

JEFFERSON DE BRITO MARTHE

**ANÁLISES CITOGENÉTICAS E DE SEQUENCIAS ESPECÍFICAS DE CROMOSSOMOS B EM
Partamona cupira (Hymenoptera: Apidae)**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2008**

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

T

M377a
2008

Marthe, Jefferson de Brito, 1981-
Análise citogenéticas e de seqüências específicas de
cromossomos B em *Partamona cupira*
(Hymenoptera : Apidae) \ Jefferson de Brito Marthe
- Viçosa, MG, 2008.
ix, 30f.: il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui anexos.

Orientador: Mara Garcia Tavares.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 18-25.

1. Abelhas - Genética. 2. Cromossomos acessórios.
3. Abelha - Genética molecular. 4. *Partamona cupira*.
5. Abelha - Citogenética. 6. Marcadores genéticos.
7. Sequenciamento nucleotídeo. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 595.799

JEFFERSON DE BRITO MARTHE

**ANÁLISES CITOGENÉTICAS E DE SEQUENCIAS ESPECÍFICAS DE CROMOSSOMOS B EM
Partamona cupira (Hymenoptera: Apidae)**

Dissertação apresentada
à Universidade Federal de
Viçosa, como parte das
Exigências do Programa de Pós-
Graduação em Genética e
Melhoramento, para obtenção do
título de *Magister Scientiae*

APROVADA: 06 de Outubro de 2008

Prof. Lucio Antônio de Oliveira Campos

Prof. Vander Calmon Tosta

**Profa. Tânia Maria Fernandes Salomão
(Co-orientadora)**

**Profa. Silvia das Graças Pompolo
(Co-orientadora)**

**Profa. Mara Garcia Tavares
(Orientadora)**

“Temos o poder de desafiar os genes egoístas de nosso nascimento e, se necessário os memes egoístas de nossa doutrinação. Podemos até discutir maneiras de cultivar e estimular o altruísmo puro e desinteressado – o que não ocorre na natureza e que nunca existiu antes em toda a história do mundo. Somos construídos como máquinas gênicas e cultivados como máquinas mêmicas, mas temos o poder de nos revoltarmos contra nossos criadores. Somente nós, na Terra podemos nos rebelar contra a tirania dos replicadores egoístas.”

Richard Dawkins (O Gene Egoísta)

Em memória do meu avô **Antônio Dantas de Brito**

Agradecimentos

À CAPES e ao CNPq, pelo apoio financeiro

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento.

Ao Departamento de Biologia Geral.

Aos meus pais Carlos Alberto e Eloíza Helena.

À minha irmã Deyse e o seu noivo Alex.

À minha avó Maria Soares da Penha Brito e família

Aos meus companheiros do laboratório de Biologia Celular: Henrique, Marcília, Fábila, Maykon, Josemar, Camila, Juliano, Denilce, Paulo, Daniela, Juliana, Étore, Filipe, Helder, Evelyse, David, Lorena, Caio e Rafael.

Às minhas companheiras do laboratório de Citogenética de Insetos: Luísa e Silvia.

À Margarete Werneck, Íris Stanciola, Geraldo Cabrito e a Professora Ana Maria Waldschmidt da UESB-BA pelas amostras

À minha orientadora, Professora Mara Garcia Tavares por todo apoio e direcionamento.

À minha co-orientadora, Professora Silvia das Graças Pompolo, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório e pela disposição em me ajudar na realização deste trabalho.

À minha co-orientadora, Professora Tânia Maria Fernandes Salomão, pelo auxílio prestado no sequenciamento.

Ao professor Lucio Antônio de Oliveira Campos, pelas suas idéias e apoio.

Aos meus companheiros de república, César, Leandro, Daniel Alonso, Jesus (Daniel Paiva) e Vagner.

À minha amiga Talita Harami, pelos bons momentos que passamos juntos e amizade incondicional.

Aos meus amigos Gustavo Teixeira e Andreia Arantes Borges, pelo companheirismo nos momentos de alegria e de dor.

À minha amiga Viviane Gomes, essa pessoa super bacana, pelas disputas colossais na mesa de sinuca e os bons momentos de descontração (e de copo é claro).

Ao meu Sensei e amigo João Vitor Ferreira, pela sabedoria que mudou minha mente, durante o meu período de juventude e me fez chegar até aqui.

À família Leite de Oliveira da minha vizinhança em Ipatinga, da qual nutro muito carinho.

Enfim, a todos que, de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse concretizado.

Biografia

JEFFERSON DE BRITO MARTHE, filho de Eloíza Helena de Brito Marthe e Carlos Alberto Coelho Marthe, nasceu em 02 de agosto de 1981, em Ipatinga, Minas Gerais

Em Outubro de 2006 graduou-se Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Viçosa, tendo desenvolvido seu projeto de monografia sob orientação da Professora Mara Garcia Tavares.

Em Outubro de 2006, ingressou no Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, submetendo-se à defesa de dissertação em 06 de Outubro de 2008.

Conteúdo

Resumo.....	vii
Abstract.....	viii
1 – Introdução.....	1
1.1 - Origem e Definição de cromossomo B.....	1
1.2 - Cromossomo B no gênero <i>Partamona</i>	3
2 – Objetivos.....	5
2.1 - Objetivo Geral.....	5
2.2 - Objetivo Específico.....	5
3 - Materiais e Métodos.....	6
3.1 - Análises com <i>Partamona cupira</i>	6
3.1.1 - Material Biológico.....	6
3.1.2 - Análises citogenéticas.....	6
3.1.3 - Análises moleculares.....	7
3.2 - Análises moleculares com <i>Partamona cupira</i> , <i>P. criptica</i> e <i>P. helleri</i> de Viçosa-MG e Salvador/BA	8
3.2.1 - Amplificação do DNA empregando-se “primers” SCARs	8
3.2.2 - Sequenciamento dos fragmentos de DNA obtidos.....	9
4 - Resultados e Discussão.....	11
4.1 - Análise citogenética.....	11
4.2 - Associação entre a presença de cromossomos B em <i>P. cupira</i> e o marcador SCAR, específico para a seqüência presente nos cromossomos B de <i>P. helleri</i>	13
4.3 - Comparação entre as seqüências do marcador SCAR de <i>P. helleri</i> de Viçosa/MG e Salvador/BA, <i>P. cupira</i> , <i>P. criptica</i> e <i>P. rustica</i>	14

6 - Referências Bibliográficas.....	18
Anexo 1.....	26
Anexo 2.....	29

Resumo

MARTHE, Jefferson de Brito. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2008.
Análises Citogenéticas e de Sequências Específicas de Cromossomos B em *Partamona Cupira*. Orientadora: Mara Garcia Tavares. Co-orientadoras: Silvia das Graças Pompolo e Tânia Maria Fernandes Salomão.

Cromossomos B, também chamados de cromossomos extra-numerários ou acessórios ocorrem em fungos, plantas e animais. Estes cromossomos possuem um padrão de segregação não mendeliano, podendo existir de uma a várias cópias por indivíduo. No gênero *Partamona*, de seis espécies caracterizadas citogeneticamente até então, somente *P. helleri* apresentou cromossomo B. Um marcador RAPD foi identificado como associado a esse cromossomo em uma colônia oriunda de Viçosa-MG, sendo posteriormente clonado, sequenciado e transformado em marcador SCAR. Este mesmo marcador foi identificado em *P. cupira*, *P. criptica* e *P. rustica*, o que sugere que estas espécies também possuem cromossomos B. Além disso, esse mesmo marcador foi detectado em indivíduos de um ninho de *P. helleri* de Salvador-BA, cujos indivíduos possuíam um grande cromossomo B heterocromático. Podendo haver uma ligação entre a presença do marcador SCAR nestas espécies e a presença de cromossomos Bs, este trabalho teve como objetivo detectar a presença de cromossomos B em *P. cupira* e verificar se existe uma associação entre ele e a presença do marcador SCAR descrito acima. Um outro objetivo foi o sequenciamento dos fragmentos SCARs de *P. cupira*, *P. criptica*, *P. rustica* e *P. helleri* de Salvador-BA, com o propósito de comparar o nível de identidade entre as sequências de SCAR. Como resultado, das 4 colônias de *P. cupira* analisadas, duas apresentaram o número de $2n=34$, ao passo que as outras duas apresentaram em alguns indivíduos um cromossomo B de grande tamanho (colônias GUI 1 e GUI 11). Observou-se ainda, uma marcação de CMA₃ no braço curto destes cromossomos extranumerários, o que sugere que o mesmo pode conter sequências de genes de DNA ribossomal nesta espécie. Verificou-se também uma clara associação entre a presença do marcador SCAR e a de cromossomos B, nos indivíduos das colônias GUI 1 e GUI 11. Levando em conta que as sequências, comparadas em conjunto possuíam apenas alguns *gaps* e quase nenhum sítio variável entre elas, pode-se dizer que o nível de identidade entre elas é extremamente alto, o que sugere algum tipo importância adaptativa em relação ao cromossomo B, ainda desconhecida, ou o surgimento deste último, através de cruzamentos interespecíficos, ainda não detectados entre as espécies do gênero. Estudos futuros deverão analisar as diferentes hipóteses levantadas sobre a origem dos cromossomos B no gênero *Partamona*, bem como a associação dos fragmentos oriundos dos “primers” SCAR de *P. helleri* com a presença destes cromossomos em *P. criptica*, *P. rustica* e *P. helleri* de Salvador BA.

Abstract

MARTHE, Jefferson de Brito. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, october 2008.
Citogenetic and Specific Sequence Analises of B Chromosomos in *Partamona Cupira*. Adviser: Mara Garcia Tavares. Co-advisers: Silvia das Graças Pompolo and Tânia Maria Fernandes Salomão.

B chromosomes, called supernumerary or accessory too, has been founded in fungi, plants and animals. This chromosomes have a rate of no mendelian segregation and he can occurs, since one to many copies by individual. In the gender *Partamona*, of six citogenetic characterized species nowadays, only *P. helleri* owned B chromosome. RAPD mark has been identified as associated to this chromosome in a colony from Viçosa City-MG. After this, it has been cloned, sequenciated and transformed in a SCAR mark. This same mark has been identified in *P. cupira*, *P. criptica* and *P. rustica*, what suggested this species have B chromosome, too. Moreover, this same mark has been identified in a colony of Salvador City-BA. whose individuals have a big heterochromatic B chromosome. How it's possible that there is a association between the presence of B chromosomes, this work had as aim detect the presence of B chromosome in *P. cupira* and verified a possible association between them and the presence of SCAR mark described above. Another object was the sequenciation of SCAR fragment from *P. cupira*, *P. criptica*, *P. rustica* and *P. helleri* (Salvador City-BA), with the aim of comparer the level of identity between the SCAR sequences. As resulted, the four colony at all from *P. cupira* analised, only two ownied the chromosomic number $2n=34$, otherwise the other two colonies ownied same individuals that demonstrated have the presence of a great B chromosome (GUI 1 E GUI 11). Another observation was CMA₃ mark in the short arm of this supernumerary chromosomes, what suggest that them may have owned ribossomal DNA sequeces. Moreover, it has been verified a clear association between the presence of SCAR mark and B chromosomes in the individuals from colonies GUI 1 E GUI 11. It's considered that sequences compared at all, have been only same gaps and almost none variable site, between them, what suggests that the level of identity between sequences is extremely high. It's suggests some kind of importance in relation to the adaptation of chromosome B, nowadays unknown, or the born of B, throw interspecific mating no detected yet. Future studies will analyze the different hypothesis about the origin of B chromosomes in the genera *Partamona* and the association between fragments from SCAR primers with the presence of Bs in *P. criptica*, *P. rustica* e *P. helleri* (Salvador City-BA).

1 - Introdução

1.1 - Definição e Origem de cromossomo B

O termo “cromossomo B” foi utilizado pela primeira vez por Randolph em 1928, para identificar cromossomos extras de milho que não teriam sido originados por nenhum tipo de cromossomo do complemento normal (JONES, 1995). Entretanto, em 1908, Stevens já havia descrito a presença de pequenos cromossomos em número variável, em populações de *Diabrotica soror* e de *D. punctata* (Coleoptera) (JONES, 1995).

Sabe-se atualmente que os cromossomos B encontram-se presentes em fungos, vegetais e em animais. Estima-se a sua ocorrência em aproximadamente 15% das espécies vivas descritas, sendo que a cada ano são descritas novas espécies que possuem cromossomos B (BEUKEBOOM, 1994).

A origem destes elementos extras permanece obscura. Somente nas últimas duas décadas, principalmente com o desenvolvimento de técnicas de Biologia Molecular e Citogenética molecular, foi possível obter um panorama mais claro sobre este contexto (BEUKEBOOM, 1994). Na atualidade, considera-se que os cromossomos B, das mais diversas espécies, possam tanto ter origem intra, quanto interespecífica. Contudo, apontar a origem do DNA progenitor destes cromossomos, nem sempre é possível (CAMACHO *et al.*, 2000).

Os cromossomos B, originados de modo intraespecífico, ocorrem devido à quebra de cromossomos do cariótipo normal, podendo ser tanto de cromossomos sexuais quanto autossomais (CAMACHO *et al.*, 2000). Os exemplos mais comuns se referem às quebras a partir dos cromossomos autossômicos. Em espécies vegetais esta origem já foi verificada em: *Crepis capillaris* (JAMILENA *et al.*, 1994, 1995), *Secale cereale* (BLUNDEN *et al.*, 1993; CUADRADO & JOULE, 1994; WILKES *et al.*, 1995; HOUBEN *et al.*, 1996; ZHANG *et al.*, 1999), *Zea mays* (ALFENITO & BICHLER, 1993; STARK *et al.*, 1996) e *Brachycome dichromosomatica* (LEACH *et al.*, 1995; DONALD *et al.*, 1995; FRANKS *et al.*, 1996; HOUBEN *et al.*, 1997, 1999). Cromossomos B originados de maneira intra-específica também já foram encontrados em insetos: *Drosophila subsilvestris* (GUTKNECHT *et al.*, 1995), em peixes: *Astyanax scabripines* (NÉO *et al.*, 2000), em répteis: *Dicoptodom tenebrosus* (BRINKMAN *et al.*, 2000) e em mamíferos: *Pteauroides volans* (McQUADE *et al.*, 1994), *Reithrodontomys megalotis* (PEPPERS *et al.*, 1997).

Por outro lado, alguns relatos de casos sobre a origem interespecífica (hibridação ou transposição interespecífica) de cromossomos B descritos. Um deles ocorre em plantas do gênero *Coix* (SAPRE & DESPHANDE, 1987). Ao realizar uma análise citológica dos híbridos interspecíficos e híbridos oriundos de *C. gigantea* ($2n=20$) e *C. aquatica* ($2n=10$), SAPRE &

DESPHANDE (1987) verificaram que um ou dois cromossomos oriundos de *C. gigantea* comportavam-se como cromossomos B, quando incorporados no genoma de *C. aquatica*, pela hibridização espontânea e sugeriram que isto também pode ocorrer em populações de outras espécies.

A origem interespecífica de cromossomos B em *Poecilia formosa* também já foi relatada. Esta espécie de peixe se reproduz por ginogênese (o gameta masculino contribui apenas para engatilhar a embriogênese e não para compartilhar seu material genético) e, as fêmeas podem cruzar com machos de outras espécies, tais como *P. mexicana* e *P. latipinna*, que são espécies bissexuais aparentadas. Neste processo de cruzamento interespecífico, alguns dos genes masculinos dessas espécies foram transmitidos à *P. formosa*, através de cromossomos extranumerários, chamados de minicromossomos (SHARTL et al., 1995).

Em Hymenoptera o único relato existente sobre a origem interespecífica de cromossomos B, até o momento, é o da vespa parasita *Nasonia vitripennis* (McALLISTER & WERREN, 1997), que possui um cromossomo B denominado PSR (*Paternal Sex Ratio*). Cópias do retrotransposon NATE foram previamente isoladas do PSR e do genoma de *N. vitripennis* e de espécies relacionadas de vespas. Uma análise filogenética destas seqüências revelou a presença de 29 elementos do cromossomo PSR de *Nasonia* em sete outras espécies de vespas. Estas espécies foram agrupadas pelas análises de hibridização dos elementos no DNA genômico proporcionando evidências que o PSR foi recentemente transferido de uma espécie do gênero *Trichomalopsis* (McALLISTER & WERREN, 1997).

Ainda no gênero *Nasonia*, DOBSON & TANOUYE (1998) realizaram cruzamentos interspecíficos para introduzir o cromossomo PSR de *N. vitripennis* em *N. giraulti* e *N. longicornis*. Os resultados demonstraram que a transferência ocorre em altas taxas e que o mecanismo de manutenção de PSR, a partir da eliminação do genoma paterno, continua a ocorrer em ambas as espécies, resultando na manutenção de PSR na população.

PERFECTTI & WERREN (2001) ao realizarem um cruzamento de *N. giraulti* e *N. vitripennis* introduziram um fragmento gênico de *N. giraulti* no genoma de *N. vitripennis*. Este neo-cromossomo B carrega o gene 1231 de *N. giraulti* para cor de olho do tipo selvagem, o que facilitou a análise da transmissão do mesmo. O cromossomo B mostrou ter uma segregação não mendeliana e algumas instabilidades mitóticas manifestaram-se, como o caso do fenótipo do mosaico para a cor de olho. Entretanto, a taxa de transmissão e a estabilidade mitótica cresceram sobre sucessivas gerações, o que dá suporte ao modelo da origem do cromossomo B por hibridização interspecífica.

1.2 - Cromossomo B no gênero *Partamona*

Em relação ao gênero *Partamona*, COSTA *et al.* (1992), BRITO *et al.* (1997, 2003 e 2005), BRITO-RIBON *et al.* (1999) e MARTINS *et al.* (2007) caracterizaram citogeneticamente um total de seis espécies: *P. helleri*, *P. vicina*, *P. ayaleae*, *P. mulata*, *P. peckolti* e *P. seridoensis*. Destas, somente *P. helleri* apresentou cromossomo B.

COSTA *et al.* (1992) encontraram de um a três destes cromossomos em diferentes indivíduos de *P. helleri*, enquanto TOSTA *et al.* (1998) detectou a existências de indivíduos com até quatro cromossomos B. Posteriormente MARTINS *et al.* (2007), descobriu de 3 a 7 cromossomos B, de tamanhos variáveis, em duas colônias de *P. helleri* da Bahia.

Os cromossomos B de *P. helleri* foram caracterizados citogeneticamente por meio das técnicas de banda C; método GTG; banda NOR; coloração com Cromomicina A₃, DAPI; banda Q e FISH (BRITO, 1998; BRITO *et al.*, 2005; MARTINS *et al.*, 2007). Concluiu-se que os cromossomos B de *P. helleri* são heterocromáticos e possuem regiões ricas em AT. O tratamento do DNA genômico com a enzima de restrição *Eco* RI e hibridização da sonda de rDNA 18S-FITC de milho por “southern blot”, demonstraram que os indivíduos com cromossomo B apresentavam bandas não presentes nos indivíduos sem este cromossomo. Este dado sugeriu a presença de seqüências específicas de B nesta espécie (seqüências presentes apenas no cromossomo B e não no conjunto A do genoma). Entretanto, ao fazer análises de FISH (Hibridação *in Situ* Fluorescente), utilizando a mesma sonda, não houve nenhuma detecção de região de rDNA nos cromossomos B (BRITO, 1998; BRITO *et al.*, 2005).

Evidências de seqüências específicas em cromossomos B foram reforçadas pelo trabalho de TOSTA *et al.* (2007) que identificaram um marcador RAPD associado a estes cromossomos em uma colônia de *P. helleri* de Viçosa-MG. Esse marcador RAPD foi clonado e parcialmente seqüenciado (TOSTA, 2001). Entretanto, ao comparar esta seqüência com seqüências disponíveis no “Gene Bank” verificou-se que a mesma não apresentou homologia com as seqüências de B de outras espécies e que ela não codificou para nenhuma proteína conhecida. Isto sugeriu que esta seqüência representa uma região não codificadora (TOSTA, 2001).

Posteriormente, este marcador RAPD foi convertido em um marcador SCAR. Utilizando este “primer” SCAR, TOSTA (2005) e TOSTA *et al.* (2007) demonstraram uma associação entre a presença de cromossomos B (detectada citogeneticamente) e a do marcador SCAR, o que mostrou que ele é útil para a identificação de indivíduos que possuem cromossomos B. TOSTA (2005) também verificou a presença deste marcador SCAR em duas outras espécies do gênero *Partamona*: *P. cupira* e *P. criptica*. Assim, como esta marca aparece apenas em indivíduos que apresentam os cromossomos B, sugere-se que esta duas espécies também apresentem cromossomos B (TOSTA, 2005). Análises citogenéticas, entretanto, ainda não foram realizadas com as mesmas, para se confirmar esta hipótese.

MARTHE *et al.* (2007) posteriormente detectaram este marcador em uma colônia de *P. rustica* proveniente de Nova Porteirinha-MG e em uma colônia de *Partamona helleri* do município de Salvador-BA, cujas operárias de *P. helleri* possuíam cromossomos B do tamanho semelhante aos cromossomos do complemento regular (MARTINS *et al.*, 2007).

Assim, considerando-se os aspectos abordados anteriormente e que ainda existe muito a ser investigado sobre a presença, frequência e origem dos cromossomos B, este trabalho se propõe a ampliar os conhecimentos sobre estes cromossomos no gênero *Partamona*.

2 - Objetivos

2.1 - Objetivo Geral

Ampliar os conhecimentos sobre os cromossomos B no gênero *Partamona*.

2.2 - Objetivos Específicos

- Verificar, por meio de análises citogenéticas, se há associação entre a presença de cromossomos B em *P. cupira* e o marcador SCAR, específico para uma seqüência presente nos cromossomos B de *P. helleri*;
- Comparar sequencias de *P. helleri* de Viçosa-MG, com sequencias de *P. cupira*, *P. criptica* e *P. helleri* de Salvador-BA, obtidas por amplificação de “primers” SCARs desenvolvidos para *P. helleri* de Viçosa-MG.

3 - Materiais e Métodos

3.1 - Análises com *Partamona cupira*

3.1.1 - Material Biológico

As análises citogenéticas foram realizadas com 19, 17, 21 e 11 larvas pós defecantes de 4 colônias (GUI 1, GUI 2, GUI 3 e GUI 11) de *Partamona cupira* provenientes de Guimarânia-MG, respectivamente.

3.1.2 - Análises citogenéticas

As análises citogenéticas foram realizadas por preparação de cromossomos metafásicos obtidos a partir dos gânglios cerebrais de larvas de *P. cupira* de acordo com o protocolo de IMAI *et al.* (1988); o restante do corpo de cada larva foi congelado, em ultra-freezer a - 80 °C, e utilizado para a análise do DNA, conforme descrito abaixo.

A dissecação do gânglio cerebral das larvas foi realizada em solução hipotônica de citrato de sódio 1% com colchicina a 0,005%. Os gânglios permaneceram imersos nesta solução por uma a duas horas e, em seguida, foram transferidos para uma lâmina histológica devidamente limpa. Posteriormente, o material foi fixado, com uma série de três fixadores: fixador I (água: etanol: ácido acético, 4:3:3), no qual o material foi dissociado sob estereomicroscópio ; fixador II (etanol: ácido acético, 1:1), adicionado em seguida, drenando-se a lâmina com papel filtro, e fixador III (100% ácido acético), adicionando-se algumas gotas, também drenando-se a lâmina com papel-filtro. As lâminas foram secas ao ar e, após 24 horas, coradas (coloração convencional) com solução de 1 mL de Giemsa (1g de Giemsa em pó, 54 mL de glicerina e 84 mL de metanol) em 30 mL de tampão Sörensen (1:1, Na₂HPO₄ 0,06 mol/L e KH₂PO₄ 0,06 mol/L) (pH 6,8), por 20 minutos, à temperatura ambiente.

As lâminas destinadas a outras técnicas foram acondicionadas em caixas plásticas e guardadas na geladeira. Colorações específicas foram realizadas com o emprego do fluorocromo Cromomicina A₃ (SCHWEIZER, 1980) e bandamento NOR (KAVALCO & PAZZA, 2004).

Em relação às técnicas de fluorescência DA/CMA₃, primeiramente gotejou-se 150 mL de solução de distamicina A 0,3 mg por mL em tampão McIlvaine (pH 7,0) sobre a lâmina, cobrindo-a com uma lamínula e deixando-a agir por 15 minutos. Em seguida, retirou-se a lamínula, lavou-se a lâmina em água corrente e mergulhou-se a lâmina em tampão McIlvaine pH 7,0 (C₆H₈O₇ 0,1 mol/L,

Na_2HPO_4 0,16 mol/L), por 15 minutos. Após este tempo, foi novamente lavada em água corrente e em tampão McIlvaine, por 15 minutos e seca ao ar. Posteriormente, gotejou-se 150 mL de solução de cromomicina A_3 (0,5 mg por mL de tampão McIlvaine pH 7,0) sobre a mesma lâmina cobrindo-a com lamínula por 60 minutos, no escuro; passado esse tempo, realizou-se uma nova lavagem em água corrente e em tampão McIlvaine por 15 minutos. Ao final, as lâminas foram montadas com solução de sacarose saturada, deixadas por 15 dias em estufa á 37 °C, antes da análise.

Para evidenciar a NOR, segundo a técnica de KAVALCO *et al.* (2004), inicialmente foi preparada a solução de nitrato de prata a 25% (1,25 g de nitrato de prata diluído em 5 mL de água destilada) e a solução de gelatina a 1% (125 μL de ácido fórmico diluído em 50 mL de água destilada e 0,5 g de gelatina em pó). Sobre a lâmina foram gotejadas 2 gotas de gelatina para 4 gotas de nitrato de prata. As lâminas foram incubadas a 55 °C e retiradas quando apresentaram uma coloração marrom-escura.

Foram observadas 10 metáfases, em média, por lâmina, utilizando-se a coloração Giemsa. As melhores imagens foram capturadas por meio da câmera Q Color 30 Olympus, acoplada ao microscópio Olympus BX-60, sejam aquelas lâminas submetidas a coloração de Giemsa, NOR ou CMA_3 . Para captura de imagens de metáfases de lâminas submetidas à coloração com DA/cromomicina A_3 foi utilizado em acréscimo o filtro WB ($\lambda=330$ a 385 nm).

3.1.3 - Análises moleculares

O DNA das larvas de *P. cupira* foi extraído conforme WALDSCHMIDT *et al.* (1997). Cada corpo de larva pós-defecante foi macerado em um tubo de 1,5 mL contendo tampão de extração com a seguinte composição: CTAB 2% (hexadecil trimetil brometo de amônio); EDTA 20 mM (pH 8,0) (ácido tetraacético diamina etileno); NaCl 1,4 M; Tris-HCl 100 mM (pH 8,0) e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ protease. Os pistilos usados na maceração foram previamente flambados. O macerado foi incubado a 65 °C por 30 min.

A desproteíntização foi feita, duas vezes, com um volume de clorofórmio. Após a desproteíntização o macerado foi centrifugado a 13.000 rpm (Centrifuga Eppendorf 5415C) por 8 min. A precipitação do ácido nucléico foi feita com um volume de isopropanol seguida de incubação a -20°C por no mínimo 2h. O material foi então submetido à centrifugação a 14.000 rpm por 30 min e o precipitado formado foi lavado duas vezes com etanol 70% e seco à temperatura ambiente.

O ácido nucléico obtido foi ressuspendido em 100 μL de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0).

Em seguida as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8% contendo 0,2 µg/ml de brometo de etídeo para se verificar a integridade e a pureza do DNA extraído.

Posteriormente, este DNA foi amplificado utilizando-se os *primers* SCARs desenhados por TOSTA *et al.* (2007) denominados “Primer” OPK 14 A: 5’CCCGCTACACATATAATTAACG3’ e “Primer” OPK 14 B: 5’CCCGCTACACCCTAAAATATGC3’. As reações de amplificação foram feitas em 25µL contendo: MgCl₂ 2,0 mM; Tris/KCl 10 mM/50 mM; 2 mM de cada desoxirribonucleosídeo trifosfato (dATP, dTTP, dGTP, dCTP); 4 mM de cada um dos “primers” SCARs, 1 unidade de *Taq* polimerase (Phoneutria) e 25 ng de DNA genômico. As amplificações, via PCR, consistiram de 40 ciclos de 30 seg a 94 °C para desnaturação do DNA, 1 min a 55 °C para pareamento dos “primers” e 1 min a 72 °C para alongamento. Ao final dos 40 ciclos foi feito um passo extra de extensão (7 min a 72 °C). Os produtos PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1%, corados previamente com brometo de etídeo e visualizados sob luz ultravioleta, utilizando-se o sistema de captura de imagens Alphadigidoc 1201.

Após a análise dos géis, foi feita uma comparação entre a presença do marcador SCAR e a de cromossomo B nos indivíduos analisados.

3.2 - Análises moleculares com *Partamona helleri* de Viçosa/MG e Salvador/BA, *P. cupira* e *P. criptica* e *P. rustica*

3.2.1 - Amplificação do DNA empregando-se “primers” SCARs

Nas reações de amplificação foram utilizados dois pares de “primers”, um externo e um interno. Os “primers” externos consistiam das sequencias dos “primers” SCAR (TOSTA *et al.*, 2007) citadas no tópico acima. Os internos foram desenhados, baseando-se na seqüência interna do marcador SCAR de *P. helleri*. A seqüência do “Primer” F é: 5’CTAAACTCATGCACTCAGC3 e a do R é: 5’CTACAGTCGAGCAAGTCA3’.

Para a amplificação de ambos os pares de “primers” foi feita uma reação de 25 µL contendo: MgCl₂ 2,0 mM; Tris/KCl 10 mM/50 mM; 2 mM de cada desoxirribonucleosídeo trifosfato (dATP, dTTP, dGTP, dCTP); 4 mM de cada um dos “primers” SCARs de *P. helleri*, 1 unidade de *Taq* polimerase (Phoneutria) e 25 ng de DNA genômico. As amplificações, via PCR, consistiram de 40 ciclos de 30 seg a 94 °C para desnaturação do DNA, 1 min a 55 °C para pareamento dos “primers” e 1 min a 72 °C para alongamento. Ao final dos 40 ciclos foi feito um passo extra de extensão (7 min a 72 °C).

Os produtos PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1%, corados com brometo de etídeo, visualizados sob luz ultravioleta e utilizados para o sequenciamento, conforme descrito abaixo.

3.2.2 - Sequenciamento dos fragmentos obtidos

Os fragmentos de DNA foram separados do gel por meio de um bisturi e eluídos por meio do Kit WIZARD PURIFICATION SYSTEMS (PROMEGA). Os fragmentos purificados foram ligados, com auxílio da enzima T₄ ligase, ao vetor plasmidial pGEM-T easy (PROMEGA). Após essa etapa, o vetor plasmidial foi usado para transformar células competentes da bactéria *E. coli* DH5 α (INOUE et al., 1990). Após a transformação, as células bacterianas foram plaqueadas em meio LB contendo ampicilina (100 μ g/mL), 5 bromo-4cloro-3 indol- β -D-galactosídeo (X-gal) e isopropil-tio- β -D-galactosídeo e incubadas à 37°C. A seleção das colônias transformantes foi realizada por meio da ampicilina, de forma que apenas as células que apresentavam a sequência codificante de resistência, presente apenas no plasmídeo, sobreviveram. A identificação dos clones recombinantes foi obtida pela análise da cor das colônias em meio LB. As colônias que contêm o plasmídeo sem o inserto ficaram azuis, pois conseguiram degradar X-gal. Já as colônias brancas possuíam o plasmídeo carregando, possivelmente, o inserto. Neste caso, o gene Lac Z é interrompido, não produzindo a enzima β -galactosidase e, portanto, não degradando X-gal.

O confirmação dos clones transformantes recombinantes (clones em que o plasmídeo contém o inserto) foi feito por meio de uma lise rápida das colônias, na qual se confirmou os clones recombinantes por comparação do tamanho dos plasmídeos, utilizando-se eletroforese. Colônias azuis, sem o plasmídeo, foram utilizadas como controle. Todas as colônias que apresentaram plasmídeos maiores do que o controle foram consideradas colônias recombinantes, ou seja, apresentavam o fragmento de DNA inserido.

A extração plasmidial dos clones recombinantes foi feita, utilizando-se o SNAP MINIPREP KIT (INVITROGEN). A seguir os insertos foram seqüenciados pelo método de terminação de cadeia com dideoxynucleotídeos (SANGER et al., 1977), utilizando os “primers” M13F – 5’GGAAACAGCTATGACCATG3’ e M13R – 5’GTTAAACGACGCCAGTG3’ do plasmídeo pGEM.

Para seqüenciar a região interna dos insertos, fragmentos de PCR destas regiões foram obtidas utilizando os “primers” internos desenhados com base na seqüência de *P. helleri* (TOSTA et al., 2007) e o produto PCR foi diretamente seqüenciado utilizando-se os mesmos “primers”. Esses “primers” foram denominados R e F e suas seqüências são: 5`CTACAGTCGAGCAAGTCA3` e 5`CTAAACTCATGCACTCAGC3`, respectivamente.

O alinhamento e edição das sequências foram realizados, utilizando-se os programas Phred (EWING, 1998a, 1998b), Phrap (PHIL GREEN, University of Washington) e Consed (GORDON et al., 1998; 2001) e a análise das mesmas foi realizada pelo programa MEGA 4 (TAMURA et al., 2007).

Esta análise envolveu o cálculo da distância entre as sequências, utilizando-se o método de p distance (nucleotídeos). Esta distância é a proporção (p) de sítios de nucleotídeos diferentes ao se comparar as sequências par à par. Isto é obtido dividindo o número total de nucleotídeos pelo total do número de nucleotídeos comparados. Nesta análise, nenhuma correlação de múltiplas substituições ou diferenças nas taxas evolucionárias entre os sítios é considerada (NEI & KUMAR, 2000).

Esta distância é calculada considerando-se as seguintes variáveis:

n_d: transição + transversão: número de sítios de nucleotídeo que são diferentes

s: transição apenas: proporção de nucleotídeos com diferenças transicionais

v: transversão apenas: proporção de nucleotídeos com diferenças transversionais

R = s/v: razão transição/transversão

L: Número válido de sítios comuns: número de sítios comparados

Seguem-se as fórmulas para computar essas variáveis

Variável	Fórmula	Varição
p	n_d/L	$p(1-p)/L$
s	P	$s(1-s)/L$
v	Q	$v(1-v)/L$
R	P/Q	$[c_1^2P + c_2^2Q - (c_1P + c_2Q)^2]/L$

Onde:

$$c_1 = 1/s \text{ e } c_2 = s/v^2;$$

P e Q são as proporções de sítios mostrando a diferença transicional e transversional, respectivamente (NEI & KUMAR, 2000).

4 - Resultados e Discussão:

4.1 - Análise citogenética

As análises citogenéticas mostraram que indivíduos de *P. cupira* das colônias GUI 2 e GUI 3 apresentaram $2n=34$ cromossomos (Figura 1). Por outro lado, um cromossomo B foi encontrado em 10 indivíduos da colônia GUI 1 e em 3 da GUI 11 (Figura 2 e Tabela 1 do Anexo 2).

Já em relação ao cariótipo nota-se que o número padrão de cromossomos de *P. cupira* é exatamente o mesmo que o de *P. helleri*, ou seja, $2n=34$. O mesmo número foi detectado em *P. mulata*, *P. aylae*, *P. vicina*, *P. peckolti* e *P. seridoensis*. Apesar desta conservação em relação ao número, existem diferenças morfológicas e na distribuição de heterocromatina entre os cromossomos das diferentes espécies analisadas (BRITO-RIBON *et al.*, 1999, COSTA *et al.*, 1992; BRITO *et al.*, 2003; BRITO *et al.*, 2005 & MARTINS *et al.*, 2007).

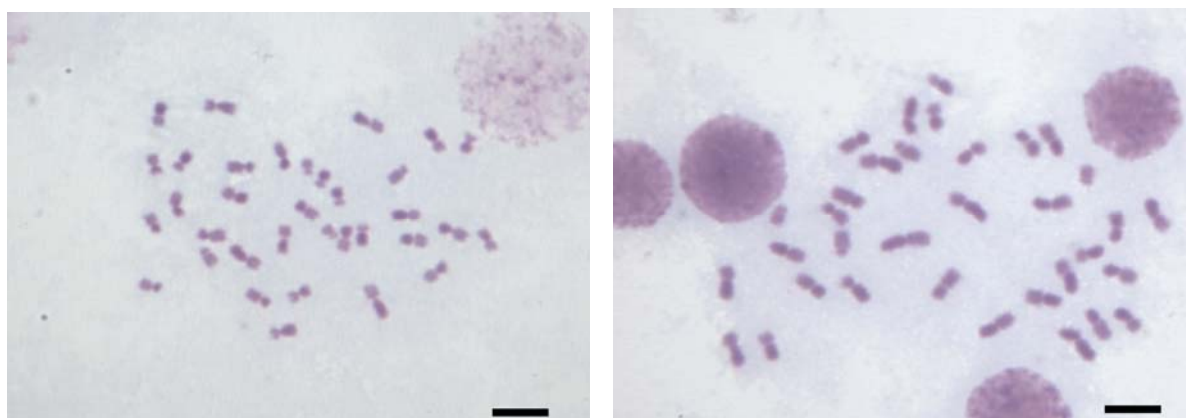


Figura 1: Cromossomos metafásicos de *P. cupira* (colônias GUI 2 [A] e GUI 3 [B], respectivamente) corados com Giemsa ($2n=34$). Barra $5\mu\text{m}$.

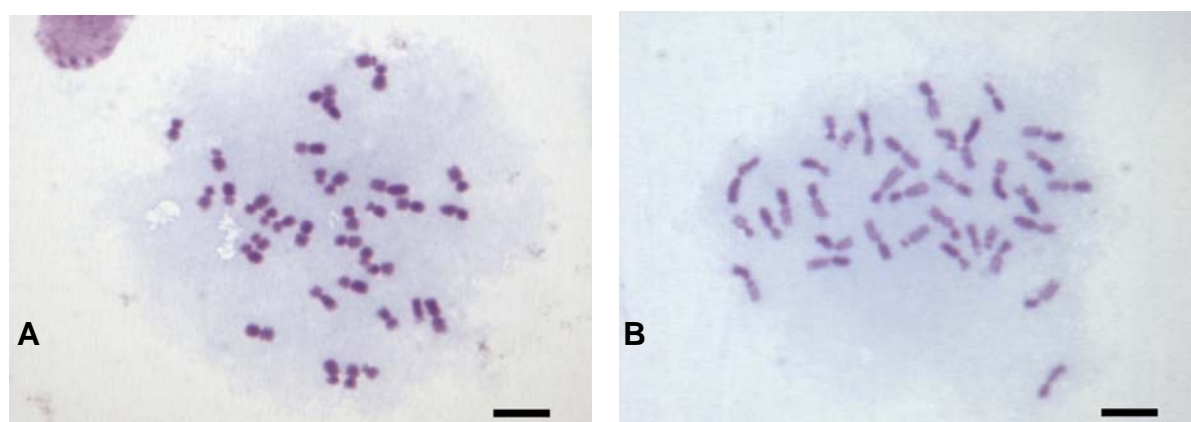


Figura 2: Cromossomos metafásicos de *P. cupira* (colônias GUI 1 [A] e GUI 11 [B], respectivamente) corados com Giemsa ($2n=35$). Barra $5\mu\text{m}$. As setas indicam a presença de cromossomo B.

O cromossomo B detectado nas duas colônias de *P. cupira* analisadas no presente trabalho apresentou um tamanho consideravelmente grande, em relação aos cromossomos Bs de *P. helleri* detectados por COSTA *et al.* (1992) e por TOSTA *et al.* (1999). Cromossomos Bs de grande tamanho ou mesmo de tamanhos variáveis, entretanto, já haviam sido detectados em colônias de *P. helleri* da Bahia (MARTINS *et al.*, 2005; MARTINS *et al.*, 2007).

A coloração com CMA₃ evidenciou a presença de uma marcação no braço curto do cromossomo B de indivíduos da colônia GUI 1 (Figura 3), mostrando o predomínio de bases CG na mesma. Isto sugere que este cromossomo possa conter sítios de sequências de DNA ribossomal, uma vez que, geralmente, existe uma associação entre a presença destes e marcações de CMA₃ na mesma região do cromossomo (SUMNER, 1990). Tal fato já foi observado em *Trypoxylon albitarse* (ARAÚJO *et al.*, 2000), *Plebeia* (MAFFEI *et al.*, 2001), *Friesella schrottkyi* (MANPUMBU, 2002), *M. compressipes* (ROCHA, 2002), *Partamona peckolti* (BRITO *et al.*, 2003), *P. seridoensis* (BRITO *et al.*, 2005), *P. helleri* (BRITO 1998; MARTINS *et al.*, 2007 & MARTINS, 2008) e *P. rustica* (MARTINS, 2008).

A presença dessas seqüências em cromossomo B não é algo novo. TOSTA (2005) aplicando a técnica de FISH através de sondas de DNA ribossomal de *Drosophila melanogaster*, identificou regiões nos cromossomos B de *P. helleri*, que poderiam, potencialmente, ser sítios de NOR. MARTINS (2008), por meio de banda NOR, identificou regiões organizadoras de nucléolo em sete tipos de cromossomos B. A presença de seqüências gênicas que codificam rRNA em cromossomos B das plantas *Crepis capillaris* (JAMILENA *et al.* 1994) e *Brachycome dichrosomatica* (DONALD *et al.*, 1995) também já foi verificada. Também foram detectados genes envolvidos na organização de nucléolo (NOR) nos cromossomos B do gafanhoto *Eyprepocnemis plorans* (CABRERO *et al.*, 1987) e a expressão de genes de rDNA em cromossomos B de *Trichogramma kaykai* (VAN VUGT *et al.*, 2005) e *Crepis capillares* (LEACH *et al.*, 2005).

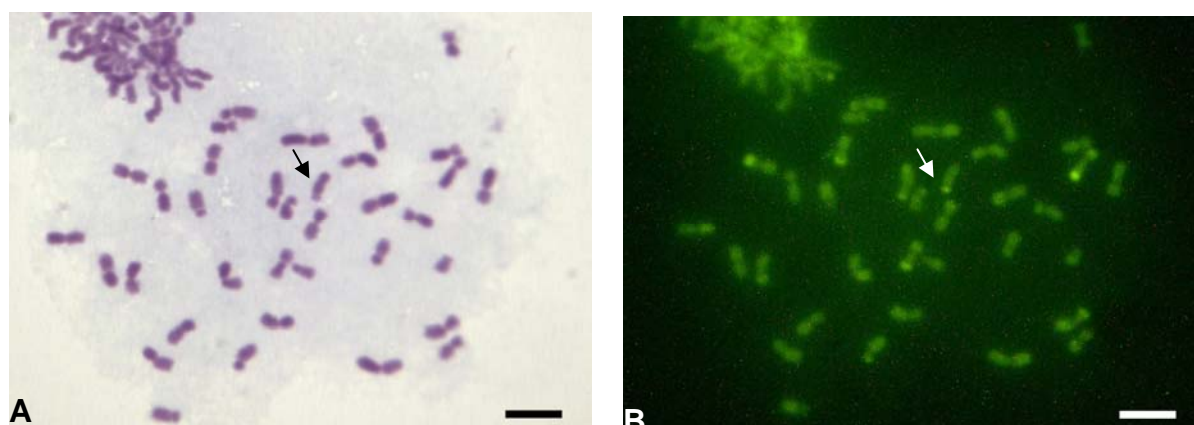


Figura 3: Cromossomos metafásicos de *P. cupira* (Colônia GUI 1) corados com Giemsa (A) e com CMA₃ (B). (2n=35). Barra = 5 µm. A seta indica a presença de B.

No presente trabalho, entretanto, não foi possível reproduzir a técnica de impregnação pela prata, para evidenciação das regiões organizadoras de nucléolo em *P. cupira* e verificar se havia sobreposição desta com a região marcada com CMA₃. Esta técnica, porém, já foi utilizada, com sucesso, em *P. helleri* (MARTINS *et al.*, 2007 & MARTINS 2008), o que sugere que uma adequação do protocolo utilizado por estes autores poderá, em um futuro próximo, responder esta questão. Alternativamente, a presença de regiões organizadoras de nucléolo nos cromossomos B de *P. cupira* poderá ser verificada utilizando-se hibridização *in situ*, com sondas fluorescentes de rDNA ou realizar o isolamento, por microdissecção, desta região do cromossomo extranumerário de *P. cupira*.

4.2 - Associação entre a presença de cromossomos B em *P. cupira* e o marcador SCAR, específico para a seqüência presente nos cromossomos B de *P. helleri*

Após a detecção de um cromossomo B em alguns indivíduos das colônias GUI 1 e GUI 11, realizou-se a amplificação do DNA destes indivíduos com “primers” SCAR de *P. helleri* para verificar se havia associação entre a presença destes cromossomos e o marcador SCAR, também em *P. cupira*. Estas análises demonstraram a presença do marcador SCAR nos 11 indivíduos da colônia GUI 1, assim como nos 3 indivíduos da colônia GUI 11 que apresentaram cromossomos Bs (Tabela 1 e Figuras 4 e 5, respectivamente). Por outro lado, não se detectou a presença do marcador em nenhum dos indivíduos das colônias GUI 2 e GUI3, nas quais não se detectou a presença de cromossomos Bs.

Percebe-se assim, que existe uma clara associação entre a presença do marcador SCAR e a presença de cromossomo B, também em *P. cupira*. Entretanto, verificou-se que alguns indivíduos da colônia GUI 1 que não apresentavam cromossomos Bs apresentaram uma banda fraca, de tamanho aproximado àquele do marcador SCAR detectável em indivíduos que possuíam cromossomos B (Figura 4).

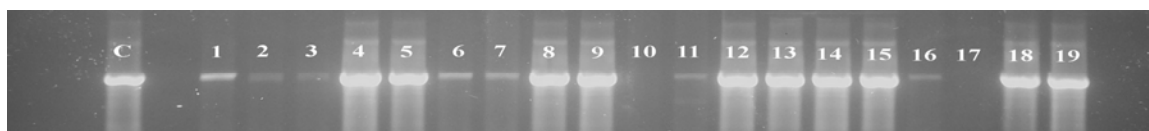


Figura 4: Padrão eletroforético do DNA genômico de indivíduos de *P. cupira* (colônia GUI 1) amplificados com os primers SCAR. Indivíduos sem (2, 3, 6, 7, 10, 11, 16, 17) e com cromossomo B (1, 4, 5, 8, 9, 12, 13, 14, 15, 18, 19). C é um indivíduo de uma colônia de *P. helleri* que possui cromossomo B, tendo sido usado como controle.

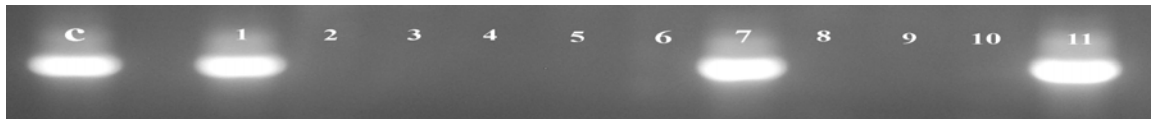


Figura 5: Padrão eletroforético do DNA genômico de indivíduos de *P. cupira* da colônia GUI 11 amplificados com os primers SCAR. Indivíduos sem (2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10) e com cromossomo B (1, 7 e 11). C é um indivíduo de uma colônia de *P. helleri* que possui cromossomo B, tendo sido usado como controle.

Para verificar o que estas bandas fracas realmente representavam sequenciou-se as marcas presentes nos indivíduos 1, 4, 5 (que possuíam o cromossomo B e o marcador SCAR bem nítido) e 2 (que não possuía o cromossomo B e apresentou a banda SCAR bem fraca) da colônia GUI 1 (Figura 4). A comparação entre as seqüências dos indivíduos 1, 4 e 5 e a seqüência padrão de *P. cupira*, que foi utilizada na comparação com *P. helleri* (ver abaixo), evidenciou ter uma alta identidade entre elas (Figura 7 do Anexo 1). Por outro lado, a seqüência do indivíduo 2 aparentou ter uma baixa identidade em relação à seqüência padrão. Estes resultados evidenciam que a marca presente no indivíduo 2 é uma marca inespecífica e demonstram, mais uma vez, a associação entre o marcador SCAR e cromossomo B em *P. cupira*.

4.3 - Comparação entre as seqüências do marcador SCAR de *P. helleri* de Viçosa/MG e Salvador/BA, *P. cupira*, *P. criptica* e *P. rustica*

As seqüências do marcador SCAR obtidas para *P. helleri* (Salvador-BA), *P. cupira*, *P. criptica* e *P. rustica* em comparação com aquela de *P. helleri* (Viçosa-MG) (TOSTA *et al.*, 2007) apresentaram distância genética zero, usando como critério o método de p distance (Nucleotídio) (Figura 6) (NEI & KUMAR, 2000).

Estas seqüências possuem poucos “gaps” e quase nenhum sítio variável entre elas. A composição média de bases A e T das mesmas é de 65,4%, valor bem próximo àquele verificado para a seqüência de *P. helleri* (66,5% - TOSTA, 2005). Levando-se em conta este resultado, sugere-se que essas marcas também estejam associadas com a presença de cromossomos Bs em *P. rustica* e em *P. criptica*. Estudos citogenéticos poderão comprovar esta hipótese.

O alto nível de identidade destas seqüências chama a atenção porque *P. helleri* é uma espécie parafilética em relação a *P. cupira*, *P. criptica* e *P. rustica* (CAMARGO & PEDRO, 2003).

Assim, apesar de não existirem dados de relógio molecular que possam dizer a quanto tempo aproximadamente estas espécies de *Partamona* estão separadas, pode ser possível que estas seqüências, considerando sua alta similaridade, tenham alguma função adaptativa relacionada a manutenção do cromossomo B. Por outro lado, apesar das diferenças morfológicas

(CAMARGO & PEDRO, 2003), pode ser que estas espécies não sejam tão distantes em termos genéticos e que, portanto, não exista um isolamento genético completo entre as mesmas, o que poderia levar a troca de material genético entre elas e explicaria a presença de seqüências tão semelhantes. O fato de elas possuírem o mesmo número cromossômico poderia, de alguma forma, facilitar tal troca. Assim, pode-se sugerir que os cromossomos Bs de *P. helleri* e *P. cupira* podem ter migrado de uma espécie para outra, ou vice versa, por cruzamento interespecífico.

<i>P. helleri</i> (MG)	5'	CCCGCTACAC	ATATAATTAA	CGTATAACGG	TTTCTAATAG	ATCTCTTTTC	CCCAAAAGTA	ATTATGAAGA	GTAACAGAAT	80
<i>P. helleri</i> (BA)	5'C. A.....	80
<i>P. cupira</i>	5'C. A.....	80
<i>P. criptica</i>	5'C. A.....	80
<i>P. rustica</i>	5'C. A.....	80
<i>P. helleri</i> (MG)		TGTAGAAGAA	AAAATAATTT	GGAGTACTGA	ATAATTGAG	CTGCCAGTGT	GAAAGATAGG	ATTGAATCCA	ATCATATATG	160
<i>P. helleri</i> (BA)		160
<i>P. cupira</i>		160
<i>P. criptica</i>		160
<i>P. rustica</i>		160
<i>P. helleri</i> (MG)		AAATCACAGT	GAAGGAGAGA	GAAAAGAGAC	CGATCCTATA	TGATATAGAT	GATATAGATG	ATATAGATAA	TCAAAATTAA	240
<i>P. helleri</i> (BA)		240
<i>P. cupira</i>		240
<i>P. criptica</i>		240
<i>P. rustica</i>		240
<i>P. helleri</i> (MG)		CAATTAAAC	ATTAACGAAT	CGATTGAATC	AGCTAGCAGA	AGCTGAATAA	TTAAATGAAA	GGCAAGATA	CGAGCAGACA	320
<i>P. helleri</i> (BA)		320
<i>P. cupira</i>		320
<i>P. criptica</i>		320
<i>P. rustica</i>		320
<i>P. helleri</i> (MG)		GAACAACAAC	GATGACTACA	GTCGAGCAAG	TCAAATACAG	TTGAATATTT	TATCTGAGTC	ACTCATTGTC	ATTCAATCTT	400
<i>P. helleri</i> (BA)	C	400
<i>P. cupira</i>		400
<i>P. criptica</i>		400
<i>P. rustica</i>		400
<i>P. helleri</i> (MG)		CCTAACTGCT	GTTTATTACC	ACTCACATAT	ACATTCATTA	ATGTATGAAA	ATTTGTAAAG	ATATCCAGAC	CGTCTGGAA	480
<i>P. helleri</i> (BA)		480
<i>P. cupira</i>		480
<i>P. criptica</i>		480
<i>P. rustica</i>		480
<i>P. helleri</i> (MG)		AA-GTATGAT	CATGGAAGGT	ACATAAGTAC	TGGCCATACC	ACAAATCTGA	CAAGTAGGTG	CTCGTATACA	TATCCGTCGG	560
<i>P. helleri</i> (BA)		560
<i>P. cupira</i>		560
<i>P. criptica</i>		..A.....	560
<i>P. rustica</i>		560
<i>P. helleri</i> (MG)		TTATGTACAT	GTGTATTTAA	TTTAATTTTT	TCGTTTCAGA	AAATATACCA	ATCCTGTCAG	TCAATCTTTT	TAACCATTGA	640
<i>P. helleri</i> (BA)		640
<i>P. cupira</i>		640
<i>P. criptica</i>		640
<i>P. rustica</i>		640
<i>P. helleri</i> (MG)		TTATTTCTTC	TCTTTTACAG	CACTCTCCT	ATATTTAAAT	TCAGTTAAAA	CTGCGCTTAC	AGATATTCTC	AATGTAATAT	720
<i>P. helleri</i> (BA)		720
<i>P. cupira</i>	G.....	720
<i>P. criptica</i>	G.....	720
<i>P. rustica</i>	G.....	720
<i>P. helleri</i> (MG)		CGGTTTATAT	TGCGACCGTT	AAAGACAACA	AGTACCGCCT	GCATAGATGG	CTGTATAGGT	GTTTCGAGAA	GTTGGAATGT	800
<i>P. helleri</i> (BA)		800
<i>P. cupira</i>		800
<i>P. criptica</i>		800
<i>P. rustica</i>		800
<i>P. helleri</i> (MG)		CGTTGATGTA	CAATATGAAG	AGAAGCGGAG	CAAGTATGGA	TCCTTCTAGT	ACCTCTGTTA	TAAGGTTTCT	TTATGATTGA	880
<i>P. helleri</i> (BA)		880
<i>P. cupira</i>		880
<i>P. criptica</i>		880
<i>P. rustica</i>		880

P. helleri (MG)	TGTGTGACTA	TTTAGAATAT	CTCGTGCAGA	CCTAGAATT	CCTGTTTTAA	CTGATGATT	TATTGATGTA	TGTAGCCGGT	960
P. helleri (BA)	960
P. cupira	960
P. criptica	960
P. rustica	960
P. helleri (MG)	ATATTTATTT	ACCGCAATTT	AGTTAGAAAG	ACATTGTGCC	AGACGTAGGT	TTTTTTTATA	GGTTCAGGAA	GATGAGATGT	1040
P. helleri (BA)	1040
P. cupira	1040
P. criptica	1040
P. rustica	1040
P. helleri (MG)	GTTAGTCAGA	TCTGTTATTT	TTTATTACAG	TGCGTCTGT	GAAACTTTAT	AATTGCTGAG	TGCATGAGTT	TAGATCTGAA	1120
P. helleri (BA)	1120
P. cupira	1120
P. criptica	1120
P. rustica	1120
P. helleri (MG)	TTGTGGCGAG	ACTATTATTC	TGGAGTTACT	TAGTTGGATG	AGAAAGTGAA	CGTGGATGAT	TTTAACTACT	TTTCTTAGGA	1200
P. helleri (BA)	1200
P. cupira	1200
P. criptica	1200
P. rustica	1200
P. helleri (MG)	TGTCTAGTAG	GCTAATTGAT	TTGTAATTGG	AAACAGATAT	TGGTATTGGA	CTTATGGGTA	TTCTTGGCTT	TGTATTGAA	1280
P. helleri (BA)	1280
P. cupira	1280
P. criptica	1280
P. rustica	1280
P. helleri (MG)	CTTATTTTTG	CTTCTTTCCA	AGCTGCGGGA	AAGTATGAAA	GTTTCAGATG	GGTTTTGAAT	ATGTATAAAA	TTGCACAAT	1360
P. helleri (BA)	1360
P. cupira	1360
P. criptica	1360
P. rustica	1360
P. helleri (MG)	GGGTTCGGAT	GGAAGCATT	TAATCTGTGG	CTGTGATTTT	GTCCACGTGC	TTAATGAAGA	GATT-CTTGA	TTATGTCTCT	1440
P. helleri (BA)	1440
P. cupira	1440
P. criptica	1440
P. rustica	1440
P. helleri (MG)	TATCATTTAT	GGAGTGCAGT	TTGGCATATT	TTAGGGTGTA	GCGGG3'				1485
P. helleri (BA)3'				1485
P. cupira3'				1485
P. criptica3'				1485
P. rustica3'				1485

Figura 6: Comparação de seqüências do marcador SCAR de *P. helleri* (Viçosa-MG), *P. helleri* (Salvador-BA), *P. cupira*, *P. criptica*, e *P. rustica*. As seqüências em vermelho e azul correspondem aos "primers" A e B do marcador SCAR respectivamente. As seqüências em verde e roxo correspondem aos "primers" internos R e F, respectivamente.

Neste sentido, os trabalhos de DOBSON & TANOUYE (1998) com *Nasonia*, já demonstraram que cromossomos Bs podem migrar de uma espécie para uma outra dentro do mesmo gênero. PERFECTTI & WERREN (2001) também já demonstraram que é possível gerar cromossomos Bs como foi mostrado no cruzamento de *N. vitripennis* e *N. giralti*, onde um fragmento gênico dessa última foi introduzido em *N. vitripennis*, passando a se comportar como cromossomo B.

McALLISTER & WERREN (1997) analisando a presença de seqüências do transposon NATE de PSR de *Nasonia vitripennis* em outras espécies, verificaram, por meio de filogenia molecular, evidências de que o PSR foi recentemente transferido de uma espécie do gênero *Trichomalopsis*.

A detecção do marcador SCAR em uma colônia de *P. helleri* de Salvador/BA (MARTHE et al., 2007) que possui um grande cromossomo B heterocromático (MARTINS et al., 2005), somada

à associação deste marcador com a presença de cromossomo B em *P. cupira*, verificada neste trabalho, reforçam a hipótese de que os cromossomos Bs podem ter origem interspecífica. Entretanto, estudos filogenéticos e filogeográficos (nos quais poderão ser vislumbrados os processos de vicariância espaço-temporal e o fluxo gênico entre as espécies relacionadas) se fazem necessários para confirmar tal hipótese.

Outra abordagem que poderia ajudar a esclarecer a origem dos cromossomos B no gênero *Partamona* é a demonstração da localização precisa destas seqüências no genoma das respectivas espécies, a qual pode ser feita empregando-se a técnica de FISH. BASSETO (2007) em seu estudo sobre cromossomos B do peixe *Astyanax scabripinnis* identificou dois marcadores RAPD associados à Bs que, transformados em sondas, apresentaram homologia tanto com cromossomos B, quanto com regiões do complemento normal. Apesar de TOSTA (2005) não ter obtido sucesso ao tentar transformar o marcador SCAR em sonda, é possível que ocorra um resultado diferente em *P. cupira*, sendo por isso uma estratégia que não pode ser descartada.

A microdissecção dos cromossomos B de *P. helleri* e *P. cupira* também pode levar à obtenção de sondas específicas que poderão facilitar o estudo sobre a origem dos cromossomos B no gênero *Partamona*. Vários trabalhos já empregaram esse tipo de metodologia, demonstrando que dependendo do organismo, o cromossomo B pode ter origem intra-específica (JAMILINA *et al.*, 1995), interspecífica (TRIFONOV *et al.*, 2002, BUGROV *et al.*, 2003) ou ambas as origens (KARAMYSHEVA *et al.*, 2002; THEURI *et al.*, 2005). Também é necessário que estes fragmentos de B, isolados por microdissecção, sejam sequenciados. Isto não só reforçaria a hipótese da relação entre os cromossomos B de *P. helleri* e *P. cupira*, como poderia ser usado para buscas comparativas de sequencias de identidades próximas nos bancos de dados disponíveis.

6 - Referências Bibliográficas

- ALFENITO, M. R. & BIRCHLER, J. A. (1993). Molecular characterization of a maize B chromosome centric sequence. **Genetics**, **135**: 589-597.
- ARAÚJO, S. M. R, POMPOLO, S. G, DERGAM, J. A & CAMPOS, L. A. O. (2000). The B chromosome system of *Trioxylon (trypargilum) albitarse* (Hymenoptera, Sphecidae). 1. Banding analysis. **Cytobios** **101**: 7-13.
- BAKKALI, M. & CAMACHO, J. P. M. (2004). The B chromosome polymorphism of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* in North Africa III. Mutation rate of B chromosomes. **Heredity** **92**: 428-433.
- BASSETO, L. C. Q. C. (2007). Identificação de marcadores de DNA associados à presença de cromossomos B em *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae). Botucatu: UNESP. **Tese** (Doutorado em Ciências Biológicas, área de concentração: genética). Universidade Estadual Paulista.
- BEUKEBOOM, L. W. (1994). Bewildering Bs: an impression of the 1st 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*. **Chrom. Res.**, **8**: 185-188.
- 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). **Bras. J. Genet.**, **20**: 185-188.
- BRITO, R. M. (1998). Caracterização citogenética de duas espécies do gênero *Partamona* Schwarz (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). Viçosa: UFV. **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* (Friese, 1980) (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) in Mato Grosso State, Brazil. **Cytobios**, **100**: 19-26.
- BRITO, R. M., CAIXEIRO, A. P. A., POMPOLO, S. G., & AZEVEDO, G. G. (2003) Cytogenetic data of *Partamona peckolti* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) by C banding and fluorochrome staining with DA/CMA₃, And DA/DAPI. **Gen. Mol. Biol.** **26**: 53-57.
- BRITO, R. M., POMPOLO, S. G., MARTINS, M. F., BARROS, E. G. HOJO, E. T. S. (2005). Cytogenetic characterization of two *Partamona* species (Hymenoptera, Apinae, Meliponini) by fluochrome staining and localization of 18 rDNA clusters by FISH. **Cytologia**, **70**: 4373-4380.
- BUGROV, A. G., KARAYSHEVA, T. V., PYATKOVA, M. S., RUBTSOV, D. N., ANDREENKOVA, O. V., WARCHALOWSKA-SLIWA, E. & RUBTSOV, N. B. (2003). B Chromosomes of the *Podisma sapporensis* Shir. (Orthoptera, Acrididae) Analysed by Chromosome Microdissection and FISH. **Folia biol (Kraków)**, **51**: 1-11.
- CABRERO, J., ALCHE, J. D. & CAMACHO, J. P. M. (1987). Effects of 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.
- CAMARGO, J. M. F. & PEDRO, S. R. M. (2003). Meliponini neotropicais: o gênero *Partamona* Schwarz, 1939 (Hymenoptera, Apidae, Apinae). **Rev. Bras. Entom.** **47(3)**: 311-372.
- COSTA, M.A., POMPOLO, S. G & CAMPOS, L. A. O. (1992). Supernumerary chromosomes in *Partamona cupira* (Hymenoptera, Apidae Meliponinae). **Rev. Bras. Genet.**, **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.
- DOBSON, S. L. & TANOUYE, M. A. (1998). Interspecific movement of paternal sex ratio chromosome. **Heredity**, **81**: 261-269.

- 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.
- EWING, B. & GREEN, P. (1998a). Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Gen. Research** **8**: 186-194.
- EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C. & GREEN, P. (1998b) Base-calling of automatedsequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Gen. Res.**, **8**: 175-185.
- 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.
- GORDON, D., ABAJIAN, C., & GREEN, P. (1998). Consed: A graphical tool for sequence finishing. **Gen. Res.**, **8**: 195-202.
- GORDON, D., DESMARAIS, C., & GREEN, P. (2001). Automated Finishing withAutofinish. **Gen. Res.**, **11(4)**: 614-625.
- GUTKNECHT, J., SPERLICH, D. & BACHMANN, L. A. (1995). A species specific satellite DNA family of *Drosophila subvivestris* 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., BELYAEV, N. D., LEACH, C. R. & TIMMIS, J.N. (1997). Differences of histone H4 acetylation and replication timing between A e B chromosomes of *Brachycome dichromosomatica*. **Chrom. Res.**, **5**: 233-237.
- HOUBEN, A., THOMPSON, N., AHNE, R., LEACH, C. R, VERLIN, D. & TIMMIS, J. N. (1999). A monophyletic origen of the B chromosomes of *Brachycome dichromosomatica* (Asteraceae). **Plant Syst. Evol.**, **219**: 127-135.
- IMAI, H. T., TAYLOR, R. W., CROZIER, R. H. (1988) Modes of spontaneous chromosomal mutation and karyotype evolution in ants with reference to the minimun interaction hypotesis. **Japn. J. Genet.** **63**: 159-185.

- INOUE, H., NOJIMA, H. & OKAYAMA, H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli*. **Gene** **96**: 23-28.
- JAMILENA, M., REJÓN, M. R. & REJÓN, C. R. (1994). A molecular analysis of the origin of the *Crepis capillaries* B chromosome. **J. Cell Sci.**, **107**: 703-708.
- JAMILENA, M., GARRIDO-RAMOS, M., REJÓN, M. R., REJÓN, C. R. & PARKER, J. S. (1995). Characterization of repeated sequences from microdissected 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.
- KARAMYSHEVA, T. V., ANDREENKOVA, O. V., BOCHKAEREV, M. N., BORISSOV, Y. M., BOGDANCHIKOVA, N., BORODIN, P. M. & RUBTSOV, N. B. (2002) B chromosomes of Korean field mouse *Apodemus peninsulae* (Rodentia, Murinae) analysed by microdissection and FISH. **Cytogenet Gen Res.**, **96**: 154-160.
- KAVALCO, K. F., PAZZA, R. A. (2004) Rapid alternative technique for obtaining silver-positive patterns in chromosomes. **Genet. Mol. Biol.**, **27**: 196-198
- 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.
- LEACH, C. R., HOUBEN, A., FIELD, B., PISTRICK, K., DEMIDOV, D. & TIMMIS, J. N. (2005). Molecular Evidence for Transcription of Genes on a B Chromosome in *Crepis capillaris*. **Genetics**, **171**: 269-278.
- MAFFEI, E. M. D., SILVA-Jr, J. C., CAIXEIRO, A. P. A., ROCHA, M. P. & DERGAM, J. A. (2001). Silver staining of nucleolar organizer regions (NORs) in some species of Hymenoptera (bees and parasitic wasps) and Coleoptera (lady beetle). **Cytobios** **104**:109-125.

- MAMPUMBU, A. R. (2002). Análise citogenética da heterocromatina e da NOR em populações de abelhas sem ferrão *Friesella schrottkyi* (Friese, 1900) (Hymenoptera: Apidae, Meliponini). Campinas: Unicamp. **Dissertação** (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) – Universidade Estadual de Campinas.
- MARTHE, J. B., WALDSCHMIDT, A. M., TAVARES, M. G., CAMPOS, L. A. O. (2007). Detecção do marcador SCAR de cromossomo B de *Partamona helleri* (Hymenoptera/Apidae) em colônias de *Partamona* do norte de Minas Gerais e da Bahia. In: 53^o Congresso Brasileiro de Genética, 2007, Águas de Lindóia – SP: 53^o Congresso Brasileiro de Genética, 2007.
- MARTINS, C. C. C., DUARTE, O. M. P., SANTANA, S. E. A., DOMINGUES, A. M. T., COSTA, M. A., ALVES, R. O., SILVIA JUNIOR, J. C., WALDSCHMIDT, A. N. (2005) Caracterização citogenética da abelha sem ferrão *Partamona rustica*, Pedro & Camargo, 2003 (Hymenoptera, Meliponina) In: 51^o Congresso Brasileiro de Genética, 2005, Águas de Lindóia-SP. 51^o-Congresso Brasileiro de Genética, 2005.
- MARTINS, C. C. C., DUARTE, O. M. P., CARVALHO-FILHO, A. F., ALVES, R. O., WALDSCHMIDT, A. M. & COSTA, M. A. (2007). Ocorrência de cromossomos supranumerários em *P. helleri* (Friese 1900) na região da Bahia (Hymenoptera, Apidae, Meliponina) In: 53^o Congresso Brasileiro de Genética, 2007, Águas de Lindóia - SP. 53^o Congresso Brasileiro de Genética, 2007. p. 61.
- MARTINS, C. C. C. (2008). Caracterização citogenética em *Partamona helleri* (Friese, 1900) e *Partamona rustica* (Pedro e Camargo 2003) (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). Ilhéus: UESC. **Dissertação** (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Santa Cruz.
- 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 system in the greater glider, *Petauroides volans* (Marsupialia; Pseudocheiridae) – II investigation of B-chromosome DNA sequences isolated by micromanipulation and PCR. **Cytogen. Cell Gen.**, **66**: 155-161.
- NEI, M. & KUMAR, S. (2000). MOLECULAR EVOLUTION AND PHYLOGENETICS. **Oxford University Press, New York**: 33

- 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 acabripinnis* (Pisces, Characidae) **Genetica**, **108**: 211-215.
- 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). **Chrom. Res**, **5**: 475-479.
- PERFECTTI, F. & WERREN, J. H. (2001). The interspecific origin of B chromosomes: Experimental Evidence. **Evolution**, **55**: 1069-1073.
- ROCHA, M. P. (2002). Análises citogenéticas em abelhas do gênero *Melipona* (Hymenoptera, Meliponinae). Campinas: Unicamp **Tese** (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural) – Universidade Estadual de Campinas.
- SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A. R. (1977) DNA sequence with chain-terminating inhibitors. **Proceed. of the Nat. Acad. of Sci. USA**, **74**: 5463-5467.
- SAPRE, A. B. & DESPHANDE, D. S. (1987). Origin of B chromosomes in Coix 1 through spontaneous interespecific hybridization. **J. Hered.**, **78**: 191-196.
- SCHWEIZER, D. (1980). Simultaneous fluorescent staining of R bands in a specific heterochromatin regions (DA/DAPI – bands) in human chromosomes. **Cytogenet. Cell Genet.**, **27**: 190-193.
- SHARTL, M., NANDA, I., SCHLUPP, I., WILDE, B., EPPLEN, 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, L., BENNETT, S. T., BARNES, S. R., PARKER, J. S. & FORSTER, J. W. (1996). Molecular analysis of the structure of maize B-chromosome. **Chrom. Res.**, **4**: 15-23.
- SUMNER, A. T. (1990). Chromosome Banding. **Published by The Academic Division of Unwin Hyman Ltd**: 188

- TAMURA, K., DUDLEY J., NEI, M. & KUMAR, S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Mol. Biol. and Evol.**, **24**: 1596-1599.
- THEURI, J., PHELPS, T., MATHEWS, S. & BIRCHLER, J. (2005). A comparative study of retrotransposons in the centromeric regions of A and B chromosomes of maize. **Cytogenet. Gen. Res.**, **110**: 203-208.
- TOSTA, V. C., WALDSCHMIDT, A. M., BRITO, R. M., POMPOLO, S. G., SALOMÃO, T. M. F., BARROS, E. G. & CAMPOS, L. A. O. (1998). Marcadores RAPD ligados a presença de cromossomos supramerários em *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae). **Genet. Mol. Biol.**, **21** (Suppl): 83.
- TOSTA, V. C., WALDSCHMIDT, A. M., GOOD-GOD, P. I. V., POMPOLO, S. G., BARROS, E. G. & CAMPOS, L. A. O. (1999). Uso de marcadores moleculares para o estudo de cromossomos supranumerários em *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Genet. Mol. Biol.**, **22** (Suppl): 182.
- TOSTA, V. C. (2001). Marcador Molecular associado a cromossomos B em *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae). Viçosa: UFV. **Dissertação** (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa.
- TOSTA, V. C. (2005). Análise da origem molecular dos cromossomos B e de seus possíveis efeitos fenotípicos em *Partamona helleri* (Hymenoptera/Apidae). Viçosa: UFV. **Tese** (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa.
- TOSTA, V. C. ; TAVARES, M. G. ; FERNANDES, A. ; BARROS, E. G. ; CAMPOS, L. A. O. ; CAMACHO, J. P. M. (2007) . Development of a SCAR marker for the analysis of B chromosome presence in *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae). **Cytogen. Gen. Res.**, **116**: 100-105, 2007.
- TRIFONOV, V. A., PERELMAN, P. L., KAWADA, S. I., IWASA, M. A., ODA, S. I. & GRAPHODATSKY, A. S. (2002). Complex structure of B-chromosomes in two mammalian species: *Apodemus peninsulae* (Rodentia) and *Nyctereutes procyonoides* (Carnivora). **Chrom. Res.**, **10**: 109-116.

- VAN VUGT, J. J. F. A., DE NOOIJER S., STOUTHAMER, R. & DE JONG, H. (2005). NOR activity and repeat sequences of the paternal sex ratio chromosome of the parasitoid wasp *Trichogramma kaykai*. **Chromosoma**, **114**: 410-119.
- 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). **Braz. J. Genet.**, **20**: 421-423.
- WILKES, T. M., FRANCKI, M. G., LANGRICGE, P., KARP, A., JONES, R. N. & FORSTER, J. W. (1995). Analysis of rye B-chromosome structure using fluorescence in situ hybridization (FISH). **Chrom. Res.**, **3**: 466-472.
- ZHANG, R. X., CHEN, C. B., SONG, W. Q., L. I. & CHEN, R. Y. (1999). Homologous analysis on centromeric region sequences of A and B chromosomes from rye by FISH. **Chin. Sci. Bullet.**, **44**: 704-707.

Anexo 1

Partamona cupira	5'	CCCGCTACAC	ATATAATTAA	CGTTAACGGT	TTCTAATAGA	TCTCTTTCCA	CCAAAAGTAA	TTATGAAGAG	TAACAGAATT	80
Individuo 1	5'	80
Individuo 4	5'	80
Individuo 5	5'	80
Partamona cupira		GTAGAAGAAA	AAATAATTG	GAGTACTGAA	TAATTTGAGC	TGCCAGTGTG	AAAGATAGGA	TTGAATCCAA	TCATATATGA	160
Individuo 1		160
Individuo 4		160
Individuo 5		160
Partamona cupira		AATCACAGTG	AAGGAGAGAG	AAAAGAGACC	GATCCTATAT	GATATAGATG	ATATAGATGA	TATAGATAAT	CAAAATTAAC	240
Individuo 1		240
Individuo 4		240
Individuo 5	C.A.	240
Partamona cupira		AATTTAAAACA	TTAACGAATC	GATTGAATCA	GCTAGCAGAA	GCTGAATAAT	TAAATGAAAG	GGCAAGATAC	GAGCAGACAG	320
Individuo 1		320
Individuo 4		320
Individuo 5	C.G.A.	320
Partamona cupira		AACAACAACG	ATGACTACAG	TCGAGCAAGT	CAAATACAGT	TGAATATTTT	ATCTGAGTCA	CTCATTGTCA	TTCAATCTTC	400
Individuo 1		400
Individuo 4	C.A.	400
Individuo 5		400
Partamona cupira		CTAACTGCTG	TTTATTACCA	CTCACATATA	CATTCATTAA	TGTATGAAAA	TTTGTAAGA	TATCCAGACC	GTCTTGAAA	480
Individuo 1		480
Individuo 4		480
Individuo 5		480
Partamona cupira		AGTATGATCA	TGGAAGGTAC	ATAAGTACTG	GCCATACCAC	AAATCTGACA	AGTAGGTGCT	CGTATACATA	TCGTCGGTT	560
Individuo 1		560
Individuo 4		560
Individuo 5		560
Partamona cupira		ATGTACATGT	GTATTTAATT	TAATTTTTTT	CGTTCAGAAA	ATATACCAAT	CCTGTCAGTC	AATCTTTTAA	ACCATTGATT	640
Individuo 1		640
Individuo 4		640
Individuo 5		640
Partamona cupira		ATTTCTTCTC	TGTTACAGCA	ACTCTCCTAT	ATTTAAATTC	AGTTAAAAC	GCGCTTACAG	ATATTCTCAA	TGTAATATCG	720
Individuo 1		720
Individuo 4	A.	720
Individuo 5		720
Partamona cupira		GTTTATATTG	CGACCGTTAA	AGACAACAAG	TACCGCCTGC	ATAGATGGCT	GTATAGGTGT	TTCGAGAAGT	TGGAATGTCTG	800
Individuo 1		800
Individuo 4		800
Individuo 5		800
Partamona cupira		TTGATGTACA	ATATGAAGAG	AAGCGGAGCA	AGTATGGATC	CTTCTAGTAC	CTCTGTTATA	AGGTTTCTTT	ATGATTGATG	880
Individuo 1		880
Individuo 4		880
Individuo 5		880
Partamona cupira		TGTGACTATT	TAGAATATCT	CGTGCAGACC	TAGAATTTCC	TGTTTTAACT	GATGATTTTA	TTGATGTATG	TAGGCGGTAT	960
Individuo 1		960
Individuo 4		960
Individuo 5		960
Partamona cupira		ATTTATTTAC	CGCAATTTAG	TTAGAAAGAC	ATTGTGCCAG	ACGTAGGTTT	TTTTTATAGG	TTCAGGAAGA	TGAGATGTGT	1040
Individuo 1		1040
Individuo 4		1040
Individuo 5		1040
Partamona cupira		TAGTCAGATC	TGTTATTTTT	TATTACAGTG	CGTTCGTGTA	AACTTTATAA	TTGCTGAGTG	CATGAGTTTA	GATCTGAATT	1120
Individuo 1		1120
Individuo 4		1120
Individuo 5		1120
Partamona cupira		GTGGCGAGAC	TATTATTCTG	GAGTTACTTA	GTTGGATGAG	AAAGTGAACG	TGGATGATT	TAACTACTTT	TCCTAGGATG	1200
Individuo 1		1200
Individuo 4		1200
Individuo 5		1200
Partamona cupira		TCTAGTA-GG	CTAATTGATT	TGTAATTGGA	AACAGATA-T	TGGTATTGGA	CTTA-TGGGT	ATTCTT-GGC	TTTGGTATTG	1280
Individuo 1	-..G.---	1280
Individuo 4	-G.---	1280
Individuo 5	C.A.C.C.	1280
Partamona cupira		AACTTATTTT	TGCTTCTTTC	CAAGCTGC--	-GGGAAAGTA	TGAAAGTTTC	AGATGGGTTT	TGAATATGTA	TAAAATTTGC	1360
Individuo 1	---	1360
Individuo 4	---	1360
Individuo 5	CC.ACGA.AT.T.G.	1360

Partamona cupira	ACAATGGGTT	CGGATGGAAG	CATTTAATC	TGTGGCTGTG	ATTTGTCCA	CGTGCTTAAT	GAAGAGATTC	TTGATTATGT	1440
Individuo 1	1440
Individuo 4	1440
Individuo 5	1440
Partamona cupira	CTCTTATCAT	TTATGGAGTG	CAGTTTGCCA	TATTTAGGG	TGTAGCGGG3'				1489
Individuo 1	1489
Individuo 4	1489
Individuo 5	1489

Figura 7: Comparação das sequências do marcador SCAR dos indivíduos 1, 4 e 5 da colônia GUI 1 de *P. cupira* com a sequência padrão de *P. cupira*. As sequências em vermelho e azul correspondem aos “primers” A e B do marcador SCAR respectivamente. As sequências em verde e roxo correspondem aos “primers” internos R e F, respectivamente.

Anexo 2

Tabela 1: Contagem de cromossomos metafásicos de indivíduos de *P. cupira* das colônias GUI 1 e GUI 11

Colônia GUI 1												
Indivíduos	Metáfases											Presença de Cromossomo B
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
1	33	34	30	34	34	34	34	34	34	34	35	presente
2	33	34	31	34	34	29	34	34	34	34	*	ausente
3	34	34	34	33	32	33	34	33	34	34	34	ausente
4	35	35	35	31	35	35	34	35	35	35	*	presente
5	35	35	35	32	34	35	33	35	34	34	*	presente
6	34	30	32	30	34	28	34	34	34	34	34	ausente
7	33	34	34	34	33	34	33	31	34	34	*	ausente
8	32	35	32	26	33	30	35	35	34	35	*	presente
9	35	34	35	33	34	32	35	34	35	35	*	presente
10	34	34	34	34	34	34	34	34	34	34	34	ausente
11	33	29	32	34	34	34	34	34	34	34	*	ausente
12	28	34	35	34	35	29	35	34	34	33	35	presente
13	33	35	35	34	24	35	33	35	34	35	31	presente
14	35	35	35	33	34	33	32	35	33	35	*	presente
15	35	34	34	32	35	34	35	32	35	35	*	presente
16	28	34	34	32	30	34	34	34	34	34	*	ausente
17	34	34	34	34	33	34	33	34	34	34	34	ausente
18	26	34	35	35	35	30	33	31	35	34	35	presente
19	34	35	35	35	35	35	34	34	35	35	34	presente
Colônia GUI 11												
Indivíduos	Metáfases											Presença de cromossomo B
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
1	35	31	34	29	33	34	35	34	34	35	*	presente
2	34	33	34	34	34	34	34	33	33	34	*	ausente
3	32	34	33	33	33	34	32	34	34	34	*	ausente
4	34	34	34	33	33	33	31	33	34	31	*	ausente
5	33	30	32	34	29	28	32	33	34	33	*	ausente
6	33	34	33	34	34	34	31	32	34	34	*	ausente
7	35	35	35	35	35	35	34	34	31	34	*	presente
8	34	34	34	30	34	34	34	34	33	34	*	ausente
9	34	33	34	30	33	33	29	32	34	33	*	ausente
10	30	32	32	33	34	34	32	34	33	34	*	ausente
11	30	29	34	35	35	32	27	35	32	31	*	presente