

VANDER CALMON TOSTA

ANÁLISE DA ORIGEM MOLECULAR DOS CROMOSSOMOS B, E  
DE SEUS POSSÍVEIS EFEITOS FENOTÍPICOS EM *Partamona helleri*  
(HYMENOPTERA, APIDAE).

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS-BRASIL  
2005

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

T

T716a  
2005

Tosta, Vander Calmon, 1975-

Análise da origem molecular dos cromossomos B, e de seus possíveis efeitos fenotípicos em *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae) / Vander Calmon Tosta. – Viçosa : UFV, 2005.  
xiii, 79f. : il. ; 29cm.

Orientador: Lucio Antonio de Oliveira Campos.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Abelha - Genética molecular. 2. Abelha - Populações.  
3. Abelha - Evolução. 4. Cromossomos acessórios.  
5. *Partamona helleri*. I. Universidade Federal de Viçosa.  
II. Título.

CDD 22.ed. 572.8715799

VANDER CALMON TOSTA

**ANÁLISE DA ORIGEM MOLECULAR DOS  
CROMOSSOMOS B, E DE SEUS POSSÍVEIS EFEITOS  
FENOTÍPICOS EM *Partamona helleri*  
(HYMENOPTERA, APIDAE)**

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

APROVADA: 12 de dezembro de 2005.

---

Profa. Mara Garcia Tavares  
(Conselheira)

---

Prof. José Eduardo Serrão

---

Profa. Silvia das Graças Pompolo

---

Profa. Ana Maria Waldschmidt

---

Prof. Lucio Antonio de Oliveira Campos  
(Orientador)

“Que é o bem? Tudo que eleva o homem ao sentimento de poder, o poder em si.

Que é o mal? Tudo que fixa raízes na debilidade.

Que é a felicidade? Sentir que aumenta nosso poder, que superamos algo que nos oferecia resistência.”

*Friedrich Nietzsche*

“...O diabo existe e não existe? Dou o dito. Abrenúncio. Essas melancolias. O senhor vê: existe cachoeira; e pois? Mas cachoeira é barranco de chão, e água se caindo por ele, retombando; o senhor consome essa água ou desfaz o barranco, sobra cachoeira alguma? Viver é negócio muito perigoso...”

*João Guimarães Rosa*

Em homenagem ao grande amor da minha vida,

*Marielce de Cássia Ribeiro Tosta*

## **AGRADECIMENTOS**

A CAPES –Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - pela bolsa de doutorado a mim concedida.

Ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - pela bolsa de doutorado “sandwich” concedida e suporte financeiro para execução do projeto.

A FAPEMIG – Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais pelo suporte financeiro para execução do projeto.

A Universidade Federal de Viçosa, especialmente ao Departamento de Biologia Geral, pela oportunidade de realização deste trabalho e por toda a formação a mim proporcionada durante os mais de dez anos de convivência como docente da instituição.

A Universidad de Granada- Granada, Espanha -, especialmente ao - Departamento de Genética, pela oportunidade de realização de parte do trabalho.

A Universidade de Campinas, especialmente ao Departamento de Biologia Celular, pela oportunidade de realização de parte do trabalho.

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

Ao amigo, tutor e orientador professor Lucio Antonio de Oliveira Campos, pela confiança em mim depositada e, principalmente, pela inestimável experiência de vida passada.

Ao professor Juan Pedro Martinez Camacho, exemplo a ser seguido por todos nós pesquisadores brasileiros, pelo acolhimento em Granada e pelas idéias essenciais na execução do trabalho.

A professora Mara Tavares García pelo incentivo, pelas idéias e aconselhamento.

Ao professor Cosme Damião Cruz, pela atenção e aconselhamento.

Ao professor Everaldo Gonçalves de Barros pelas sempre importantes sugestões e pelo interesse.

A professora Silvia das Graças Pompolo pelas oportunidades que me proporcionou ao longo da minha estadia na UFV, pelas idéias e apoio.

A professora Tânia Maria Fernandes Salomão, minha primeira orientadora, pelo apoio incondicional.

A professora Elza Fernandes de Araújo por sempre disponibilizar o laboratório de Genética Molecular e de Microorganismos do BIOAGRO para a execução do trabalho .

À professora Shirley Recco Pimentel Gomes por disponibilizar seu laboratório para as análises de FISH, pelas idéias e acolhimento em Campinas.

Ao professor Francisco Perfectti, pelo apoio e idéias nas análises estatísticas durante minha estadia em Granada.

As professoras Josefa Cabrero Hurtado e Maria Dolores Lopéz-León pelo apoio e idéias nas análises moleculares durante minha estadia em Granada.

A todos os colegas com os quais trabalhei nestes anos e que de alguma forma contribuíram para minha formação: em especial às Doutoradas Ana Maria Waldshmidt, Rute Magalhães Brito, Sônia Maria Rocha Sanchez, Lenira Heloína, Mariana Melo e ao Doutor Rui Carlos Peruquetti, essenciais com suas idéias e apoio para a execução deste trabalho.

Aos senhores Íris e Geraldo, assistentes técnicos do Apiário da UFV, sempre gentis e disponíveis em colaborar na coleta das amostras de *Partamona helleri*.

Aos amigos que deixei em Granada, Abdel, Jesús, Inma, Maria e Eli, sempre muito gentis e atenciosos comigo.

Aos meus grandes amigos de ontem, de hoje e de sempre, com os quais aprendi muito nesta vida: Pablo Gonçalves Rodrigues, Samuel Resende Paiva, Márcio Marcelo de Moraes Júnior, Gabriel de Menezes Yasbeck, Eduardo Machado Cruz, José Soares Júnior, Danilo Dias Soares, Marcus Vinícius Barbosa Simões, Geovani Corrêa Giacomini, Flávio Paiva Monteiro, Leonardo Fagundes Fernandino, Tércio Bonfim Bragança e Lucia Andréa de Jesus.

Por fim, a minha família, em especial as minhas duas mães, vovó Lourdes e mamãe Kicia, e ao meu avô (*in memoriam*) Aguinaldo Vieira Tosta, que infelizmente não está aqui para ver o seu trabalho realizado, sim seu trabalho, pois não bastasse ter me dado seu sobrenome me adotando como filho, me deu o seu exemplo de correção e honestidade, e o seu incentivo por dar valor a coisas que enobrecem o homem, como um bom livro, sem tal exemplo jamais teria trilhado o caminho da ciência.

## **BIOGRAFIA**

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

Em agosto de 1999, graduou-se bacharel e licenciado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Viçosa ingressando no mesmo mês e ano, no curso de Mestrado em Genética e Melhoramento na Universidade Federal de Viçosa sob orientação do Prof. Lucio Antonio de Oliveira Campos, obtendo o título de *Magister Scientae* em 03 de agosto de 2001.

Em agosto de 2001, ingressou no curso de Doutorado em Genética e Melhoramento na Universidade Federal de Viçosa, também sob orientação do Prof. Lucio Antonio de Oliveira Campos. Em 2004, sob supervisão do Professor Juan Pedro Martínez Camacho realizou estágio de Doutorado na Universidad de Granada –Granada, Espanha -.

Em fevereiro de 2005 passou a lecionar a disciplina de Genética e Evolução na UNIVIÇOSA – Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde - LTDA. Em, 12 de dezembro de 2005, submeteu-se à defesa de tese de Doutorado.

## CONTEÚDO

<b>RESUMO</b> .....	x
<b>ABSTRACT</b> .....	xii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1. Considerações gerais sobre os cromossomos B.....	1
1.2. Considerações sobre os cromossomos B em <i>Partamona helleri</i> (Hymenoptera, Apidae).....	10
1.3. Objetivos.....	13
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	15
<b>2. CAPÍTULO 1 – Utilização de marcadores SCAR para o estudo de cromossomos B em populações naturais de <i>Partamona helleri</i> (HYMENOPTERA, APIDAE)</b> .....	24
<b>EXTRATO</b> .....	25
2.1. INTRODUÇÃO.....	26
2.2. METODOLOGIA.....	27
2.2.1. Material Biológico.....	27
2.2.2. Conversão dos Marcadores RAPD em marcadores SCAR.....	28
2.2.3. Análises empregando o marcador SCAR.....	28
2.2.4. Análises citogenéticas.....	29

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34
<b>3. CAPÍTULO 2 - Análises sobre a origem molecular dos cromossomos B em <i>Partamona helleri</i> (HYMENOPTERA, APIDAE).</b> .....	38
EXTRATO.....	39
3.1. INTRODUÇÃO.....	40
3.2. METODOLOGIA.....	42
3.2.1 Seqüenciamento.....	42
3.2.2. Hibridização <i>in situ</i> fluorescente.....	43
3.2.3. Material biológico para hibridização genômica “dot blot” e amplificação com os “primers” SCAR.....	45
3.2.4. Hibridização Genômica “dot blot”.....	45
3.2.5. PCR (Polymerase Chain Reaction) utilizando os “primers” SCAR.....	46
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
3.3.1. Análises da origem molecular dos cromossomos B de <i>Partamona helleri</i> a partir da seqüência obtida.....	47
3.3.2. Análises da origem molecular dos cromossomos B de <i>Partamona helleri</i> por Hibridização <i>in situ</i> fluorescente.....	50
3.3.3. Análises da origem molecular dos cromossomos B de <i>Partamona helleri</i> por Hibridização genômica “dot blot” e uso do marcador SCAR.....	51
3.3.4 Conclusões.....	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
<b>4. CAPÍTULO 3 - Análise dos possíveis efeitos fenotípicos dos cromossomos B em <i>Partamona helleri</i> (HYMENOPTERA, APIDAE).</b> .....	62
EXTRATO.....	63
4.1. INTRODUÇÃO.....	64
4.2. METODOLOGIA.....	66
4.2.1. Material Biológico.....	66

4.2.2. Caracterização dos indivíduos quanto a presença/ausência de cromossomos B.....	66
4.2.3- Obtenção das medidas das asas para análises de assimetria flutuante.....	67
4.2.4- Análises estatísticas.....	68
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>78</b>

## RESUMO

TOSTA, Vander Calmon, D. S., Universidade Federal de Viçosa, Dezembro de 2005. **Análise da origem molecular dos cromossomos B, e de seus possíveis efeitos fenotípicos em *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae).** Orientador: Lucio Antonio de Oliveira Campos. Conselheiros: Mara García Tavares e Cosme Damião Cruz.

Cromossomos B são cromossomos extras ao complemento normal, que seguem suas próprias vias evolutivas, ou seja, têm um padrão de herança distinto do usual (mendeliano) entre os indivíduos que os carregam. Na espécie *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae) foram encontrados até quatro desses cromossomos. Esse trabalho apresentou como objetivos gerais investigar a origem molecular e os efeitos no “fitness” dos cromossomos B de *P. helleri*. Para facilitar a obtenção dos objetivos gerais, um marcador RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA) associado a cromossomos B em *P. helleri* foi satisfatoriamente convertido em um marcador SCAR (Sequence Characterized Amplified Region), que se mostrou também associado a tais cromossomos. As análises evidenciaram que os cromossomos B de *P. helleri* se originaram de uma forma independente em relação aos cromossomos do complemento normal A da espécie. O processo de origem deve ter ocorrido no contexto evolutivo do gênero

Partamona, em especial, no contexto evolutivo de um clado monofilético no qual se encontram, além de *P. helleri*, as espécies *P. criptica*, *P. Cupira*, *P. rustica* e *P. mulata*. A origem independente dos cromossomos B em relação ao complemento cromossômico normal A deve ter ocorrido por hibridização interespecífica, mas não fica descartada a possibilidade de elementos transponíveis participarem desse processo. Por fim, o trabalho não apontou efeito dos cromossomos B na assimetria dos indivíduos de *P. helleri*, permitindo concluir que indivíduos que apresentam cromossomos B não são mais assimétricos do que os indivíduos que não possuem tais cromossomos em *P. helleri* considerando o caráter asa anterior. Apesar de sugerirem uma origem interespecífica para os cromossomos B de *P. helleri*, os resultados apontam a necessidade de um maior número de estudos de citogenética e genética molecular das espécies do gênero *Partamona* para se ter maior clareza sobre a origem desses cromossomos. Apontam também, a necessidade de análises de outros caracteres morfológicos externos de *P. helleri*; bem como caracteres fenotípicos internos (fisiológicos) para se obter conclusões sobre os efeitos dos cromossomos B no “fitness” dos indivíduos e populações dessa espécie.

## ABSTRACT

TOSTA, Vander Calmon, D. S., Universidade Federal de Viçosa, December 2005.  
**Analyses of molecular origin and possible fenotipic effects of *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae) B chromosomes.** Adviser: Lucio Antonio de Oliveira Campos. Committe members : Mara García Tavares and Cosme Damião Cruz.

B chromosomes are additional chromosomes in relation to normal complement (A chromosomes) that presents your own evolutionary pathways and do not obey Mendelian laws of inheritance among individuals present them. In species *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae) had been found until four B chromosomes. This work presents like general objectives obtain a better comprehension of molecular origin and fitness effects of *P. helleri* B chromosomes. In order to make easier general objectives an RAPD (Random Amplified Polimorfic DNA) marker associated with *P. helleri* B chromosomes was successful transformed in SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) marker, which also showed association with *P. helleri* B chromosomes. Analyses showed that *P. helleri* B chromosomes arise independently from A normal chromosomes. Origin process should be happen on Partamona genus evolutionary context, in special, on evolutionary context of an monophyletic clade where besides *P. helleri*, were found the species *P. criptica*, *P. Cupira*, *P. rustica* and *P. mulata*. B chromosomes independently origin in relation to normal

A chromosomes could be happen because interspecific hybridization, but there are possibility of transposable elements integrate the process. At last, this work did not point B chromosomes effects on asymmetry of *P. helleri* individuals; so it is possible conclude that individuals with B chromosomes are not more asymmetric than individuals without B chromosomes considering the character anterior wing. Despite results showed an interspecific origin to *P. helleri* B chromosomes, it pointed the necessity to do more cytogenetics and molecular studies of *Partamona* species in order to clarify B chromosomes origin in evolutionary context of *Partamona* genus. The results pointed too the necessity of analyze others morphological and physiological characters of *P. helleri* in order to obtain conclusions about B chromosomes fitness effects in individuals and populations of this species.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Considerações gerais sobre os cromossomos B

O termo cromossomo B foi primeiramente usado por RANDOLPH (1928) para identificar cromossomos supranumerários em milho, que não seriam duplicações de nenhum dos cromossomos do complemento normal. Sua descoberta, entretanto, pode ser creditada a STEVENS (1908), que descreveu a presença de pequenos supranumerários, em números variáveis, em populações das espécies dos Coleoptera *Diabrotica soror* e *Diabrotica punctata*. WILSON (1907) já tinha utilizado o termo supranumerários para cromossomos em insetos Hemiptera do gênero *Methapodi*, no entanto, ele não tinha uma amostra populacional ampla que confirmasse seus dados.

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

Atualmente, sabe-se que cromossomos B são encontrados amplamente em espécies vegetais, animais e fungos, ocorrendo em aproximadamente 15 por cento das espécies vivas descritas, sendo que a cada ano

são descobertas mais ocorrências dos mesmos (BEUKEBOOM, 1994). Segundo BEUKEBOOM (1994), esses cromossomos sempre foram definidos como: extras ao complemento normal; dispensáveis; normalmente menores que os cromossomos A (complemento normal); herdados de modo não mendeliano; heterocromatinizados; não carreadores (ou raramente) de região organizadora de nucléolo; mitoticamente instáveis, resultando em frequências variadas em diferentes órgãos, no mesmo indivíduo; que reduzem a fertilidade e o crescimento quando em número elevado e que não apresentam genes com efeitos principais. JONES (1995) apresenta uma definição mais atual e simplificada. Ele define os cromossomos B como: “cromossomos dispensáveis, os quais não recombinam com nenhum outro membro do complemento cromossômico A e têm padrão irregular e não mendeliano de herança”. CAMACHO et al. (2000) apresentam uma definição semelhante a esta, definindo os cromossomos B como: “cromossomos extras ao complemento normal, dispensáveis e, que seguem suas próprias vias evolutivas, ou seja, têm um padrão de herança distinto do usual (mendeliano) entre os indivíduos que os carregam”.

A origem e evolução dos cromossomos B eram algo um tanto obscuro quando da sua descrição por Wilson em 1907; somente nas últimas duas décadas, principalmente com o desenvolvimento das técnicas de genética e citogenética molecular, foi possível obter um panorama um pouco mais claro sobre estes aspectos (BEUKEBOOM, 1994).

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

Os cromossomos B, que se originam intraespecificamente, são originados a partir de quebra de cromossomos do complemento normal. Esta quebra pode ser a partir de cromossomos autossomais ou sexuais (CAMACHO et al., 2000). Os exemplos mais comuns referem-se às quebras a partir de cromossomos autossomais como: em vegetais, *Crepis capillaris* (JAMILENA et

al., 1994, 1995), *Secale cereale* (BLUNDEN et al., 1993; CUADRADO & JOUVE, 1994; WILKES et al., 1995; HOUBEN et al., 1996; ZHANG et al., 1999), *Zea Mays* (ALFENITO & BICHLER, 1993; STARK et al., 1996), *Brachycome dichromosomatica* (LEACH et al., 1995; DONALD et al., 1995; FRANKS et al., 1996; HOUBEN et al., 1997a, 1999); em insetos, *Drosophila subsilvestris* (GUTKNECHT et al., 1995), *Trypoxylon albitarse* (ARAÚJO, et al. 2001); em peixes, *Astyanax scabripines* (NÉO et al., 2000); em répteis, *Dicoptodom tenebrosus* (BRINKMAN et al., 2000); em mamíferos, *Pteauroides volans* (McQUADE et al., 1994), *Reithrodontomys megalotis* (PEPPERS et al., 1997).

No que tange a origem dos cromossomos B a partir de cromossomos sexuais, deve-se salientar que ela pode acontecer tanto em sistemas em que não há heteromorfismo entre os cromossomos sexuais, quanto em sistemas onde há heteromorfismo. Como exemplo de origem a partir de cromossomos sexuais não heteromórficos pode-se citar os supranumerários do gafanhoto *Eyprepocnemis plorans* – sistema XX/XO - (LÓPEZ-LEÓN et al., 1994). No caso em que os cromossomos sexuais são heteromórficos, teoricamente, os cromossomos B poderiam se originar tanto do cromossomo sexual que determina o sexo homogamético, quanto do cromossomo sexual que determina o sexo heterogamético. Na prática, contudo, só se registraram casos em que o cromossomo B se originou a partir do cromossomo que determina o sexo heterogamético como, por exemplo, nos insetos Diptera (*Glossina spp.*) (AMOS & DOVER, 1981) e nos anfíbios (*Leiopelma hochstetteri*) (SHARBEL et al., 1998).

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

salientar que, mesmo tendo origem por hibridação, estes cromossomos podem ter em sua composição seqüências derivadas de elementos transponíveis, como em *Nasonia vitripennis* (McCALLISTER, 1995; McALLISTER & WERREN, 1997).

BEUKEBOOM (1994) aponta algumas das técnicas usadas para a detecção da origem dos cromossomos B: “southern blot”, hibridização “*in situ*”, hibridização subtrativa, hibridização cruzada de micro-clone, diversos métodos baseados em PCR (Polymerase chain reaction) e análise de seqüências.

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

- 1) padrão de bandeamento similar entre os cromossomos B e os do complemento normal, como em *Chironomus plomosus* (KEYL & HÄGELE, 1971);
- 2) seqüências de DNA repetitivas dos cromossomos B encontradas também nos cromossomos A, como: em plantas, *Crepis capillaris* (JAMILENA et al., 1995); *Secale cereale* (BLUNDEN et al., 1993; CUADRADO & JOUVE, 1994; HOUBEN et al., 1996), *Zea Mays* (ALFENITO & BICHLER, 1993; STARK et al., 1996), *Brachycome dichromosomatica* (LEACH et al., 1995; FRANKS et al., 1996; HOUBEN et al., 1997a, 1999); em insetos, *Drosophila subsilvestris* (GUTKNECHT et al., 1995) e *Glossina spp.* (AMOS & DOVER, 1981); em répteis, *Dicoptodom tenebrosus* (BRINKMAN et al., 2000); em mamíferos, *Pteauroides volans* (McQUADE et al., 1994);
- 3) seqüências de DNA repetitivas dos cromossomos B não encontradas nos cromossomos A, mas presentes em espécies relacionadas, como em plantas do gênero *Coix* (SAPRE & DESPHANDE, 1987); em peixes, *Poecilia formosa* (SHARTL et al., 1995) e em insetos, *Nasonia vitripennis* (McALLISTER & WERREN, 1997);

4) observação direta da origem de fragmentos cromossômicos em cruzamentos interespecíficos, como em plantas do gênero *Coix* (SAPRE & DESPHANDE, 1987), em peixes, *Poecilia formosa* (SHARTL et al., 1995) e em vespas, *Nasonia vitripennis* (PERFECCTI & WERREN, 2001);

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

Visto como os cromossomos B se originam e se distinguem molecularmente dos cromossomos normais, fica a pergunta: como estes cromossomos são mantidos na população? Segundo CAMACHO et al. (2000), a dinâmica populacional dos cromossomos B é determinada pelo balanço entre dois fatores principais: os seus efeitos no “fitness” dos indivíduos que os carregam e sua taxa de transmissão, que não segue os padrões de herança mendeliana. Deste balanço se apresentam várias situações, nas quais, o cromossomo B pode apresentar desde um comportamento parasítico, reduzindo o “fitness” dos indivíduos portadores, até um comportamento aparentemente neutro, ou mutualístico, em relação ao complemento normal.

A partir deste quadro foram montados modelos que tentam explicar a evolução dos cromossomos B. Os dois modelos clássicos são: o modelo heterótico (WHITE, 1973) e o modelo parasítico ou egoísta (JONES, 1982); esses modelos assumem que a frequência dos cromossomos B está em equilíbrio nas populações atuais.

O modelo heterótico assume que há uma relação de mutualismo dos cromossomos B com os cromossomos normais, esta relação se deve ao balanço entre efeitos positivos conferido pelos B que não se acumulam, e efeitos negativos dos cromossomos B que se acumulam.

Já o modelo egoísta sugere que a frequência dos cromossomos B se torna estável nas populações que os apresentam devido a pressões de seleção contra os indivíduos que apresentam acúmulo desses cromossomos. Assim, nesse modelo, a frequência dos cromossomos B quando eles aumentam em número é

minimizada até atingir um ponto de equilíbrio, pois, em grande número os cromossomos B aumentam seus efeitos negativos no “fitness” e conseqüentemente a pressão de seleção sobre os mesmos.

Contrapondo os modelos clássicos, CAMACHO et al. (1997) apresentaram um novo modelo de evolução dos cromossomos B no qual, a frequência destes cromossomos não está necessariamente em equilíbrio em uma população. Eles propuseram que os cromossomos B inicialmente teriam uma grande força de direcionamento durante a meiose (“meiotic drive”), que implica em acúmulo dos mesmos, mas, que esta força seria paulatinamente neutralizada pelo genoma hospedeiro através da evolução de genes supressores de direcionamento; propuseram também, que os cromossomos B persistem por tempo indefinido em uma população porque eles são eliminados muito lentamente e que novas variantes surgem de tempo em tempo prolongando o polimorfismo.

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

Pode-se afirmar, que os cromossomos B podem possuir genes com efeito direto no “fitness” dos organismos que os apresentam. A identificação de um gene, da família gênica dos citocromos P-450 (*Pda*), em cromossomo B do fungo patogênico *Nectria haematococa* por MIAO et al. (1991) é uma prova desse fato. Este gene é responsável pela desintoxicação da fitoalexina pisantina um composto antimicrobiano produzido pela ervilha (*Pisum sativum*), que é nocivo ao fungo. Assim, eles mostraram não só que o cromossomo B pode ter genes funcionais, como estes genes podem influenciar no “fitness” dos indivíduos, pois os fungos que apresentam tais cromossomos são resistentes a ação da fitoalexina, gerando variação patogênica em *Nectria*.

Além dos efeitos diretamente relacionados aos genes, principalmente aos ribossomais, CAMACHO et al. (2000), afirma que existem muitas evidências que os cromossomos B, indiretamente, podem afetar um vasto número de processos celulares e fisiológicos, tanto em plantas quanto em animais. Porém, eles ressaltam que estes efeitos raramente se manifestam no fenótipo externo, como por exemplo em *Allium schoenoprasum*, espécie onde plantas que possuem cromossomos B, apresentam em condição de “stress hídrico”, vantagem, pois necessitam de menos água para germinar do que as plantas sem estes cromossomos (PLOWMAN & BOUGORD, 1994). Outros exemplos desta manifestação dos cromossomos B no fenótipo externo podem ser encontrados na espécie de Diptera *Chironomus plomosus*, onde os indivíduos que apresentam cromossomos B são mais adaptados a condições de poluição extrema (MICHAILOVA & METTINEN, 2000) ou, na planária hermafrodita *Polycelis nigra* na qual indivíduos com cromossomos B produzem uma menor quantidade de descendentes e, o desenvolvimento de formas juvenis, filhas de pais com cromossomos B, é retardado (BEUKEBOOM et al., 1998).

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

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

machos normais, originados a partir dos ovos que normalmente não são fecundados nessa espécie (WERREN, 1991).

Aparentemente, a maioria dos genes encontrados nos cromossomos B não é expresso. Todavia, CAMACHO et al. (2000) chamam a atenção que esta inatividade dos cromossomos B não deve ser considerada somente em termos da constituição física dos B: muitas seqüências repetitivas nas fitas de DNA e alta compactação cromossômica (heterocromatina). Segundo os autores estes genes não são expressos devido à formação de complexos das seqüências codificantes dos cromossomos B com proteínas ou outras moléculas orgânicas, os quais podem afetar e serem afetados pela estrutura física da cromatina. Como exemplos pode-se citar: o trabalho de HOUBEN et al. (1997b), que mostra que os cromossomos B em *Brachycome dichrosomatica* são desacetilados em relação aos cromossomos do complemento normal e, em conjunto com a replicação tardia dos supranumerários, tornam-se geneticamente inertes e os trabalhos de LÓPEZ-LEÓN et al. (1991, 1995 a,b) com o gafanhoto *Eyprepocnemis plorans*, LEACH et al. (1995) com *Brachycome dichrosomatica* e NEVES et al. (1992) em centeio (*Secale cereale*) que mostram um certo controle da expressão dos cromossomos B por meio de metilação.

CAMACHO et al. (2000) concluíram que, apesar de alguns cromossomos B apresentarem efeitos diretos ou indiretos no “fitness”, muito mais pesquisas são necessárias para verificar a veracidade da hipótese de que todos os cromossomos B apresentam genes ativos. Além disso, eles enfatizam que os efeitos dos cromossomos B dependem das condições ambientais nas quais populações que os carregam se encontram e assim, esses efeitos podem apresentar variação tanto temporal quanto espacial.

Estudos como o de CAMACHO et al. (1997), o qual possibilitou a composição do modelo de desequilíbrio (“non-equilibrium model”) comprovam estas proposições, mostrando que modelos populacionais podem viabilizar uma melhor compreensão da biologia dos cromossomos B. Dentre os estudos populacionais feitos nos últimos anos destaca-se, o de ARAÚJO et al. (2001), que mostraram na espécie de vespa *Triplexolon albitarse*, a primeira evidência de

cromossomos B que tem seu comportamento meiótico estabilizado, ou seja, mostraram que na maioria das populações desta vespa os machos têm um cromossomo B e as fêmeas dois cromossomos B. Como os machos são haplóides e as fêmeas diplóides, parece que os cromossomos B estão se estabilizando nestas populações. Assim, foi sugerido que o cromossomo B desta espécie está sendo integrado como um membro regular do complemento normal.

Nos estudos populacionais é extremamente importante considerar os efeitos biogeográficos. BEUKEBOOM (1994) afirmou que estudos biogeográficos mais intensivos se fazem necessários por dois motivos principais: em primeiro lugar, para distinguir entre efeitos históricos e/ou seletivos em explicar a distribuição de um cromossomo B particular, para isto, torna-se necessário uma grande quantidade de dados biogeográficos; ainda afirma que dados obtidos para uma população podem não ser válidos para outras populações, de modo que uma população poderia possuir genes supressores para B e outras não, ou então que dado ambiente não suportaria a presença de cromossomos B.

Em estudos recentes estes aspectos explicitados por BEUKEBOOM foram abordados. CABRERO et al. (1997) analisando 19 populações do gafanhoto *Eyprepocnemis plorans*, coletadas ao longo de quatro rios de uma mesma bacia, mostraram que a presença dos cromossomos B terminava abruptamente em cada rio, coincidindo com uma passagem estreita, uma barreira geográfica. Estes dados, mais o fato da frequência de cromossomos B ser negativamente correlacionada com a altitude, o tamanho da população e a distância da costa marítima permitiram a CABRERO et al. (1997) afirmarem que a distribuição geográfica dos cromossomos B de *Eyprepocnemis plorans* era moldada principalmente por eventos históricos e não por seleção natural.

Já em uma outra análise, NEO et al. (2000) examinaram três populações de peixes caracídeos *Astyanax scabripinnis* localizadas em diferentes altitudes ao longo do mesmo rio. Este estudo revelou que as duas populações de locais com maior altitude (1800 metros e 1920 metros) apresentavam peixes com cromossomos B, enquanto que a população do local com menor altitude (700

metros) não apresentava. Estes resultados aliados ao fato do rio ter grandes quedas, o que impede que peixes da parte alta desçam o rio tornando o fluxo gênico restrito a parte alta, permitiram aos autores concluir que, os cromossomos B só existiam nessa parte porque esta região apresentava as condições mais favoráveis para os peixes; em condições desfavoráveis como na parte baixa, populações apresentando cromossomos B não se mantêm.

Os resultados de todos estes trabalhos recentes reforçam a conclusão de BEUKEBOOM (1994) que afirma que estudos detalhados de campo que monitorassem a distribuição e frequência dos cromossomos B, em combinação com estudos que medissem a variação do “fitness” nas populações, seriam indispensáveis para a compreensão da dinâmica populacional dos cromossomos B.

## 1.2 Considerações sobre os cromossomos B em *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae)

Dada uma visão geral do que é, como se origina e como se mantém os cromossomos B nas populações e, tendo em vista as perspectivas apontadas por CAMACHO et al. (2000) pode-se afirmar que um estudo mais amplo sobre os cromossomos B em *Partamona helleri* seria de grande relevância. Estes estudos permitiriam não só uma compreensão maior da origem, dinâmica populacional e efeitos dos cromossomos B nesta espécie, bem como esclarecimentos sobre a problemática dos cromossomos B como um todo e um maior conhecimento de evolução genômica.

Em *P. helleri*, COSTA et al. (1992) encontraram de um a três destes cromossomos B, em diferentes indivíduos. BRITO et al. (2005) concluíram que existem dois tipos de cromossomos B diferentes entre si. TOSTA et al. (2004) encontraram indivíduos com até quatro cromossomos B nesta espécie.

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

No gênero *Partamona*, foram caracterizadas citogeneticamente um total de sete espécies: *P. helleri* (COSTA et al. 1992, BRITO et al. 1997, BRITO et al. 2005); *P. sp. aff. nigrior*, *P. vicina*, *P. ayaleae*, *P. mulata*, *P. sp. n.* (BRITO-RIBON et al. 1999); *P. rustica* (MARTINS et al. 2005). Apenas a espécie *P. helleri* após caracterização citogenética havia apresentado indivíduos com cromossomos B, entretanto, recentemente, MARTINS et al. (2005) mostraram a presença de cromossomos B, também, em *P. rustica*.,

A espécie *P. helleri* se distribui na Mata Atlântica do Sudeste do Brasil, da Bahia até Santa Catarina, no limite sul da distribuição do gênero *Partamona* (PEDRO, 1998). A nidificação se dá em ninhos de pássaros livres, principalmente de “João Graveto” (Passeriformes, Furnaridae) ou semi-expostos, em cavidades de beirais de casa, em vasos de samambaias e entre raízes de epífitas (Ihering, 1903,1930; Mariano, 1911; Ducke, 1916 *apud* PEDRO, 1998 e observações pessoais). PEDRO (1998) afirma que *P. helleri* apresenta, possivelmente, uma população (espécie?) distinta na faixa atlântica que vai do Rio de Janeiro ao Espírito Santo, entretanto, devido à falta de material suficiente para análises taxonômica e de dados sobre a biologia desta população, não permitiram à autora tomar uma decisão mais segura.

Pouco se sabe sobre a origem molecular, dinâmica populacional e efeito dos cromossomos B em *P. helleri*. BRITO (1998), BRITO et al. (2005), caracterizaram citogeneticamente a espécie *P. helleri* utilizando as técnicas de banda C, método GTG, banda NOR, coloração com cromomicina A<sub>3</sub> e DAPI; banda Q; e FISH utilizando sonda rDNA 18S-FITC de milho (*Zea Mays*),

concluindo que os cromossomos B de *P. helleri* são heterocromáticos e possuem regiões ricas em AT.

BRITO (1998), BRITO et al. (2005) concluíram também em uma análise citogenética por método FISH (hibridização *in situ* fluorescente) que os cromossomos B de *P. helleri* devem ter surgido a partir de um segmento do complemento normal que não aquele distalmente posicionado no braço longo do par heteromórfico (par 2), como COSTA et al. (1992) sugeriam. No mesmo trabalho, em uma análise de “Southern Blot”, BRITO et al. (2005) mostraram que, após tratamento do DNA genômico de indivíduos com e sem cromossomos B com a enzima de restrição *EcoRI*, os indivíduos com cromossomo B apresentavam bandas não presentes nos indivíduos sem este cromossomo, o que sugeriu a presença de sítios específicos clivados pela enzima em cromossomos B dessa espécie.

IRSIGLER et al. (2000), em um estudo preliminar sobre o efeito dos cromossomos B na assimetria flutuante em populações de *P. helleri*, sugeriram que indivíduos portadores de cromossomos B são mais assimétricos que aqueles que não possuem esses cromossomos. Visto que indivíduos mais simétricos têm maior “fitness” (MOLLER & SWADDLE, 1997), este estudo sugere que os cromossomos B podem estar diminuindo o “fitness” dos indivíduos que os carregam.

TOSTA (2001), TOSTA et al. (2004) identificaram, isolaram, clonaram e sequenciaram parcialmente um marcador RAPD associado a esses cromossomos B. A seqüência parcial se mostrou extremamente rica em AT, confirmando os dados obtidos com coloração por fluorocromos por BRITO (1998). Devido a inespecificidade e baixa repetibilidade dos marcadores RAPD, TOSTA et al. (2004) realizaram uma análise de “Southern Blot” utilizando o DNA clonado como sonda para verificar se ele era realmente homólogo ao marcador RAPD. De maneira interessante, a análise de “southern” mostrou que a sonda hibridizava não só com o fragmento de DNA original detectado pelo marcador RAPD, mas também com bandas adicionais presentes nos indivíduos com cromossomo B, sugerindo que a seqüência clonada fosse repetitiva.

Como conclusão do trabalho, TOSTA et al. (2004) afirmam que o fragmento de DNA clonado será muito importante para a construção de uma sonda específica para cromossomos B de *P. helleri*, de forma a permitir a hibridização dessa sonda no genoma desta espécie e de outras relacionadas, fornecendo assim dados sobre a origem dos cromossomos B. Além disso, os autores ressaltam a possibilidade de se construir “primers” específicos para cromossomos B a partir da seqüência obtida, estendendo-se o “primer” de RAPD que confere a banda associada aos cromossomos B; a construção destes “primers” facilitará estudos sobre dinâmica populacional e efeitos dos cromossomos B de *P. helleri*.

### **1.3. Objetivos**

Com o intuito de ampliar o conhecimento sobre os cromossomos B de *Partamona helleri* para uma melhor compreensão dos mesmos; este trabalho apresentou os seguintes objetivos gerais:

- Investigar a origem molecular dos cromossomos B em *P. helleri* e;
- analisar o efeito dos cromossomos B no “fitness” de indivíduos e populações dessa espécie.

Para atingir os objetivos gerais o trabalho apresentou três grupos de objetivos específicos, especificados abaixo:

**a.1)** Construção e uso de marcadores SCAR para o estudo de cromossomos B em *P. helleri*.

- Construir um par de “primers” específicos (SCAR – sequence characterized amplified region), tomando como base a seqüência parcial do fragmento RAPD clonado por TOSTA (2001); e

- Testar a eficácia dos marcadores SCAR no intuito de caracterizar populações naturais de *P. helleri* quanto a presença e ausência de cromossomos B.

**b.1)** Análises sobre a origem molecular dos cromossomos B em *P. helleri*

- Verificar a homologia do marcador RAPD clonado por TOSTA (2001) com regiões cromossômicas do complemento normal de *P. helleri*;
- Verificar a homologia do marcador RAPD clonado por TOSTA (2001) com DNA genômico total de *P. helleri* e outras espécies do gênero *Partamona*; e
- Seqüenciar completamente o marcador RAPD clonado por TOSTA (2001) e verificar a homologia desse fragmento com regiões presentes em cromossomos B já seqüenciadas em outros organismos, especialmente em insetos.

**c.1)** Análises sobre o efeito dos cromossomos B no “fitness” de indivíduos de *P. helleri*.

- Analisar a relação entre a presença de cromossomos B (detectada pelo marcador SCAR) em indivíduos adultos de *P. helleri* e a simetria bilateral desse indivíduo, com intuito de verificar se a presença dos cromossomos B influencia a estabilidade do desenvolvimento do mesmo, diminuindo o “fitness”; e
- Analisar a relação entre a frequência de cromossomos B em um ninho de *P. helleri* e o índice de assimetria flutuante considerando o ninho, com intuito de verificar se a presença dos cromossomos B em um dado ninho aumenta a assimetria média dos indivíduos desse ninho, alterando seu “fitness”.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENITO, M. R. & BIRCHLER, J. A. (1993) Molecular characterization of a maize B-chromosome centric sequence. **Genetics**. **135**, 589-597.
- AMOS, A. & DOVER, G. (1981) The distribution of repetitive DNAs between regular and supernumerary chromosomes in species of *Glossina* (tse-tse): a two-step process in the origin of supernumeraries. **Chromosoma**. **81**, 673-690.
- ARAÚJO, S. M. S. R., POMPOLO, S. G., PERFECTTI, F., CAMACHO, J. P. M. (2001) Integration of a B chromosome into the A genome of a wasp. **Proceeds of Royal Society of London. Series B**. **268**, 1127-1131.
- BEUKEBOOM, L. W. (1994) Bewildering Bs: an impression of the 1 st B-Chromosome conference. **Heredity**. **73**, 328-336.
- BLUNDEN, R., WILKES, T. J., FORSTER, J. W., JIMENEZ, M. M., SANDERY, M. J., KARP, A., JONES, R. N. (1993) Identification of the E3900 family, a second family of rye B chromosome specific repeated sequences. **Genome**. **36**, 706-711.
- BRINKMAN, J. N., SESSIONS, S. K., HOUBEN, A., GREEN, D. M. (2000) Structure and evolution of supernumerary chromosomes in the Pacific giant salamander, *Dicamptodon tenebrosus*. **Chromosome Research**. **8**, 477-485.
- BRITO, R. M., COSTA, M. A., POMPOLO, S. G. (1997) Characterization and distribution of supernumerary chromosomes in 23 colonies of *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Brazilian Journal of Genetics**. **20**, 185-188.

- BRITO, R. M. (1998) **Caracterização citogenética de duas espécies do gênero *Partamona* schwarz, 1939 (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae)**. Viçosa: UFV, 1998. 97p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa.
- BRITO-RIBON, R. M., MIYAZAWA, C. S., POMPOLO, S. G. (1999) First karyotype characterization of four species of *Partamona* (Fries, 1980) (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) in Mato Grosso State, Brazil. **Cytobios.** **100**, 19-26.
- BRITO, R. M., POMPOLO, S. G., MAGALHÃES, M. F. M., BARROS, E. G., SAKAMOTO-HOJO, E. T. (2005) Cytogenetic characterization of two *Partamona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) by fluorochrome staining and localization of 18S rDNA clusters by FISH. **Cytologia.** **70**, *in press*.
- CABRERO, J., ALCHE, J. D., CAMACHO, J. P. M. (1987) Effects of B chromosomes on the activity of nucleolar organizer regions in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*: activation of a latent nucleolar organizer region on a B chromosome fused to an autosome. **Genome.** **29**, 116-121.
- CABRERO, J., LÓPEZ-LEÓN, M., CASTRO, A. J., MARTÍN-AIGANZA, A., CAMACHO, J. P. M. (1997) Geographical distribution of B chromosomes in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*, along a river basin, is mainly shaped by non-selective historical events. **Chromosome Research.** **5**, 194-198.
- CAMACHO, J. P. M., SHAW M. W., LÓPEZ-LEÓN, M. D., PARDO, M. C. & CABRERO, J. (1997) Population Dynamics of a selfish B Chromosome neutralized by the standard genome in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **The American Naturalist.** **149**, 1031-1050.

- CAMACHO, J. P. M., SHARBEL, T. F., BEUKEBOOM, L. W. (2000) B-chromosome evolution. **Philosophic Transactions of Royal Society of London. Series B. 355**, 163-178.
- CARLSON, W. R., ROSEMAN, R., ZHENG, Y. (1993) Localizing a region on the B-chromosome that influences crossing-over. **Maydica. 38**, 107-113.
- COSTA, M. A., POMPOLO, S. G., CAMPOS, L. A. O. (1992) Supernumerary chromosomes in *Partamona cupira* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Revista Brasileira de Genética. 15**, 801-806.
- CUADRADO, A. & JOUVE, N. (1994) Highly repetitive sequences in B chromosomes of *Secale cereale* revealed by fluorescence in situ hybridization. **Genome. 37**, 709-712.
- DONALD, T. M., LEACH, C. R., CLOUGH, A., TIMMIS, J. N. (1995) Ribosomal RNA genes and the B chromosome of *Brachycome dichromosomatica*. **Heredity. 74**, 556-561.
- FRANKS, T. K., HOUBEN, A., LEACH, C. R., TIMMIS, J. N. (1996) The molecular organization of a B chromosome tandem repeat sequence from *Brachycome dichromosomatica*. **Chromosoma. 105**, 223-230.
- GUTKNECHT, J., SPERLICH, D., BACHMANN, L. A. (1995) A species specific satellite DNA family of *Drosophila subsivestris* appearing predominantly in B chromosomes. **Chromosoma. 103**, 533-544.
- HOUBEN, A., KYNAST, R. G., HEIM, U., HERMANN, H., JONES, R. N., FORSTER, J. W. (1996) Molecular cytogenetic characterization of the terminal heterochromatic segment of the B-chromosome of rye (*Secale cereale*). **Chromosoma, 105**. 97-103.

- Houben, A., Leach, C. R., Verlin, D., Rofe, R., Timmis, J. N. (1997a) A repetitive DNA sequence common to the different B chromosomes of the genus *Brachycome*. **Chromosoma**. **106**, 513-519.
- Houben, A., Belyaev, N. D., Leach, C. R., Timmis, J. N. (1997b) Differences of histone H4 acetylation and replication timing between A and B chromosomes of *Brachycome dichromosomatica*. **Chromosome Research**, **5**, 233-237.
- Houben, A., Thompson, N., Ahne, R., Leach, C. R., Verlin, D., Timmis, J. N. (1999) A monophyletic origin of the B chromosomes of *Brachycome dichromosomatica* (Asteraceae). **Plant Systematics and Evolution**, **219**. 127-135.
- IRSIGLER, A. S. T., TOSTA, V. C., CAMPOS, L. A. O. (2000) Estudo dos efeitos fenotípicos de cromossomos supranumerários em *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Genet. Mol. Biol.** **23** (Suppl) 147.
- JAMILENA, M., REJÓN, M. R., REJÓN, C. R. (1994) A molecular analysis of the origin of the *Crepis capillaries* B chromosome. **Journal of Cell Science**. **107**, 703-708.
- JAMILENA, M., GARRIDO-RAMOS, M., REJÓN, M. R., REJÓN, C. R., PARKER, J. S. (1995) Characterization of repeated sequences from micro dissected B chromosomes of *Crepis capillaries*. **Chromosoma**. **104**, 113-120.
- JONES, R. N. (1995) Tansley Review N°. 85 B chromosomes in plants. **New Phytol.** **131**, 411-434.
- JONES, R. N. & REES, H. (1982) **B chromosomes**. New York: Academy Press. 232p.

- KEYL, H. J. & HAGELE, K. (1971) B chromosomen bei *Chironomus*. **Cromosoma**. **35**, 403-417.
- LEACH, C. R., DONALD, T. M., FRANKS, T. K., SPINIELLO, S. S., HANRAHAN, C. F., TIMMIS, J. N. (1995) Organization and origin of a B chromosome centromeric sequence from *Brachycome dichromosomatica*. **Chromosoma**. **103**, 708-714.
- LÓPEZ-LEÓN, M. D., CABRERO, J., CAMACHO, J. P. M. (1991) A nucleolus organizer region in a B-chromosome inactivated by DNA methylation. **Chromosoma**. **100**, 134-138.
- LÓPEZ-LEÓN, M. D., NEVES, N., SCHWARZACHER, T., HESLOP-HARRISON, T. S. HEWITT, G. M., CAMACHO, J. P. M. (1994) Possible origin of a B chromosome deduced from its DNA composition using double FISH technique. **Chromosome Research**. **2**, 87-92.
- LÓPEZ-LEÓN, M. D., CABRERO, J., CAMACHO, J. P. M. (1995a) Changes in NOR activity pattern in the presence of supernumerary heterochromatin in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **Genome**. **38**, 68-74.
- LÓPEZ-LEÓN, M. D., CABRERO, J., CAMACHO, J. P. M. (1995b) Changes in DNA methylation during development in the B chromosome NOR of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **Heredity**. **74**, 296-302.
- MARTINS, C. C. C., DUARTE, O. M. P., SANTANA, S. E. A., DOMINGUES, A. M. T., COSTA, M. A., ALVES, R. N. O., SILVA-JÚNIOR, J. C., WALDSCHMIDT, A. M. Caracterização citogenética da abelha sem ferrão *Partamona rústica* (PEDRO & CAMARGO, 2003 Hymenoptera, Apidae).

**Genetic and Molecular Biology.** Resumos do 51<sup>o</sup> Congresso Brasileiro de Genética, Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil.

McALLISTER, B. F. (1995) Isolation and characterization of a retroelement from B chromosome (PSR) in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. **Insect Molecular Biology**, **4**, 253-262.

McALLISTER, B.F., WERREN, J.H. (1997) Hybrid origin of a B chromosome (PSR) in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. **Chromosoma**. **106**, 243-253.

McQUADE, L. R., HILL, R. J., FRANCIS, D. (1994) B-chromosome systems in the greater glider, *Petauroides volans* (Marsupialia: Pseudocheiridae) - II. investigation of B-chromosome DNA sequences isolated by micromanipulation and PCR. **Cytogenetic and Cell Genetic**. **66**, 155-161.

MIAO, V. P., COVERT, S. F., VANETTEN, H. D. (1991) A fungal gene for antibiotic resistance on a dispensable ("B") chromosome. **Science**. **254**, 1773-1776.

MICHAILOVA, P. & METTINEN, A. (2000) Cytotaxonomical variability of *Chironomus* L. and *C-anthracinus* Zett. (Diptera, Chironomidae) from industrial and municipal polluted areas of Finland. **Caryologia**. **53**, 69-81.

MoLLER, A. P. & SWADDLE, J. P. **Asymmetry, Developmental Stability, and Evolution**. London: Oxford Series in Ecology and Evolution. 287p.

NÉO, D. M., BERTOLLO, L. A. C., MOREIRA FILHO, O . (2000) Morphological differentiation and possible origin of B chromosomes in natural Brazilian population of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Genetica**. **108**, 211-215.

- NEVES, N., BARÃO, A., CASTILHO, A., SILVA, M., MORAIS, L., CARVALHO, V., VIEGAS, W., JONES, R. N. (1992) Influence of DNA methylation on rye B-chromosome nondisjunction. **Genome**. **35**, 650-652.
- PEDRO, S. R. de M. (1998) **Meliponini neotropicais: o gênero *Partamona schwarz*, 1939 (Hymenoptera, Apidae) taxonomia e biogeografia**. Ribeirão Preto: FFCLRP, 1998. 219 p. Tese (Doutoramento em Ciências, área: Entomologia). Universidade de São Paulo, USP.
- PEPPERS, J. A., WIGGINS, L. E., BAKER, R. J. (1997) Nature of B chromosomes in the harvest mouse *Reithrodontomys megalotis* by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). **Chromosome Research**. **5**, 475-479.
- PERFECTTI, F. & WERREN, J. H. (2001) The interespecific origin of B chromosomes: experimental evidence. **Evolution**. **55**, 1069-1073.
- PLOWMAN, A. B. & BOUGOURD, S. M. (1994) Selectively advantageous effects of B chromosomes on germination behavior in *Allium schoenoprasum* L. **Heredity**. **72**, 587-593.
- RANDOLPH, L. F. (1928) Types of supernumerary chromosomes in maize. **Anatomical records**. **41**, 102.
- SAPRE, A. B. & DESPHANDE, D. S. (1987) Origin of B chromosomes in *Coix* L. through spontaneous interespecific hybridization. **Journal of Heredity**. **78**, 191-196.

- SHARBEL, T. F., GREEN, D. M., HOUBEN, A. (1998) B-chromosome origin in the endemic New Zealand frog *Leiopelma hochstetteri* through sex chromosome devolution. **Genome**. **41**, 14-22.
- SHARTL, M., NANDA, I., SCHLUPP, I., WILDE, B., EPPLER, J. T., SCHMIDT, M., PARZEFALL, J. (1995) Incorporation of subgenomic amounts of DNA as compensation for mutational load in a gynogenetic fish. **Nature**. **373**, 68-71.
- STARK, E. A., CONNERTON, I., BENNETT, S. T., BARNES, S. R., PARKER, J. S., FORSTER, J. W. (1996) Molecular analysis of the structure of the maize B-chromosome. **Chromosome Research**. **4**, 15-23.
- STEVENS, N. M. (1908) The chromosomes in *Diabrotica vittata*, *Diabrotica soror* and *Diabrotica 12-punctata*. A contribution to the literature on heterochromosomes and sex determination. **Journal of Experimental Zoology**. **5**, 453-470.
- TANIC, N., DEDOVIC, N., VUJOSEVIC, M., DIMITRIJEVIC, B. (2000) DNA profiling of B chromosomes from the Yellow-necked mouse *Apodemus flavicollis* (Rodentia, Mammalia). **Genome Research**, **10**, 55-61.
- TOSTA, V. C. (2001) **Marcador Molecular associado a cromossomos B em *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae).** Viçosa: UFV, 2001. 55p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa.
- TOSTA, V. C., FERNANDES-SALOMÃO, T. M., TAVARES, M. G., POMPOLO, S. G., BARROS E. G., CAMPOS, L. A. O. (2004) A RAPD marker associated with B chromosomes in *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae) **Cytogenetic and Genome Research**. **106**, 279-283.

- ZHANG, R. X., CHEN, C. B., SONG, W. Q., LI, X. L., CHEN, R. Y. (1999) Homologous analysis on centromeric region sequences of A and B chromosomes from rye by FISH. **Chinese Science Bulletin.** **44**, 704-707.
- WERREN, J. H. (1991) The paternal sex-ratio of *Nasonia*. **The American Naturalist.** **137**, 392-402.
- WILKES, T. M., FRANCKI, M. G., LANGRIDGE, P., KARP, A., JONES, R. N., FORSTER, J. W. (1995) Analysis of rye B-chromosome structure using fluorescence *in situ* hybridization (FISH). **Chromosome Research.** **3**, 466-472.
- WILSON, E. B. (1907) The supernumerary chromosomes of Hemiptera. **Science.** **26**, 870-871.

## 2. CAPÍTULO 1

**Utilização de marcadores SCAR para o estudo de cromossomos B em populações naturais de *Partamona helleri* (HYMENOPTERA, APIDAE). Tosta, V. C.,<sup>a</sup> Tavares, M. G.,<sup>a</sup> Fernandes-Salomão,<sup>a</sup> T. M., Barros E. G.,<sup>a,b</sup> Campos, L. A. O.,<sup>a</sup> e Camacho, J. P. M.<sup>c</sup>**

<sup>a</sup> *Departamento de Biologia Geral, e* <sup>b</sup> *Instituto de Biotecnologia Aplicada a Agropecuária (BIOAGRO), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG (Brasil);* <sup>c</sup> *Departamento de Genética, Universidad de Granada, Granada, Andalucía (España).*

## **EXTRATO**

No presente trabalho, um marcador RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA) associado a cromossomos B em *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae) foi convertido em um marcador SCAR (Sequence Characterized Amplified Region). O marcador SCAR obtido foi testado em dez colônias diferentes de *P. helleri*. Comparando os dados obtidos nas análises com o marcador SCAR com os dados obtidos em análises citogenéticas com as mesmas dez colônias pode-se verificar que há uma associação entre a presença do marcador e a presença do cromossomo B. Nas cinco colônias em que os indivíduos sempre apresentavam o marcador SCAR, as análises citogenéticas sempre apontaram indivíduos portadores de cromossomos B. Nas colônias onde não se detectou marcadores SCAR, as análises citogenéticas confirmaram a ausência dos cromossomos B. Finalmente, nas três colônias em que foram encontrados indivíduos com e sem o marcador SCAR, também foi verificado indivíduos apresentando presença e ausência de Bs nas análises citogenéticas. Este trabalho abre a perspectiva de se usar o marcador SCAR obtido para se verificar a distribuição geográfica dos cromossomos B em indivíduos adultos de populações naturais de *P. helleri*, bem como verificar o efeito desses cromossomos nesses indivíduos e populações.

## 2.1. INTRODUÇÃO

Cromossomos B são cromossomos adicionais, dispensáveis, que provavelmente surgem a partir dos cromossomos A, entretanto, apresentam distintos padrões evolutivos em relação aos cromossomos A e uma herança de padrão não mendeliano (CAMACHO et al., 2000). Eles podem surgir também intraespecificamente por hibridização. Como resultado da sua evolução molecular, esses cromossomos são, em geral, heterocromáticos, com grandes quantidades de seqüências de DNA repetitivos e elementos transponíveis. Além disso, algumas vezes apresentam genes expressos afetando, direta, ou indiretamente, o “fitness” dos indivíduos que os carregam (BEUKEBOOM, 1994; CAMACHO et al., 2000).

Várias espécies de animais, plantas e fungos apresentam cromossomos B. Entre estas espécies se encontra a espécie *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae) que tem distribuição geográfica do sudeste do Brasil, do norte do estado de Santa Catarina até o sul do estado da Bahia (PEDRO, 1998). O número cromossômico padrão desta espécie é 34 nas fêmeas e 17 nos machos (haplóides), entretanto, indivíduos com 1, 2, 3 ou 4 cromossomos B têm sido encontrados (COSTA et al., 1992; BRITO et al., 1997; TOSTA, 2001; TOSTA et al., 2004).

O estudo dos efeitos da presença dos cromossomos B em indivíduos de *P. helleri* é difícil, porque esses cromossomos somente são identificados por meio de análises citogenéticas em larvas pós-defecante (TOSTA et al., 2004). Nessa espécie uma possível forma de se identificar cromossomos B em indivíduos adultos seria utilizar marcadores moleculares. Marcadores moleculares têm sido utilizados com sucesso para detecção de cromossomos B em diversos organismos, como em vespas *Nasonia vitripennis* (NUR et al., 1988), em milho *Zea mays* (GOURMET e RAYBURN, 1996) e em ratos *Apodemus flavicollis* (TANIC et al., 2000)

Nesse contexto, TOSTA (2001), TOSTA et al. (2004) isolaram e clonaram em *P. helleri* um marcador RAPD associado a indivíduos portadores de

cromossomos B; evidenciando a presença de seqüências específicas de DNA em indivíduos carreando esses cromossomos. Esse marcador permite identificar indivíduos adultos portadores de cromossomos B nessa espécie.

Devido aos problemas de repetibilidade da técnica de RAPD, este trabalho apresentou como objetivo desenvolver e testar marcadores SCAR (Sequence characterized amplified region) a partir da seqüência parcial do marcador RAPD obtida por TOSTA (2001), no intuito de obter um marcador mais fidedigno para a identificação dos cromossomos B em *P. helleri*.

## **2.2. METODOLOGIA**

### **2.2.1. Material Biológico**

Dez colônias de *P. helleri*, previamente coletadas, foram transferidas e mantidas no apiário central da Universidade Federal de Viçosa. As colônias 590, 591, 592 eram provenientes de Porto Firme/MG (20°40'LS, 43°05' LW), as colônias 588 e 603 provenientes de Viçosa/MG (20°45'LS, 42°52' LW), a colônia 895 proveniente de Araponga (20°40'LS, 42°32' LW), as colônias 896 e 897 provenientes de Piranga/MG (20°40'LS, 42°31' LW), e finalmente, as colônias 902 e 903 provenientes de Rio Vermelho (18°18'LS, 43°00' LW).

Dez indivíduos adultos de cada colônia foram submetidos a amplificação com um par de “primers” SCAR, enquanto vinte larvas pós defecante de cada uma, das mesmas dez colônias, foram analisadas citogeneticamente.

### **2.2.2. Conversão dos Marcadores RAPD em marcadores SCAR**

O marcador RAPD associado aos cromossomos B foi excisado diretamente do gel de agarose usando o Qiagen Kit (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. O fragmento de DNA purificado foi clonado no vetor pGEM-T Easy (Promega). Este fragmento foi parcialmente seqüenciado utilizando a metodologia de SANGER (1977). Dois primers longos foram desenvolvidos com base nos dados obtidos do seqüenciamento o primer OPK-14 A (CCCGCTACACATATAATTA) e OPK-14 B (CCCGCTACACCCTAAAATAT).

### **2.2.3. Análises empregando o marcador SCAR**

Os “primers” SCAR desenvolvidos foram testados em dez indivíduos coletados, de cada uma das dez colônias mantidas no Apiário. Para estas análises a extração do DNA foi feita de acordo com o protocolo de WALDSCHMIDT et al. (1997) e amplificado por uma reação de polimerase em cadeia (PCR). Cada reação (25 µl) continha 25ng de DNA, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM Tris-KCl, 4mM de cada um dos “primers” SCAR, 2mM dNTPs, e 1U de *Taq* DNA polimerase. As ampliações de PCR consistiram de 40 ciclos de 30 s a 94 °C para desnaturação do DNA, 1 min a 55 °C para anelamento dos “primers”, e 1 min e 30 s a 72 °C para alongamento. Um passo final, de extensão, a 72 °C por 7 min foi realizado após os 40 ciclos. Os produtos SCAR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,2%, corados com brometo de etídio e visualizado e fotografado sob luz ultra-violeta.

#### **2.2.4. Análises citogenéticas**

Lâminas contendo cromossomos metafásicos foram obtidas a partir do gânglio cerebral de cada uma das vinte larvas pós-defecantes, coletadas nas dez colônias citadas acima, de acordo com técnica proposta por IMAI et al.(1988).

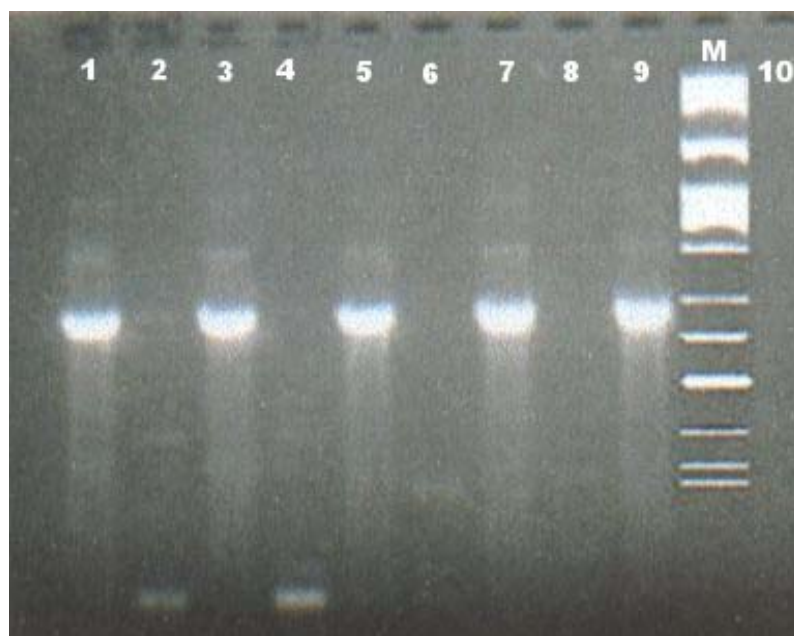
Para caracterizar cada larva quanto à presença/ausência de cromossomos B, dez metáfases de cada lâmina foram analisadas com o auxílio de um microscópio óptico Olympus.

### **2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O marcador RAPD obtido por TOSTA et al. (2004) (Fig. 1) foi convertido em um marcador SCAR. Em uma amplificação de dez indivíduos da colônia 896, é possível visualizar (Fig 2.), um exemplo onde cinco indivíduos apresentam o marcador SCAR, e outros cinco não. O produto de reação com os “primers” SCAR apresentou o mesmo tamanho que o produto de reação polimórfico (marcador) com o “primer” RAPD, conforme indicado pela comparação com o padrão de bandas obtidas pela digestão do DNA do fago  $\lambda$  com as enzimas *EcoRI* e *HindIII*.

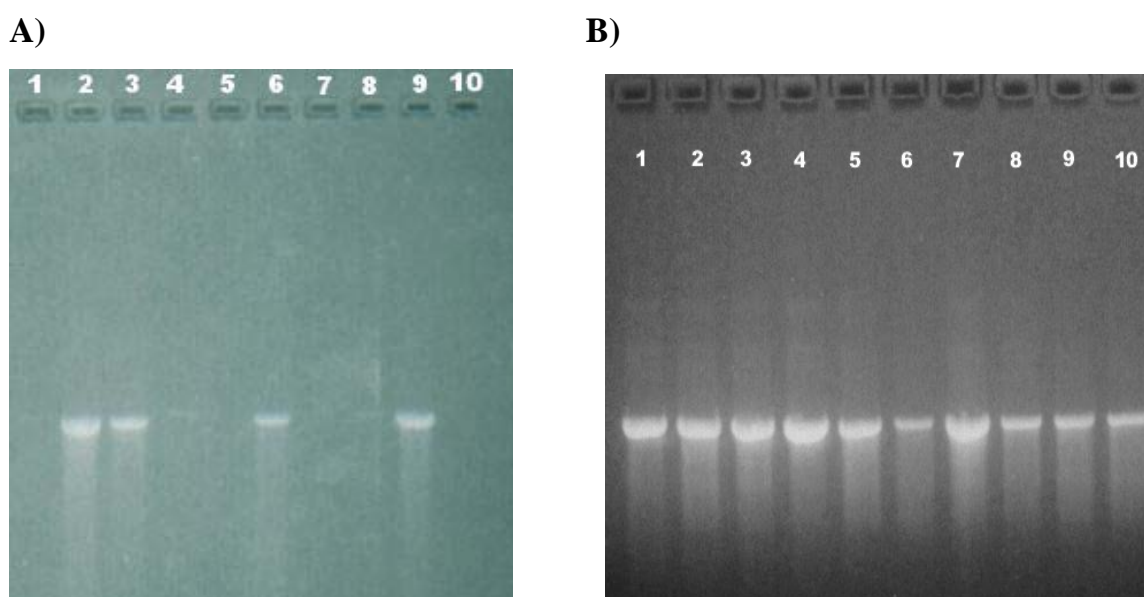


**Figura 1** - Eletroforese de DNA genômico de larvas amplificado com o primer RAPD OPK-14. Amostras 1, 3, 5, 7, 9 de larva com cromossomos B mostram um produto RAPD que não está presente nas amostras 2, 4, 6, 8, 10 de larvas sem cromossomos B. M corresponde ao DNA do fago  $\lambda$  digerido com *EcoRI* e *HindIII*. Extraído de TOSTA et al. (2004).



**Figura 2** - Eletroforese de DNA genômico de indivíduos adultos amplificado com os primers SCAR OPK-14 A (CCCGCTACACATATAATTAA) e OPK-14 B (CCCGCTACACCCTAAAATAT). Amostras 1, 3, 5, 7, 9 mostram um produto SCAR que não está presente nas amostras 2, 4, 6, 8, 10. M corresponde ao DNA do fago  $\lambda$  digerido com *EcoRI* e *HindIII*.

O marcador SCAR obtido foi testado em dez colônias diferentes. Três colônias (896, 897 e 588) apresentaram indivíduos com e sem a presença do marcador (fig. 3A), duas (603 e 895) apresentaram somente indivíduos sem a presença do marcador, enquanto outras cinco colônias (590, 591, 592, 902 e 903) sempre apresentaram o referido marcador (fig 3B).



**Figura 3 – A)** Eletroforese de DNA genômico de indivíduos adultos amplificado com os primers SCAR OPK-14 A (CCCGCTACACATATAATTAA) e OPK-14 B (CCCGCTACACCCTAAAATAT). As amostras 2, 3, 6 e 9 mostram um produto SCAR. Este padrão, de presença e ausência do marcador foi encontrado nas colônias 896, 897 e 588. Outras duas colônias, 603 e 895 não apresentaram indivíduos com o marcador. **B)** Eletroforese de DNA genômico amplificado de indivíduos adultos com os mesmos primers SCAR OPK-14 A e OPK-14 B. Todas as amostras mostram um produto SCAR. Este padrão se repetiu para as colônias 590, 591, 592, 902 e 903.

Comparando os dados obtidos nas análises com o marcador SCAR com os dados obtidos nas análises citogenéticas (Tabela 1), pode-se verificar que há uma associação entre a presença do marcador SCAR, e a presença do cromossomo B, ou seja, em todas as seis colônias em que os indivíduos sempre apresentavam o marcador SCAR, as análises citogenéticas sempre apontaram indivíduos destas mesmas colônias portadores de cromossomos B. O mesmo ocorreu nas colônias que não apresentavam marcadores SCAR, as quais nas

análises citogenéticas não apresentaram cromossomos B. Finalmente, nas duas colônias em que foram encontrados indivíduos com e sem o marcador, também foi verificado indivíduos apresentando presença e ausência de Bs nas análises citogenéticas.

**Tabela 1** - Associação das análises utilizando o marcador SCAR com as análises citogenéticas

Colônia	Indivíduos apresentando cromossomos B nas metáfases	Indivíduos sem cromossomos B nas metáfases	Indivíduos apresentando o marcador SCAR na eletroforese	Indivíduos que não apresentaram o marcador SCAR na eletroforese
588 <sup>3</sup>	10	10	10	10
590 <sup>1</sup>	20	-	10	-
591 <sup>1</sup>	20	-	10	-
592 <sup>1</sup>	20	-	10	-
603 <sup>2</sup>	-	20	-	10
895 <sup>2</sup>	-	20	-	10
896 <sup>3</sup>	13	7	5	5
897 <sup>3</sup>	12	8	4	6
902 <sup>1</sup>	20	-	10	-
903 <sup>1</sup>	20	-	10	-

\* Todos os indivíduos das colônias do **Grupo 1** apresentam ambos, o marcador SCAR na eletroforese, e os cromossomos B nas metáfases. Todos os indivíduos das colônias do **Grupo 2** não apresentam, nem os marcadores SCAR na eletroforese, nem os cromossomos B nas metáfases. Por fim, os indivíduos das colônias do **Grupo 3** mostram tanto o marcador como os cromossomos B em alguns indivíduos.

Estes dados corroboram a hipótese de TOSTA et al. (2004) de que o fragmento RAPD isolado esta associado a presença de cromossomos B em *P. helleri*. Além disso, permite afirmar que o marcador SCAR obtido a partir do marcador RAPD, principalmente por sua maior repetibilidade, será útil para se estudar os cromossomos B em *P. helleri*, principalmente em estudos populacionais que envolvam indivíduos adultos, onde a identificação da presença e ausência dos cromossomos B até então não era possível.

Estudos que consideram a dinâmica espaço-temporal dos cromossomos B em adultos (PERFECTTI et al., 2004), a variação biogeográfica desses cromossomos (REMIS & VILARDI, 2004), e relações entre as variações

biogeográficas e sazonais com a morfologia externa (TSURUSAKI & SHIMADA 2004) tornar-se-ão possíveis com a utilização desse marcador, uma vez que tal marcador viabilizará o cálculo da prevalência e da proporção de indivíduos carreando cromossomos B em uma população de *P. helleri*, entretanto, apesar de facilitar o estudo com populações de adultos de *P. helleri*, tanto o marcador RAPD, como o marcador SCAR obtido a partir do RAPD, apresentam o problema de não distinguir o número de cromossomos B por indivíduo.

PERFECTTI et al.(2004) apontam três parâmetros para quantificar a frequência de um cromossomo B em populações de *Eyprepocnemis plorans*: a prevalência (proporção de indivíduos carreando esses cromossomos B); a carga (média do número de cromossomos B em indivíduos portadores de Bs); e a frequência média de cromossomos B (calculada como o número médio de Bs por indivíduos considerando-se indivíduos portadores e não portadores). Desses três parâmetros PERFECTTI et al. (2004) apontam a frequência média, como o parâmetro mais sensível e a carga como o menos sensível. Já a prevalência, é um parâmetro de sensibilidade intermediária, não apresentando ampla variação entre as populações de *E. plorans*, e como indicado por CAMACHO et al. (1997), só devendo ser usada para detectar grandes variações de frequências de Bs entre populações. Desse modo, pode-se concluir que tanto os marcadores RAPD, como o marcador SCAR, serão úteis para distinguir variações em larga escala nas frequências de cromossomos B entre as populações, uma vez que só possibilitarão o cálculo da prevalência, sendo ambos inadequados para verificar pequenas variações.

Além de permitir a identificação dos cromossomos B, e conseqüentes estudos distribuição biogeográfica dos mesmos nas populações de *P. helleri*, marcadores moleculares associados a esses cromossomos podem ser úteis para estudar os efeitos dos Bs em indivíduos e populações que os apresentam. TOKARSKAIA et al. (2000), por exemplo, apontaram uma correlação positiva entre a presença de cromossomos B e o aumento de

polimorfismo para *loci* RAPD em cervos do gênero *Capreolus*, o que indica como efeito dos Bs, uma contribuição para a variabilidade genética da população.

Assim, este trabalho abre a perspectiva de se usar o marcador SCAR obtido, em estudos onde se possa verificar a distribuição geográfica dos cromossomos B em indivíduos adultos de populações naturais de *P. helleri*, bem como verificar o efeito desses cromossomos nesses indivíduos e populações.

## **AGRADECIMENTOS**

O presente trabalho foi realizado com o apoio do CNPq, uma entidade do Governo Brasileiro voltada ao desempenho científico e tecnológico, contou também com o auxílio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Ministério do Meio Ambiente (MMA); a todos esses órgãos de fomento a nossa gratidão. Somos gratos também ao Dr. Rui Carlos Peruquetti e ao Doutorando Mário César Laboissiere Del Sarto pela indispensável ajuda na obtenção do material biológico.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

BEUKEBOOM, L. W. (1994) Bewildering Bs: an impression of the 1<sup>st</sup> B-Chromosome conference. **Heredity**. **73**, 328-336.

BRITO, R. M., COSTA, M. A., POMPOLO, S. G. (1997) Characterization and distribution of supernumerary chromosomes in 23 colonies of *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Brazilian Journal of Genetics**. **20**, 185-188.

- COSTA, M. A., POMPOLO, S. G., CAMPOS, L. A. O. (1992) Supernumerary chromosomes in *Partamona cupira* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Revista Brasileira de Genética**. **15**, 801-806.
- CAMACHO, J. P. M., SHARBEL, T. F., BEUKEBOOM, L. W. (2000) B-chromosome evolution. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B**. **355**, 163-178.
- CAMACHO, J. P. M., SHAW M. W., LÓPEZ-LEÓN, M. D., PARDO, M. C., CABRERO, J. (1997) Population dynamic of a selfish B chromosome neutralized by the standard genome in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **American Naturalist**. **149**, 1030-1050.
- GOURMET, C., RAYBURN, L. (1996) Identification of RAPD markers associated with the presence of B chromosomes in maize. **Heredity**. **77**, 240-244.
- IMAI, H. T., TAYLOR, R. W., COZIER, R. H. (1988) Modes of spontaneous chromosomal mutation and Karyotype evolution in ants with reference to Minimum Interaction Hypothesis. **Japanese Journal of Genetics**. **63**:159-185.
- NUR, U., WERREN, J. H., EICKBUSH, D. G., BURKE, W. D., EICKBUSH, T. H. (1988) A “selfish” B chromosome that enhances its transmission by eliminating the paternal genome. **Science**. **24**, 512-514.
- PERFECTTI, F., PITA, M., DE LA VEGA, C. G., GOSÁLVEZ, J., CAMACHO, J. P. M. (2004) Spatio-temporal dynamics of a neutralized B chromosome in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **Cytogenetic and Genome Research**. **106**, 376-385.

- PEDRO, S. R. de M. (1998) **Meliponini neotropicais: o gênero *Partamona* Schwarz, 1939 (Hymenoptera, Apidae) taxonomia e biogeografia.** Ribeirão Preto: FFCLRP, 1998. 219 p. Tese (Doutoramento em Ciências, área: Entomologia). Universidade de São Paulo, USP.
- REMIS, M. I. & VILARDI, J. C. (2004) Mitotically unstable chromosome polymorphism in the grasshopper *Dichroplus elongates*. **Cytogenetic and Genome Research. 106**, 359-364.
- SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Science USA. 74**, 5463-5467.
- TANIC, N., DEDOVIC, N., VUJOSEVIC, M., DIMITRIJEVIC, B. (2000) DNA profiling of B chromosomes from the Yellow-necked mouse *Apodemus flavicollis* (Rodentia, Mammalia). **Genome Research. 10**, 55-61.
- TOKARSKAIA, O. N., EFREMOVA, D. A., KAN, D. G., DANIKIN, A. A., SEMPERE, A., PETROSIAN, V. G., SEMENOVA, S. K., RYSKOV, A. P. (2000) Variability of multilocus DNA markers in populations of the Siberian (*Capreolus pygargus* Pall.) and European (*C. capreolus* L.) roe deer. **Genetika. 36**, 1520-1530.
- TOSTA, V. C., FERNANDES-SALOMÃO, T. M., TAVARES, M. G., POMPOLO, S. G., BARROS E. G., CAMPOS, L. A. O. (2004) A RAPD marker associated with B chromosomes in *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae) **Cytogenetic and Genome Research. 106**, 279-283.

TOSTA, V. C. (2001) **Marcador Molecular associado a cromossomos B em *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae).** Viçosa: UFV, 2001. 55p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa.

TSURUSAKI, N., SHIMADA, T. (2004) Geographic and seasonal variations of the number of B chromosomes and external morphology in *Psathyropus tenuipes* (Arachnida: Opiliones).

WALDSCHMIDT, A. M., SALOMÃO, T. M. F., BARROS, E. G., CAMPOS, L. A. O. (1997) Extraction of genomic DNA from *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). **Brazilian Journal of Genetics**. **20**, 421-423.

### 3. CAPÍTULO 2

**Análises sobre a origem molecular dos cromossomos B em *Partamona helleri*  
(HYMENOPTERA, APIDAE).**

**Tosta, V. C.,<sup>a</sup> Tavares, M. G.,<sup>a</sup> Fernandes-Salomão,<sup>a</sup> T. M. Pompolo, S. G.,<sup>a</sup>  
Gomes, S. R. P.,<sup>b</sup> Perfectti, F.,<sup>c</sup> Campos, L. A. O.,<sup>a</sup> e Camacho, J. P. M.<sup>c</sup>**

<sup>a</sup> *Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG (Brasil);*

<sup>b</sup> *Departamento de Biologia Celular, Universidade de Campinas, Campinas –SP (Brasil)*

<sup>c</sup> *Departamento de Genética, Universidad de Granada, Granada, (España).*

## **EXTRATO**

Esse trabalho mostrou que os cromossomos B de *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae) contêm “cluster” de genes de rRNA, e provavelmente se originaram de uma forma independente em relação aos cromossomos do complemento normal A da espécie. Mostrou também que tal processo de origem deve ter ocorrido no contexto evolutivo do gênero *Partamona*, em especial, no contexto evolutivo de um clado monofilético no qual se encontram, além de *P. helleri*, as espécies *P. criptica*, *P. cupira*, *P. rustica* e *P. mulata*. Essa hipótese é sustentada pelo conjunto de dados obtidos por: 1) análises da seqüência obtida a partir de um marcador RAPD (Random amplified polimorfism DNA) associado a cromossomos B em *P. helleri*; 2) hibridização *in situ* fluorescente “FISH” usando tal seqüência como sonda 3) hibridização genômica “Dot blot” usando tal seqüência como sonda; 4) análises com um marcador SCAR (Sequence characterized amplified region) desenvolvido a partir do marcador RAPD. A origem independente dos cromossomos B em relação ao complemento cromossômico normal A pode ter ocorrido por hibridização interespecífica, mas não fica descartada a possibilidade de elementos transponíveis participarem desse processo de origem. Um maior número de estudos de citogenética e genética molecular das espécies de *Partamona* são necessários para se ter maior clareza sobre a origem dos cromossomos B não só em *P. helleri*, bem como no gênero como um todo.

### 3.1. INTRODUÇÃO

Cromossomos B são cromossomos adicionais dispensáveis os quais provavelmente surgem a partir dos cromossomos A, entretanto, apresentam distintos padrões evolutivos em relação aos cromossomos A e uma herança de padrão não mendeliano (CAMACHO et al. 2000).

Desde sua descrição por WILSON (1907), a origem e evolução dos cromossomos B permaneceram obscuras. Segundo BEUKEBOOM (1994), somente nas últimas duas décadas, principalmente com o desenvolvimento das técnicas de genética e citogenética molecular, foi possível obter um panorama um pouco mais claro sobre esses aspectos

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

Os cromossomos B, que se originam intraespecificamente, são originados principalmente a partir de quebra de cromossomos do complemento normal. Esta quebra pode ser a partir de cromossomos autossomais ou sexuais (CAMACHO et al., 2000). HOUBEN et al. (1999), LEACH et al. (2004) detalham a origem dos cromossomos B de plantas *Brachycome dichromosomatica* como quebra de cromossomos do complemento autossômico. LÓPEZ-LÉON et al. (1994) mostram a origem de cromossomos B em gafanhotos *Eyprepocnemis plorans* a partir de cromossomos sexuais não heteromórficos (sistema XX/XO), enquanto SHARBEL et al. (1998) apontam a origem desses cromossomos em anfíbios *Leiopelma hochstetteri* a partir dos cromossomos que determinam o sexo heterogamético.

Casos em que ocorre origem interespecífica dos cromossomos B são bem mais raros. Nesses casos, a origem dos cromossomos B deve-se a elementos transponíveis ou a hibridação interespecífica. Pode-se citar três exemplos que apontam esta origem: em plantas do gênero *Coix* (SAPRE &

DESPHANDE, 1987); em peixes (*Poecilia formosa*) (SHARTL et al., 1995) e em insetos (*Nasonia vitripennis*, Hymenoptera) (McALLISTER & WERREN, 1997), (PERFECTTI & WERREN, 2001). Nestes exemplos, a origem se dá por hibridação interespecífica, entretanto, é importante salientar que, mesmo tendo origem por hibridação, estes cromossomos podem ter em sua composição seqüências derivadas de elementos transponíveis, por transferência lateral de DNA, como em *Nasonia vitripennis* (McCALLISTER, 1995) e (McALLISTER & WERREN, 1997).

Em *Partamona helleri* análises sobre a origem dos cromossomos B foram realizadas por BRITO (1998), (BRITO et al. 2005), que caracterizaram citogeneticamente a espécie utilizando as técnicas de banda C, método GTG, banda NOR, coloração com cromomicina A<sub>3</sub> e DAPI; banda Q; e FISH utilizando-se sonda rDNA 18S de milho (*Zea Mays*), concluindo que os cromossomos B de *P. helleri* são heterocromáticos e possuem regiões ricas em AT, o que possibilitou um conhecimento da estrutura molecular desses cromossomos, entretanto, não conseguiram determinar a origem dos cromossomos B de *P. helleri*.

TOSTA (2001), TOSTA et al (2004a) isolaram, clonaram e seqüenciaram parcialmente um marcador RAPD associado aos cromossomos B de *P. helleri*. Devido a inespecificidade e baixa repetibilidade dos marcadores RAPD, TOSTA et al. (2004a) realizaram uma análise de “Southern Blot” utilizando o fragmento clonado como sonda para verificar se ele era realmente homólogo ao marcador RAPD. De maneira interessante, a análise de “Southern” mostrou que a sonda hibridizava não só com o fragmento de DNA original detectado pelo marcador RAPD, mas também com bandas adicionais presentes nos indivíduos com cromossomo B, sugerindo que a seqüência clonada podia ser repetitiva.

O presente trabalho apresentou como objetivo analisar a origem dos cromossomos B de *P. helleri* verificando se a mesma ocorreu intra ou interespecificamente, e se resultou na presença ou não de genes nesses cromossomos. Para se atingir o objetivo foram seguidos os seguintes passos: 1)

seqüenciar completamente o marcador RAPD associado a cromossomos B isolado e clonado por TOSTA et al. (2004a); 2) verificar a homologia da seqüência obtida com regiões presentes em cromossomos B já seqüenciadas em outros organismos, especialmente em insetos; 3) utilizar o marcador RAPD clonado como sonda e, empregando técnicas de genética e citogenética molecular, verificar a homologia do mesmo com o DNA contido nos cromossomos do complemento normal de *P. helleri* e com DNA genômico de outras espécies do gênero *Partamona* e; 4) amplificar o DNA genômico de *P. helleri* e de outras espécies relacionadas usando o marcador SCAR associado a cromossomos B desenvolvido por TOSTA et al. (2004b) como análise complementar àquela realizada no item anterior.

## **3.2. METODOLOGIA**

### **3.2.1 Seqüenciamento**

O marcador RAPD associado a cromossomos B; identificado, isolado e clonado no vetor pGEM-T easy (clone P1) por TOSTA et al. (2004a), foi seqüenciado em ambas direções usando um seqüenciador automático de DNA da Applied Biosystems (Hitachi) modelo 3100 Avant Genetic Analyzer, pelo método da terminação da cadeia com dideoxynucleotídeo (SANGER et al., 1977).

Esta seqüência será registrada no banco de dados NCBI (The National Center for Biotechnology Information of the Government of the United States of America). Análises da seqüência foram feitas utilizando o banco de dados NCBI.

### 3.2.2. Hibridização *in situ* fluorescente

Preparações cromossômicas foram obtidas utilizando a técnica proposta por IMAI et al.(1988) a partir de gânglio cerebral de larvas pós-defecantes coletadas em colônias de *P. helleri* mantidas no Apiário da Universidade Federal de Viçosa (20° 45' LS, 42° 52 LW). Para caracterizar cada larva quanto a presença/ausência de cromossomos B, dez metáfases de cada lâmina foram analisadas com o auxílio de um microscópio óptico Olympus BX-60.

O procedimento de hibridização *in situ* foi realizado de acordo com VIEGAS-PÉQUINOT (1992), com algumas adaptações descritas abaixo. Foram marcadas duas sondas, uma utilizando 1µg de DNA do marcador RAPD clonado (clone P1- TOSTA et al., 2004a) contendo o plasmídeo recombinante pGEM-T easy, e outra utilizando 1 µg do cístron ribossomal de *Drosophila melanogaster* pdm 238 ( rDNA 18S, 5,8S e 28S mais seqüências intergênicas RHOIHA et al. 1981) inserido em um plasmídeo pBR 32. A reação de marcação foi realizada através do Kit de marcação (“Nick-Translation”. KIT BIONICK-GIBCO). Lâminas previamente selecionadas para hibridização foram tratadas com 150 µl de RNase (100 µg/µl) para cada lâmina, cobertas com lamínula de vidro (24x50) e incubadas em câmara úmida a 37° C por uma hora.

Após o tratamento com RNase, as lâminas foram tratadas com três banhos consecutivos de 2X SSC por três minutos cada, a temperatura ambiente. Em seguida foram tratadas com uma série alcoólica em etanol 50%, 75% e absoluto, três minutos cada, a temperatura ambiente. Para desnaturação as lâminas secas foram colocadas em borel contendo solução de formamida 70%, por 2 minutos a 70° C. A sonda adicionada ao meio de hibridização foi colocada a 100° C por 10 minutos para desnaturação; ao mesmo tempo, as lâminas foram passadas da solução de formamida para três banhos consecutivos de 2X SSC gelados, por 2 minutos cada banho e depois tratadas em uma série alcoólica em etanol 50%, 75% e absoluto, dois minutos cada. Após a ebulição, a sonda foi colocada no gelo e centrifugada por 30 segundos a 12000 rpm. As lâminas

retiradas do etanol absoluto foram secas ao ar e, foram adicionados 10 µl de sonda por área de hibridização, cobrindo com lamínula de plástico (24x24). As lâminas foram incubadas “overnight” a 37° C em um recipiente forrado com papel toalha umedecido com a solução de formamida utilizada para a desnaturação. Após um dia e meio, as lâminas foram tratadas com dois banhos de formamida 50% a 37° C, por 2 minutos cada; e depois com dois banhos de 2X SSC, também, a 37° C por 2 minutos cada.

Após a lavagem com sais, se iniciou o processo de detecção da sonda. As lâminas foram tratadas com dois banhos consecutivos de PBT, temperatura ambiente, por 5 minutos cada. Em seguida, foi adicionado às lâminas 100 µl de solução de antibiotina (99,4 µl de PBT:0,6 µl de antibiotina). As lâminas foram cobertas com lamínula de vidro (24x32) e incubadas em placa de petri umedecida com PBT, em estufa a 37° C por 45 minutos. Após incubação, as lâminas foram tratadas com dois banhos consecutivos de PBT, temperatura ambiente, por 5 minutos cada, novamente. Enquanto as lâminas estavam no banho com PBT, a solução de anti-IgG (99 µl de PBT:1 µl de anti-IgG) foi centrifugada, por 5 minutos a 4° C, a 12000 rpm. As lâminas retiradas do banho de PBT foram tratadas com 100µl da solução de anti-IgG, cobertas com lamínula de vidro (24x32) e incubadas em placa de petri umedecida com PBT, em estufa a 37° C por 45 minutos, no escuro. Ao final da incubação, as lâminas foram tratadas com 100µl de solução de iodeto de propídeo (7µg/ml) por 1 minuto e depois lavadas com jatos de PBS, utilizando pipeta Pasteur. Por fim, as lâminas foram tratadas com 13 µl de Vectashield, cobertas com lamínula de vidro seca e limpa e analisadas em microscópio próprio para fluorescência.

### **3.2.3. Material biológico para hibridização genômica “Dot blot” e amplificação com os “primers” SCAR**

Para a obtenção do DNA no intuito de realizar as análises de “Dot blot” e análises utilizando o marcador SCAR foram obtidas amostras de *P. helleri* mantidas no Apiário da Universidade Federal de Viçosa (20° 45’ LS, 42° 52’ LW), de *Partamona cupira* coletadas em Guimarães, Minas Gerais, Brasil, (18° 50’ LS, 46° 47’ LW), de *Partamona criptica* coletadas em Domingos Martinho, Espírito Santo, Brasil (20° 21’ LS, 40° 39’ LW), de *Partamona sp* coletadas em Rio Branco, Acre, Brasil (9° 58’ LS, 67° 48’ LW) e por fim de indivíduos de uma população identificada como *P. helleri* (apesar do hábito de nidificar em ninhos de térmitas) coletadas em Paraopeba, Minas Gerais, Brasil (19° 18’ LS, 44° 25’ LW).

### **3.2.4. Hibridização Genômica “Dot blot”**

Para estas análises o DNA genômico de indivíduos das quatro espécies do gênero *Partamona*; *Partamona sp*, *P. criptica*, *P. cupira* e *P. helleri*, foi extraído de acordo com o protocolo de WALDSCHMIDT et al. (1997). O DNA de *P. helleri* foi previamente caracterizado quanto à presença/ausência de cromossomos B usando marcadores SCAR desenvolvidos por TOSTA et al. (2004b). A desnaturação do DNA genômico foi feita tratando 1µg do DNA extraído, com soluções de NaOH 5N por 10 min e acetato de amônio 5N por 10 min.

Para a preparação da sonda se obteve o DNA plasmidial do plasmídeo pGEM – T easy contendo o marcador RAPD clonado por TOSTA et al. (2004a). A extração plasmidial foi feita utilizando-se o QIA prep Spin Miniprep (Qiagen, Cat. No. 27106). O DNA plasmidial então foi amplificado

com os marcadores SCAR obtidos por TOSTA et al. (2004b) e o fragmento gerado foi cortado e purificado do gel de agarose usando o QIAGEN KIT (Qiagen, Cat. No. 24106) de acordo com as instruções do fabricante. O fragmento purificado isolado do plasmídeo foi então marcado com flúor-12-dUTP (Amersham Biosciences) de acordo com as instruções do fabricante.

O DNA genômico (5µl) desnaturado foi aplicado a uma membrana de náilon (Stratagene). Reações de pré-hibridização e hibridização foram feitas a 65°C em 5 x SSC (0.06 M citrato de sódio , 0.6M NaCl), 0.1% SDS, 5% dextran sulfato e agente de bloqueio (Amersham Biosciences). Para a hibridização foi usada a sonda previamente marcada. Após a hibridização, a membrana foi lavada com 1x SSC, 0.1% SDS por 15 min at 60°C e em 0.5x SSC, 0.1% SDS for 15 min at 65°C. Marcas na membrana foram detectadas utilizando ‘CPD-Star™ detection system’ (Amersham Biosciences). A membrana foi exposta a filme de raios-X a temperatura ambiente por 20 min.

### **3.2.5. PCR (Polymerase Chain Reaction) utilizando os “primers” SCAR**

Os “primers” SCAR desenvolvidos por TOSTA et al. (2004b) foram testados em indivíduos de *P. helleri* (com e sem cromossomos B), *Partamona sp*, *P. criptica* e *P. cupira*, além de indivíduos de uma colônia de Paraobepa que apesar de nidificarem em termiteiros foram identificados como *P. helleri*. Para estas análises a extração do DNA foi feita de acordo com o protocolo de WALDSCHMIDT et al. (1997) e amplificado por uma reação de polimerase em cadeia (PCR). Cada reação (25 µl) continha 25ng de DNA, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM Tris-KCl, 4mM de cada um dos “primers” SCAR, 2mM dNTPs, e 1U de *Taq* DNA polimerase. As amplificações de PCR consistiram de 40 ciclos de 30 s a 94 °C para desnaturação do DNA, 1 min a 55 °C para anelamento dos “primers”, e 1 min e 30 s a 72 °C para alongamento. Um passo final, de extensão,

a 72 °C por 7 min foi realizado após os 40 ciclos. Os produtos SCAR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,2%, corados com brometo de etídio e visualizados e fotografado sob luz ultravioleta.

### **3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.3.1. Análises da origem molecular dos cromossomos B de *Partamona helleri* a partir da seqüência obtida.**

A seqüência do marcador RAPD associado a cromossomos B clonado (TOSTA et al. 2004a) foi completamente obtida (fig. 1). Como esperado, a seqüência inicia pelos nucleotídeos que compõem o primer “OPK-14” (OPERON-TECHNOLOGIES) utilizado para sua obtenção, e apresenta cerca de 66% de Adenina e Timina, corroborando os dados obtidos por BRITO (1998) em análises citogenéticas com o uso de fluorocromos que apontavam ser os cromossomos B de *P. helleri* ricos em AT.

Essa seqüência não apresentou nenhuma homologia significativa com outras seqüências, nem mesmo com outros cromossomos B ou com elementos transponíveis, em análises de “megablast” e “descontiguous blast” utilizando o banco de dados genéticos “NCBI” (sistema BLASTN 2.2.12, ALTSCHUL et al. 1997). Mesmo quando comparada isoladamente ao genoma de outros Arthropodas por “Megablast”, ou em análises comparativas diretas com genoma de outros insetos como *Apis mellifera*, *Nasonia vitripennis* e *Drosophila melanogaster* por “descontiguous blast” nenhuma homologia significativa foi encontrada.

A seqüência também não apresentou nenhuma homologia significativa quando comparada ao genoma de parasitas genômico como *Wolbachia*, parasita de *Drosophila melanogaster*; e em comparações diretas da seqüência obtida com seqüências de cromossomos B de insetos já conhecidas;

seja em vespas (*Nasonia vitripennis*) clones X64904, X64905 e X64906 (EICKBUSH et al., 1992) seja em gafanhotos (*Eyprepocnemis plorans*) clone de número X75637 (LÓPEZ-LEÓN et al., 1995) utilizando o mesmo banco de dados genéticos.

```

5' - CCCGCTACACATATAATTAAAGTATAACGGTTTCTAATAG 40
  ATCTCTTTTCCCCAAAAGTAATTATGAAGAGTAACAGAAT 80
  TGTAGAAGAAAAATAATTTGGAGTACTGAATAATTTGAG 120
  CTGCCAGTGTGAAAGATAGGATTGAATCCAATCATATATG 160
  AAATCACAGTGAAGGAGAGAGAAAAGAGACCGATCCTATA 200
  TGATATAGATGATATAGATGATATAGATAATCAAAATTAA 240
  CAATTA AACATTAACGAATCGATTGAATCAGCTAGCAGA 280
  AGCTGAATAATTAATGAAAGGGCAAGATACGAGCAGACA 320
  GAACAACAACGATGACTACAGTCGAGCAAGTCAAATACAG 360
  TTGAATATTTTATCTGAGTCACTCATTGTCATTCAATCTT 400

  CCTAACTGCTGTTTATTACCACTCACATATACATTCATTA 440
  ATGTATGAAAATTTGTAAAGATATCCAGACCGTCCTGGAA 480
  AAGTATGATCATGGAAGGTACATAAGTACTGGCCATACCA 520
  CAAATCTGACAAGTAGGTGCTCGTATACATATCCGTCGGT 560
  TATGTACATGTGTATTTAATTTAATTTTTTTCGTTTCAGAA 600
  AATATAACCAATCCTGTCAGTCAATCTTTTTTAACCATTGAT 640
  TATTTCTTCTCTTTTACAGCAACTCTCCTATATTTAAATT 680
  CAGTTAAACTGCGCTTACAGATATTCTCAATGTAATATC 720
  GGTTTATATTGCGACCGTTAAAGACAACAAGTACCGCCTG 760
  CATAGATGGCTGTATAGGTGTTTCGAGAAGTTGGAATGTC 800
  GTTGATGTACAATATGAAGAGAAGCGGAGCAAGTATGGAT 840
  CCTTCTAGTACCTCTGTTATAAGGTTTCTTTATGATTGAT 880
  GTGTGACTATTTAGAATATCTCGTGCAGACCTAGAATTC 920
  CTGTTTTAACTGATGATTTTATTGATGTATGTAGGCGGTA 960
  TATTTATTTACCGCAATTTAGTTAGAAAGACATTGTGCCA 1000
  GACGTAGGTTTTTTTTATAGGTTTCAGGAAGATGAGATGTG 1040
  TTAGTCAGATCTGTTATTTTTTATTACAGTGC GTTCTGTG 1080
  AAAC TTTATAATTGCTGAGTGCATGAGTTTAGATCTGAAT 1120
  TGTGGCGAGACTATTATTCTGGAGTACTTAGTTGGATGA 1160
  GAAAGTGAACGTGGATGATTTTAACTACTTTTCCTAGGAT 1200
  GTCTAGTAGGCTAATTGATTTGTAATTGGAAACAGATATT 1240
  GGTATTGGACTTATGGGTATTCTTGGCTTTGGTATTGAAC 1280
  TTATTTTTGCTTCTTTCCAAGCTGCGGGAAAGTATGAAAG 1320
  TTTCAGATGGGTTTTGAATATGTATAAAATTTGCACAATG 1360
  GGTTTCGGATGGAAGCATTTTAATCTGTGGCTGTGATTTTG 1400
  TCCACGTGCTTAATGAAGAGATTCTTGATTATGTCTCTTA 1440
  TCATTTATGGAGTGCAGTTTGGGATATTTTAGGGGTGTAGC 1480
GGG-3' 1483

```

**Figura 1** – Sequência do marcador RAPD associado a cromossomos B clonado (clone P1 - TOSTA et al. 2004a). Em vermelho, nucleotídeos que compõem o primer “OPK-14” utilizado para obtenção da seqüência. Em verde, nucleotídeos complementares ao primer “OPK-14” na extremidade oposta.

Uma última análise comparativa com o banco de dados genéticos NCBI, realizada no intuito de analisar a possibilidade de uma determinada proteína ser codificada pela seqüência obtida, não encontrou nenhuma proteína conhecida possível de ser codificada por tal seqüência, o que leva a acreditar ser esta uma seqüência não codificadora.

Esses resultados apontam para a possibilidade dessa seqüência ser uma seqüência específica dos cromossomos B de *P. helleri*, não codificadora e, completados conforme dados de TOSTA et al (2004a) repetitiva.

LEACH et al. (2004) afirmam que a maioria das seqüências específicas de cromossomos B encontradas até hoje, estão presentes pelo menos em um número pequeno de cópias nos cromossomos do complemento normal A das mesmas e, que é mais plausível que estas seqüências sejam amplificadas nos cromossomos B, e não específicas dos mesmos.

Porém, uma exceção para esta regra pode ser encontrada em um estudo detalhado utilizando AFLP (amplified length polymorfism analyses) e FISH (fluorescence *in situ* hybridization) no peixe ciprinídeo *Alburnus alburnus* o qual apresenta um dos maiores cromossomos B dentre os vertebrados. Nesse estudo (ZIEGLER et al 2003) mostram que os cromossomos B de dessa espécie contêm seqüências específicas com forte homologia com o retrotransposon de *Drosophila* Gypsy/Ty3. A seqüência é muito abundante nos cromossomos B mais não detectável nos cromossomos do complemento normal A, nem em cromossomos B da espécie *Rutilus rutilus* filogeneticamente relacionada a *Alburnus alburnus*; sugerindo que esse cromossomo B haja evoluído de forma independentemente dos cromossomos A. Da mesma forma é possível que os cromossomos B de *P. helleri* também tenham evoluído independentemente dos cromossomos do complemento normal.

### 3.3.2. Análises da origem molecular dos cromossomos B de *Partamona helleri* por Hibridização *in situ* fluorescente

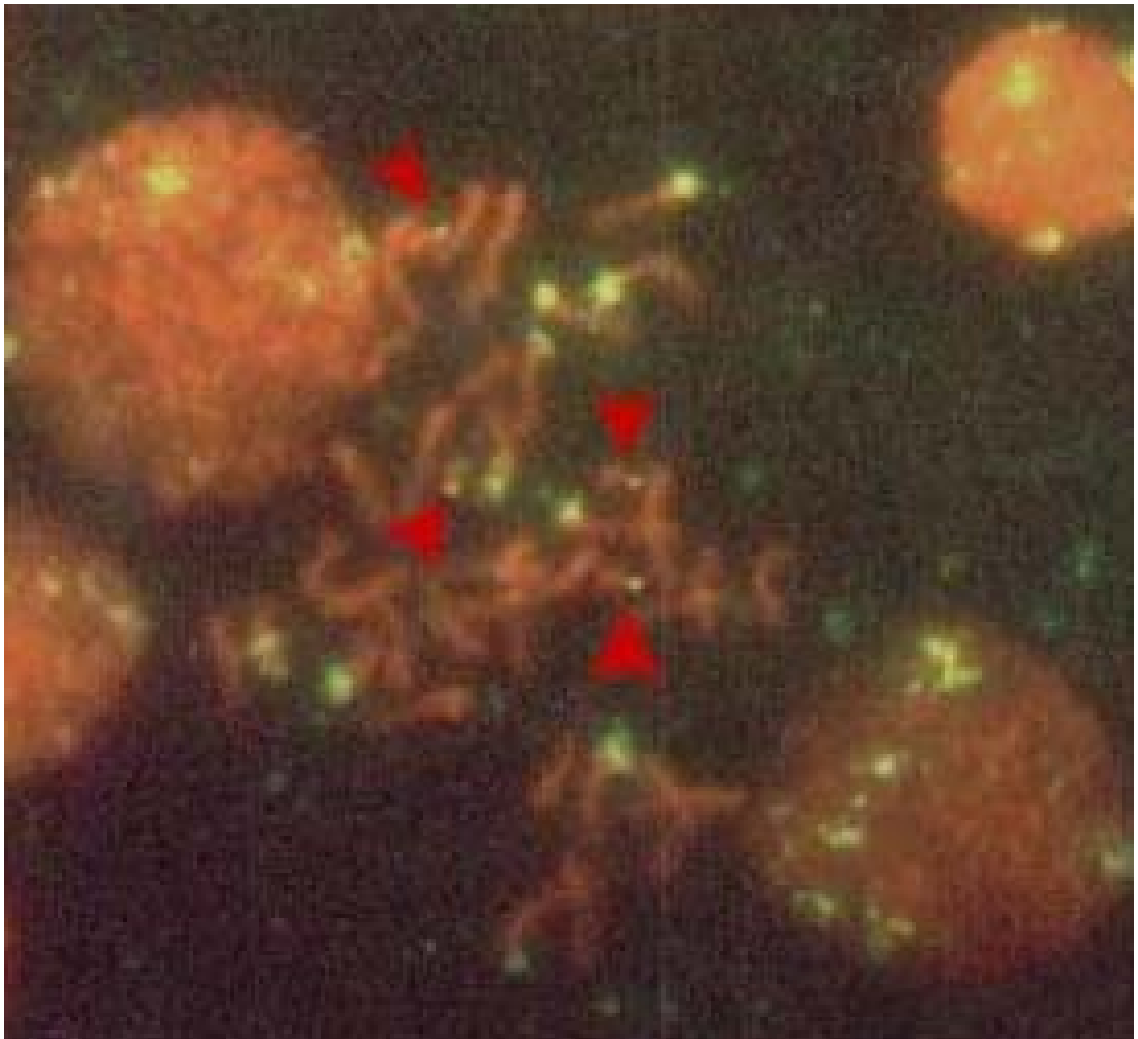
Utilizando a seqüência específica dos cromossomos B de *P. helleri* como sonda não foi possível detectar sinal algum de hibridização em duas tentativas de hibridização *in situ* fluorescente desta sonda com indivíduos de *P. helleri* que apresentavam cromossomos B: uma utilizando o protocolo de VIEGAS-PÉQUINOT (1992) com pequenas modificações (detalhado anteriormente) e outra utilizando um protocolo descrito por LÓPEZ-LÉON et al. (1994). Provavelmente, a seqüência isolada de cromossomos B deve apresentar baixa repetibilidade, por isso não se conseguiu obter sucesso nas hibridizações, pois mesmo que os sinais de hibridização ocorressem seriam muito fracos para serem detectados.

Por outro lado, sinais de hibridização foram detectados nos cromossomos B utilizando um cístron ribossomal de *Drosophila melanogaster* pdm 238 (rRNA 18S, 5,8S e 28S mais seqüências intergênicas, RHOIHA et al. 1981) inserido em um plasmídeo pBR 32. (fig. 2) podendo se afirmar que os cromossomos B de *P. helleri* apresentam genes de rRNA.

Genes de rRNA, segundo LEACH et al. (2004), são encontrados em cromossomos B de mais de vinte espécies como os que codificam rRNA em plantas, *Brachycome dichrosomatica* (DONALD et al., 1995) e *Crepis capillaris* (JAMILENA et al., 1994). Segundo CAMACHO et al. (2000) esses genes que codificam rRNA e existem aos “clusters” podem ser visualizados como constrições secundárias (regiões organizadoras de nucléolo ou NOR) em cromossomos metafásicos, e podem fornecer conclusões interessantes sobre a origem e evolução dos cromossomos B.

A presença de genes de rRNA em cromossomos B pode indicar a origem dos cromossomos B como evidenciado por (LEACH et al. 2004) em plantas *Brachycome dichromosomatica* onde a presença de genes de rRNA específicos nos cromossomos B permitiram sugerir a origem dos Bs como quebra de cromossomos do complemento autossômico, ou como evidenciado por

LÓPEZ-LÉON et al. (1994) mostrando a origem de cromossomos B em gafanhotos *Eyprepocnemis plorans* a partir de cromossomos sexuais não heteromórficos (sistema XX/XO) através da análise de “clusters” de genes de rRNA presentes nos cromossomos B desses gafanhotos. Estudos mais detalhados considerando a presença dos genes de rRNA em *P. helleri* talvez possam dar mais luz sobre a origem e evolução dos Bs nessa espécie.

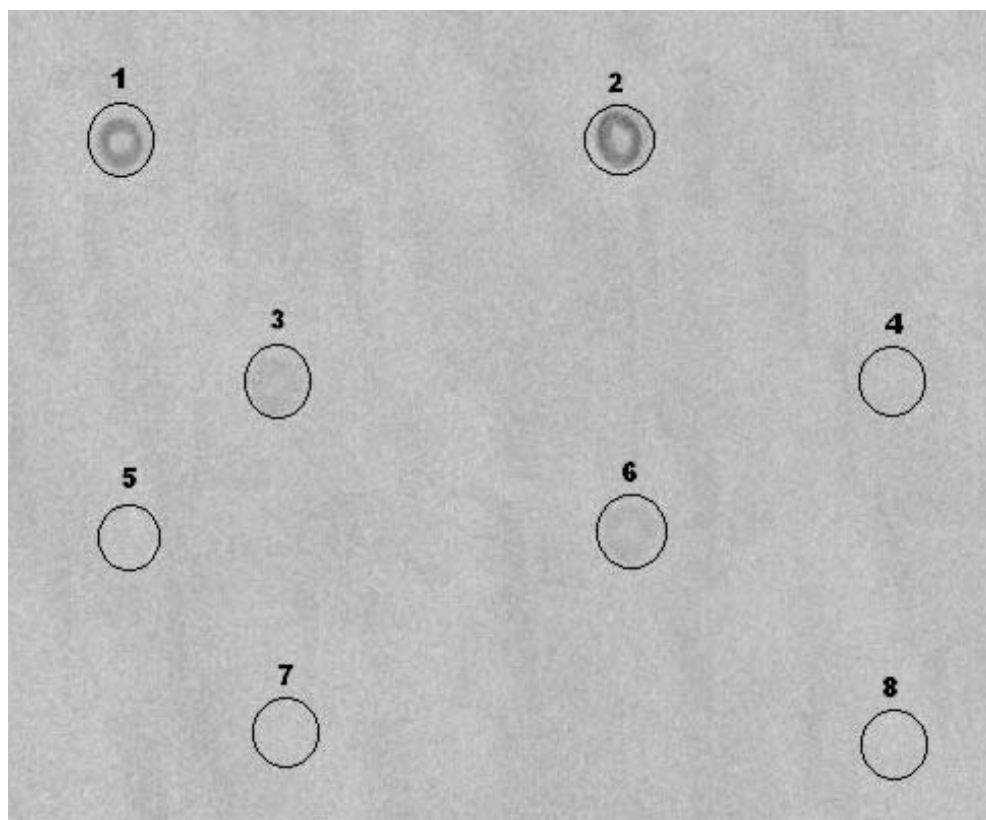


**Figura 2** – Metáfase mitótica de célula ganglionar obtida de larva pós-defecante de *P. helleri* apresentando  $2n=38$ , com quatro cromossomos B (setas vermelhas) com sinal de hibridização com a sonda obtida a partir do cístron ribossomal de *Drosophila melanogaster* pdm 238 (rRNA 18S, 5,8S e 28S mais seqüências intergênicas, RHOIHA et al. 1981) inserido em um plasmídeo pBR 32.

No entanto, os presentes resultados não possibilitaram afirmar com maior clareza a origem dos cromossomos B de *P. helleri* através da técnica de hibridização *in situ* fluorescente. Esse fato levou a se buscar alternativas para esclarecer tal origem. Sendo assim, decidiu-se por realizar uma hibridização genômica “dot blot”, utilizando a seqüência obtida como sonda para hibridizações com DNA genômico total de indivíduos de *P. helleri* (com e sem cromossomos B), bem como com indivíduos de outras espécies do gênero *Partamona*.

### **3.3.3. Análises da origem molecular dos cromossomos B de *Partamona helleri* por Hibridização genômica “Dot blot” e uso do marcador SCAR.**

A seqüência específica de cromossomos B de *P. helleri*, utilizada como sonda, foi hibridizada com sucesso com DNA genômico total de indivíduos de *P. helleri* com cromossomos B, de indivíduos de *P. cupira* e de indivíduos de *P. criptica* em uma hibridização genômica “Dot blot”. No mesmo experimento, a sonda não hibridizou com DNA genômico total de indivíduos de *P. helleri* sem cromossomos B, indivíduos de *P. helleri* de uma população que nidifica em termiteiros, nem com indivíduos de *Partamona sp.* originários da região amazônica brasileira (fig. 3).



**Figura 3** - “Dot blot” onde se utilizou como sonda a seqüência específica dos cromossomos B de *Partamona helleri*. Amostras de DNA genômico total de operárias das seguintes espécies foram utilizadas no experimento: as amostras 1 e 2 são de *P. helleri* com cromossomos B, enquanto as amostras 7 e 8 são da mesma espécie sem cromossomos B; a amostra 3 é de *Partamona Cupira*; a amostra 4 é de *P. helleri* que nidifica em ninhos de térmita; a amostra 5 é de de operárias de *Partamona sp.*, da região amazônica brasileira; por fim a amostra 6 é de *Partamona criptica*. É possível visualizar a hibridização da sonda com as amostras 1 e 2 de operárias de *P. helleri* com cromossomos B(bem forte), com a amostra 3 (*P. cupira*) e com a amostra 6 (*P. criptica*) (mais fraco).

Em uma eletroforese do DNA amplificado por PCR com os “primers” SCAR, o marcador SCAR desenvolvido por TOSTA et al (2004b) associado a cromossomos B foi visualizado em indivíduos de *P. helleri* com cromossomos B, de indivíduos de *P. cupira* e de indivíduos de *P. criptica*. Na mesma eletroforese não se encontrou o marcador SCAR em indivíduos de *P. helleri* sem cromossomos B, indivíduos de *P. helleri* de uma população que nidifica em termiteiros, nem com indivíduos de *Partamona sp.* originários da região amazônica brasileira (fig. 4). Os resultados obtidos utilizando o marcador SCAR coincidem e corroboram os resultados obtidos no “dot blot”.

A)

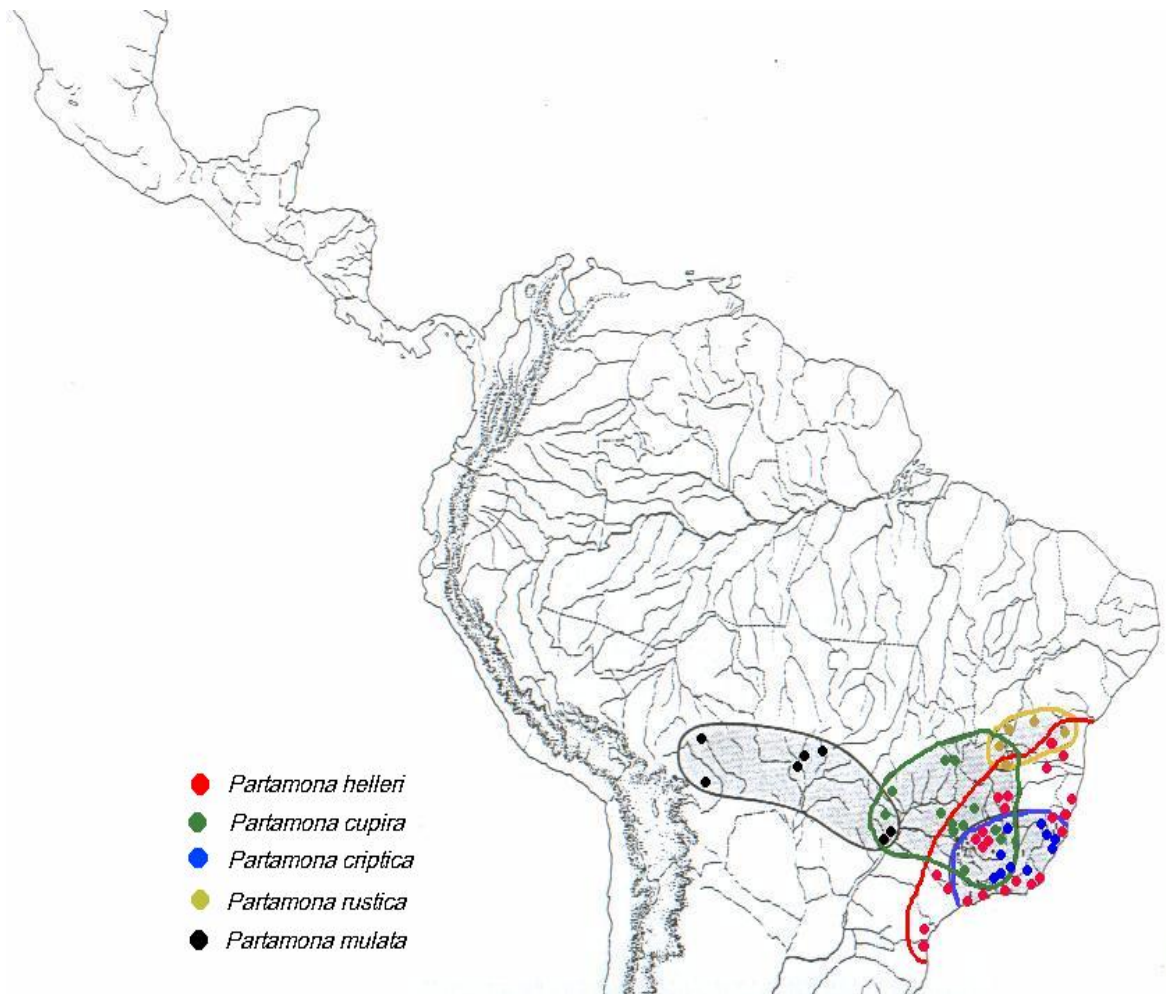


B)



**Figura 4** – Nas duas partes da figura (**A e B**), a amostra 1 é de DNA genômico de operárias de *P. helleri* com cromossomos B, enquanto que a amostra 2 é de DNA genômico de operárias de *P. helleri* sem cromossomos B evidenciando a presença da banda marcadora somente nas amostras de indivíduos com cromossomos B. Na parte **A** da figura, as amostras 3, 4 e 5 são de operárias de *Partamona sp.*, típicas da região amazônica brasileira, enquanto que as amostras 6, 7 e 8 são de operárias de *P. helleri* que nidifica em ninhos de térmitas. Na parte **B** da figura, as amostras 3,4 e 5 são de operárias de *P. cupira*, enquanto que as amostras 6, 7 e 8 são de operárias de *P. criptica*.

Esses resultados indicam que os cromossomos B de *P. helleri* evoluíram independentemente dos cromossomos do complemento normal A, podendo ter sido originados por hibridização interespecífica. Essa possibilidade é reiterada pelo fato de *P. helleri*, *P. cupira* e *P. criptica* serem espécies que tem uma origem filogenética comum, sendo abrigadas em um grupo denominado Cupira dentro do gênero *Partamona*. No grupo cupira, que abriga sete espécies, as espécies *P. helleri*, *P. cupira*, *P. criptica*, *P. rustica* e *P. mulata* (fig. 5) são ditas como tendo origem monofiléticas, compondo um clado comum, totalmente a parte das outras duas espécies do grupo *Partamona ailyae* e *Partamona sooretamae* (PEDRO, 1998).



**Figura 5** – Distribuição geográfica das cinco espécies do gênero *Partamona* que formam um clado monofilético segundo PEDRO (1998).

Estudos citogenéticos detalhados, de *P. cupira*, *P. criptica* e *P. rustica* são necessários para compreender melhor como a seqüência específica de cromossomos B de *P. helleri* se encontra no genoma destas espécies, se ela esta presente em cromossomos do complemento normal A ou se estas espécies também apresentam cromossomos B. COSTA et al. (1992), BRITO et al. (1997), BRITO-RIBON et al. (1999), MARTINS et al. (2005) caracterizaram citogeneticamente um total de sete espécies do gênero *Partamona*: *P. helleri*, *P. sp. aff. nigrior*, *P. vicina*, *P. ayaleae*, *P. mulata*, *P. rustica* e *P. sp. n.*. Até recentemente, só a espécie *P. helleri* após caracterização citogenética havia apresentado indivíduos com cromossomos B, entretanto, MARTINS et al. (2005) encontraram um grande cromossomo B, também, em *P. rustica*.

Os dados de MARTINS et al. (2005) mostrando a presença de cromossomos B em *Partamona rustica*, reforçam a idéia de que cromossomos B possam existir também em *P. criptica* e *P. cupira*, reiterando a idéia de hibridização interespecífica. Contudo, não se pode esquecer, como afirmam (McCALLISTER, 1995) e (McCALLISTER & WERREN, 1997) que o fato dos cromossomos B ter origem interespecífica não afasta a idéia dos mesmos apresentarem seqüências de elementos transponíveis, como ocorre em *Nasonia vitripennis*, e isto também pode ter ocorrido com os cromossomos B de *P. helleri*, que podem ter se originado por algum processo de transferência lateral de DNA.

### 3.3.4 Conclusões

O conjunto de resultados do presente trabalho permite afirmar que os cromossomos B de *Partamona helleri* se originaram de uma forma independente em relação aos cromossomos do complemento normal A da espécie. Em conjunto com os dados de MARTINS et al. (2005) permite afirmar também que o processo que resultou na origem desses cromossomos B possivelmente ocorreu dentro de um contexto evolutivo do gênero *Partamona*, provavelmente no contexto evolutivo de um clado monofilético dentro desse gênero no qual se encontram, além de *P. helleri*, as espécies *P. criptica*, *P. cupira*, *P. rústica* e *P. mulata*. Por fim, pode se afirmar ser plausível que estes cromossomos tenham sido originários de processos de hibridização interespecífica, mas não fica descartada a possibilidade de elementos transponíveis serem os verdadeiros responsáveis, ou no mínimo co-autores do processo. Estudos de citogenética detalhados das espécies, que em conjunto com *P. helleri* compõem o clado monofilético dentro do gênero *Partamona*, são extremamente necessários para se ter maior clareza sobre a origem desses cromossomos B.

## AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com o apoio do CNPq, uma entidade do Governo Brasileiro voltada ao desempenho científico e tecnológico, contou também com o auxílio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Ministério do Meio Ambiente (MMA); a todos esses órgãos de fomento a nossa gratidão. Somos gratos também ao Dr. Fernando Amaral da Silveira pela identificação dos exemplares de *Partamona Cupira*, ao Dr. Eldér Morato pela obtenção das amostras de *Partamona sp.* e ao Dr. Rui Carlos Peruquetti pela obtenção das amostras de *Partamona criptica*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTSHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHÄFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLEE, W., LIPMAN, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acid Research**. **25**, 3389-3402.
- BEUKEBOOM, L. W. (1994) Bewildering Bs: an impression of the 1 st B-Chromosome conference. **Heredity**. **73**, 328-336.
- BRITO, R. M., COSTA, M. A., POMPOLO, S. G. (1997) Characterization and distribution of supernumerary chromosomes in 23 colonies of *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Brazilian Journal of Genetics**. **20**, 185-188.

- BRITO, R. M. (1998) **Caracterização citogenética de duas espécies do gênero *Partamona* schwarz, 1939 (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae)**. Viçosa: UFV, 1998. 97p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa.
- BRITO-RIBON, M., MIYAZAWA, C. S., POMPOLO, S. G. (1999) First karyotype characterization of four species of *Partamona* (Fries, 1980) (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) in Mato Grosso State, Brazil. **Cytobios.** **100**, 19-26.
- CAMACHO, J. P. M., SHARBEL, T. F., BEUKEBOOM, L. W. (2000) B-chromosome evolution. **Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.** **355**, 163-178.
- COSTA, M. A., POMPOLO, S. G., CAMPOS, L. A. O. (1992) Supernumerary chromosomes in *Partamona cupira* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Revista Brasileira de Genética.** **15**, 801-806.
- DONALD, T. M., LEACH, C. R., CLOUGH, A., TIMMIS, J. N. (1995) Ribosomal RNA genes and the B chromosome of *Brachycome dichromosomatica*. **Heredity.** **74**, 556-561.
- EICKBUSH, D. G., EICKBUSH, T. H., WERREN, J. H. (1992) Molecular characterization of repetitive DNA sequences from a B chromosome. **Chromosoma.** **101**, 575-583.
- HOUBEN, A., THOMPSON, N., AHNE, R., LEACH, C. R., VERLIN, D., TIMMIS, J. N. (1999) A monophyletic origin of the B chromosomes of *Brachycome dichromosomatica* (Asteraceae). **Plant Systematics and Evolution**, **219**. 127-135.

- JAMILENA, M., REJÓN, M. R., REJÓN, C. R. (1994) A molecular analysis of the origin of the *Crepis capillaries* B chromosome. **Journal of Cell Science**. **107**, 703-708.
- LÓPEZ-LEÓN, M. D., NEVES, N., SCHWARZACHER, T., HESLOP-HARRISON, T. S., HEWITT, G. M., CAMACHO, J. P. M. (1994) Possible origin of a B chromosome deduced from its DNA composition using double FISH technique. **Chromosome Research**. **2**, 87-92.
- LÓPEZ-LEÓN, M. D., VÁZQUEZ, P., HEWITT, G. M., CAMACHO, J. P. M. (1995) Cloning and sequence analysis of an extremely homogeneous tandemly repeated DNA in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **Heredity**. **75**, 370-375.
- MARTINS, C. C. C., DUARTE, O. M. P., SANTANA, S. E. A., DOMINGUES, A. M. T., COSTA, M. A., ALVES, R. N. O., SILVA-JÚNIOR, J. C., WALDSCHMIDT, A. M. Caracterização citogenética da abelha sem ferrão *Partamona rústica* (PEDRO & CAMARGO, 2003 Hymenoptera, Apidae). **Genetic and Molecular Biology**. Resumos do 51º Congresso Brasileiro de Genética, Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil.
- LEACH, C. R., Houben, A., Timmis, J. N. (2004) The B chromosomes in *Brachycome*. **Cytogenetic and Genome Research**. **106**, 199-209.
- McALLISTER, B.F. (1995) Isolation and characterization of a retroelement from B chromosome (PSR) in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. **Insect Molecular Biology**, **4**, 253-262.
- McALLISTER, B.F., WERREN, J.H. (1997) Hybrid origin of a B chromosome (PSR) in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. **Chromosoma**. **106**, 243-253.

- PEDRO, S. R. de M. (1998) **Meliponini neotropicais: o gênero *Partamona schwarz*, 1939 (Hymenoptera, Apidae) taxonomia e biogeografia.** Ribeirão Preto: FFCLRP, 1998. 219 p. Tese (Doutoramento em Ciências, área: Entomologia). Universidade de São Paulo, USP.
- PERFECTTI, F. & WERREN, J. H. (2001) The interespecific origin of B chromosomes: experimental evidence. **Evolution.** **55**, 1069-1073.
- SAPRE, A. B. & DESPHANDE, D. S. (1987) Origin of B chromosomes in *Coix* L. through spontaneous interespecific hybridization. **Journal of Heredity.** **78**, 191-196.
- SHARBEL, T. F., GREEN, D. M., HOUBEN, A. (1998) B-chromosome origin in the endemic New Zealand frog *Leiopelma hochstetteri* through sex chromosome devolution. **Genome.** **41**, 14-22.
- SHARTL, M., NANDA, I., SCHLUPP, I., WILDE, B., EPPLIN, J. T., SCHMIDT, M., PARZEFALL, J. (1995) Incorporation of subgenomic amounts of DNA as compensation for mutational load in a gynogenetic fish. **Nature.** **373**, 68-71.
- TOSTA, V. C. (2001) **Marcador Molecular associado a cromossomos B em *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae).** Viçosa: UFV, 2001. 55p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa.
- TOSTA, V. C., FERNANDES-SALOMÃO, T. M., TAVARES, M. G., POMPOLO, S. G., BARROS E. G., CAMPOS, L. A. O. (2004a) A RAPD marker associated with B chromosomes in *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae). **Cytogenetic and Genome Research.** **106**, 279-283.

- TOSTA, V. C. (2004b), FERNANDES-SALOMÃO, T. M., TAVARES, M. G., POMPOLO, S. G., BARROS, E. G., CAMPOS, L. A. O. Use of SCAR marker to study B chromosomes in natural populations of *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae). **Annals of second B chromosome conference**. Bubión, Granada, Spain. pág. 38.
- SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Science USA**. **74**, 5463-5467.
- WALDSCHMIDT, A. M., SALOMÃO, T. M. F., BARROS, E. G., CAMPOS, L. A. O. (1997) Extraction of genomic DNA from *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). **Brazilian Journal of Genetics**. **20**, 421-423.
- WILSON, E. B. (1907) The supernumerary chromosomes of Hemiptera. **Science**. **26**, 870-871.
- ZIEGLER, C. G., LAMATSCH, D. K., STEINLEIN, C., ENGEL, W., SCARTL, M., SCHMID, M. (2003) The giant B chromosome of the cyprinid fish *Alburnus alburnus* harbors a retrotransposon – derived repetitive DNA sequence. **Chromosome Research**. **11**, 23-35.

### 4-Capítulo 3

**Análise dos possíveis efeitos fenotípicos dos cromossomos B em *Partamona helleri* (HYMENOPTERA, APIDAE).**  
**Tosta, V. C.,<sup>a</sup> Perfectti, F.,<sup>b</sup> Tavares, M. G.,<sup>a</sup> Cruz, C. D.,<sup>a</sup> Campos, L. A. O.,<sup>a</sup>  
e Camacho, J. P. M.<sup>b</sup>**

<sup>a</sup> *Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG (Brasil);* <sup>b</sup> *Departamento de Genética, Universidad de Granada, Granada,(Espanña).*

## EXTRATO

O presente trabalho não apontou efeito dos cromossomos B na assimetria dos indivíduos de *Partamona helleri*, quando analisado o caráter asa anterior. Isso foi facilmente notado em uma análise de variância, pelos altos valores de  $p$  obtidos para os efeitos da Presença/Ausência de Bs na assimetria. Assim, pode-se concluir que indivíduos que apresentam cromossomos B não são mais assimétricos do que os indivíduos que não possuem tais cromossomos em *P. helleri* considerando o caráter asa anterior. Nas análises de variância dos efeitos dos cromossomos B sobre a assimetria dos indivíduos, pode-se observar um valor de  $p$  significativo para os efeitos de lado. Esse fato indica um padrão de assimetria direcional e permite dizer que em *P. helleri* as asas direitas são significativamente maiores que as esquerdas. Um teste estatístico simples como o teste T evidenciou com mais clareza este fato. Esse é um dado novo na literatura e merece averiguação para se identificar possíveis causas para esse padrão de simetria em *P. helleri*. Análises de outros caracteres morfológicos externos de *P. helleri*; bem como estudos que meçam efeitos fenotípicos internos (fisiológicos) dos cromossomos B, efeitos fenotípicos na prole ou que verifiquem a expressão diferencial de alguns genes em indivíduos com e sem B de *P. helleri* são necessários para que se possa concluir com mais clareza se esses cromossomos afetam ou não o “fitness” dos indivíduos e populações dessa espécie.

## 4.1. INTRODUÇÃO

Cromossomos B são supranumerários dispensáveis que não se recombinam com cromossomos do complemento normal A e apresentam um modo de herança irregular e não mendeliano (JONES, 1995).

Segundo CAMACHO et al. (2000), os cromossomos B apresentam vários efeitos nos indivíduos que os carregam. Contrastando com o que se acreditava antigamente, esses cromossomos apresentam genes que podem ser expressos, como os genes de rRNA, e os efeitos dos cromossomos B no “fitness” dos organismos, muitas vezes, estão relacionados aos produtos desses genes. Uma prova disto foi a identificação de um gene, da família dos citocromos P-450 (*Pda*), em cromossomo B do fungo patogênico *Nectria haematococa* parasita de ervilha por MIAO et al. (1991). Este gene é responsável pela desintoxicação da fitoalexina pisantina um composto antimicrobiano produzido pela ervilha (*Pisum sativum*), que é nocivo ao fungo. Assim, eles mostraram não só que o cromossomo B pode ter genes funcionais, como estes genes podem influenciar no “fitness” dos indivíduos, pois os fungos que apresentam tais cromossomos são resistentes a ação da fitoalexina.

Além dos efeitos diretamente relacionados aos genes, principalmente aos de rRNA, CAMACHO et al. (2000), afirmam que existem muitas evidências que os cromossomos B, indiretamente, podem afetar um vasto número de processos celulares e fisiológicos, tanto em plantas quanto em animais. Porém, estes autores ressaltam que os efeitos dos cromossomos B raramente se manifestam no fenótipo externo, como por exemplo em *Allium schoenoprasum*, espécie onde plantas que possuem cromossomos B, apresentam em condição de “stress hídrico”, vantagem, pois necessitam de menos água para germinar do que as plantas sem estes cromossomos (PLOWMAN & BOUGORD, 1994).

Outros exemplos desta manifestação dos cromossomos B no fenótipo externo podem ser encontrados na espécie de Diptera *Chironomus plomosus*, onde os indivíduos que apresentam cromossomos B são mais

adaptados a condições de poluição extrema (MICHAILOVA & METTINEN, 2000) ou, na planária hermafrodita *Polycelis nigra* na qual indivíduos com cromossomos B produzem uma menor quantidade de descendentes e, o desenvolvimento de formas juvenis, filhas de pais com cromossomos B, é retardado (BEUKEBOOM et al., 1998).

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

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

Em *P. helleri* IRSIGLER et al. (2000) fizeram um estudo preliminar se utilizando da técnica de assimetria flutuante, que apontou a possibilidade de indivíduos que possuíam cromossomos B serem mais assimétricos que os indivíduos sem tais cromossomos. No entanto, esses autores não consideraram o erro de medida introduzido pelo medidor, além de analisarem uma amostragem pequena. Segundo (MOLLER & SWADDLE, 1997), a assimetria pode refletir uma instabilidade de desenvolvimento, assim, o fato dos indivíduos com cromossomos B serem mais assimétricos indicaria uma redução no “fitness” destes indivíduos.

Tomando como referência indicações de IRSIGLER et. al (2000), o presente trabalho teve como objetivo analisar a assimetria flutuante em asas de *P. helleri* no intuito de verificar se os cromossomos B alteram o “fitness” dos indivíduos, que os apresentam.

## 4.2. METODOLOGIA

### 4.2.1- Material Biológico

Foram analisados 10 indivíduos de 23 diferentes colônias de *P. helleri*, coletadas em Viçosa (20° 45'S, 42° 52'W), São Miguel do Anta (20° 41'S, 42° 43'W), Piranga (20° 40'S, 43° 17'W), Rio Vermelho (18° 18'S, 43° 00'W), Esmeralda (19° 45'S 44° 19'W), Betim (19° 58'S, 44° 13'W), Belo Horizonte (19° 55'S, 43° 55'W), Santa Teresa (19° 55'S, 40° 36'W) e São Carlos (22° 01'S, 47° 53'W). As asas de cada indivíduo eram retiradas previamente e o resto do corpo era utilizado para extração de DNA.

### 4.2.2- Caracterização dos indivíduos quanto a presença/ausência de cromossomos B

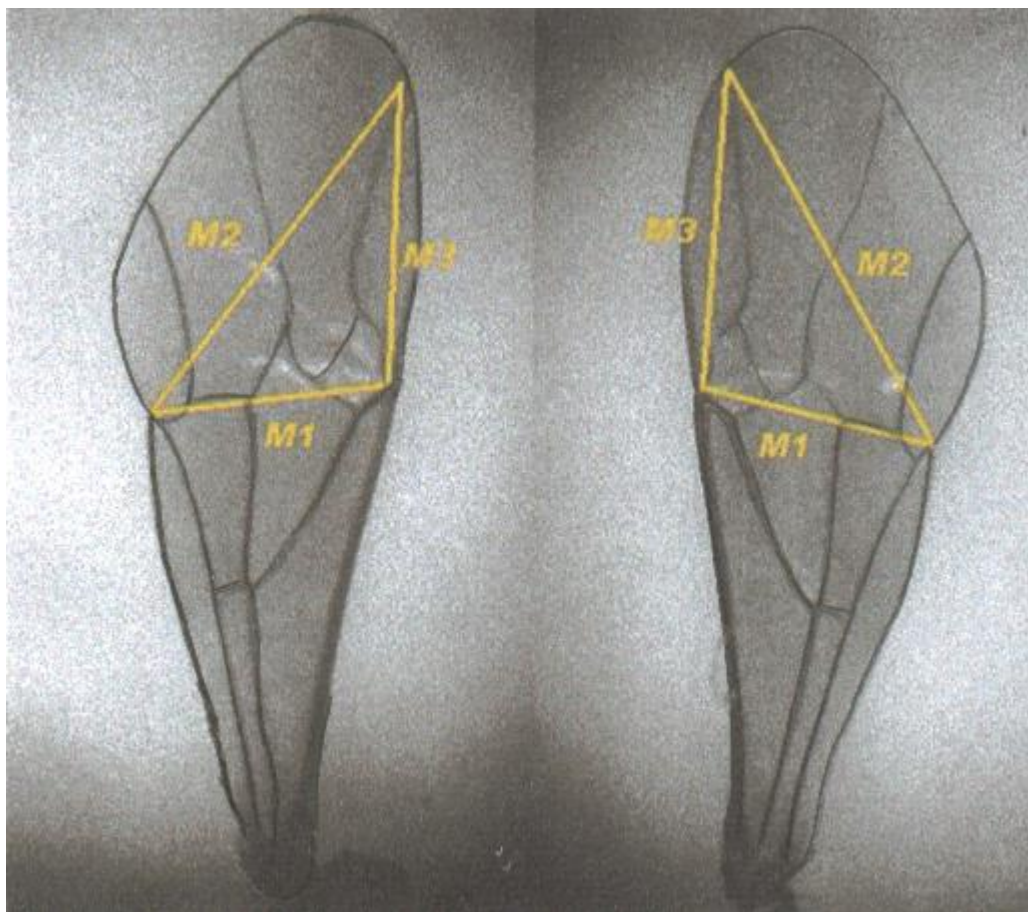
Para a caracterização dos indivíduos quanto a presença/ausência de cromossomos B foi utilizado o marcador SCAR desenvolvido por TOSTA et al. (2004).

Para estas análises a extração do DNA foi feita de acordo com o protocolo de WALDSCHMIDT et al. (1997) e amplificado por uma reação de polimerase em cadeia (PCR). Cada reação (25 µl) continha 25ng de DNA, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM Tris-KCl, 4mM de cada um dos “primers” SCAR, 2mM dNTPs, e 1U de *Taq* DNA polimerase. As amplificações de PCR consistiram de 40 ciclos de 30 s a 94 °C para desnaturação do DNA, 1 min a 55 °C para anelamento dos “primers”, e 1 min e 30 s a 72 °C para alongamento. Um passo final, de extensão, a 72 °C por 7 min foi realizado após os 40 ciclos. Os produtos SCAR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,2%, corados com brometo de etídio e visualizado e fotografado sob luz ultra-violeta.

### 4.2.3- Obtenção das medidas das asas para análises de assimetria flutuante

As asas foram distendidas em uma lâmina de microscopia, utilizando pincel e cola branca, sobre a lâmina contendo a asa era sobreposta outra lâmina; as lâminas eram unidas entre si com pedaços de massa para modelar postos nas extremidades. As imagens das asas foram obtidas utilizando um estereomicroscópio acoplado a uma câmera digital ambas Olympus, através do software Camedia Master 2.0 Olympus Optical, Co Ltd. (1998-2000). As medidas foram feitas utilizando o programa Image J 1.29, Wayne Rasband, National Institute of Health, USA e uma caneta de leitura óptica.

As asas anteriores direitas e esquerdas dos 230 indivíduos de *P. helleri* analisados foram medidas. Foram tomadas três medidas, no intuito de caracterizar a asa. Uma medida de largura máxima M1, uma diagonal M2 e uma de altura M3 (Figura 1). As três medidas foram utilizadas tendo como referência às inervações da asa, para que o erro fosse minimizado. Pelo mesmo motivo não foram tomadas medidas de área que também apresentam um grande erro de medida.



**Figura 1** – Asas anteriores, direita (D) e esquerda (E), de indivíduos de *P. helleri* usadas para tomar as três medidas (apontadas na figura) usadas como referência para análises de assimetria flutuante. Cada medida foi efetuada três vezes.

#### 4.2.4- Análises estatísticas

A verificação do erro de medida foi feita seguindo a metodologia de PALMER et al. (1994), por uma ANOVA utilizando o software STATISTICA 6.0, onde se verificou a interação entre as medidas repetidas, realizadas de cada lado, nas asas, e os indivíduos ; quando essa interação é significativa, é possível afirmar que o erro introduzido pelo medidor é muito pequeno em relação à assimetria a qual é suficientemente grande para possibilitar as análises, ou seja, por mais que fosse introduzido erro ao se medir as asas, a assimetria não devia a esse erro. Para que fosse realizado o cálculo do erro de medida, cada medida do

estudo foi tomada três vezes. Para as análises de variância no intuito de verificar a ocorrência de assimetria foi utilizada a média dessas três medidas.

Os efeitos dos cromossomos B na assimetria dos indivíduos como um todo e na assimetria dos indivíduos considerando o ninho de qual pertenciam foram medidos por uma análise de variância (ANOVA), específica para análises de assimetria flutuante, seguindo as proposições de PALMER & STROBECK (1986), PALMER (1994) utilizando o software STATISTICA 6.0.

Nestas análises se mediu primeiramente a interação entre a presença/ausência de cromossomos B nos indivíduos sem se considerar o ninho e as medidas para cada lado das asas anteriores desses indivíduos. Em um segundo conjunto de análises se avaliou a interação entre a presença/ausência de cromossomos B nos indivíduos considerando o ninho e as medidas para cada lado das asas anteriores desses indivíduos. Quando a primeira interação é significativa indica que a presença/ausência de cromossomos B afeta a assimetria dos indivíduos, quando a segunda interação é significativa indica que os cromossomos B em ninhos específicos afetam a assimetria dos indivíduos.

### **4.3- RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os 230 indivíduos de *P. helleri* foram caracterizados quanto a presença e ausência de cromossomos B. Indivíduos que apresentaram o marcador SCAR na eletroforese foram caracterizados como portadores de cromossomos B, e indivíduos que não apresentaram tal marcador na eletroforese foram caracterizados como não portadores (Tabela 1).

**Tabela 1-** Caracterização dos indivíduos quanto à presença de cromossomos B

Ninho	Localização	Nº de Indivíduos Portadores de B	Nº de Indivíduos não Portadores de B
1	Viçosa	0	10
2	Viçosa	10	0
3	Viçosa	7	3
4	Viçosa	0	10
5	Viçosa	0	10
6	S. M. Anta	6	4
7	S. M. Anta	10	0
8	S. M. Anta	10	0
9	Esmeralda	0	10
10	S. M. Anta	7	3
11	S. M. Anta	5	5
12	Belo Horizonte	7	3
13	Belo Horizonte	7	3
14	São Carlos	6	4
15	Piranga	0	10
16	Piranga	0	10
17	Rio Vermelho	10	0
18	Rio Vermelho	10	0
19	Rio Vermelho	10	0
20	Rio Vermelho	10	0
21	Betim	5	5
22	Betim	7	3
23	São Carlos	0	10

As três medidas (M1, M2 e M3) das asas anteriores direitas e esquerdas, também foram obtidas com sucesso. O valor máximo e mínimo, bem como a média de cada medida, para cada lado, são apresentados na tabela 2.

**Tabela 2** – Valor mínimo, máximo e médio das três medidas utilizadas (valor arbitrário)

	Lado Direito			Lado Esquerdo		
	Min.	Máx.	Médio	Min.	Máx.	Médio
M1	339,6815	424,8610	386,0678	338,3525	417,3420	381,8662
M2	460,6360	567,0780	510,5786	450,8385	558,8165	505,7801
M3	309,9680	379,4680	343,1347	303,3020	387,1945	342,2575

Para as três medidas, mediante uma ANOVA bilateral, seguindo as instruções de PALMER (1994), pode-se comprovar que a interação lado indivíduo é significativa (Tabela 3;  $p = 0,000270$  para M 1,  $p = 0,000872$  para M

2 e  $p = 0,000403$  para a M 3). Como a interação lado\*indivíduo é significativa, implica que a assimetria foi suficientemente grande para seguir fazendo os cálculos, ou seja o erro introduzido pelo medidor não interferiu nos cálculos posteriores.

**Tabela 3** – Análise de variância bilateral para avaliação do erro de medida

Medidas	Efeito	F	p
M1	Lado	51.75609	0.000000
	Indivíduo	57.53480	0.000000
	Lado*Indivíduo	2.50631	0.000270
M2	Lado	58.63036	0.000000
	Indivíduo	38.20037	0.000000
	Lado*Indivíduo	2.30552	0.000872
M3	Lado	1.35624	0.253681
	Indivíduo	20.23409	0.000000
	Lado*Indivíduo	2.43810	0.000403

Essa análise também evidenciou que a interação entre os lados é significativa, tanto para a medida 1 ( $p < 0,0000001$ ) quanto para a medida 2 ( $p < 0,000001$ ), o que segundo PALMER (1994) leva a conclusão de que há simetria direcional. Para a medida três, a interação entre os lados é não significativa ( $p = 0.253681$ ), e portanto aponta para uma simetria não direcional. A possibilidade de haver uma simetria direcional, ou seja que um lado da asa seja maior que o outro é um dado novo na literatura para *P. helleri*.

A análise de variância dos dados não apontou efeito dos cromossomos B na assimetria dos indivíduos como sugerido por IRSIGLER et al. (1999), tanto quando os indivíduos foram analisados em conjunto, sem se considerar o ninho (Tabela 4), quanto considerando o efeito dos Bs em indivíduos por ninho (Tabela 5). Isso é facilmente notado pelos altos valores de  $p$  para os efeitos da Presença/Ausência de B's, o que demonstra a não significância da hipótese dos cromossomos B influenciarem a assimetria dos indivíduos. Assim, pode-se concluir que indivíduos que apresentam cromossomos B não são mais assimétricos do que os indivíduos que não possuem tais cromossomos quando analisado o caráter asa anterior em *P. helleri*.

**Tabela 4** – Análise de variância para avaliação dos efeitos da presença/ausência de B's sobre a assimetria sem considerar o ninho de origem do indivíduo.

<b>Medida</b>	<b>Efeito</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
M1	Lado	521.3520	0.000000
	Presença/Ausência de B's	1.3615	0.244512
M2	Lado	582.5523	0.000000
	Presença/Ausência de B's	1.3718	0.251532
M3	Lado	1.3011	0.234643
	Presença/Ausência de B's	1.3523	0.241713

**Tabela 5** – Análise de variância para avaliação dos efeitos da presença/ausência de B's sobre a assimetria considerando o ninho de origem do indivíduo.

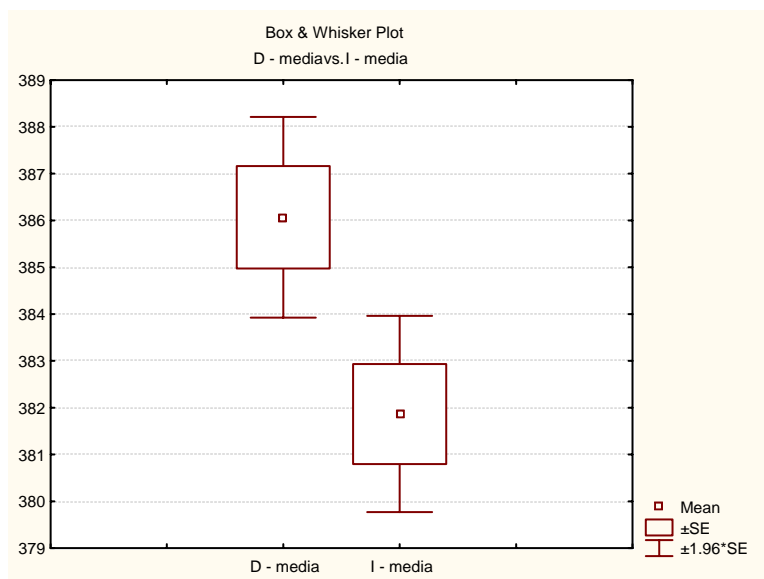
<b>Medida</b>	<b>Efeito</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
M1	Lado	506.4669	0.000000
	Ninho	0.8386	0.675177
	Presença/Ausência de B's	0.6063	0.437097
M2	Lado	567.3462	0.000000
	Ninho	0.8077	0.645331
	Presença/Ausência de B's	0.5644	0.390866
M3	Lado	0.9232	0.768988
	Ninho	0.7957	0.621227
	Presença/Ausência de B's	0.4534	0.352039

Nas análises de variância dos efeitos dos cromossomos B sobre a assimetria dos indivíduos (Tabelas 4 e 5), também, pode se observar um valor de  $p$  significativo para os efeitos de lado, para M 1 e M 2. Esse dado corrobora o padrão de assimetria direcional e permite dizer que em *P. helleri* as asas direitas são significativamente maiores que as esquerdas. Um teste estatístico simples como o teste T, mostra com mais clareza este fato como pode ser visualizado na Tabela 6 e Figura 3, considerando M 1.

**Tabela 6** - Teste t para a média de M 1 das asas direitas (D – média) e esquerdas (I – média)

<b>Variável</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>N</b>	<b>t</b>	<b>Graus de Liberdade</b>	<b>p</b>
D - média	386,067	16,4880				
I - média	381,866	16,1092	227	1596,09	226	0,00*

\* o valor de p (0,00) indica que há diferenças significativas entre o tamanho das asas.



**Figura 3** – Comparação entre a média de M 1 para o lado direito (D) em relação a média de M 1 para o lado esquerdo (I).

Os resultados obtidos confirmam os dados de CASTRO et. al. (1998) e BEUKEBOOM (1994) que afirmam ser mínimos os efeitos fenotípicos externos dos cromossomos B. Esses autores sugerem que estudos que meçam efeitos fenotípicos internos (fisiológicos) dos cromossomos B, ou efeitos fenotípicos na prole, sejam eles quantitativos (maior número de filhos) ou qualitativos (peso, tamanho, dos filhos), podem ser melhores indicadores da influência dos cromossomos B no “fitness” dos indivíduos que os carregam. Desenvolvimento de cruzamentos controlados em *P. helleri* como já acontece em outros meliponídeos poderia ser uma boa alternativa para se avaliar essas características.

Outra linha de estudos interessantes para analisar os efeitos fenotípicos dos cromossomos B em *P. helleri* seria verificar a expressão diferencial de alguns genes em indivíduos com e sem B. TOSTA et al. (2005) apontam a presença de genes para rDNA em cromossomos B de *P. helleri*, genes ribossomais transcritos já foram descritos em cromossomos B, como nas plantas *Brachycome dichromosomatica* (DONALD et. al. 1995) e, além disso apontados como tendo efeitos diretos no “fitness”, como no gafanhoto *Eyprepocnemis plorans* no qual os cromossomos B afetam a expressão das regiões organizadoras

de nucléolo dos autossomos (CABRERO et al., 1987, LÓPEZ-LEÓN et al. 1995).

Como conclusão, o presente trabalho permite afirmar que os cromossomos B em *P. helleri* não afetam o “fitness” dos indivíduos que os carregam, sendo o “fitness” avaliado pela medida de assimetria flutuante de asas anteriores de indivíduos de *P. helleri*. Permite afirmar também que, utilizando o marcador SCAR (TOSTA et al. 2004) para identificar a presença/ausência de cromossomos B em indivíduos adultos de *P. helleri*, outras características fenotípicas poderão ser testadas quanto a influência dos cromossomos B nas mesmas, possibilitando maiores esclarecimentos sobre os efeitos dos cromossomos B nos indivíduos e populações de *P. helleri*.

## **AGRADECIMENTOS**

O presente trabalho foi realizado com o apoio do CNPq, uma entidade do Governo Brasileiro voltada ao desempenho científico e tecnológico, contou também com o auxílio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Ministério do Meio Ambiente (MMA); a todos esses órgãos de fomento a nossa gratidão. Somos gratos também ao Dr. Alberto Tinault do Departamento de Zoologia da Universidade de Granada pelo empréstimo do material óptico para obtenção das imagens das asas de *P. helleri*; ao Dr. Rui Carlos Peruquetti e ao Doutorando Mário César Laboissière Del Sarto pela indispensável ajuda na obtenção do material biológico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEUKEBOOM, L. W. (1994) Phenotypic fitness effects of the selfish B chromosome, paternal sex ratio (PSR) in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. **Evolutionary Ecology**. **8**, 1-24.
- BEUKEBOOM, L. W., SEIF, M., PLOWMAN, A. B., DE RIDDER, F., MICHIELS, N. K. (1998) Phenotypic fitness effects of B chromosomes in the pseudogamous parthenogenetic planarian *Polycelis nigra*. **Heredity**. **80**, 594-603.
- CABRERO, J., ALCHÉ, J. D., CAMACHO, J. P. M. (1987) Effects of B chromosomes on the activity of nucleolar organizer regions in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*: activation of a latent nucleolar organizer region on a B chromosome fused to an autosome. **Genome**. **29**, 116-121.
- CAMACHO, J. P. M., SHARBEL, T. F., BEUKEBOOM, L. W. (2000) B-chromosome evolution. **Phil. Trans. R. Soc. Lond. B**. **355**, 163-178.
- CARLSON, W. R., ROSEMAN, R., ZHENG, Y. (1993) Localizing a region on the B-chromosome that influences crossing-over. **Maydica**. **38**, 107-113.
- CASTRO, A. J., PERFECTTI, F., PARDO, M. C., CABRERO, J., LÓPEZ-LEÓN, M. D., CAMACHO, J. P. M. (1998) No harmful effects of a selfish B chromosome on several morphological and physiological traits in *Locusta migratoria*. **Heredity**. **80**, 753-759.
- DONALD, T. M., LEACH, C. R., CLOUGH, A., TIMMIS, J. N. (1995) Ribosomal RNA genes and the B chromosome of *Brachycome dichromosomatica*. **Heredity**. **74**, 556-561.

- IRSIGLER, A. S. T., TOSTA, V. C., CAMPOS, L. A. O. (2000) Estudo dos efeitos fenotípicos de cromossomos supranumerários em *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Genet. Mol. Biol.**, **23** (Suppl) 147.
- JONES, R. N. (1995) Tansley Review N°. 85 B chromosomes in plants. **New Phytol.** **131**, 411-434.
- LÓPEZ-LEÓN, M. D., CABRERO, J., CAMACHO, J. P. M. (1995) Changes in NOR activity pattern in the presence of supernumerary heterochromatin in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **Genome.** **38**, 68-74.
- MIAO, V. P., COVERT, S. F., VANETTEN, H. D. (1991) A fungal gene for antibiotic resistance on a dispensable ("B") chromosome. **Science.** **254**, 1773-1776.
- MICHAILOVA, P. & METTINEN, A. (2000) Cytotaxonomical variability of *Chironomus* L. and *C-anthracinus* Zett. (Diptera, Chironomidae) from industrial and municipal polluted areas of Finland. **Caryologia.** **53**, 69-81.
- MoLLER, A. P. & SWADDLE, J. P. **Asymmetry, Developmental Stability, and Evolution.** London: Oxford Series in Ecology and Evolution. 287p.
- PALMER, A. R. & STROBECK, C. (1986) Fluctuating asymmetry: measurement, analysis, patterns. **Annual Ecology Systematic.** **17**, 391-421.
- PALMER, A. R. (1994) Fluctuating asymmetry analyses: A primer. In MARKOW, T. A. (ed), **Developmental Instability: Its Origins and Evolutionary Implications.** Dordrecht, Netherlands: Kluwer. 335-364.

- PLOWMAN, A. B. & BOUGOURD, S. M. (1994) Selectively advantageous effects of B chromosomes on germination behaviour in *Allium schoenoprasum* L. **Heredity**. **72**, 587-593.
- WALDSCHMIDT, A. M., SALOMÃO, T. M. F., BARROS, E. G., CAMPOS, L. A. O. (1997) Extraction of genomic DNA from *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). **Brazil J. Genet.** **20**, 421-423.
- TOSTA, V. C. (2004), FERNANDES-SALOMÃO, T. M., TAVARES, M. G., POMPOLO, S. G., BARROS, E. G., CAMPOS, L. A. O. Use of SCAR marker to study B chromosomes in natural populations of *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae). **Annals of second B chromosome conference**. Bubión, Granada, Spain. pág. 38.
- TOSTA, V. C., TAVARES, M. G., FERNANDES-SALOMÃO, T. M. POMPOLO, S. G, GOMES, S. R. P., PERFECTTI, F., CAMPOS, L. A. O., e CAMACHO, J. P. M. (2005), Análises a cerca da origem molecular dos cromossomos B em *Partamona helleri* (HYMENOPTERA, APIDAE). (Capítulo 2 da presente Tese).

## 5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem tirar algumas conclusões sobre a origem molecular e os efeitos fenotípicos dos cromossomos B em *Partamona helleri* e abrem perspectivas de pesquisas utilizando o modelo cromossomos B dessa espécie.

Primeiramente, em relação à origem dos cromossomos B em *P. helleri* o conjunto de resultados do trabalho deixa claro que algum tipo de mecanismo de transferência lateral de DNA deva ter ocorrido, de tal forma que os cromossomos B de *P. helleri* se originaram de uma forma independente em relação aos cromossomos do complemento normal A da espécie. Além disso, os resultados levam a crer que o processo resultante na origem desses cromossomos B possivelmente ocorreu dentro do contexto evolutivo do gênero *Partamona*, provavelmente no contexto evolutivo de um clado monofilético dentro desse gênero no qual se encontram, além de *P. helleri*, as espécies *P. criptica*, *P. cupira*, *P. rústica* e *P. mulata*. Possivelmente esses cromossomos se originaram por um processo de hibridização interespecífica, mas não fica descartada a possibilidade de elementos transponíveis serem os verdadeiros responsáveis, ou no mínimo co-autores do processo. A partir de agora devem ser realizados estudos de citogenética detalhados das espécies, que em conjunto com *P. helleri*

compõem o clado monofilético dentro do gênero *Partamona*, para se ter maior clareza sobre a origem desses cromossomos B.

Com relação aos efeitos fenotípicos, os resultados apontaram a ausência de efeitos dos cromossomos B no “fitness” dos indivíduos de *P. helleri* que os apresentam. No entanto, como apenas um caráter morfológico (asas anteriores) foi analisado, há a necessidade de estudos complementares que meçam não só efeitos fenotípicos em caracteres externos, mas outros efeitos fenotípicos internos (fisiológicos) dos cromossomos B, ou efeitos fenotípicos na prole, para avaliar melhor a influência dos cromossomos B no “fitness” dos indivíduos que os carregam. Assim, uma linha de estudos interessantes para analisar os efeitos fenotípicos dos cromossomos B em *P. helleri* seria verificar a expressão diferencial de alguns genes em indivíduos com e sem B.

Por fim, pode-se afirmar que o marcador SCAR obtido será de grande valia nos estudos que avaliem essa influência dos Bs no “fitness” de indivíduos e populações de *P. helleri*, por exemplo, estudos usando o marcador SCAR associado a outros marcadores moleculares que meçam a variabilidade genética dos indivíduos com e sem cromossomos B permitiriam avaliar com maior clareza efeitos fenotípicos desses cromossomos. Estudos que avaliem a frequência de Bs em populações de *P. helleri*, permitindo averiguar a influencia de algum fator biogeográfico como clima, relevo, vegetação; ou da combinação desses fatores na frequência de tais cromossomos nessas populações, é mais uma das possibilidades abertas por tais marcadores.