

ALESSANDRA DE OLIVEIRA FAUSTINO

**UTILIZAÇÃO DE ABELHAS ADULTAS EM ANÁLISES DE
CITOMETRIA DE FLUXO**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

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

T

F268u
2018 Faustino, Alessandra de Oliveira, 1993-
 Utilização de abelhas adultas em análises de citometria de
 fluxo / Alessandra de Oliveira Faustino. – Viçosa, MG, 2018.
 viii, 23f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Tânia Maria Fernandes Salomão.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 19-23.

1. Citometria de fluxo. 2. Abelhas. 3. DNA.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia
Geral. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e
Estrutural. II. Título.

CDD 22. ed. 571.6

ALESSANDRA DE OLIVEIRA FAUSTINO

**UTILIZAÇÃO DE ABELHAS ADULTAS EM ANÁLISES DE
CITOMETRIA DE FLUXO**

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

APROVADA: 20 de fevereiro de 2018.



Maykon Passos Cristiano



Denilce Meneses Lopes
(Coorientadora)



Tânia Maria Fernandes Salomão
(Orientadora)

Dedico esse trabalho aos meus pais e familiares, amigos e ao meu namorado Pedro, que sempre me incentivaram e me deram forças para chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por me conceder todos os dias paciência, sabedoria e força de vontade para que eu nunca desistisse de realizar esse sonho.

Aos meus amados pais Paulo e Edna, que mesmo quando eu duvidava da minha capacidade, acreditaram em mim e me acompanharam nesta trajetória, me incentivando até o fim.

À minha querida irmã Paula pela amizade e amparo.

Ao meu namorado Pedro Vitor pelo amor, apoio incondicional e principalmente pela compreensão por todos os momentos em que me fiz ausente.

Às minhas orientadoras Denilce e Tânia pelo suporte e orientação durante todos esses anos, contribuindo muito para meu crescimento profissional e pessoal.

Ao professor Leandro Licursi por toda contribuição e por sempre se colocar à disposição para ajudar na concretização desse trabalho.

Aos professores da Pós-Graduação pelo conhecimento transmitido.

Aos professores que aceitaram o convite para participar da banca.

Às minhas companheiras e amigas de laboratório Jaqueline, Priscila, Natália, Marina e Camila. Faltam palavras para agradecer vocês por todo acolhimento, ajuda e suporte! Muito obrigada, de coração!

Ao pessoal do Laboratório de Biologia Molecular de Insetos pela troca de experiências.

À técnica de laboratório mais prestativa que já conheci, Renata.

Aos meus companheiros de pós-graduação (Ítalo, Amanda, Rodrigo, Hélio, Ingrid, Larissa, Filipe, Luciane e Daniel), que foram um dos presentes mais lindos que a Biocel poderia me conceder.

À Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Geral e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural pela oportunidade de concluir esse trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e à FAPEMIG pelos recursos fornecidos para a realização desse trabalho.

À secretária do programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural, Beth, que sempre esteve de prontidão para ajudar em qualquer situação.

Ao Núcleo de Microscopia da UFV.

Aos professores Maykon Cristiano e Danon por me acolherem em seus laboratórios para a realização dos experimentos e à doutoranda Mariana por todo ensinamento e auxílio.

À REP mais linda desse Brasil, que se tornou minha segunda família durante esses últimos anos. Muito obrigada pelo carinho de sempre e por deixarem meus dias mais leves e alegres.

Aos demais amigos de Viçosa e aos que aqui conheci, vocês tornaram esses dois anos os melhores da minha vida!

Aos familiares e amigos de Rodeiro, que se fizeram sempre presentes.

E a todos que de alguma forma contribuíram para que eu chegasse até aqui.

O meu MUITO OBRIGADA!

“Os sonhos não envelhecem... Vai em frente. Sorriso no rosto e firmeza nas decisões. Deus resolveu reformar o mundo, e escolheu o seu coração para iniciar a reforma. Isso prova que Ele ainda acredita em você. E se Ele ainda acredita, quem é você para duvidar...”

Pe. Fábio de Melo

RESUMO

FAUSTINO, Alessandra de Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2018. **Utilização de abelhas adultas em análises de citometria de fluxo.** Orientadora: Tânia Maria Fernandes Salomão. Coorientadora: Denilce Meneses Lopes.

O primeiro trabalho de citometria de fluxo utilizando abelhas da tribo Meliponini, quantificou o genoma de três espécies, as quais apresentaram conteúdo de DNA de 0,43 pg em *Scaptotrigona xantotricha*, 0,93 pg em *Melipona rufiventris* e 0,95 pg em *Melipona mondury*. Posteriormente à determinação do seu conteúdo genômico, *S. xantotricha* passou a ser utilizada como padrão interno, em todos os estudos de citometria com meliponíneos. Atualmente, valores de apenas 63 espécies de abelhas estão disponíveis, mostrando uma escassez de dados nesse grupo. Uma das razões para esse desprovemento de dados, pode ser devido à dificuldade do acesso as larvas e pupas, que foram as únicas utilizadas, até o momento, nos estudos de quantificação do genoma de abelhas. Sendo assim, a busca pela utilização de material mais acessível, pode ser uma estratégia para que mais espécies sejam analisadas. Portanto, o presente estudo teve como objetivo testar diferentes tampões para a quantificação do conteúdo de DNA nuclear em abelhas adultas. Para a preparação das suspensões nucleares, a serem analisadas no citômetro de fluxo, foram utilizadas abelhas adultas da espécie *S. xantotricha* e o padrão interno *Drosophila melanogaster*, juntamente com os tampões LB01, Galbraith, MgSO₄ e TRIS. Os histogramas obtidos, apresentaram bons níveis de resolução e coeficiente de variação satisfatórios, com percentuais menores do que 5%, variando de 2,24% com o tampão Galbraith a 3,34% com o tampão LB01. O tamanho do genoma de adultos de *S. xantotricha* apresentou valores muito próximos ou idênticos aos dados disponíveis na literatura para as larvas e pupas dessa mesma espécie. Da mesma forma, a razão experimental não apresentou grandes variações em relação à teórica (2,39), sendo o tampão MgSO₄ com razão de 2,34 o mais distante. Em relação à porcentagem de debris celular, as amostras que utilizaram os tampões Galbraith, MgSO₄ e TRIS, mostraram-se mais limpas em relação as que utilizaram o tampão LB01. Por fim, os resultados dos parâmetros analisados, no mesmo dia da extração e 24 após extração, foram muito semelhantes. Mediante o exposto, podemos concluir que a utilização de abelhas adultas para a determinação do conteúdo de DNA é tão eficaz quanto ao uso de larvas e pupas, visto que seus resultados não apresentaram diferenças estatisticamente significantes quando comparados com os dados da literatura.

ABSTRACT

FAUSTINO, Alessandra de Oliveira, M.Sc, Universidade Federal de Viçosa, February, 2018. **Use of adult bees in flow cytometry analyzes.** Advisor: Tânia Maria Fernandes Salomão. Co-advisor: Denilce Meneses Lopes.

The first work of flow cytometry using bees from Meliponini tribe quantified the genome of three species, to which they presented DNA content of 0.43 pg in *Scaptotrigona xantotricha*, 0.93 pg in *Melipona rufiventris* and 0.95 pg in *Melipona mondury*. After the determination of its genomic content, *S. xantotricha* became to be used as the internal standard in all the studies of meliponine cytometry. Currently, values of just 63 species of bees are available, showing a scarcity of data in this group. One of the reasons for this data shortage may be due to the difficulty of access the larvae and pupae, which were the only ones used, until the moment, in the studies of quantifying the genome of bees. Thus, the search for the use of more accessible material may be a strategy for more species to be analyzed. Therefore, the present study aimed to test different buffers for the quantification of nuclear DNA content in adult bees. For the preparation of the nuclear suspensions, to be analyzed in the flow cytometer, adult bees of the species *S. xantotricha* and the internal standard *Drosophila melanogaster*, along with LB01, Galbraith, MgSO₄ and TRIS buffers. The histograms obtained had good resolution levels and coefficient of variation of satisfactory, with percentages lower than 5%, ranging from 2.24% with Galbraith buffer to 3.34% with LBO1 buffer. The size of the genome obtained with the use of adults of *S. xantotricha* values very close or identical to the available data in the literature for the larvae and pupae of the same species. Similarly, the experimental coefficient did not show great variations in relation to the theoretical one (2.39), and the MgSO₄ buffer with a ratio of 2.34 was the most distant. In relation to the percentage of debris cell, the samples using the Galbraith, MgSO₄ and TRIS buffers were cleaner compared to those using the LB01 buffer. Finally, the results of analyzed parameter in the same day of extraction and 24 hours after extraction were very similar. In front of this fact, we can conclude that the utilization of adult bee for the determination of DNA content is so effective as to use of larvae and pupae, since its result not showed significant statistical differences when compared with the literature data.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Abelhas da tribo Meliponini	1
1.2 Citometria de fluxo na determinação do tamanho do genoma nuclear	2
1.3 Tamanho do genoma nuclear em abelhas	6
2. OBJETIVOS	9
2.1 Objetivo Geral	9
2.2 Objetivos Específicos	9
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1 Material biológico	10
3.2 Isolamento de núcleos intactos	10
3.3 Citometria de fluxo	10
3.4 Análise estatística	11
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
5. CONCLUSÕES	18
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19

1. INTRODUÇÃO

1.1 Abelhas da tribo Meliponini

Os representantes da tribo Meliponini, também conhecidos como “abelhas indígenas sem ferrão”, assim como os Apini, são espécies altamente eussociais (Michener 1974; Michener, 2007). Essas duas tribos, juntamente com Euglossini, formada por espécies solitárias e Bombini, por espécies primitivamente eussociais, constituem o grupo monofilético dos corbiculados, cujo nome faz referência a uma estrutura presente na tíbia das patas posteriores chamada corbícula, que é utilizada por essas abelhas para o transporte de pólen (Michener 1974; Michener, 2007).

Dentre as abelhas eussociais, a tribo Meliponini é considerada a mais diversificada quanto aos aspectos comportamentais, diversidade de sistemas de comunicação, estratégias de forrageamento, densidades populacionais e arquiteturas de ninhos (Michener, 1974; Sakagami, 1982). Possuem grande importância na polinização de plantas nativas e culturas comerciais, bem como na produção de substâncias úteis, como mel e cera (Michener, 2007; Gonçalves, 2010). Desta maneira, os meliponíneos mostram-se relevantes ecológica e economicamente, sendo considerados de vital importância para o equilíbrio do ecossistema e para manutenção de muitas espécies vegetais, as quais dependem exclusivamente deles para sua reprodução (Lasalle et al., 1993; Proní, 2000; Michener, 2007).

Os indivíduos dessa tribo são encontrados nas regiões tropicais do mundo, nas áreas subtropicais do hemisfério sul e na região neotropical, sendo representada por 420 espécies válidas, agrupadas em 33 gêneros (Michener, 2000; Moure et al., 2007; Camargo e Pedro, 2013; Melo, 2016). No Brasil a tribo é amplamente dispersa, apresentando cerca de 240 espécies, distribuídas em 29 gêneros (Camargo e Pedro, 2013 ; Pedro, 2014).

Scaptotrigona, um dos gêneros pertencentes à tribo Meliponini, é composto por 22 espécies que se encontram dispersos pela região neotropical da América do Sul e Central e no México (Michener, 2007). No Brasil, encontram-se as espécies *S. affabra*, *S. bipunctata*, *S. depilis*, *S. fulvicutis*, *S. polystica*, *S. postica*, *S. tricolorata*, *S. tubiba* e *S. xanthotricha*, que se distribuem nos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Bahia, Ceará, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Pará, Pernambuco, Piauí, Rio

Grande do Sul, Rio de Janeiro, Rondônia, Santa Catarina, Sergipe, São Paulo e Tocantins (Camargo e Pedro, 2013). As abelhas desse gênero apresentam uma grande diversidade de formas e tamanhos, muitas delas constituindo complexos de difícil separação taxinômica (Silveira et al., 2002). Caracterizam-se por nidificarem em cavidades pré-existentes, muitas vezes em troncos de árvores de grande porte e por possuírem colônias bastante populosas (Michener, 2000; Shevelev, 2005). Além disso, destacam-se dentre os outros grupos de polinizadores por dispor de estratégias que as tornam mais eficientes na coleta do alimento (Velthuis, 1997).

Diante da importância socioeconômica das abelhas dessa tribo, vários são os estudos que vem sendo realizados nos mais variados aspectos de sua biologia, como por exemplo, na citogenética (Tavares et al., 2017) e tamanho do genoma (Lopes et al., 2009; Tavares et al., 2012), morfologia (De Carvalho et al., 2017) filogenia molecular (Rasmussen e Cameron, 2010), biogeografia (Miranda et al., 2015), taxonomia (Camargo e Pedro, 2013), diversidade (Gonçalves e Brandão, 2008), sequenciamento de genoma (Silverio et al., 2014), dentre outros.

1.2 Citometria de fluxo na determinação do tamanho do genoma nuclear

A determinação do tamanho do genoma é de grande relevância, considerando que seus resultados permitem inferir a respeito da diversidade genética, taxonomia, relações filogenética e evolutiva do genoma, além de concepções futuras para projetos de sequenciamento, dados estes que podem ser utilizados em diversas áreas da biologia (Doležel, 1997; Gregory, 2005; Ochatt, 2008). O conteúdo de DNA haploide está disponível (valores de C, em picogramas) para 6.222 espécies, dos quais 3.793 referem-se aos vertebrados e 2.429 aos invertebrados (Gregory, 2017). Dentre esses valores, os insetos apresentam 1.345 registros, sendo destes, 240 referentes a ordem Hymenoptera. Esses dados mostram que o conteúdo de DNA em insetos varia na faixa de 0,09 picogramas (pg) em *Mayetiola destructor*, representando o menor tamanho de genoma, a 16,93 pg em *Podisma pedestris*, representando o maior tamanho de genoma (Gregory, 2017).

Até a década de 80 a técnica mais utilizada para estimar a quantidade de DNA nuclear das células era a microdensitometria de Feulgen, que media o conteúdo de DNA por meio de um microscópio equipado com um espectrofotômetro e um densitômetro, os quais foram substituídos posteriormente pelo microdensitômetro de integração. Com o passar do tempo, esta técnica foi sendo

gradativamente substituída pela citometria de fluxo (FCM), devido a sua eficiência e rapidez na obtenção dos resultados (Gregory, 2005; Doležel e Greilhuber, 2010). O primeiro a caracterizar um citômetro de fluxo foi Andrew Moldovan, no ano de 1934 em um artigo publicado na revista Science. Neste artigo, ele explica a funcionalidade do citômetro na contagem de células coradas por um fluorocromo à medida que a amostra passa pelos capilares do aparelho (Moldovan, 1934).

Inicialmente a citometria era utilizada para as análises de células sanguíneas, como por exemplo na detecção de doenças como a malária, mas até meados das décadas de 70 e 80 os esforços se concentravam principalmente no desenvolvimento dos equipamentos, ao invés da sua utilização para expansão de pesquisas biológicas (Lillie, 1978; Bertho, 2001). À medida que a técnica foi evoluindo, juntamente com o surgimento de novas substâncias marcadoras de DNA, novas áreas da biologia foram abrangidas, além da imunologia celular e hematologia, as quais foram evidentemente as grandes motivadoras do desenvolvimento da citometria. Além disso, outros tipos de células, como as microbianas e vegetais, passaram a ser analisadas por citometria (Doležel, 1997; Côrte-Real et al., 2002).

A FCM, requer para a análise do conteúdo de DNA, a obtenção de núcleos intactos, isolados a partir de tecidos frescos, utilizando para tal um tampão de isolamento (Tabela 1) (Galbraith et al., 1983). Esses tampões, têm a função de liberar os núcleos das células, mantendo sua integridade, além de proteger o DNA contra degradação por endonucleases e fornecer condições adequadas para sua posterior coloração. Apesar da grande diversidade de tampões existentes, todos devem possuir alguns componentes básicos, como: detergentes não iônicos (como por exemplo, Triton X-100, Tween 20) para liberar e limpar os núcleos de agregados celulares, além de impedir sua associação com detritos; substâncias tamponantes (por exemplo, Tris, MOPS ou HEPES) para estabilizar o pH da solução; estabilizadores de cromatina (por exemplo, MgCl₂, MgSO₄ e espermina) para manter a estrutura do DNA; agentes quelantes (por exemplo, EDTA e citrato de sódio) para ligar cátions divalentes e sais inorgânicos (por exemplo, KCl, NaCl) para obter a força iônica apropriada (Dolezel e Bartos 2005).

Após a obtenção dos núcleos, o DNA é corado com fluorocromos específicos, tais como, brometo de etídio ou iodeto de propídio (Tabela 2), os quais são os mais apropriados para a determinação do conteúdo total de DNA nuclear, pois não apresentam especificidade de ligação a determinados pares de bases, intercalando-

se com a cadeia dupla de DNA (Doležel et al., 1992; Doležel et al., 1998; Loureiro e Santos, 2004). Depois de coradas, as amostras podem então ser analisadas no citômetro de fluxo, onde será medido a intensidade de fluorescência emitida pelos núcleos, para a quantificação do genoma nuclear (Zoldos et al., 1998; Dolezel e Bartos, 2005; Doležel e Greilhuber, 2010).

Tabela 1- Dez principais tampões utilizados na técnica de citometria de fluxo.

Tampão	Composição	Referências
Galbraith	45 mM MgCl ₂ ; 30 mM citrato de sódio; 20 mM MOPS; 0.1% (v/v) Triton X-100; pH 7.0	Galbraith et al. (1983)
MgSO₄	9.53 mM MgSO ₄ .7H ₂ O; 47.67 mM KCl; 4.77 mM HEPES; 6.48 mM DTT; 0.25% (v/v) Triton X-100; pH 8.0	Arumuganathan e Earle (1991)
LB01	15 mM Tris; 2 mM Na ₂ EDTA; 0.5 mM espermina.4HCl; 80 mM KCl; 20 mM NaCl; 15 mM β-mercaptoetanol; 0.1% (v/v) Triton X-100; pH 7.5	Dolezel et al. (1989)
Otto	Otto I: 100 mM ácido cítrico mono hidratado; 0.5% (v/v) Tween 20 (pH aprox. 2–3) Otto II: 400 mM Na ₂ PO ₄ .12H ₂ O (pH aprox. 8–9)	Otto (1990), Dolezel e Gohde (1995)
Tris.MgCl₂	200 mM Tris; 4 mM MgCl ₂ .6H ₂ O; 0.5% (v/v) Triton X-100; pH 7.5	Pfossier et al. (1995)
Baranyi	Solução de Baranyi I: 100 mM ácido cítrico mono hidratado; 0.5% (v/v) Triton X-100 Solução de Baranyi II: 400 mM Na ₂ PO ₄ .12H ₂ O; 10 mM citrato de sódio; 25 mM sulfato de sódio	Baranyi e Greihuber (1995)
Bergounioux	“Sais de cultura de tecidos” suplementado com 700 mM sorbitol; 1.0% (v/v) Triton X-100; pH 6.6	Bergounioux et al. (1986)
Rayburn	1 mM hexilenoglicol; 10 mM Tris; 10 mM MgCl ₂ ; 0.5% (v/v) Triton X-100; pH 8.0	Rayburn et al. (1989)
Bino	200 mM manitol; 10 mM MOPS; 0.05% (v/v) Triton X-100; 10 mM KCl; 10 mM NaCl; 2.5 mM DTT; 10 mM espermina.4HCl; 2.5 mM Na ₂ EDTA.2H ₂ O; 0.05% (w/v) azida de sódio pH 5.8	Bino et al. (1993)
De Laat	15 mM HEPES; 1 mM EDTA Na ₂ .2H ₂ O; 0.2% (v/v); Triton X-100; 80 mM KCl; 20	de Laat e Blaas (1984)

mM NaCl; 15 mM DTT; 0.5 mM
espermina.4HCl; 300 mM sucrose; pH 7.0

(Dolezel et al., 2007)

Tabela 2- Fluorocromos mais utilizados em citometria de fluxo para estimar o conteúdo de DNA nuclear.

Tampão	Modo de ligação primário	Comprimento de onda	
		Excitação	Emissão
Iodeto de Propídeo (IP)	Intercalação	525 (azul-verde)	605 (vermelho)
Brometo de Etídeo (BE)	Intercalação	535 (azul-verde)	602 (vermelho)
4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI)	Regiões ricas A-T	345 (UV)	460 (azul)
Hoechst 33258	Regiões ricas A-T	360 (UV)	460 (azul)
Cromomicina	Regiões ricas G-C	445 (violeta-azul)	570 (verde)
Mitramicina (MI)	Regiões ricas G-C	445 (violeta-azul)	575 (verde)

(Loureiro e Santos, 2004)

1.3 Tamanho do genoma nuclear em abelhas

Apesar da importância do conhecimento do tamanho do genoma, poucas espécies de abelhas foram analisadas até o momento, principalmente se considerarmos a grande diversidade de espécies solitárias (Gregory, 2017). Todos os trabalhos de citometria de fluxo com abelhas, até o presente momento, utilizaram larvas e/ou pupas para o preparo de suas amostras, e provavelmente esse pode ser um dos motivos para a escassez de dados neste grupo, pois, para a coleta do material é necessário a abertura dos ninhos, os quais muitas vezes são difícil acesso. Além do mais, caso o manejo para a retirada desse material não seja feito de forma correta pode acarretar em danos para a colônia. Dessa forma, a busca pela utilização de material que não modifique a arquitetura dos ninhos e que seja mais facilmente encontrado, como por exemplo, indivíduos adultos, pode ser uma estratégia para que outras espécies sejam analisadas, aumentando o número de indivíduos com o tamanho do genoma determinado.

As primeiras quantificações de DNA em abelhas foram realizadas com as

espécies *Apis mellífera*, *Apis cerana* e *Megachile rotundata*, as quais apresentaram conteúdo de DNA de 0,19 pg em *Apis mellífera* e *Apis cerana* e 0,30 pg em *Megachile rotundata* (Jordan e Brosemer, 1974).

O primeiro trabalho utilizando abelhas da tribo Meliponini foi o de Lopes et al. (2009), o qual quantificaram por meio da técnica de citometria de fluxo o genoma de três espécies, sendo elas: *Melipona rufiventris*, *M. mondury* e *Scaptotrigona xantotricha*. Logo após a determinação do seu conteúdo genômico, *S. xantotricha* passou a ser utilizada como padrão interno em todos os trabalhos de citometria de fluxo com meliponíneos, apresentando conteúdo de DNA de C=0,43 pg. Em seguida, Tavares et al. (2010) quantificaram o genoma de mais 15 espécies do gênero *Melipona* (*Melipona quadrifasciata*, *M. bicolor*, *M. capixaba*, *M. marginata*, *M. seminigra*, *M. mandacaia*, *M. asilvai*, *M. subnitida*, *M. scutellaris*, *M. compressipes*, *M. quinquefasciata*, *M. grandis*, *M. crinita*, *M. fuscopilosa* e *M. ebúrnea*). Os resultados obtidos nesses estudos mostraram uma variação do tamanho genômico de 0,27 pg em *Melipona subnitida* e *M. quadrifasciata* a 1,38 pg em *M. capixaba*. Esses resultados corroboram com os encontrados por técnicas citogenéticas, as quais sugerem que o gênero pode ser dividido em dois grupos, um com baixo e outro com alto conteúdo de DNA de acordo com seu conteúdo de heterocromatina (Rocha e Pompolo, 1998; Tavares et al., 2010).

Posteriormente, Tavares et al. (2012) quantificaram o genoma de mais 26 espécies de Meliponini, pertencentes a 15 gêneros, cujos resultados obtidos variaram na faixa de 0,26 pg em *Paratrigona subnuda* a 0,98 em *Melipona flavolineata*, com média de 0,54 pg. Atualmente, valores de 63 espécies de abelhas estão disponíveis no banco de dados – Animal Genome Size Database (Gregory, 2017).

Estas variações de tamanhos do genoma, podem ocorrer dentro de um mesmo gênero ou dentro de uma mesma espécie, porém, muitas vezes, essas discordâncias em relação ao conteúdo de DNA podem estar relacionadas à problemas metodológicos (Doležel e Greilhuber, 2010; Bennett e Leitch, 2012; Gregory, 2017). Os inibidores de coloração endógenos presente nas plantas e a errônea utilização de determinados padrões internos, por exemplo, são fatores que podem interferir nos resultados de medição (Greilhuber, 2005). Segundo Doležel e Greilhuber (2010), mesmo após anos de estudos, ainda existem dificuldades para se obter valores fidedignos de DNA nuclear em eucariotos. Dessa forma, a escolha de uma metodologia adequada é imprescindível para determinar se essas variações

são reais ou decorrentes de erros durante a preparação das amostras (Greilhuber, 2005).

Mediante o exposto, o presente estudo teve como objetivo testar diferentes tampões para a quantificação do conteúdo de DNA nuclear em abelhas adultas, de forma a determinar qual ou quais deles proporcionam melhores resultados, fornecendo um protocolo padronizado e mais acessível para a quantificação do tamanho do genoma em indivíduos adultos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Determinar uma metodologia eficaz para a estimativa do conteúdo de DNA nuclear em abelhas adultas, utilizando citometria de fluxo (FCM).

2.2 Objetivos Específicos

- Padronizar a técnica de citometria de fluxo para quantificação de DNA em indivíduos adultos, utilizando o padrão interno dos trabalhos de citometria com meliponíneos, *Scaptotrigona xantotricha*, como referência a ser testada.

- Determinar o melhor protocolo de obtenção de núcleos por meio da análise de parâmetros citométricos, tais como: coeficiente de variação (CV), quantidade de debris celular, intensidade média de fluorescência (MFI) e razão.

- Avaliar a reprodutibilidade dos resultados obtidos 24 horas após o preparo das amostras.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material biológico

Para a quantificação do conteúdo de DNA, foram utilizadas abelhas adultas da espécie *Scaptotrigona xantotricha*, como modelo experimental para padronização da técnica, coletada no apiário da Universidade Federal de Viçosa- MG e como padrão interno foi utilizada *Drosophila melanogaster*, gentilmente cedidas pelo professor Dr. Pedro Crescêncio Souza Carneiro do Laboratório de *Drosophila*.

3.2 Isolamento de núcleos intactos

Núcleos intactos foram isolados da cabeça de abelhas adultas de *S. xantotricha*, pertencentes a uma única colônia e da cabeça do padrão interno *D. melanogaster*, utilizando quatro tampões diferentes para a extração dos núcleos, Galbraith, LB01, TRIS e MgSO₄ (Tabela 1).

Para o preparo das amostras, foram colocados dentro de tubos Eppendorf de 1,5 ml 100 µL do tampão de extração de núcleos testado, juntamente com uma cabeça de adulto de *S. xantotricha* acrescida com uma cabeça do padrão interno *D. melanogaster* (referência de quantidade de DNA C=0,18 pg). Com o auxílio de um pistilo, o material foi triturado e em seguida foram acrescentados mais 300 µL do mesmo tampão ao tubo Eppendorf.

As suspensões obtidas foram filtradas em tela de 400 µm e posteriormente os núcleos corados com uma solução composta de 3,5 µL de RNase e 6,5 µL de iodeto de propídio (PI). As amostras foram armazenadas em refrigerador a 4°C, no escuro, durante 60 min e em seguida analisadas (Moura et al. (in preparation)). Todo procedimento foi realizado em triplicatas.

3.3 Citometria de fluxo

As amostras foram analisadas em um citômetro de fluxo BD FACSVersé equipado com uma fonte laser (488 nm). A fluorescência de PI emitida a partir de núcleos foi coletada através de um filtro de passagem de banda 568/42 nm e convertida em 250 canais. O equipamento foi calibrado para linearidade e alinhado com microbeads e soluções padrão de acordo com as recomendações do fabricante. O software BD FACSuite 1.0.3 foi usado para análise de dados. O pico de núcleos padrão foi ajustado para o canal 50 e mais de 10000 núcleos foram

analisados.

3.4 Análise estatística

Os dados obtidos, foram submetidos a análise de variância (ANOVA), seguido pelos pós testes de comparação múltipla de Tukey ou Dunnett. A análise dos dados e as comparações estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism versão 6.0 e os valores foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0.05$ com intervalo de confiança de 95%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A metodologia empregada na prática da citometria de fluxo para a quantificação do genoma, mostrou-se adequada para uma análise rápida, acurada e com alta reprodutibilidade. O tamanho do genoma obtido com a utilização de adultos de *Scaptotrigona xantotricha*, apresentou pequenas variações em cada um dos tampões analisados, como indicado na Figura 1. De acordo com Lopes et al. (2009), a quantidade de DNA encontrado nas larvas de *S. xantotricha* é de 0,43 pg. Nossos resultados coincidiram com os obtidos nesse trabalho, quando os tampões Galbraith e TRIS foram utilizados. Valores similares, média de 0,42 pg, foi determinada quando os tampões LB01 e MgSO₄ foram utilizados.

As espécies da tribo Meliponini apresentam diferentes formas de nidificação, podendo ser no interior de cavidades pré-existentes, como por exemplo em troncos de árvores ou construindo ninhos expostos (Wille & Michener 1973; Michener 1961, 2007). Dessa forma, a obtenção de material para análise citométrica pode se tornar difícil, dependendo da localização do ninho, uma vez que para dosagem do conteúdo de DNA, normalmente são utilizados gânglios de larvas. Considerando os resultados obtidos para o conteúdo de DNA de *S. xantotricha* no presente estudo, os quais foram iguais ou muito próximos aos relatados na literatura e devido as possíveis dificuldades ao acesso do material para análise, fica evidente que para a quantificação do genoma de abelhas, pelo método da citometria de fluxo, a utilização de indivíduos adultos é uma excelente alternativa, visto que esta prática favoreceria a preservação dos ninhos e manterá a vitalidade da colmeia, uma vez que não será necessária sua abertura e/ou destruição para coleta de material.

Os coeficientes de variação (CVs) obtidos com os diferentes tampões foram satisfatórios, apresentando valores percentuais menores do que 5%, variando em torno de 2,24% quando utilizou-se o tampão Galbraith à 3,34% utilizando o tampão LBO1 (Figura 1). Lopes et al. (2009) e Soares et al. (2012), ao analisarem pela FCM espécies de abelhas sem ferrão relataram CVs maiores, com variação de 2,87 a 4,14% e 2,93 a 3,82% respectivamente, quando comparados aos valores no presente estudo. Ambos os trabalhos utilizaram larvas ou pupas, juntamente com o tampão de extração nuclear OTTO para a preparação de suas amostras.

O coeficiente de variação, é uma medida de dispersão utilizada para estimar a precisão de experimentos. Segundo Galbraith et al. (2001), o coeficiente de variação em estudos de citometria de fluxo, apresentam geralmente valores que variam de 1

a 3%, visto que esta, é considerada uma análise com alto grau de resolução. Todavia, valores de CVs menores que 5% ainda são considerados aceitáveis (Galbraith et al., 2001). Posto isto, a utilização de adultos em associação com os tampões analisados, LB01, Galbraith, MgSO₄ e TRIS, pode ser uma ótima opção, pois, oferece bons resultados além de dados mais homogêneos.

Três dos quatro tampões analisados, Galbraith, MgSO₄ e TRIS, proporcionaram amostras com menores porcentagens de debris celular, sendo os valores, 81,53%, 86,83%, 81,27%, correspondentes a cada um dos tampões mencionados, respectivamente. As amostras que utilizaram o tampão LB01 foram as que obtiveram maior porcentagem de debris, com 96,67% (Figura 1). A quantidade de debris encontrado nas amostras está proporcionalmente relacionado com a qualidade desta. O excesso de debris celular dificulta a análise e interpretação dos dados, visto que pode mascarar os resultados. Quanto mais limpas as amostras estiverem, mais fácil a visualização dos resultados e conseqüentemente, mais confiável se torna o processo de quantificação. No presente estudo, os tampões Galbraith, MgSO₄ e TRIS foram os que viabilizaram amostras mais limpas, podendo ser utilizados no isolamentos de núcleos de indivíduos adultos.

Além do bom desempenho dos tampões mencionados nesse trabalho, é importante ressaltar o baixo custo para suas elaborações. Galbraith, o qual apresentou melhores resultados dentre os tampões analisados, em todos os testes realizados, possui uma composição simples, como demonstrado na Tabela 1 (45 mM MgCl₂; 30 mM citrato de sódio; 20 mM MOPS; 0.1% (v/v) Triton X-100; pH 7.0). Dessa forma, fica a critério do pesquisador a escolha do tampão a se utilizar, de acordo com os objetivos a serem alcançados.

Todos os histogramas apresentaram bons níveis de resolução, como pode ser observado na Figura 3, podendo ser diferenciados e identificados o padrão interno (*D. melanogaster*) e a amostra (*S. xantotricha*).

A razão teórica é utilizada como parâmetro universal na determinação do conteúdo de DNA, sendo calculada de acordo com a diferença de fluorescência, emitida pela amostra e padrão interno, capturados pelo citômetro. Os valores obtidos por esse cálculo, permitem que o experimento seja reproduzido novamente em qualquer outro aparelho. Para calcular a razão experimental, foram utilizados os valores adquiridos da análise de 90% dos núcleos das amostras (Intensidade Média de Fluorescência- MFI), coradas com iodeto de propídio (PI), através da fórmula, $MFI_{Scaptotrigona}/MFI_{Drosophila}$. As amostras cujos valores mais se aproximaram da razão

teórica (2,39), foram as adquiridas com o tampão Galbraith, com 2,40 e as que mais se distanciaram foram as utilizando o tampão $MgSO_4$ com 2,34 (Figura 2). De acordo com as análises estatística, essas diferenças foram significantes estatisticamente, apresentando valores de $p < 0.05$. Sendo assim, o emprego de adultos na preparação de amostras para análise de citometria de fluxo mostra-se tão eficiente quanto o uso de larvas e pupas, as quais foram as únicas utilizadas nesse tipo de trabalho até o momento para as espécies de abelha da tribo Meliponini (Lopes et al., 2009; Tavares et al., 2010; Tavares et al., 2012; Gregory, 2017).

Após 24 horas da extração dos núcleos, as amostras foram analisadas novamente no citômetro, seguindo os mesmos parâmetros das análises realizadas no mesmo dia da extração. Os resultados apresentaram pequenas variações quanto a intensidade média de fluorescência, razão e conteúdo de DNA, como pode ser observado na Tabela 3. Os valores relacionados com a razão e conteúdo de DNA, das amostras que utilizaram o tampão TRIS mostraram-se menores após 24 horas, passando de 2,37 para 2,36 e 0,43 para 0,42 pg, respectivamente. O mesmo foi observado utilizando o tampão Galbraith, no qual os valores de MFI divergiram de 145608 para 145297,7. O inverso foi observado para os demais tampões, onde os valores para estes parâmetros aumentaram após 24 horas de preparação das amostras. Apesar dessas pequenas variações em relação ao período de leitura das amostras, para se obter resultados mais confiáveis, é necessário que as análises sejam feitas o quanto antes, após o período de incubação das mesmas. Porém, diante dos resultados apresentados, as amostras não se tornam inviabilizadas durante o período de 24 horas, podendo ser utilizadas caso necessário.

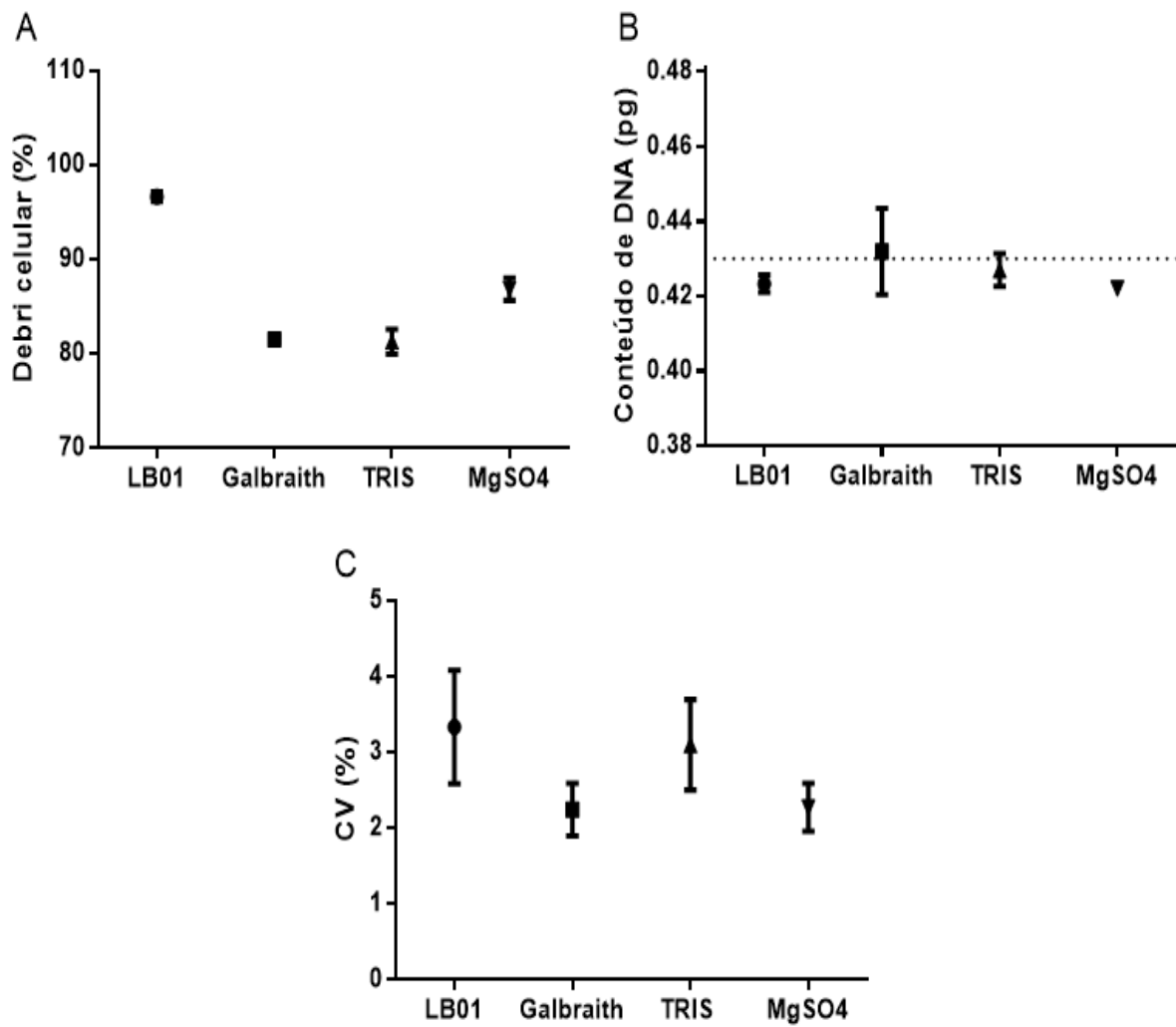


Figura 1- Diagrama dos resultados obtidos para porcentagem (%) de Debri celular (A), Conteúdo de DNA em picograma (pg) (B) e porcentagem de Coeficiente de variação (CV) (C), utilizando os tampões de isolamento denominados LB01, Galbraith, Tris e MgSO₄ e tecido cerebral de *Scaptotrigona xantotricha*.

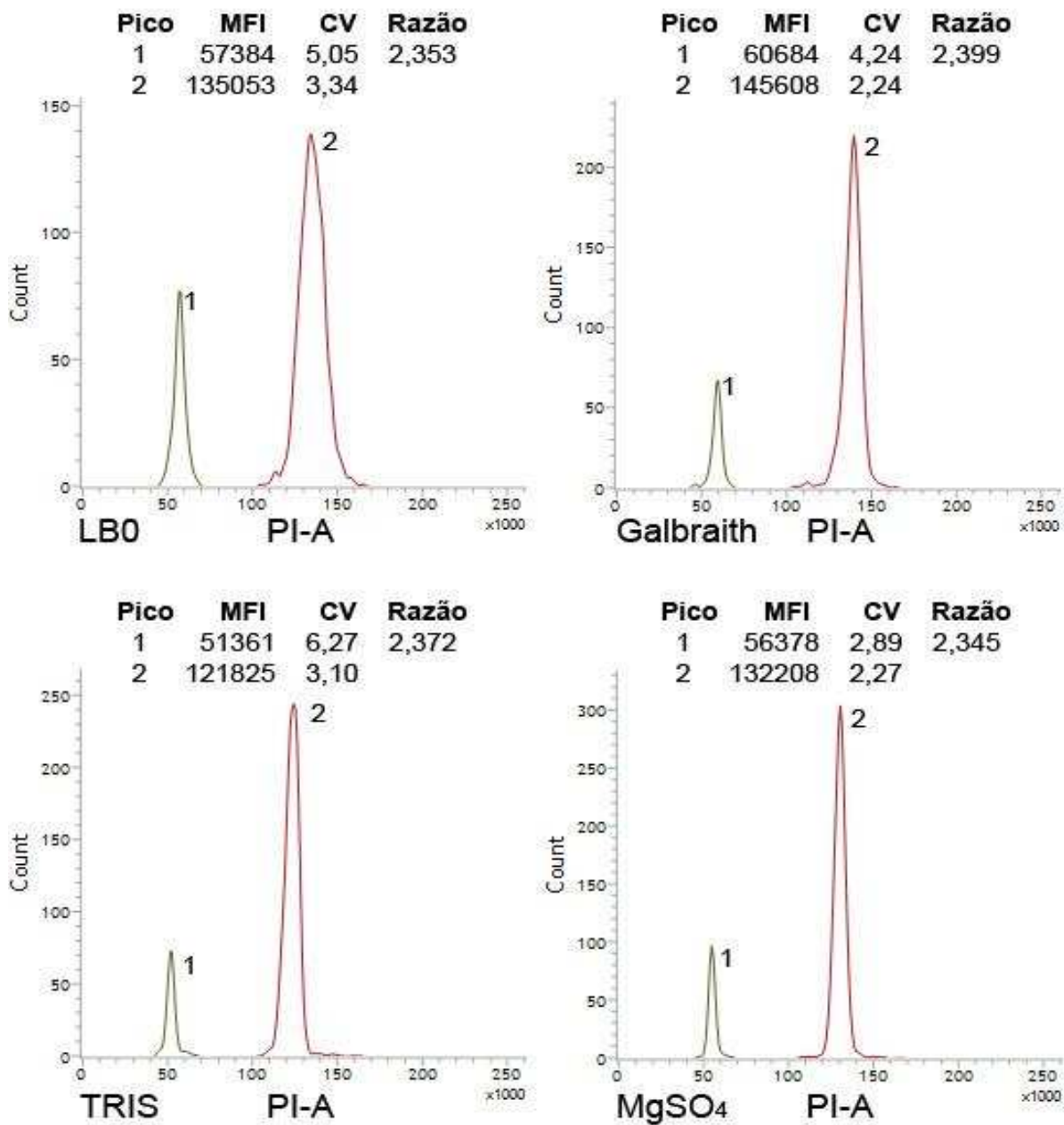


Figura 2- Histogramas de fluorescência, obtidos após análise das suspensões nucleares de tecido cerebral de *Drosophila melanogaster* (C= 0,18 pg DNA, como padrão de referência interno- Pico 1) e *Scaptotrigona xantotricha* (C= 0,43- Pico 2), corados com PI. O nome dos tampões utilizados para a preparação das amostras (LB0, Galbraith, TRIS, MgSO₄) estão indicados na parte inferior dos seus respectivos histogramas.

Tabela 3- Resultados das variantes: intensidade média de fluorescência (MFI), razão experimental e conteúdo de DNA experimental das análises realizadas logo após ou 24 horas após extração dos núcleos celulares de *Scaptotrigona xantotricha*.

Tampão	Extração			Pós extração- 24 horas		
	MFI	Razão ^a	Conteúdo de DNA ^b	MFI	Razão ^a	Conteúdo de DNA ^b
LB01	135053,7	2,35	0,42 pg	144140	2,39	0,43 pg
Galbraith	145608	2,40	0,43 pg	145297,7	2,45	0,44 pg
Tris	121825,7	2,37	0,43 pg	127080	2,36	0,42 pg
MgSO4	132208	2,34	0,42 pg	140581	2,38	0,43 pg

^aRazão teórica: 2,39; ^bConteúdo de DNA teórico: 0,43.

Dados obtidos utilizando *Drosophila melanogaster* (DNA= 0,18 pg) como padrão interno.

5. CONCLUSÕES

O presente estudo foi o primeiro a testar a utilização de abelhas adultas em experimentos de citometria de fluxo. Os resultados obtidos com essas análises mostraram-se de alta qualidade, apresentando valores muito próximos aos da literatura, cujas variações não foram consideradas estatisticamente significantes.

Portanto, podemos concluir que o emprego de indivíduos adultos em associação com os tampões analisados é de grande relevância, pois além de resultarem em dados confiáveis, nos parâmetros analisados, ainda contribuem para preservação dos ninhos e facilitam estudos com outras espécies de abelhas, incluindo as solitárias.

Sendo assim, disponibilizamos aqui uma metodologia segura para quantificação do genoma, na qual sua aplicação apresenta um avanço na determinação do conteúdo de DNA em abelhas, permitindo que espécies, as quais possuem ninhos de difícil acesso, possam agora ter seu DNA quantificado. Esse método pode ser utilizado posteriormente, para determinação do conteúdo genômico de outros insetos da ordem Hymenoptera.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BENNETT, M. D.; LEITCH, L. J. 2012. **Plant DNA C-values database** (release 6.0, Dec. 2012). Disponível em: <http://www.kew.org/cvalues/>. Acesso em: 5 de Outubro de 2017.

BERTHO, A. L. 2001. **Citometria de fluxo**. Sebenta de Citometria de Fluxo. Instituto Oswaldo Cruz. Brasil. picf.ioc.fiocruz.br/apostila.doc.

CAMARGO, J. M. F.; PEDRO, S. R. M. 2013. Meliponini Lepeletier, 1836. In Moure, J. S., Urban, D. & Melo, G. A. R. (Orgs). **Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region** - online version. Available at <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>.

CÔRTE-REAL, M.; SANSONETTY, F.; LUDOVICO, P.; PRUDÊNCIO, C.; RODRIGUES, F.; FORTUNA, M.; SOUSA, M.; SILVA, M. e LEÃO, C. 2002. **Contributos da citologia analítica para estudos de biologia de leveduras**. Boletim de Biotecnologia, v. 71, n. 19-33.

DE CARVALHO, W. J., et al. 2017. **Characterization of antennal sensilla, larvae morphology and olfactory genes of Melipona scutellaris stingless bee**. PloS one, v. 12, n. 4, p. e0174857.

DOLEZEL, J.; LUCRETTI, S.; MEISTER, A.; LYSAK, M.; NARDI, L.; OBERMAYER, R. 1998. **Plant genome size estimation by flow cytometry: Inter-laboratory comparison**. Annals of Botany, v. 82 (Suppl A), p. 17-26.

DOLEZEL, J.; SGORBATI, S.; LUCRETTI, S. 1992. **Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content estimation in plants**. Physiologia Plantarum, v. 85, n. 4, p. 625-631.

DOLEZEL, J. 1997. **Application of flow cytometry for the study of plant genomes**. Journal of Applied Genetics, v. 3, n. 38, p. 285-302.

DOLEŽEL, J.; GREILHUBER, J. 2010. **Nuclear genome size: are we getting**

closer? Cytometry Part A, v. 77, n. 7, p. 635-642.

DOLEŽEL, J.; BARTOŠ, J. A. N. 2005. **Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size.** Annals of Botany, v. 95, n. 1, p. 99-110.

DOLEZEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, Jan (Ed.) 2007. **Flow cytometry with plant cells: analysis of genes, chromosomes and genomes.** John Wiley & Sons.

GALBRAITH, D. W.; HARKINS, K. R.; MADDOX, J. R.; AYRES, N. M.; SHARMA, D. P.; FIROOZABADY, E. 1983. **Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues.** Science, v. 220, p. 1049-1051.

GALBRAITH, D. W.; LAMBERT, G. M.; MACAS, J.; DOLEZEL, J. 2001. **Analysis of nuclear DNA content and ploidy in higher plants.** *Current protocols in cytometry*, p. 7-6.

GONÇALVES, P. H. P. 2010. **Análise da variabilidade genética de uma pequena população de *Frieseomelitta varia* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) por meio de análise do DNA mitocondrial, microssatélites e morfometria geométrica das asas** (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).

GONÇALVES, R. B.; BRANDÃO, C. R. F. 2008. **Diversidade de abelhas (Hymenoptera, Apidae) ao longo de um gradiente latitudinal na Mata Atlântica.** Biota Neotropica, v. 8, n. 4, p. 51-61.

GREGORY, T. R. 2005. **Genome size evolution in animal. The evolution of the genome.** Elsevier Inc.

GREGORY, T. R. 2017. **Animal Genome Size Database.** Disponível em: <http://www.genomesize.com>. Acesso em: 5 de Outubro de 2017.

GREILHUBER, J. 2005. **Intraspecific variation in genome size in angiosperms: identifying its existence.** Annals of Botany, v. 95, n. 1, p. 91-98.

JORDAN, R. A.; BROSEME R. W. 1974. **Characterization of DNA from three bee**

species. Journal of Insect Physiology, v. 20, n. 12, p. 2513-2520.

LASALLE, J., et al. 1993. **Hymenoptera: their biodiversity, and their impact on the diversity of other organisms.** Hymenoptera and Biodiversity, p. 1-26.

LILLIE, R. D. 1978, “**Romanowsky-Malachowski stains the so-called Romanowsky stain: Malachowski's 1891 use of alkali polychromed methylene blue for malaria plasmodia**”. Stain Technol, v. 53, n. 1, p. 23-28.

LOPES, D. M., et al. 2009. **Genome size estimation of three stingless bee species (Hymenoptera, Meliponinae) by flow cytometry.** Apidologie, v. 40, n. 5, p. 517-523.

LOUREIRO, J.; SANTOS, C. 2004. **Aplicação da citometria de fluxo ao estudo do genoma vegetal.** Boletim de Biotecnologia, São Paulo, v. 77, p. 18-29.

MELO, G. A. R. 2016. **Plectoplebeia, a new Neotropical genus of stingless bees (Hymenoptera: Apidae).** Zoologia (Curitiba), v. 33, n. 1.

MICHENER, C. D. 1974. **The social behavior of the bees: a comparative study v. 73, No. 87379.** Harvard University Press.

MICHENER, C. D. 2000. **The bees of the World.** The Jhon Hopkins University Press, Baltimore. p. 779-805.

MICHENER, C. D. 2007. **The Bees of the World.** Baltimore, London: John Hopkins University Press. 953 p.

MICHENER, C. D., et al. 1961. **Observations on the nests and behavior of Trigona in Australia and New Guinea (Hymenoptera, Apidae).** American Museum novitates. No. 2026.

MIRANDA, E. A., et al. 2015. **Natural history and biogeography of Partamona rustica, an endemic bee in dry forests of Brazil.** Insectes sociaux, v. 62, n. 3, p. 255-263.

MOLDAVAN, A. 1934. **Photo-electric technique for the counting of microscopical cells.** Science, v. 80, n. 2069, p. 188-189.

MOURE, J. S.; URBAN, D.; MELO, G. A. R. 2007. **Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region.** Curitiba: Sociedade Brasileira de Entomologia. Disponível em: <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Acesso em: 5 de Outubro de 2017.

OCHATT, S. J. 2008. **Flow cytometry in plant breeding.** Cytometry part A, v. 73, n. 7, p. 581-598.

PEDRO, S. R. M. 2014. **The stingless bee fauna in Brazil (Hymenoptera: Apidae).** Sociobiology, v. 61, n. 4, p. 348-354.

PRONÍ, E. A. 2000. **Biodiversidade de abelhas indígenas sem ferrão (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae) na bacia do rio Tibagi, Estado do Paraná, Brasil.** Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR, 3(2), p. 145-150.

RASMUSSEN, C.; CAMERON, S. A. 2009. **Global stingless bee phylogeny supports ancient divergence, vicariance, and long distance dispersal.** Biological Journal of the Linnean Society, v. 99, n. 1, p. 206-232.

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

SAKAGAMI, S. F. 1982. **Stingless bees.** Social insects, v. 3, p. 361-423.

SHEVELEV, I. F. 2005. **Los Maravillosos Tapezuá (*Scaptotrigonas*): Abejas sin aguijón** Assuncion-Paraguai. p.169.

SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A. R.; ALMEIDA, E. A. B. 2002. **Abelhas do Brasil: Sistemática e Identificação.** 1ª edição, Belo Horizonte: edição dos Autores, p.253.

SILVERIO, M., et al. 2014. **Sequencing of the whole mitochondrial genome of the Brazilian stingless bee; *Melipona scutellaris***. In: BMC proceedings. BioMed Central, p. 152.

SOARES, F. A. F., et al. 2012. **Determinação da composição de bases AT e GC por citometria de fluxo em abelhas**. f. 19-22. Dissertação (Mestrado em genética e melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

TAVARES, M. G.; CARVALHO, C. R.; SOARES, F. A. F. 2010. **Genome size variation in *Melipona* species (Hymenoptera: Apidae) and sub-grouping by their DNA content**. *Apidologie*, v. 41, n. 6, p. 636-642.

TAVARES, M. G., et al. 2012. **Genome size diversity in stingless bees (Hymenoptera: Apidae, Meliponini)**. *Apidologie*, v. 43, n. 6, p. 731-736.

TAVARES, M. G.; LOPES, D. M.; CAMPOS, L. A. O. 2017. **An overview of cytogenetics of the tribe Meliponini (Hymenoptera: Apidae)**. *Genetica*, v. 145, n. 3, p. 241-258.

VELTHUIS, H. H. W. 1997. *Biologia das Abelhas sem Ferrão*. Departamento de Etologia, Universidade de Utrecht, Holanda & Departamento de Ecologia, USP, São Paulo, Brasil. p. 33.

WILLE, A.; MICHENER, C. D. 1973. **The nest architecture of stingless bees with special reference to those of Costa Rica (Hymenoptera, Apidae)**. *Revista de Biología Tropical*, v. 21, n. 1.

ZOLDOS, V., et al. **Genome size and base composition of seven *Quercus* species: inter-and intra-population variation**. *Genome*, v. 41, n. 2, p. 162-168.