os cromossomos de *M. xylicola*, em tamanho mais proporcional com os de *M. similis*, mostram que esta diferença de tamanho é devido aos diferentes graus de condensação dos cromossomos no material apresentado. Pode-se considerar a possível origem do quarto par acrocêntrico em *M. similis* por fissão cêntrica em cariótipo ancestral com $n=3$, constituído por meta e submetacêntricos semelhante ao de *M. xylicola*. Uma fissão cêntrica ocorrida num dos pares daria origem a dois cromossomos telocêntricos ou acrocêntricos pequenos. Um par acrocêntrico ou telocêntrico oriundo de tal fissão foi convertido a M-SM, provavelmente por adição de heterocromatina no braço curto ou a partir do centrômero e ou inversão pericêntrica. Um esquema hipotético ilustrativo é apresentado na Figura 21.

A sugestão de que tenha ocorrido a adição de heterocromatina se deve ao fato de que os pares 1, 2 e 3 de *M. similis* diferem pouco em tamanho, enquanto que o par 4 mede cerca de metade do tamanho dos demais. Caso tivesse

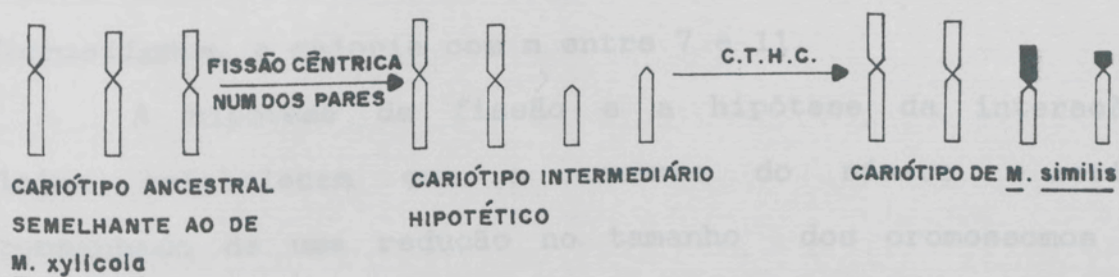
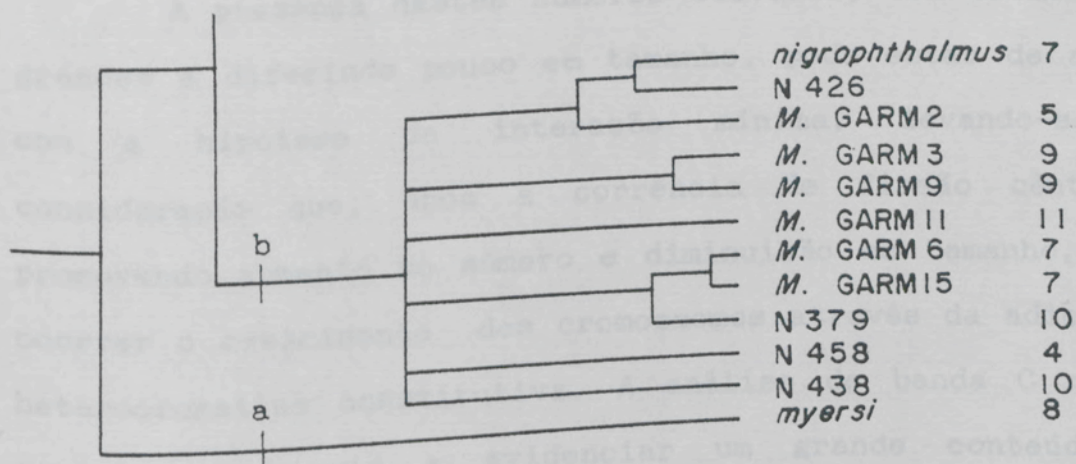


FIGURA 21 - Esquema Hipotético dos Rearranjos Ocorridos Dentro do Grupo *xylicola*. As Regiões Hachuradas Representam Heterocromatina Constitutiva.

ocorrido apenas inversão pericêntrica, um dos submetacêntricos resultante deste evento deveria ser de tamanho menor.

Grupo cariotípico II - *Microstigmus* (*Spilostigmus*) e *M. (Trichostigmus)* (Figura 20 a e b, reproduzido abaixo).



Este grupo caracterizou-se por agrupar os números cromossômicos mais elevados encontrados entre os *Microstigmus*, a maioria com n. entre 7 e 11.

A hipótese da fissão e a hipótese da interação mínima estabelecem que o aumento do número seria acompanhado de uma redução no tamanho dos cromossomos e ainda que, nestes cariótipos com números cromossômicos elevados, haveria uma tendência de ocorrer maior quantidade de cromossomos acrocêntricos e telocêntricos (IMAI et al. 1977, 1986, 1988).

No grupo cariotípico II há pelo menos dois tipos diferentes de cariótipos com números elevados (acima de $n=5$). Um tipo com cromossomos grandes, a maioria do tipo M-SM, variando pouco em tamanho, e o outro com cromossomos menores e com maior variação de tamanho. Ocorre ainda, porém em menor frequência, cariótipos com número baixo ($n \leq 5$) e cromossomos grandes do tipo M-SM com tamanhos semelhantes.

A presença destes números elevados, com cromossomos grandes e diferindo pouco em tamanho, pode estar de acordo com a hipótese da interação mínima, levando-se em consideração que, após a ocorrência de fissão cêntrica, promovendo aumento no número e diminuição no tamanho, pode ocorrer o crescimento dos cromossomos através da adição de heterocromatina constitutiva. A análise de banda C nestas espécies pode vir a evidenciar um grande conteúdo de heterocromatina nestes cariótipos.

Embora evidências de ocorrência de poliploidia nos Hymenoptera sejam raras (IMAI et al., 1977), deve-se considerar também a possibilidade de que alguns números

cromossômicos encontrados no grupo II tenham se originado através deste evento. A presença de números baixos, como $n=4$, no grupo II constitui um argumento a favor desta hipótese. Este talvez seja um tipo conservado de cariótipo, pelo menos no que tange ao número e, portanto, se constituiria numa plesiomorfia para a espécie que o apresenta.

O cariótipo de *M. myersi* com $n=8$ cromossomos (Figura 5) pode ser visto como outro argumento para a hipótese de uma poliploidia no grupo II. Os seus cromossomos podem ser agrupados dois a dois formando quatro pares: 1-2, 3-4, 5-6, 7-8, pela semelhança de tamanho e morfologia.

Fato semelhante pode ser observado em *M. nigrophtalmus*, com $n=7$ (Figura 11A), onde se pode formar pares: 1-2, 3-4, e 6-7, sobrando o par 5. KERR (1952) comenta que entre os Hymenoptera primitivos, onde o número cromossômico mais comumente encontrado é o $n=8$, num grande número de espécies encontra-se oito cromossomos que, morfologicamente podem ser arrumados em quatro pares. No entanto, dados mais refinados como, por exemplo, bandeamento C e análise do conteúdo de DNA seriam necessários antes de se concluir sobre a ocorrência de poliploidia nos *Microstigmus*.

M. GARM2 (Figura 11B), próximo a *M. nigrophtalmus* no grupo *bicolor*, apresenta $n=5$. Este caso é melhor explicado pela derivação direta a partir de um número ancestral com $n=4$. O aumento para $n=5$ teria então ocorrido por uma fissão cêntrica, que deu origem aos pares 4 e 5 atuais. O par 4 apresenta diferença de coloração entre os braços, sendo o

longo mais corado, como acontece nas regiões heterocromáticas. Embora não tenha sido feito o bandeamento C para esta espécie, este padrão algumas vezes fica evidente na coloração convencional. A seqüência de eventos então ocorridos na origem deste par deve ter envolvido pelo menos uma fissão cêntrica, uma inversão pericêntrica e crescimento em tandem de heterocromatina constitutiva (C.T.H.C.). Um dos pares no cariótipo ancestral, por fissão teria dado origem a dois cromossomos do tipo acro- telocêntrico. Ambos foram convertidos a M-SM; um por C.T.H.C. e o outro por inversão pericêntrica, como ilustra a Figura 22. A confirmação do padrão de banda C para esta espécie, no entanto, precisa ser feita.

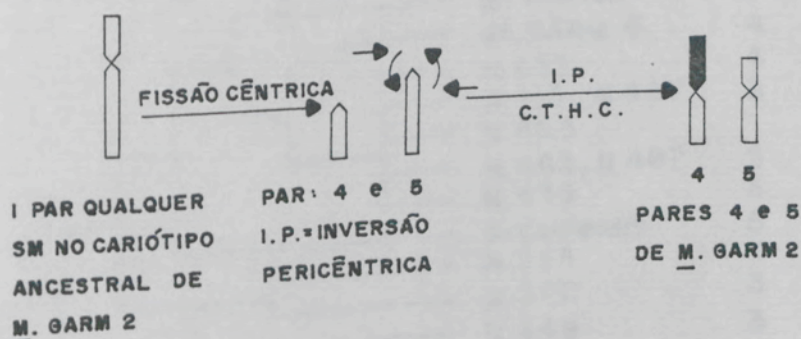
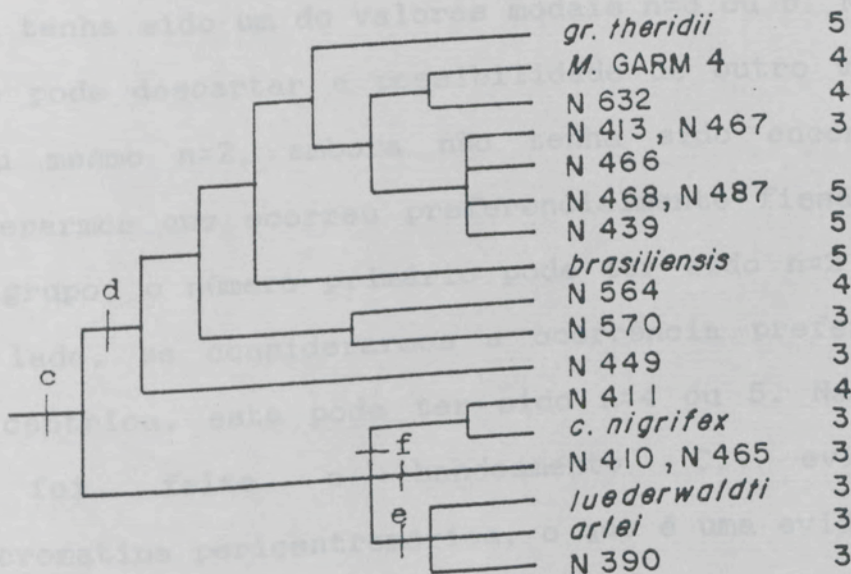


FIGURA 22 - Esquema hipotético dos rearranjos ocorridos na evolução do cariótipo de *M. GARM2*.

A origem de cariótipos com números mais elevados, como $n=10$ e 11 (Figuras 6, 8C e 9), com cromossomos pequenos e variáveis em tamanho seria melhor explicada por fissão, segundo a hipótese da interação mínima.

As espécies *M. GARM6* e *M. GARM15* apresentam cariótipos bastante semelhantes. Diferem basicamente no par 2, metacêntrico na primeira e subtelocêntrico na segunda. Estas espécies são muito semelhantes morfologicamente. Segundo Melo (não publicado), elas puderam ser separadas por apresentarem variação no local de nidificação, que é muito específico para cada espécie nos gêneros aqui estudados. Porém, o número de espécies analisadas e a escassez de material para análises mais refinadas em citogenética dificulta a maior exploração dos eventos envolvidos na evolução do cariótipo no grupo II.

Grupo cariotípico III - *Microstigmus* (*Microstigmus*)
(Ver Figura 20c, reproduzido abaixo).



O grupo cariotípico III é mais homogêneo em torno de número cromossômicos baixos. Reúne o maior número de espécies estudadas e com maior frequência de $n=3$ e 5. Neste grupo, tornou-se mais evidente a ocorrência de fissões cêntricas e C.T.H.C. Os cariótipos com $n=3$ apresentaram, na sua maioria, os dois primeiros pares do tipo M-SM e o terceiro par do tipo acro, telo ou "pseudoacrocêntrico" ("pA"). Este último é o termo criado por IMAI et al.(1988) para designar aqueles cromossomos acrocêntricos com braços heterocromáticos bem desenvolvidos, podendo chegar a ser maior que o braço eucromático por meio do C.T.H.C.

Para o grupo cariotípico II foi sugerido que o número ancestral tenha sido $n=4$. A poliploidia, com a duplicação deste número, juntamente com rearranjos do tipo Robertsoniano, foram alguns dos possíveis eventos que deram origem às formas cariotípicas encontradas naquele grupo.

No grupo III sugere-se que predominem os rearranjos do tipo Robertsoniano. O número cromossômico ancestral talvez tenha sido um dos valores modais $n=3$ ou 5. No entanto, não se pode descartar a possibilidade de outro valor, como $n=4$ ou mesmo $n=2$, embora não tenha sido encontrado. Se considerarmos que ocorreu preferencialmente fissão cêntrica neste grupo, o número primário pode ter sido $n=2$ ou 3. Por outro lado, se considerarmos a ocorrência preferencial de fusão cêntrica, este pode ter sido $n=4$ ou 5. Nas espécies onde foi feito o bandeamento C, evidenciou-se heterocromatina pericentromérica, o que é uma evidência para a ocorrência de fusão e também para inversão pericêntrica. No entanto, a presença de muitos cromossomos acro e

telocêntricos pode ser considerada como evidência de fissões cêntricas.

Um cariótipo em particular é bastante freqüente no grupo III. O $n=3$, com fórmula cariotípica $k=2M-SM + 1T-A$ ou "pA", é encontrado em *M. arlei*, *M. luederwaldti*, *M. N390* (gr. *luederwaldti* - Figura 12), *M. N465* (gr. *nigrifex* - Figura 13), *M. N449* (Figura 14) e *M. cfr. lobifex* (gr. *lobifex* - Figura 15). Este cariótipo caracteriza-se por: 1 - pequena variação na forma do terceiro par por adição de heterocromatina. 2 - é um valor modal. 3 - aparece num maior número de grupos taxonômicos diferentes do que outros cariótipos com $n=4$ ou 5 (fenograma, Figura 20c). Este cariótipo pode ser aquele que mais se aproxime do ancestral do grupo cariotípico III, pelas características descritas acima. Além disso, o valor modal $n=5$ é mais comum no grupo *theridii*, considerado por MELO (1993) como o mais derivado entre os *Microstigmus*.

Feitas as observações acima e sob à luz da hipótese da interação mínima (IMAI et al. 1986), supõe-se que, no grupo cariotípico III, este seja o cariótipo mais conservado, podendo inclusive ser o ancestral ou um dos ancestrais para o grupo, sendo os números maiores derivados dele.

- Evidências sobre evolução cariotípica no gr. *luederwaldti* (ver Figuras 12 e 20.e)

As espécies do grupo *luederwaldti* apresentaram cariótipos bem semelhantes entre si. A diferença mais evidente entre elas se refere ao terceiro par, telocêntrico em *M. arlei* e submetacêntrico com braço curto

heterocromático em *M. luederwaldti* (pseudoacrocêntrico) e, provavelmente, também em *M. N390*. *M. luederwaldti* está mais relacionada a *M. N390* e outras espécies mais derivadas de seu grupo (*gr. luederwaldti*), não-incluídas neste estudo (Melo não-publicado). Isto indica que *M. arlei* representa uma forma conservada de cariótipo. Em *M. luederwaldti*, o C.T.H.C a partir do centrômero deu origem a um submetacêntrico, como o terceiro par. Embora não se tenha feito banda C em *M. N390*, é provável que seu cariótipo seja morfológicamente semelhante a este.

- Evidências para evolução cariotípica no *gr. nigrifex* (Figura 13 e 20.f).

As três espécies deste grupo apresentaram diferenças significativas a partir do par 3. *M. N465* tem cariótipo parecido com o de *M. arlei*, podendo ser considerado uma plesiomorfia.

M. N411 (Figura 13A) apresentou $n=4$, sendo os dois últimos pares acrocêntricos e *M. cfr nigrifex* (Figura 13B) apresentou $2n=6$ M-SM. Ao analisar o cariótipo destas duas espécies, é possível sugerir a origem de *M. N411* a partir de um cariótipo semelhante ao de *M. cfr. nigrifex*. Os dois pares acrocêntricos em *M. N411* teriam se derivado de uma fissão cêntrica, provavelmente do par dois, dado o tamanho dos acrocêntricos e também porque o par um apresenta uma constrição secundária não presente nos pares acrocêntricos.

- Evolução cariotípica dentro do Gr. *gr. theridii* (Figuras 14-17 e 20.d).

Este grupo taxonômico engloba o restante das espécies a partir de *M. N449* (ver Figura 20). Como se

observa na Figura 14, *M. N499* e *M. N570* apresentam o mesmo número cromossômico, mas diferem na morfologia. Talvez o bandeamento C nestas espécies venha a trazer resultados interessantes a respeito de possíveis homologias entre estes dois cariótipos.

M. N564 apresenta seu cariótipo bastante semelhante ao de *M. GARM4* (um par SM e três pares telocêntricos). No entanto, estas duas espécies estão distantes taxonomicamente. Este cariótipo pode ter se originado mais de uma vez dentro deste Grande grupo ou constitui um caráter plesiomórfico em *M. GARM4*.

Fato semelhante se observa com relação a *M. brasiliensis* (Figura 14A) e *M. gr. theridii* (Figura 17), onde todas as espécies apresentaram cariótipos com bastante semelhança, inclusive quanto ao padrão de banda C, nas espécies que foram analisadas quanto a este padrão. Nas análises iniciais deste trabalho chegou-se a colocar *M. brasiliensis* dentro do grupo *theridii*. Entretanto os dados de MELO (1993) sobre a taxonomia a separa dele, como se vê na Figura 20.

O cariótipo que deu origem ao do grupo *theridii* e *M. brasiliensis* poderia ter sido o mesmo $n=3$ sugerido para os grupos anteriores, semelhante ao de *M. arlei* (Figura 12C) e *M. cfr lobifex* (Figura 15A).

O $n=4$ de *M. N564* (Figura 14B) e *M. GARM4* corresponderia ao cariótipo intermediário na transição para o $n=5$ do grupo *theridii* e *M. brasiliensis* (Figura 14A, e 17), conforme a Figura 23.

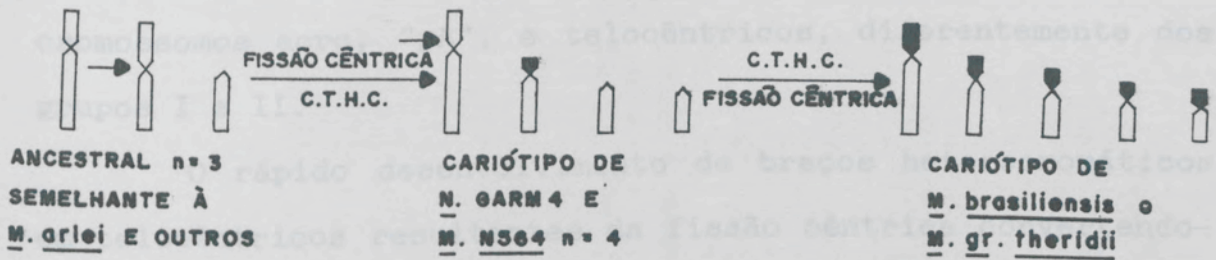


FIGURA 23 - Esquema Hipotético dos passos Evolutivos Envolvendo três dos Cariótipos Encontrados no Gr. *gr. theridii*.

A inclusão de *M. N439* e *M. N487* (Figura 15) neste esquema fica dificultado pelo surgimento de mais um par cromossômico, cuja origem não pôde ser proposta com os dados obtidos. São dois cariótipos que apresentam semelhanças entre si e se tratam de duas espécies estreitamente relacionadas taxonomicamente.

Neste grupo, verificou-se a ocorrência de C.T.H.C. no par dois de *M. N487* (Figura 15D) e, se há homologia entre o cariótipo desta espécie com o de *M. N439*, pode-se dizer que no quinto par ocorreu uma inversão, dando origem ao SM neste último.

M. GARM4 e *M. N632* diferem citogeneticamente apenas no conteúdo de heterocromatina havendo, portanto, homologia nas regiões eucromáticas nos quatro pares. Entre as espécies estudadas *M. N632* foi a que apresentou maior conteúdo de heterocromatina (Figuras 16B e D). O C.T.H.C. parece ter

vido uma tendência do grupo cariotípico III. Os rearranjos do tipo Robertsoniano, principalmente fissão cêntrica, parece ter sido outra tendência pela grande freqüência de cromossomos acro, "pA", e telocêntricos, diferentemente dos grupos I e II.

O rápido desenvolvimento de braços heterocromáticos em telocêntricos resultantes da fissão cêntrica convertendo-os em acrocêntricos e, ou, M-SM (pseudoacrocêntricos - IMAI et al. [1988]) parece ter sido selecionado como forma de devolver a estabilidade telomérica nestes cromossomos. Assim, é sugerido que os telocêntricos se desenvolvam rapidamente em acrocêntricos, por C.T.H.C. e estes em M-SM. Os riscos com a translocação, neste caso, tendem a aumentar porque a heterocromatina tende a formar associações não-específicas. A fusão cêntrica, com eliminação de heterocromatina constitutiva reduziria estes riscos, mas traria de volta os riscos com translocações, devido ao aumento do tamanho dos cromossomos. A inversão pericêntrica, acompanhada de E.H.C, seria uma forma de produzir cariótipos estáveis, com um novo e elevado número de cromossomos de tamanho menor, como prediz a hipótese da interação mínima.

Com isso, IMAI et al. (1988) propõem que a heterocromatina tende a ser eliminada por fusão cêntrica e principalmente por inversão pericêntrica.

A presença de heterocromatina pericentromérica é uma evidência para os rearranjos acima.

Este tipo de heterocromatina é encontrada nos três grupos aqui discutidos. Nos grupos I e II, por serem de origem mais antiga, talvez já tenha ocorrido a eliminação da maior

parte da heterocromatina onde esta existia. No grupo III, por ser esta adição de heterocromatina de origem mais recente, ainda é comum em várias espécies.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

A análise de 36 espécies de *Microstigmus* e seis de *Spilomena* evidenciou uma grande variação no número cromossômico nestes dois gêneros. O número haplóide variou de 3 a 11 em *Microstigmus* e de 3 a 6 em *Spilomena*. A distribuição dos números cromossômicos foi bimodal ($n=3$ e 5) e 74% das espécies apresentaram $n \leq 5$.

Com base na variação numérica foi possível dividir as espécies estudadas em três grupos cariotípicos: O grupo I, que apresentou maior heterogeneidade numérica (n variando de 3 a 8), o grupo II, mais homogêneo em torno de números elevados (a maioria com n entre 7 e 11) e apenas 2 valores baixos ($n=4$ e 5) e o grupo III, mais homogêneo em torno de valores baixos (com n variando de 3 a 5). O grupo I contém as espécies mais primitivas de *Microstigmus* e as *Spilomena* de acordo com o esquema filogenético de MBLG (1993). O grupo II corresponde às espécies de *Microstigmus* intermediárias neste esquema e o grupo III contém as espécies mais derivadas de *Microstigmus*.

A evolução do cariótipo pela hipótese modal, a qual estabelece que o número modal deve ser o ancestral de um determinado grupo, tem sido sugerida por alguns autores. Já a hipótese da interação mínima de IMAI et al. (1986) estabelece que o número de cromossomos tende a aumentar por meio de fissões centrílicas, com consequente diminuição do tamanho dos cromossomos.

5. RESUMO E CONCLUSOES

Os estudos realizados no sentido de minimizar a interação entre os cromossomos e com isso reduzir a ocorrência de mutações cromossômicas deletórias, como a translocação recíproca. Embora esta hipótese argumente

A análise de 36 espécies de *Microstigmus* e seis de *Spilomena* evidenciou uma grande variação no número cromossômico nestes dois gêneros. O número haplóide variou de 3 a 11 em *Microstigmus* e de 3 a 8 em *Spilomena*. A distribuição dos números cromossômicos foi bimodal (n=3 e 5) e 74% das espécies apresentaram $n \leq 5$.

Com base na variação numérica foi possível dividir as espécies estudadas em três grupos cariotípicos: O grupo I, que apresentou maior heterogeneidade numérica (n variando de 3 a 8), o grupo II, mais homogêneo em torno de números elevados (a maioria com n entre 7 e 11) e apenas 2 valores baixos (n=4 e 5) e o grupo III, mais homogêneo em torno de valores baixos (com n variando de 3 a 5). O grupo I contém as espécies mais primitivas de *Microstigmus* e as *Spilomena* de acordo com o esquema filogenético de MELO (1993). O grupo II corresponde às espécies de *Microstigmus* intermediárias neste esquema e o grupo III contém as espécies mais derivadas de *Microstigmus*.

A evolução do cariótipo pela hipótese modal, a qual estabelece que o número modal deva ser o ancestral de um determinado grupo, tem sido sugerida por alguns autores. Já a hipótese da interação mínima de IMAI et al. (1986) estabelece que o número de cromossomos tende a aumentar por meio de fissões cêntricas, com conseqüente diminuição do tamanho dos mesmos. Isto seria adaptativo no sentido de minimizar a interação entre os cromossomos e com isso reduzir a ocorrência de mutações cromossômicas deletérias, como a translocação recíproca. Embora esta hipótese argumente em favor das fissões, considera-se que fusões cêntricas podem ocorrer. A hipótese modal estabelece que as variações numéricas ocorrem nos dois sentidos a partir do número ancestral. Como uma hipótese não exclui a outra, elas podem ser aplicadas conjuntamente.

Em *Microstigmus* e *Spilomena* os valores modais estão entre os números mais baixos encontrados, o que levou a se sugerir que um número baixo seja ancestral para o grupo em estudo, tendo os demais derivado deste por rearranjos Robertsonianos, como estabelece a hipótese da interação mínima.

A abordagem sobre a evolução do cariótipo foi apenas tentativa, principalmente nos grupo I e II onde as mudanças numéricas e morfológicas foram muito grandes e freqüentes. A sugestão de ocorrência de poliploidia em duas espécies do grupo II (*M. myersi* e *M. nigrophtalmus*) foi com base apenas nas semelhanças entre os pares no complemento haplóide e pelo fato de neste grupo haver números baixos (como no suposto ancestral) juntos a números elevados. A

poliploidia é um evento raro, no entanto, existem algumas evidências de sua ocorrência entre os Hymenoptera, não devendo esta hipótese, portanto ser ignorada. Estudos futuros podem vir a trazer argumentos a favor ou contra a mesma.

O grupo cariotípico III apresentou menor variação no número e na morfologia quando comparado com os anteriores. Devido a isso foi possível fazer com certa segurança observações e comparações cariotípicas entre as espécies dos diversos grupos taxonômicos nele reunidos.

Os rearranjos Robertsonianos, principalmente do tipo fissão cêntrica, parecem ter sido mais freqüentes neste grupo, dada a maior ocorrência de cromossomos acrocêntricos e telocêntricos, que caracterizam este tipo de rearranjo. Os telocêntricos, segundo IMAI et al. (1988) são convertidos em acrocêntricos pelo rápido crescimento de heterocromatina, como forma de recuperar a estabilidade telomérica. Este tipo de cromossomo (acrocêntrico com braço curto heterocromático) foi muito freqüente no grupo cariotípico III, sendo mais uma evidência para a ocorrência de fissões cênicas. Estes dados permitem concluir que há uma tendência para o aumento do número cromossômico neste grupo por fissões, como prediz a hipótese da interação mínima. O esquema filogenético de MELO (1993) foi importante no sentido de que formou grupos de espécies relacionadas, o que permitiu uma análise mais segura dos dados de citogenética. O número de espécies analisadas ainda é pequeno para se entender melhor a evolução do cariótipo nestas vespas. Há um grande número de espécies novas ainda não descritas e muitas outras podem vir

a ser encontradas, uma vez que este grupo ainda é pouco estudado. Desta forma, o esquema filogenético aqui discutido pode sofrer muitas modificações com o progresso destes estudos e novas análises citogenéticas poderão vir a esclarecer muitos pontos de dúvidas deixados pelos poucos dados analisados até o presente trabalho.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- ANTROPOV, A.V. To the knowledge of the fauna of the genus *Spillocopa* (Hymenoptera, Sphecoidae) of the South American. *Zool. Zh.*, 70: 57-62, 1991.
- ANTROPOV, A.V. *Parastigmus*, a new genus of the subtribe *Stigmina* from South America (Hymenoptera, Sphecoidae, Pemphredoninae). *Linzer* **BIBLIOGRAFIA**, 24(1): 97-102, 1992.
- BOHART, R.M. & MENKE, A.S. *Sphecidae wasps of the world: a generic revision*. Berkeley, University of California, 1976. 696p.
- COSTA, M.A.; POMPOLO, S.G.P.; CAMPOS, L.A.O. Supernumerary chromosomes in *Pertarona cupira* (Hymenoptera, Apidae, Melliponinae). *Rev. Bras. Genet.*, 15(4): 801-805, 1992.
- COSTA, M.A.; NRELO, S.A.R.M.; POMPOLO, S.G.P.; CAMPOS, L.A.O. Karyotypes and heterochromatin distribution (C-Banding patterns) in three species of *Microstigmus* wasps (Hymenoptera, Sphecidae, Pemphredoninae). *Rev. Bras. Genet.*, 16(4): 923-926, 1993.
- CROSLAND, M.W.J.; CROZIER, R.H.; IMAI, H.T. Evidence for several sibling biological species centred on *Nyrneccia pilosula* (F. Smith) (Hymenoptera: Formicidae). *J. Austr. Soc.*, 27: 13-14, 1988.
- CROZIER, R.H. Hymenoptera. In: JOHN, E., ed. *Animal cytogenetics*. Berlin, Gebrüder Borntraeger, 1975, v.3 (Insecta, 7) p. 1-36.
- CROZIER, R.H. Evolutionary genetics of the Hymenoptera. *Ann. Rev. Entomol.*, 22: 253-286, 1977.

CRUZ-LAMUN, C. Haplodiploidy in Hymenoptera. *Rev. Bras. Genet.*, 9(3): 433-449, 1984.

EVANS, H.K. & WEST-EBERHARD, H.J. *The wasps*. Ann. Arbor, University of Michigan, 1970. 265p.

FAHRENHÖRST, H. Nachweis überelastischer Chromosomenzahlen (=18) bei allen 4 Apis-Arten. *Apidologie*, 8(1): 89-100, 1977a.

FAHRENHÖRST, H. Chromosome number in the tropical honeybee species *Apis dorsata* and *Apis florea*. *J. Apic. Res.*, 16(1): 55-58, 1977b.

FAHRENHÖRST, H. Spermatogene ... *Genet. Mag.*, 34: 277-306, 1918.

FICKER, A.T. A new genus and species of Pimpline wasp from Africa and key to genera (Hymenoptera, Pimplidae). *Ann. Entomol. Soc. Amer.*, 11(9): 1081-1094, 1917.

BIBLIOGRAFIA

ANTROPOV, A.V. To the knowledge of the fauna of the genus *Spilomena* (Hymenoptera, Sphecidae) of the South American. *Zod. Zh.*, 70: 57-62, 1991.

ANTROPOV, A.V. *Parastigmus*, a new genus of the subtribe Stigmina from South America (Hymenoptera, Sphecidae, Pempredoninae) *Linzer. Biol. Beitr.*, 24(1): 97-102, 1992.

BOHART, R.M. & MENKE, A.S. *Sphecidae wasps of the world: a generic revision*. Berkeley, University of Callifornia, 1976. 695p.

COSTA, M.A.; POMPOLO, S.G.P.; CAMPOS, L.A.O. Supernumerary chromosomes in *Partamona cupira* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Rev. Bras. Genet.*, 15(4): 801-806, 1992.

COSTA, M.A.; MELO, G.A.R.M.; POMPOLO, S.G.P.; CAMPOS, L.A.O. Karyotypes and heterochromatin distribution (C-Banding patterns) in three species of *Microstigmus* wasps (Hymenoptera, Sphecidae, Pempredoninae) *Rev. Bras. Genet.*, 16(4): 923-926, 1993.

CROSLAND, M.W.J.; CROZIER, R.H.; IMAI, H.T. Evidence for several sibling biological species centred on *Myrmecia pilosula* (F. Smith) (Hymenoptera: Formicidae). *J. Austr. Soc.*, 27: 13-14, 1988.

CROZIER, R.H. Hymenoptera. In: JOHN, B., ed. *Animal cytogenetics*. Berlin, Gebruder Bornetraeger, 1975. v.3 (Insecta, 7) p. 1-95.

CROZIER, R.H. Evolutionary genetics of the Hymenoptera. *Ann. Rev. Entomol.*, 22: 263-288, 1977.

- CRUZ-LANDIM, C. Haplodiploidia em Hymenoptera. *Rev. Bras. Genet.*, 8(3): 433-449, 1984.
- EVANS, H.E. & WEST-EBERHARD, M.J. *The wasps*. Ann. Arbor, University of Michigan, 1970. 265p.
- FAHRENHORST, H. Nachweis übereinstimmender chromosomen-zahlen (n=16) bei allen 4 Apis-Arten. *Apidologie*, 8(1): 89-100, 1977a.
- FAHRENHORST, H. Chromosome number in the tropical honeybee species *Apis dorsata* and *Apis florea*. *J. Apic. Res.*, 16(1): 56-58, 1977b.
- FASTEN, N. Spermatogenesis of the pacific coast edible crab *Cancer magister* Dana. *Biol. Bull. Woods Hole*, 34: 277-306, 1918.
- FINNAMORE, A.T. A new genus and species of Psenine wasp from Africa and key to genera (Hymenoptera, Pemphredonidae, Pseninae) *Com. Entomol.*, 1119: 1081-1094, 1987.
- GODAY, C.; CIOFI-LUZZATO, A.; PIMPINELLE, S. Centromere ultrastruture in germ-line chromosomes of *Parascaris*. *Chromosoma*, 91: 121-125, 1985.
- HOSHIBA, H. The karyological and G-banding analyses of a *Polistes* male wasps, *Parapolibia indica* Saussure (Vespidae, Hymenoptera) *Proc. Jap. Acad.*, 61(b): 119-121, 1985.
- HOSHIBA, H. Karyotype studies on two species of Polistinae, *Polistes chinensis* and *P. nimpha* (Vespidae, Hymenoptera). *Chromos. Inf. Serv.*, 40: 26-28, 1986.
- HOSHIBA, H. Karyological analysis of a stingless bee *Melipona favosa* (Apidae, Hymenoptera). *Cytologia*, 53: 153-156, 1988.
- HOSHIBA, H. & ONO, M. The early emerging of the Japanese paper wasp, *Poliste snelleni* Saussure (Vespidae, Hymenoptera) and its chromosomes. *Proc. Jap. Acad.*, 60(b): 368-371, 1984.
- HOSHIBA, H.; MATSSUURA, A.M.; IMAI, H.T. Karyotype evolution in the social wasps (Hymenoptera, Vespidae) *Jap. J. Genet.*, 64: 209-222, 1989.
- HUNG, A.C.F. Chromosomes of three *Brachimeria* species (Hymenoptera, Chalcididae) *Experientia*, 42: 579-580, 1986.
- HUNG, A.C.F.; REED, H.C.; VINSON, J.B. Chromosomes of four species of *Polistes* wasps (Hymenoptera, Vespidae) *Caryologia*, 34: 225-230, 1981.

- IMAI, H.T. Karyological studies of Japanese ants I. Chromosome evolution and species differentiation in ants. *Sci. Rep. Tokyo Kyoiky Univ., Sec. B.*, 14: 27-46, 1969.
- IMAI, H.T. Evidence for nonrandom localization of the centromere on mammalian chromosomes. *J. Theor. Biol.*, 49: 111-123, 1975.
- IMAI, H.T.; CROZIER, R.H.; TAYLOR, R.W. Karyotype evolution in Australian ants. *Chromosoma*, 59: 341-393, 1977.
- IMAI, H.T.; URBANI, C.B.; KUBOTA, M.; SHARMA, G.P.; NARSIMHANNA, M.N.; DAS, B.C.; SHARMA, A.K.; SHARMA, A.; DEODIKAR, G.B.; VAYDIA, W.G.; RAJASEKARASETTY, M.R. Karyological survey of Indian ant. *Jpn. J. Genet.*, 59: 1-32, 1984.
- IMAI, H.T.; MARUYAMA, T.; GOJOBORI, T. INOUE, Y.; CROZIER, R.H. Theoretical bases for karyotype evolution 1. The minimum interaction hypothesis. *Amer. Nat.*, 128(6): 900-920, 1986.
- IMAI, H. T.; TAYLOR, R. W. CROSLAND, M. W. J.; CROZIER, R. H. Modes of spontaneous chromosomal mutations and karyotype evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis. *Jpn. J. Genet.*, 63: 159-185, 1988.
- IMAI, H.T.; TAYLOR, R.W.; KUBOTA, M.; OGATA, K.; WADA, W. Y. Notes on the remarkable karyology of the primitive ant *Nothomyrmecia macrops* and of the related genus *Myrmecia* (Hymenoptera, Formicidae). *Psiche*, 97(3): 3-4, 1990.
- KERR, W.E. Estudos sobre o gênero *Melipona*. *An. Esc. Agron. "Luiz de Queiroz"*, 5: 181-276, 1948.
- KERR, W.E. A variação do número cromossômico na evolução dos Hymenoptera. *Sci. Genet.*, 4(3): 182-190, 1952.
- KERR, W.E. Some aspects of the evolution of social bees (Apidae). *Evol. Biol.*, 3: 119-175. 1969.
- KERR, W.E. Number of chromosomes in some species of bees. *J. Kans. Entomol. Soc.*, 45: 111-122, 1972.
- KERR, W.E. & SILVEIRA, Z.V. Karyotype evolution in bees and corresponding taxonomic implications. *Evolution*, 26: 197-202, 1972.
- MATTHEWS, R.W. *Microstigmus comes*: Sociality in a sphecid wasp. *Science*, 160: 787-788, 1968.
- MATTHEWS, R. W. Evolution of social behavior in sphecid wasps, In: ROSS, K.G. & MATTHEWS, R.W. (eds). *The social biology of wasps* Ithaca, Comstock, Cornell University, 1991. p. 579-602.

- MATTHEWS, R.W. & STARR, C.K. *Microstigmus comes* wasps have a method of nest construction unique among social insects. *Biotropica*, 16(1):55-508, 1984.
- MELO, G.A.R. *Notas sobre a sistemática do gênero Microstigmus (Hymenoptera, Sphecidae) e aspectos da biologia das espécies encontradas em Viçosa, Minas Gerais.* Viçosa, MG, UFV, 1990. 78p. (Monografia)
- MELO, G.A.R. Duas novas espécies de *Microstigmus* Ducke, 1907 (Hymenoptera, Sphecidae). *Rev. Bras. Entomol.*, 36(3): 663-670, 1992.
- MELO, G.A.R. *Relações filogenéticas entre espécies do gênero Microstigmus Ducke, 1907 (Hymenoptera, Sphecidae, Pemphredoninae) com base em dados izosimáticos e morfológicos.* Viçosa, MG, UFV, 1993. 103p. (Tese M.S.)
- MELO, G.A.R. & CAMPOS, L.A.O. Trophallaxis in a primitively social sphecid wasp. *Ins. Soc.*, 40: 107-109, 1993.
- MELO, G.A.R. & EVANS, H.E. Two new *Microstigmus* species (Hymenoptera, Sphecidae), with description of their parasite, *Goniosus microstigmi* sp (hymenoptera, Bethylidae). *Proc. Entomol. Soc. Wash.*, 95(2) 258-263, 1993.
- MENKE, A.S. *Arpactophilus* reassessed, with three bizarre new species from New Guinea (Hymenoptera: Sphecidae: Pemphredoninae). *Invert. Taxon.*, 2: 737-747, 1989.
- MICHENER, C.D. *The social behavior of the bees; a comparative study.* Cambridge, Harvard University Press, 1974. 404p.
- MISRA, J. S. & SRIVASTAVA, A. D. Chromosomal changes correlated with differentiation during embrionic development of *Polistes hebraeus* (Vespidae, Hymenoptera) *Proc. Natl. Acad. Sci. Ind.*, 4(B) I: 97-102. 1971.
- NAITO, T. Chromosome numbers differentiation in Sawflies and its systematic implications (Hymenoptera, Tenthretinidae). *Kontyu*, 50(4) 569-587, 1982.
- NIIYAMA, H. A comparative study of the chromosomes in Decapods, Isopods and Amphipods, with some remarks on cytotaxonomy and sex determination in the Crustacea. *Mem. Fac. Fish Hokk. Univ.*, 7: 1-60, 1959.
- NIIYAMA, H. On the unprecedentedly large numbers of chromosomes of the crayfish *Astacus trowbridgei* Stimpson. *Annot. Zoos. Japan*, 35: 229-233, 1962.
- NIIYAMA, H. The chromosomes of two species of edible crabs (Brachyura, Decapoda, Crustacea). *Bull. Fac. Hokk. Univ.*, 16: 201-205, 1966.

- POMPOLO, S.G. *Citogenética em vespas sociais (Hymenoptera, Polistinae)*. Ribeirão Preto, FMRP-USP, 1988. 85p. (Tese D.S.)
- POMPOLO, S.G. & TAKAHASHI, C.S. *Karyotype of two species of wasps of the genus Polistes (Polistinae, Hymenoptera)*. *Insec. Soc.*, 33: 142-148, 1986.
- POMPOLO, S.G. & TAKAHASHI, C.S. *Cytogenetics of Brazilian Polybiine wasp (Hymenoptera, Vespidae, Polistinae)*. *Rev. Bras. Genet.*, 10(3): 483-496, 1987.
- POMPOLO, S.G. & TAKAHASHI, C.S. *Karyotype of ten species of social wasps ((Hymenoptera, Polistinae, Polybiini) Rev. Bras. Genet.*, 13(3): 469-477, 1990a.
- POMPOLO, S.G. & TAKAHASHI, C.S. *Chromosome numbers and C-banding in two wasp species of the genus Polistes (Hymenoptera, Polistinae, Polistini)* *Insec. Soc.*, 37(3): 251-257, 1990b.
- RICHARDS, O.W. *The species of South American wasps of the genus Microstigmus Ducke (Hymenoptera, Sphecoidea, Pemphredoninae)*. *Trans. R. Entomol Soc. Lond.*, 124: 123-148, 1972.
- SUMNER, A.T. *A simple technique for demonstration centromeric heterochromatin*. *Exp. Cell. Res.*, 75, 304-306, 1972.
- SUMNER, A.T. *Chromosome banding*. London, Unwin Hyman, 1990. 434p.
- TARELHO, Z.V.S. *Contribuição ao estudo citogenético dos Apoidea*. Ribeirão Preto, FMRP-USP, 1973. 112p. (Tese M.S.)
- TURNER, R.E. *A new species of Microstigmus (Hym. Sphegid.)* *Bull. Entomol. Res.*, 20: 407-408, 1929.
- WEST-EBERHARD, M.J. *Morphology and behavior in the taxonomy of Microstigmus wasps*. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF IUSSI, 8, Netherlonois, 1977. *Proceedings...* The Netherlands. p.123-125.
- WHITE, M.J.D. *Animal cytology and evolution*. Cambridge University Press, 1973. 961p.
- WILSON, E. O. *The insect societies*. Cambridge, Cambridge Muss Harvard, 1971. 547p.