

ANDERSON FERNANDES DE MIRANDA

ESTUDOS CITOGENÉTICOS E MOLECULARES DO GÊNERO
***Partamona*: FILOGENIA E CROMOSSOMO B**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2012

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

T

M672e
2012

Miranda, Anderson Fernandes de, 1978-
Estudos citogenéticos e moleculares do gênero *Partamona*:
filogenia e cromossomo B / Anderson Fernandes de Miranda
– Viçosa, MG, 2012.
x, 60f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Lúcio Antônio de Oliveira Campos.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Genética. 2. Biodiversidade. 3. Biologia molecular.
4. Abelha. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

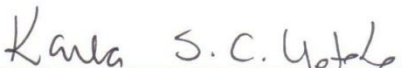
CDD 22. ed. 576.88

ANDERSON FERNANDES DE MIRANDA

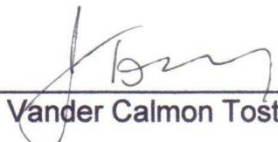
ESTUDOS CITOGENÉTICOS E MOLECULARES DO GÊNERO
***Partamona*: FILOGENIA E CROMOSSOMO B**

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

APROVADA: 12 de julho de 2012.


Karla Suemy Clemente Yotoko


Jorge Abdala Dergam dos Santos


Vander Calmon Tosta


Denilce Meneses Lopes
(Coorientadora)


Lucio Antonio de Oliveira Campos
(Orientador)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à Prof^a Celice Alexandre Silva, que assumiu a dura tarefa de apoiar meu doutorado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente ao povo brasileiro, pagador de impostos exorbitante, que em parte vêm sendo repassados aos órgãos de fomento à pesquisa de nosso país. Em momento, destaco o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Fundação de Amparo à Pesquisa do Mato Grosso (FAPEMAT) e à Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), que indiretamente financiaram esta pesquisa.

Agradecimento também se faz necessário à Universidade Federal de Viçosa e à Universidade do Estado de Mato Grosso, por terem me acolhido e proporcionado formação acadêmica e pessoal.

Ao programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, em especial ao José Marcelo Soriano (antigo coordenador), à Simone Guimarães (atual coordenadora) e às secretárias Edna e Rita. Nenhum deles mediu esforços para a conclusão deste trabalho.

Ao meu orientador, Lucio Antonio de Oliveira Campos, não só por me ensinar a fazer Ciência: tornar-me um pesquisador melhor será importante para minha vida profissional, porém suas orientações transcendem a simples conduta profissional. Com suas falas e principalmente atitudes, este senhor me tornou um cidadão mais responsável e consciente de minhas obrigações, na medida em que me ensinou como o bem público tem de ser trado. Seus conselhos no âmbito pessoal, além de me indicarem a direção de uma conduta harmônica com os que me rodeiam, têm me ajudado a ser um marido e pai melhor. Estes três anos e meios de convivência influenciarão minhas posturas permanentemente.

Aos professores Jorge Dergam (que, com a frase "Mi casa, su casa.", abriu as portas de seu laboratório em um momento muito importante de meu doutoramento), Karla Yotoko (exemplo de qualidade científica e informalidade), Denilce Lopes (me ensinou que serenidade não quer dizer conformismo), Tânia Fernandes-Salomão (às vezes, um pouco de maternalismo faz bem), Leonardo Bhering (organização nunca é demais) e

Mara Tavares (um dínamo produtivo): a todos vocês agradeço o convívio e os exemplos. Sou melhor depois de conviver com vocês.

Aos amigos e companheiros do Laboratório de Biologia Molecular de Insetos, Helder Resende (seriedade), Hugo Werneck (guerreiro), Tales Vicari (positivista), Renata Barbosa (responsável, bem-humorada e organizada).

À Bárbara Maurício e à Alexandra Medeiros, que me ajudaram executando trabalhos intelectualmente estimulantes e também os de macaco. Cada uma, ao seu estilo, contribuiu deixando pegadas em meus trabalhos.

À Dr^a Silvia Regina de Menezes Pedro, pela identificação das espécies do gênero *Partamona* analisadas no presente trabalho. Sem seus esforços este trabalho não teria progredido.

Aos colegas da Universidade do Estado de Mato Grosso, Departamento de Ciências Biológicas, campus de Tangará da Serra. Em especial, aos amigos que vestiram a armadura, pegaram o escudo, a espada e foram para a guerra em minha defesa, protegendo meu direito (se é que era um direito meu) ao afastamento. Não citarei nomes para não incorrer em injustiças, mas a Dedicatória que fiz à professora Celice se aplica a vocês também.

Algumas pessoas não atuaram diretamente na execução deste trabalho, mas ajudaram a manter meu espírito (se é que existe) equilibrado. Dedico um agradecimento muito especial aos “Pagodeiros”: Cabana (Filipe Ayupp), Gustavão (Hugo Ayupp), Jornaleiro (Guilherme Ayupp), Cocada (nome de batismo desconhecido), Careca (Gustavo), Marelo (nome de batismo desconhecido), Túlio e Saulim.

Um profundo agradecimento às mulheres da minha vida, Gê e Yasmin. A responsabilidade que me trouxeram não faz frente às alegrias do convívio. Já andei perdido, mas vocês me encontraram. Sou um homem melhor e mais forte agora.

À minha mãe, Leninha, e às minhas irmãs, Cíntia e Bethânia, que dedicaram parte dos últimos anos servindo de exemplo para a criação de minha filha. Não gosto nem de pensar na falta de referências pela qual a Yasmin vai passar no Mato Grosso.

Ao meu querido pai, Geraldo Miranda, exemplo incorruptível de honestidade.

Ao meu irmão preto, Bira (Cleuber Raimundo), e ao meu irmão branco, Experto (Dênis Fernandes de Miranda). Ao preto, por me mostrar que o homem que é fruto exclusivamente do meio é um completo incompetente. Ao branco, por vir me mostrando que, quando há competência, os limites desaparecem.

Ao meu amigo Ganso (Filipe Moreira de Andrade), profissional pelo qual tenho imensa admiração, admiração essa que vem me estimulado a melhorar em todos estes anos de contato.

À família Sampaio, pela ajuda nas coletas no Pará, em especial ao Wagner Sampaio, cuja parceria tem-me ajudado a melhorar profissional e pessoalmente nestes oito anos de convívio.

Bom, no mais, muitas abelhas morreram... agradeço também a elas.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. OBJETIVOS	3
3. REFERÊNCIAS	5
CAPÍTULO 1: RECONSTRUÇÃO FILOGENÉTICA PARCIAL DO GÊNERO <i>PARTAMONA</i> (HYMENOPTERA: APIDAE): INTROGRESSÃO E ORIGEM DO CROMOSSOMO B.....	7
1. RESUMO	8
2. INTRODUÇÃO	9
3. MATERIAIS e MÉTODOS	10
3.1. Amostras e extração de DNA.....	10
3.2. Reação em Cadeia da Polimerase e Sequenciamento	11
3.3. Análise das sequências e Reconstruções filogenéticas	12
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
4.1. Teste do marcador SCAR	13
4.2. Análise dos Fragmentos de COI, CytB e Ef1-a	15
4.3. Reconstruções filogenéticas	16
4.4. Relógio Molecular, Cladogênese e cromossomo B	23
5. REFERÊNCIAS	26
CAPÍTULO 2: EVIDÊNCIAS DE <i>NUMTS</i> ENVOLVENDO O GENE CITOCROMO B EM ABELHAS DO GÊNERO <i>Partamona</i> (Hymenoptera, Apidae)	28
1. RESUMO	29
2. INTRODUÇÃO	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1. Amostras, extração de DNA, amplificação e sequenciamento	31
3.2. Análise das sequências	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5. REFERÊNCIAS	39
CAPÍTULO 3: DIFERENTES TIPOS DE CROMATINA EM TRÊS ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Partamona</i> (HYMENOPTERA, APIDAE).....	41
1. RESUMO	42
2. INTRODUÇÃO	43
3. MATERIAIS E MÉTODOS	44
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5. REFERÊNCIAS	53

CONCLUSÕES GERAIS	56
ANEXO 1.....	58

RESUMO

MIRANDA, Anderson Fernandes de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2012. **Estudos citogenéticos e moleculares do gênero *Partamona*: filogenia e cromossomo B.** Orientador: Lucio Antonio de Oliveira Campos. Coorientadoras: Denilce Meneses Lopes e Mara Garcia Tavares.

O gênero *Partamona* é constituído por 33 espécies e apresenta uma ampla distribuição geográfica sendo encontrado desde o México até o sul do Brasil. Algumas espécies desse gênero são, morfologicamente muito semelhantes, sendo, em alguns casos, diferenciadas apenas pela arquitetura de entrada dos ninhos e pelos hábitos de nidificação. A constatação da presença de cromossomos Bs em populações de diversas espécies do gênero (*P. helleri*, *P. rustica* e *P. criptica* e *P. cupira*) levanta várias questões sobre a origem e evolução destes cromossomos em *Partamona*. Para um melhor entendimento destes dois aspectos, foi realizado um trabalho do padrão de ocorrência deste cromossomo em 15 espécies do gênero com a finalidade de associar a presença de cromossomo B e a hipótese filogenética entre as espécies portadoras dos mesmos. Foi formulada uma hipótese filogenética baseada em dados de genes mitocondriais e nucleares de algumas espécies do gênero. Dessa forma, foi possível inferir a ocorrência de cruzamentos interespecíficos entre as espécies *P. helleri* e *P. chapadicola* que poderiam estar relacionados com a transmissão do cromossomo B entre as espécies do gênero. Foram verificadas também incongruências entre as hipóteses filogenéticas baseadas em caracteres morfológicos e comportamentais e a baseada em caracteres moleculares sugerindo que tanto a espécie *P. seridoensis* quanto *P. chapadicola* possam compor grupos distintos de espécies crípticas. Foi caracterizada a presença de uma cópia de DNA mitocondrial (Cytocromo B) inserido no genoma nuclear (*numt*) em algumas espécies (*P. ailyae*, *P. helleri*, *P. mulata*, *P. rustica*, *P. cupirae* e *P. seridoensis*). E por fim, as análises citogenéticas das espécies *P. chapadicola*, *P. nhambiquara* e *P. rustica*, apontam para a visualização de uma nova classe cromossômica presente nestas espécies, que apresenta

três regiões com intensidades de coloração distintas baseadas na técnica de banda C.

ABSTRACT

MIRANDA, Anderson Fernandes de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2012. **Cytogenetic and molecular studies of the genus *Partamona*: phylogeny and B chromosomes.** Adviser: Lucio Antonio de Oliveira Campos. Co-advisers: Denilce Meneses Lopes and Mara Garcia Tavares.

The genus *Partamona* contains 33 species and presents a wide geographic distribution, being found from Mexico to southern Brazil. Some species of this genus are morphologically similar, in some cases differentiated only by nest entrance architecture and nesting habits. The presence of B chromosomes in diverse species of this genus (*P. helleri*, *P. rustica* and *P. criptica* and *P. cupira*) raises questions about the origin and evolution of these chromosomes in *Partamona*. To better understand these two aspects, we studied the occurrence of B chromosomes in 15 species of *Partamona* with the aim of associating the presence of these chromosomes with the phylogenetic hypothesis of these species, based on mitochondrial and nuclear genes. In this way, it was possible to infer the occurrence of interspecific crosses between *P. helleri* and *P. chapadicola* that could be related to the transmission of B chromosomes within this genus. Incongruencies between the phylogenetic hypotheses based on morphological characters, behavior and the molecular characters were verified, suggesting that both *P. seridoensis* and *P. chapadicola* may compose distinct groups of cryptic species. The presence of a copy of mitochondrial DNA (Cytochrome B) inserted in the nuclear genome (*numt*) was found in *P. ailyae*, *P. helleri*, *P. mulata*, *P. rustica*, *P. cupira* and *P. seridoensis*. Finally, cytogenetic analyses of the species *P. chapadicola*, *P. nhambiquara* and *P. rustica* indicated a new chromosomal class in these species, presenting three regions with distinct intensities of coloration based on C-banding.

1. INTRODUÇÃO GERAL

As abelhas do gênero *Partamona* (Hymenoptera, Apidae) são constituídas por 33 espécies e apresenta uma ampla distribuição geográfica, desde o México até o sul do Brasil (Camargo e Pedro, 2003). Algumas espécies desse gênero são morfologicamente muito semelhantes sendo, em alguns casos, diferenciadas apenas pela arquitetura de entrada dos ninhos e pelos hábitos de nidificação.

Essas abelhas são encontradas em diversos ambientes como florestas, caatinga, cerrado e regiões montanhosas (Camargo e Pedro, 2003) e apresentam um comportamento agressivo sendo popularmente conhecidas como "abelhas cachorro". Algumas espécies são adaptadas a ambientes antrópicos, sendo encontradas em vasos de plantas e frestas de paredes, outras são termitófilas obrigatórias.

Várias pesquisas têm sido realizadas em populações de algumas espécies de *Partamona* portadoras de cromossomos B. Neste gênero, esses cromossomos foram descobertos originalmente por Pompolo (1992) e abriram novas linhas de trabalho ao redor do tema, tanto com trabalhos envolvendo citogenética clássica de mapeamento de populações (Costa et al., 1992; Brito et al., 1997; Martins et al., 2009), quanto em trabalhos envolvendo técnicas de biologia molecular para detecção e estudo da similaridade genética entre cromossomos B de diferentes espécies do gênero (Tosta et al., 2004; Tosta et al., 2007; Marthe et al., 2010).

No momento uma contextualização histórica das descobertas envolvendo a citogenética e mais especificamente, os cromossomos B no gênero se faz necessária para expor os objetivos deste trabalho.

Os estudos citogenéticos deste gênero iniciaram-se em 1973 com Tarelho, que apresentou o cariótipo de duas espécies (*P. pearsoni* e *P. helleri* referida como *P. cupira helleri*). Atualmente, das 33 espécies, descritas apenas nove foram caracterizadas citogeneticamente. Todas as espécies estudadas até o momento apresentaram o número cromossômico igual a 34 (Brito-Ribonet al., 1999; Brito et al., 2003; Brito et al., 2005), exceto aquelas populações que possuem cromossomos B.

Os cromossomos B são considerados cromossomos dispensáveis, que estão presentes em alguns indivíduos de certas populações, apresentam segregação meiótica e mitótica irregular e como consequência, se acumulam em algumas linhagens celulares germinativas (Camacho et al., 1999). Algumas teorias foram apresentadas para explicar a origem destes cromossomos. Dentre as mais aceitas, estão a origem a partir do genoma A (envolvendo duplicações e fissões de fragmentos tanto de cromossomos autossômicos quanto de cromossomos sexuais) e a teoria da origem por híbrida interespecífica apresentado por McAllister e Warren (1997) para a vespa *Nasoniavitripennis*, na qual um macho de uma espécie do gênero *Trichomalopsis* portador de um cromossomo B hibridiza com uma fêmea de *N. vitripennis* transferindo este cromossomo a esta espécie.

Esses cromossomos são encontrados em muitos grupos de animais e vegetais. Em abelhas eles já foram relatados para as espécies: *Tetragonisca fiebrigi* (Barth et al., 2010); *Melipona quinquefasciata* (Rocha, 2002); *Meliponarufiventris* (Lopes, et al., 2008); *Partamona helleri* (Costa et al., 1992; Brito et al., 1997; Martins et al., 2009) e *Partamona cupira* (Marthe et al., 2010).

A descoberta de populações de *Partamona helleri* portadoras de cromossomos B (Pompolo, 1992) estimulou o desenvolvimento de várias linhas de pesquisa acerca desses cromossomos. Tosta et al. (2004) utilizando a técnica de RAPD, detectou um fragmento de DNA específico dos indivíduos de *P. helleri* portadores de cromossomos B. Posteriormente este fragmento foi sequenciado e foi construído um par de *primers* específicos (marcador SCAR) para o cromossomo B. Utilizando a citogenética, Marthe et al. (2010) mostraram que em *P. cupira*, a presença de banda obtida com marcador SCAR (obtido por Tosta et al., 2004) estava associada à presença de cromossomo B. Também foi verificado por Marthe et al. (2010) que populações de duas outras espécies, *P. rustica* e *P. criptica*, apresentavam sequências amplificadas como o uso do marcador SCAR, sugerindo que estas espécies também possuíam os cromossomos Bs. A constatação da presença dos cromossomos B em diversas espécies do gênero levanta várias questões sobre sua origem e evolução no grupo.

Neste ponto chama a atenção o fato de pelo menos quatro espécies do gênero serem positivos para o marcador SCAR e uma questão vem a tona: em qual contexto populações destas espécies adquiriram o cromossomo B? Teriam herdado o cromossomo B do ancestral comum mais próximo que possuía este cromossomo? Ou o cromossomo B poderia ter se originado de forma independente das diversas espécies? Ou, ainda, poderia outro fenômeno explicar este fato?

As únicas informações a respeito das relações filogenéticas das espécies do grupo são os trabalhos de Rasmussen e Cameron (2010) envolvendo apenas sete espécies do gênero e os trabalhos de Camargo e Pedro (2003) utilizando caracteres morfológicos e envolvendo todas as espécies do gênero. Todavia, os próprios autores ressaltam a grande dificuldade em se propor uma hipótese filogenética consistente com base em caracteres desta natureza devido à escassez dos mesmos e dificuldades em sua polarização e codificação. Logo a inexistência de uma filogenia robusta do gênero dificulta o estabelecimento de uma hipótese para a origem dos cromossomos B nas diversas espécies.

Considerando a inexistência uma filogenia consistente para o gênero *Partamona*, fazem-se necessários estudos que possibilitem o estabelecimento de uma hipótese filogenética baseada em marcadores moleculares tais como as sequências de nucleotídeo de genes mitocondriais e nucleares. Isto permitirá conhecer as relações filogenéticas dentro do gênero e fornecerá base de dados para a aplicação dos métodos filogenéticos comparativos.

2. OBJETIVOS

- GERAL

Propor uma hipótese filogenética molecular e associar tal hipótese aos dados obtidos por meio da utilização do marcador SCAR desenvolvido para cromossomo B com o intuito de propor uma hipótese sobre a origem dos cromossomos Bs para o gênero *Partamona*.

- ESPECÍFICOS

- Ampliar o número de espécies analisadas quanto à presença do marcador SCAR associado ao cromossomo B nas amostras de espécies de *Partamona* comparando estes dados com os obtidos via citogenética clássica.
- Sequenciar genes mitocondriais e nucleares e propor hipóteses filogenéticas para o grupo;
- Investigar as relações filogenéticas entre as espécies do gênero *Partamona* utilizando a sequência dos genes mitocondriais e nucleares e verificar se as espécies que possuem o marcador SCAR são filogeneticamente aparentadas.
- Com base nos resultados encontrados, formular hipótese acerca da origem e evolução desses cromossomos nesse gênero
- Caracterizar citogeneticamente as espécies *P. rustica*, *P. chapadicola* e *P. nhambiquara*.

3. REFERÊNCIAS

- BARTH A, FERNANDES A, POMPOLO SG and COSTA MA. 2011. Occurrence of B chromosomes in *Tetragonisca* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): a new contribution to the cytotaxonomy of the genus. *Genetics and Molecular Biology*, 34(1): 77-79.
- BRITO RM, COSTA MA and POMPOLO SG. 1997. Characterization and distribution of supernumerary chromosomes in 23 colonies of *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Brazilian Journal of Genetics*, 20:185-188.
- BRITO-RIBON RM, MIYAZAWA CS and POMPOLO SG. 1999. First karyotype characterization of Four Species of *Partamona* (Friese, 1980) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) in Mato Grosso State - Brazil. *Cytobios*, 100:19-26.
- BRITO RM, CAIXEIRO APA, POMPOLO SG and AZEVEDO GG. 2003. Cytogenetic data of *Partamona peckolti* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) by C banding and fluorochrome staining with DA/CMA3 and DA/DAPI. *Genetics and Molecular Biology*, 26:53-57.
- BRITO RM, POMPOLO SG, MAGALHÃES MFM, BARROS EG and SAKAMOTO-HOJO ET. 2005. Cytogenetic characterization of two *Partamona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) by fluorochrome staining and localization of 18S rDNA clusters by FISH. *Cytologia* 70:373-380.
- CAMACHO JPM, SHARBEL TF and BEUKEBOOM, LW. 1999. B chromosome evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 354: 163-178
- CAMARGO JMF and PEDRO SRM. 2003. Meliponini Neotropicais: O gênero *Partamona* Schwarz, 1939 (Hymenoptera, Apidae, Apinae). *Revista Brasileira de Entomologia*, 47(3): 311-372.
- COSTA MA, POMPOLO SG and CAMPOS LAO. 1992. Supernumerary Chromosomes In *Partamona cupira* (Hymenoptera, Apidae Meliponinae). *Revista Brasileira de Genética*, 15: 801-806.
- LASALLE J and GAULD ID. 1993. Hymenoptera and Biodiversity. Centre for Agricultural Bioscience International and The Natural History Museum, Londres. 348 pp.
- KERR WE, CARVALHO G A and NASCIMENTO VA. 1996. Abelha urucu – biologia, manejo e conservação. Fundação Acangaú, Belo Horizonte, 144p.
- LOPES DM, POMPOLO SG, CAMPOS LAO and TAVARES MG. 2008. Cytogenetic characterization of *Melipona rufiventris* Lepelletier 1836 and *Melipona mondury* Smith 1863 (Hymenoptera, Apidae) by C banding and fluorochromes staining. *Genetics and Molecular Biology*, 31: 49-52.
- MARTHE JB, POMPOLO SG, CAMPOS LAO, SALOMÃO TMF and TAVARES MG. 2010. Cytogenetic characterization of *Partamona cupira* (Hymenoptera, Apidae) by fluorochromes. *Genetics and Molecular Biology*, 33(2): 253-255.

- MARTINS CCC, DUARTE OMP, WALDSCHMIDT AM, ALVES RMO and COSTA MA. 2009. New occurrence of B chromosomes in *Partamona helleri* (Friese, 1900) (Hymenoptera, Meliponini). *Genetics and Molecular Biology*, 32(4): 782-785.
- MCALLISTER BF and WERREN JH. 1997. Hybrid origin of a B chromosome (PSR) in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. *Chromosoma*, 106:243-253.
- MOURE JS, URBAN D and MELO, GAR (Orgs). 2007. Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the neotropical region. Sociedade Brasileira de Entomologia, Curitiba. pp 1054.
- POMPOLO SG. 1992. Estudos citogenéticos em Meliponinae. *Naturalia*. Special edition: 62-66.
- ROCHA M P. 2002. Análises citogenéticas em abelhas do gênero *Melipona* (Hymenoptera, Meliponinae). Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo. 86p.
- TARELHO ZVS. 1973. Contribuição ao estudo citogenético dos Apoidea. MS Dissertation, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- TOSTA VC, TAVARES MG, FERNANDES A, BARROS EG, CAMPOS LAO and CAMACHO JPM. 2004. A RAPD marker associated with B chromosomes in *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae). *Cytogenetics Genome Research*, 106:279-283.
- TOSTA VC, TAVARES MG, FERNANDES A, BARROS EG, CAMPOS LAO and CAMACHO JPM. 2007. Development of a SCAR marker for the analysis of B chromosome presence in *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae). *Cytogenetics Genome Research*, 116:127-129.

**CAPÍTULO 1: RECONSTRUÇÃO FILOGENÉTICA PARCIAL DO GÊNERO
PARTAMONA (HYMENOPTERA: APIDAE): INTROGRESSÃO E ORIGEM
DO CROMOSSOMO B.**

1. RESUMO

A descoberta de cromossomo B em indivíduos de algumas colônias de *P. helleri* estimulou o desenvolvimento de várias linhas de pesquisa acerca desses cromossomos. Desde trabalhos envolvendo citogenética clássica, até a criação de um marcador específico para o cromossomo B (marcador SCAR), culminando com a descoberta de que outras três espécies do gênero (*P. cupira*, *P. rustica* e *P. criptica*) que, a princípio, também possuíam o mesmo cromossomo. Com o intuito de entender a origem e evolução deste cromossomo no gênero *Partamona*, testamos o marcador SCAR em 1367 indivíduos provenientes de 151 colônias de 15 espécies do gênero *Partamona* (*P. cupira*, *P. helleri*, *P. aff helleri*, *P. rustica*, *P. seridoenses*, *P. ailyae*, *P. chapadicola*, *P. combinata*, *P. criptica*, *P. epiphytophila*, *P. gregaria*, *P. mulata*, *P. nhambiquara*, *P. testacea* e *P. vicina*). Vinte e oito colônias pertencentes a cinco espécies (duas colônias de *P. cupira*, 21 de *P. helleri*, duas de *P. aff helleri*, duas de *P. rustica* e uma de *P. seridoenses*) apresentaram-se positivas para o marcador SCAR. Posteriormente realizamos o sequenciamento de três genes, Citocromo Oxidase subunidade 1 (COI), Citocromo B (CytB) e Fator de Elongação da Tradução (EF1a), para inferência das relações filogenéticas do grupo. Os genes mitocondriais proporcionaram reconstruções das relações entre as espécies analisadas. Os resultados obtidos nos levaram a inferir sobre a existência de possíveis cruzamentos interespecíficos entre *P. helleri* e *P. chapadicola*, o que aponta que cruzamentos desta natureza poderiam estar relacionados tanto com a origem do cromossomo B quanto à transmissão dos mesmos entre as espécies do gênero. As reconstruções filogenéticas também apontam para a ocorrência de um marcante evento de cladogênese ocorrido há aproximadamente 35 milhões de anos que dividiu o grupo em dois clados. Já incongruências entre a caracterização taxonômica e as informações moleculares sugerem que tanto a espécie *P. seridoensis* quanto *P. chapadicola* possam compor grupos distintos de espécies crípticas.

2. INTRODUÇÃO

As abelhas da tribo Meliponini possuem importância ecológica e econômica, pois são responsáveis por grande parte da polinização de plantas nativas e cultivadas nas áreas onde ocorrem (Michener, 2000). Dentre os 33 gêneros que compõem esta tribo (Moure et al., 2007), encontramos o gênero *Partamona* Schwarz, 1939, que possui 33 espécies de distribuição exclusivamente neotropical, sendo encontradas do México ao Sul do Brasil. Estas abelhas estão presentes em todos os ambientes brasileiros (florestas, caatinga, cerrado e regiões montanhosas) e algumas delas possuem excepcional tolerância a ambientes antrópicos (Camargo e Pedro, 2003). A taxonomia do grupo é problemática, pois possui várias espécies morfológicamente muito semelhantes, sendo que em alguns casos a arquitetura dos ninhos é o caráter mais confiável para diagnóstico das espécies (Camargo e Pedro, 2003).

A descoberta de populações de *Partamona helleri* portadoras de cromossomos B (Pompolo, 1992) estimulou o desenvolvimento de várias linhas de pesquisa acerca desses cromossomos em meliponídeos. Tosta et al. (2004) utilizando a técnica de RAPD detectaram um fragmento de DNA específico dos indivíduos de *P. helleri* portadores de cromossomos B. Posteriormente este fragmento foi sequenciado e a partir do sequenciamento foi construído um par de *primers* específicos (marcador SCAR) para o cromossomo B. Utilizando a citogenética, Marthe et al. (2010) mostraram que em *P. cupira*, a presença de banda obtida com marcador SCAR (obtido por Tosta et al., 2004) estava associada a presença de cromossomo B. Também foi verificado que populações de duas outras espécies, *P. rustica* e *P. criptica*, apresentavam sequências amplificadas como o uso do marcador SCAR, sugerindo que estas espécies também possuíam o cromossomo B.

Buscando subsídios para o entendimento da origem e evolução dos cromossomos B em espécies do gênero *Partamona*, no presente estudo propomos uma hipótese acerca das relações filogenéticas entre algumas espécies do gênero e verificar se com base nestas relações é possível elaborar uma hipótese sobre a origem dos cromossomos B nas diferentes espécies de *Partamona*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Amostras e extração de DNA

Foram coletados indivíduos adultos de 152 colônias de 15 espécies do gênero *Partamona*, duas do gênero *Geotrigona*, três do gênero *Trigona* e uma do gênero *Paratrigona* (Figura 1 e Anexo 1). As amostras foram imersas em etanol absoluto e estocadas em freezer à -20°C. As espécies foram identificadas pela Dr^a Silvia Regina de Menezes Pedro do departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto e amostras testemunhas se encontram depositados na Coleção Camargo (Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da USP, Ribeirão Preto-SP, Brasil) bem como na coleção do museu de entomologia da Universidade Federal de Viçosa (Viçosa-MG, Brasil).

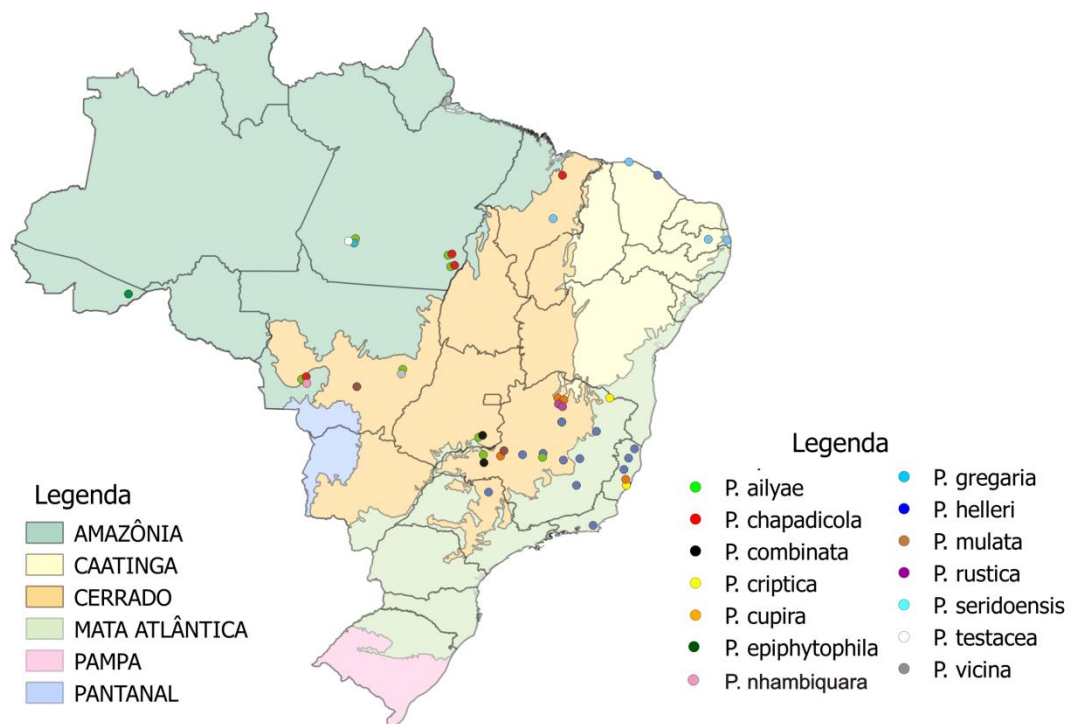


Figura 1. Relação das espécies amostras analisadas.

A extração do DNA total das operárias foi realizada conforme o protocolo recomendado por Waldschmidt et al. (1997). A quantificação e verificação da integridade e pureza do DNA foram analisadas por meio de eletroforese em gel de agarose a 0,8% contendo 0,2 µg/ml de GelRed™ (Biotium).

3.2. Reação em Cadeia da Polimerase e Sequenciamento

Para verificar a presença do marcador SCAR associado ao cromossomo B o DNA genômico foi amplificado utilizando-se os *primers* específicos (Tabela 2) com as especificações propostas por TOSTA et al., 2007. Ao fim da reação, os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% e analisados com o auxílio do sistema de captura de imagens Alphadigdoc 1201. A análise dos géis foi feita pela presença e ausência de bandas contendo o produto de amplificação por indivíduo.

Para a amplificação dos fragmentos dos genes Citocromo Oxidase subunidade 1 (COI), Citocromo B (CytB) e Fator de Elongação da Tradução (EF1a) (Tabela 2) foram utilizadas as seguintes condições de reação: uma mistura de 50 µL contendo MgCl₂ 2,0 mM; Tris/HCl 10 mM/50 mM; 2 mM de cada desoxirribonucleosídeo trifosfato (dATP, dTTP, dGTP, dCTP); 4 mM de cada um dos *primers* (*reverse* e *forward*), 1 unidade de *Taq* polimerase (Promega®) e 50ng de DNA genômico. A reação foi realizada em um termociclador Eppendorf® (Modelo Mastercycler Gradient) seguindo as seguintes etapas: um passo inicial de 3 min. a 95°C, seguido de e 35 ciclos de 1 min. a 95°C para desnaturação do DNA, 1 min. e 20 seg. a 51,2°C para pareamento dos *primers* e 1 min. e 20 seg. a 72°C para alongamento. Ao final dos 35 ciclos foi realizado um passo extra de extensão (10 min. à 72°C). Uma alíquota de 5 µL de cada um dos produtos de PCR foi corado com GelRed™ (Biotium), submetido à eletroforese em gel de agarose 1% para averiguar a qualidade e concentração do produto de PCR. Posteriormente estes foram sequenciados em uma máquina de sequenciamento automático (Mega Bace™ 500, GE Healthcare) pela empresa MacroGen Inc. (Seul, Coréia do Sul).

Tabela 2- Relação dos *primers* (reverse e forward) utilizados. Temp. = temperatura de anelamento do primer. ** Primers desenhados por Helder Canto Resende e Henrique Batalha-Filho baseados no genoma de *Melipona bicolor*.

Gene	Código	Sequência (5'-3')	Temp.	Referência
SCAR	OPK14A	CCCGCTACACATATAATTAACG	55°C	Tosta et al., 2007
	OPK14B	CCCGCTACACCCTAAAATATGC		
CytB	CytbF	TCGTTTAATTCAATAAATGGAGC	51,2°C	**
	CytbR	ATTACWCCTCCTAATTTATTWGAAT		
COI	COIdegF	TAAACTTCWGGATGWCCAAAAAATCA		Presente trabalho
	COIdegR	TATCWACHAATCATAAAAATMTTGG		
EF1-a	EF1_2F	GGACACAGAGATTTTCATCAARAA		Kawakita et al., 2003
	EF1_2R	TTGCAAAGCTTCRTGRTGCATTT		

3.3. Análise das sequências e Reconstruções filogenéticas

A sequência consenso das fitas *forward* e *reverse* (*contigs*) foi obtida e editada para cada amostra pelo programa DNA BaserTM (versão 3.5.0). Os *contigs* foram alinhados utilizando o programa Mega versão 5.05 (Tamura et al. 2011). O alinhamento das sequências foi obtido por meio do algoritmo Clustal W (Higgins et al., 1994) implementado pelo programa Mega versão 5.05 e todas as sequências foram inspecionadas à procura de códons de parada prematuros, que poderiam indicar que as sequências em questão tratavam-se de fragmentos de DNA mitocondrial que se encontravam no núcleo (*Numt*).

A relação filogenética entre as espécies foi inferida por meio do software MRBAYES versão 3.1.2 (Ronquist e Huelsenbeck, 2003) que utiliza o método de inferência Bayesiana. O modelo apropriado de substituição de bases GTR+I+G (para os genes COI e CytB) e HKY (para EF1a) foram selecionados baseado no critério de informação Akaike fornecido pelo programa MrModelTest versão 2.3 (Posada e Crandall, 1998).

As árvores foram editadas com o auxílio do programa FigTree versão 1.3.1 (Rambaut, 2009). As redes de haplótipos foram obtidas por meio dos programas DNASP versão 5.10 (Librado e Rozas, 2009) e NETWORK

versão 4.6 (Fluxus Technology Ltda) utilizando-se o método de *median-joining* (Bandelt et al., 1999).

Para a obtenção das estimativas do tempo de divergências entre os clados foram utilizados o fragmento do gene CytB e o programa Beast versão 1.7.2 (Drummond e Rambaut, 2007), como o mesmo modelo de substituição de bases utilizado na reconstrução filogenética para este gene (GTR+I+G). O modelo escolhido para o relógio molecular foi o relaxado (*Relaxed Clock: uncorrelated log-normal*). Foi considerada a data de 43,5 ($\pm$ 0,5) milhões de anos para a separação entre o gênero *Partamona* e o gênero *Paratrigonade* acordo com os dados apresentados por Rasmussen e Cameron(2010).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Teste do marcador SCAR

O marcador SCAR foi testado em 1367 indivíduos provenientes de 151 colônias de 15 espécies do gênero *Partamona* (*P. cupira*, *P. helleri*, *P. aff helleri*, *P. rustica*, *P. seridoenses*, *P. ailyae*, *P. chapadicola*, *P. combinata*, *P. criptica*, *P. epiphytophila*, *P. gregaria*, *P. mulata*, *P. nhambiquara*, *P. testacea* e *P. vicina*). Apenas 53 indivíduos (3,88%) presentes em 28 colônias (18,5% do total analisadas) pertencentes a cinco espécies (duas colônias de *P. cupira*, vinte e uma de *P. helleri*, duas de *P. aff helleri*, duas de *P. rustica* e uma de *P. seridoenses*) apresentaram marcação positiva para o marcador SCAR (Tabela 3). Populações das espécies *P. criptica*, *P. cupira* e *P. rustica* já haviam sido estudadas anteriormente e responderam positivamente ao marcador SCAR indicando que cromossomos B estavam presentes nestas populações (Tosta, 2005 e Marthe et al., 2010), porém no presente trabalho não houve registro para as colônias analisadas de *P. criptica*.

Tabela 3- Relação de espécies que apresentaram resultado positivo para o marcador OPK14. Também são apresentados os índices de prevalência média por localidade e por espécie.

Espécie	Código	Localidade/Estado	n	Com B	Prevalência
<i>P. helleri</i>	PHES117	Governador Lindenberg-ES	10	10	1,00
	PHES119	Governador Lindenberg-ES	10	9	0,90
	PHES128	Governador Lindenberg-ES	10	9	0,90
	PHES129	Governador Lindenberg-ES	10	8	0,80
	PHES122	Governador Lindenberg-ES	10	7	0,70
	PHES120	Governador Lindenberg-ES	10	4	0,40
	PHES131	Governador Lindenberg-ES	10	3	0,30
	PHES127	Governador Lindenberg-ES	10	9	0,90
	Prevalência Média:				0,74
	PHES118	Jaguaré-ES	10	8	0,80
	PHES121	Jaguaré-ES	10	7	0,70
	Prevalência Média:				0,75
	PHES124	Alfredo Chaves-ES	10	6	0,60
	PHES130	Alfredo Chaves-ES	10	1	0,10
	Prevalência Média:				0,35
	PHMG05	Viçosa-MG	3	2	0,67
	PHMG09	Viçosa-MG	2	1	0,50
	PHMG06	Viçosa-MG	3	1	0,33
	Prevalência Média:				0,50
	PHMG82	Inhaí-MG	10	8	0,80
	PHMG83	Inhaí-MG	10	6	0,60
	Prevalência Média:				0,70
	PHMG81	Poté- MG	10	4	0,40
	PHSP112	Ribeirão Preto- SP	10	5	0,50
	PHSP113	Ribeirão Preto- SP	10	2	0,20
	Prevalência Média:				0,35
	PREVALÊNCIA MÉDIA POR sp.:				0,56
<i>P. cupira</i>	PCUMG1	Guimarães-MG	10	2	0,20
	PCUMG132	Guimarães-MG	10	2	0,20
	PREVALÊNCIA MÉDIA POR sp.:				0,20
<i>P. aff helleri</i>	PaffHMG11	Paraopeba-MG	7	5	0,71
	PaffHMG14	Paraopeba-MG	6	3	0,50
	PREVALÊNCIA MÉDIA POR sp.:				0,60
<i>P. rustica</i>	PRUMG2	Nova Porteirinha-MG	10	2	0,20
	PRMG48	Nova Porteirinha-MG	3	2	0,67
	PRUMG145	Nova Porteirinha-MG	10	2	0,20
	PREVALÊNCIA MÉDIA POR sp.:				0,36
<i>P. seridoensis</i>	PSECE77	Camocim- CE	10	10	1,00

A comparação entre as prevalências médias por espécie que apresenta cromossomo B permitiu observar que *P. sp. (aff) helleri*

apresentou o maior valor (0,60), seguida por *P. helleri* (0,56). A espécie que possuiu menor prevalência média foi *P. cupira* (0,20). Porém, tanto o número de colônias de *P. sp. (aff) helleri* quanto de *P. cupira* foram muito pequenos para podermos inferir sobre a abundância do cromossomo B nestas espécies.

Considerando a espécie *P. helleri*, as maiores prevalências médias foram encontradas em Governador Lindenberg-ES (0,74), Jaguaré-ES (0,75) e Inhaí-MG (0,70). A alta prevalência média encontrada na população de Jaguaré-ES está parcialmente em desacordo com a prevalência obtida por Vignati (2011) para a mesma população. Em seu trabalho, Vignati apresenta dois valores de prevalência, um obtido via biologia molecular (marcador SCAR) de 0,47 e outro de 0,74 obtido via citogenética clássica.

4.2. Análise dos Fragmentos de COI, CytB e Ef1-a

Os tamanhos médios dos fragmentos dos genes COI, CytB e EF1-a, que foram sequenciados, foram de 593, 598 e 721 pares de bases, respectivamente (Figura 2). Quando o tamanho dos fragmentos utilizados no presente trabalho são comparados com os genes COI e CytB completos de *Melipona bicolor* (Silvestre et al., 2008; acesso GenBank: AF466146.1), estes fragmentos representam 57% e 37% do tamanho total dos genes respectivamente, sendo que o fragmento de COI se posiciona na porção inicial do gene e o fragmento de CytB na porção mediana (Figura 2). O fragmento de EF1-a apresentou um *intron* de 194 pares de bases de comprimento correspondendo a 20,1% do total.

Entre os genes mitocondriais, CytB apresentou maior número de sítios variáveis (223 contra 149 de COI), possuindo também maior número de sítios parcimoniosamente informativos e autoapomorfias (*singletons*) (Figura 2), o que nos leva a acreditar que os genes mitocondriais tenham taxas diferentes de substituição. Resultados semelhantes foram encontrados por Ferreira (2011) estudando os mesmos genes de 73 colônias de *P. helleri*. Foi possível verificar uma predominância de bases AT (77,9% para COI e 79,8% para CytB) que já era esperada para abelhas (Crozier e Crozier, 1993; Dick et al., 2004, Silvestre et al, 2008; Batalha-Filho et al,

2010, Lopes, 2008 e Ferreira, 2011) e insetos de uma forma geral (Shin et al., 2006; Nakamine e Takeda, 2008).

Foi possível verificar para o fragmento de EF1-a uma alta taxa de sítios conservados o que se mostrou um problema para a reconstrução da filogenia do grupo com este gene, uma vez que não proporcionou diferenças suficientes para separação das espécies com base nas diferenças observadas. De fato, a alta conservação de genes nucleares, quando comparados aos mitocondriais já era esperado. Avise (2009) ressalta este aspecto e o atribui ao fato de o DNA nuclear ser monitorado por um mecanismo mais eficiente de reparo, estar em um ambiente menos rico em agentes oxidantes e se encontrar em íntima associação à histonas o que restringiria as taxas de mutação, quando comprado com o DNA mitocondrial.

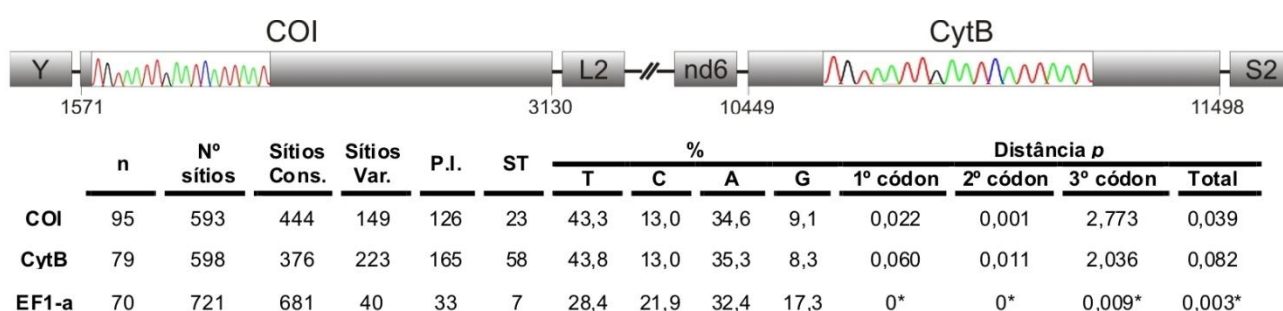


Figura 2- Esquema estrutural em escala dos genes COI e CytB posicionados no genoma mitocondrial, segundo Silvestre et al., 2008. O comprimento total em pares de base dos genes COI e CytB são de 1559 e 1049, respectivamente. O gene COI se encontra intercalado pelos RNAs transportadores de Leucina e Tirosina (tRNA^{TYR} tRNA^{LEU}, respectivamente), já o CytB intercalados pelos genes NADH desidrogenase subunidade 6 (nd6) e tRNASER (S2). * Distâncias *p* relacionadas apenas à região dos éxons. Em destaque relacionamos a análise dos genes indicando número de sítios sequenciados, conservados, variados, parcimoniosamente informativos (P.I.), autoapomórficos (ST) e porcentagem de bases T, C, A e G.

4.3. Reconstruções filogenéticas

Todas as reconstruções filogenéticas realizadas neste trabalho apontam para a monofiletismo das espécies gênero *Partamona* ou pelo menos das espécies analisadas. A monofiletia do gênero já havia sido inferida anteriormente (Camargo e Pedro, 2003; Pedro e Camargo, 2003 e Rasmussen e Cameron, 2010).

O segmento do gene EF1-a sequenciado foi muito pouco variado (Figura 3), entretanto a reconstrução filogenética utilizando esse segmento

mostrou dois grupos com alto valor de probabilidade posterior, um constituído por *P. ailyae*, *P. mulata* e *P. vicina*, conjunto de espécies que também aparecem juntas e de forma bem distinta das demais espécies quando a reconstrução filogenética foi feita com base nos genes COI e CytB (Figuras 4 e 5). O outro clado distinto é constituído por *P. cupira* e *P. seridoensis* (amostra PSCE77) que também aparecem juntas quando a reconstrução foi feita utilizando o fragmentos de COI.

Tanto a reconstrução utilizando caracteres morfológicos (Pedro e Camargo, 2003), quanto utilizando caracteres ecológicos e comportamentais (Camargo e Pedro, 2003) propõe um cladograma na qual *P. ailyae* apresenta grande proximidade à *P. mulata*, o mesmo acontecendo para *P. testacea* e *P. vicina*, porém os cladogramas formados pelos pares de espécies duas a duas não se apresentam como grupo irmão da forma que foi observado no presente trabalho.

O outro clado recuperado pelas reconstruções de todos os genes foi composto por *P. cupira* e *P. seridoensis* (amostra PSCE77) que para Camargo e Pedro (2003) contém espécies que não estão intimamente relacionadas como representada no nosso caso. De fato, ao se analisar o gene COI, a proximidade entre as *P. cupira* e PSCE77 foi tamanha que esta amostra compartilhou mais semelhanças com as amostras de *P. cupira* do que com as outras amostras da própria espécie (PSPB47 e PSMA68) (Figura 5).

Ainda sobre *P. seridoensis*, outras duas amostras foram analisadas (PSPB47 e PSMA68, proveniente da Paraíba e Maranhão, respectivamente) e não foi verificada proximidade filogenética entre elas. A amostra PSPB47 se mostrou como espécie irmã de uma amostra de *P. criptica* (PCRMG66) em uma politomia onde se encontram também *P. helleri* e *P. rustica* (Figura 5). Já a terceira amostra de *P. seridoensis* (PSMA68) posiciona-se como grupo irmão das amostras de *P. chapadicola* provenientes do Maranhão.

As três amostras de *P. seridoensis* compartilham mais caracteres moleculares com outras espécies do que entre si ((PSPB47, *P. criptica*) e (PSMA68, *P. chapadicola*) e (PSCE77, *P. cupira*)), apontando para um problema taxonômico na caracterização morfológicas da espécie.

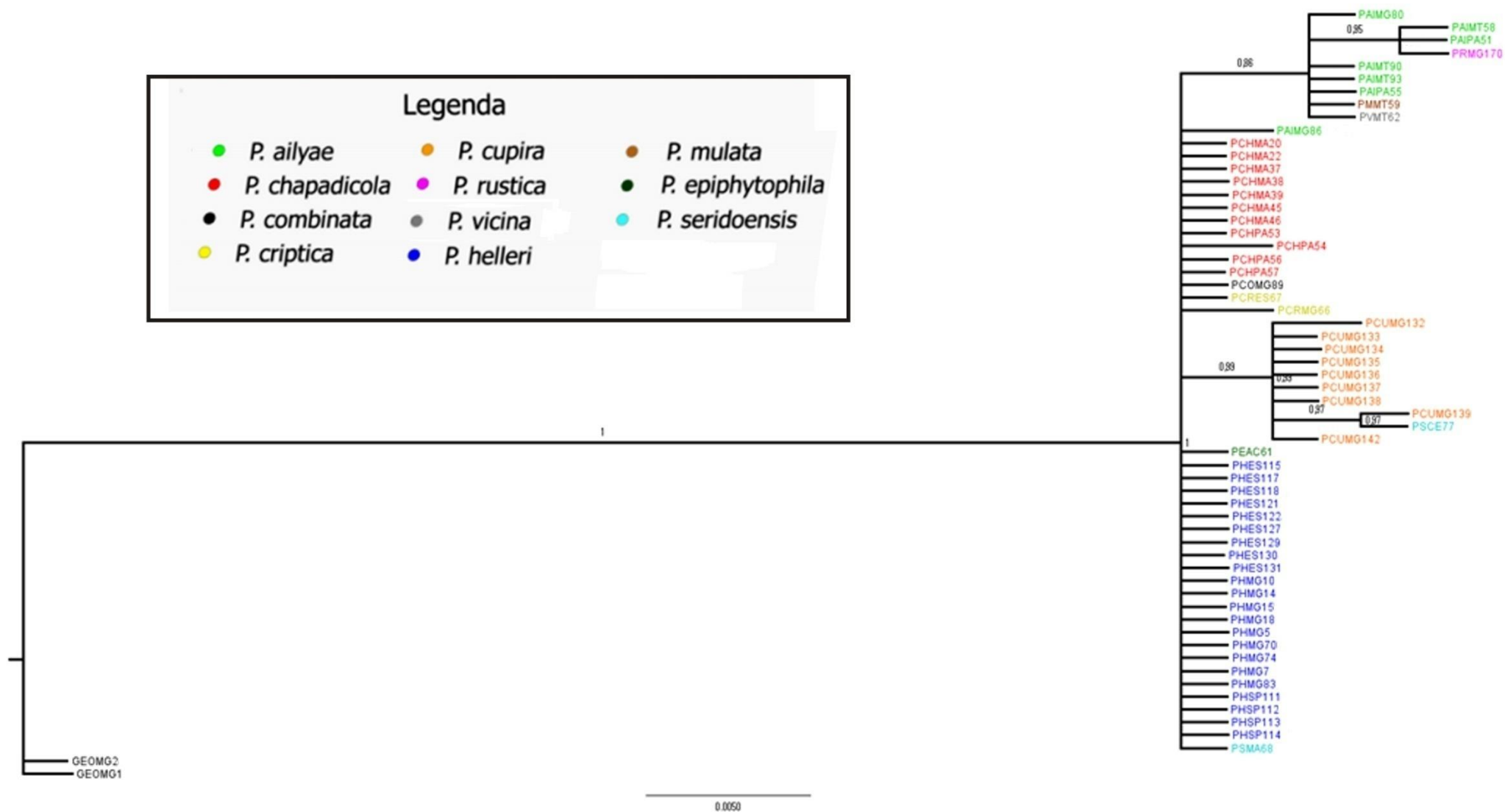


Figura 3- Reconstrução filogenética obtida por meio de inferência bayesiana do gene EF1-a. números antes dos nós representam as probabilidades posteriores. Cada cor representa uma espécie.

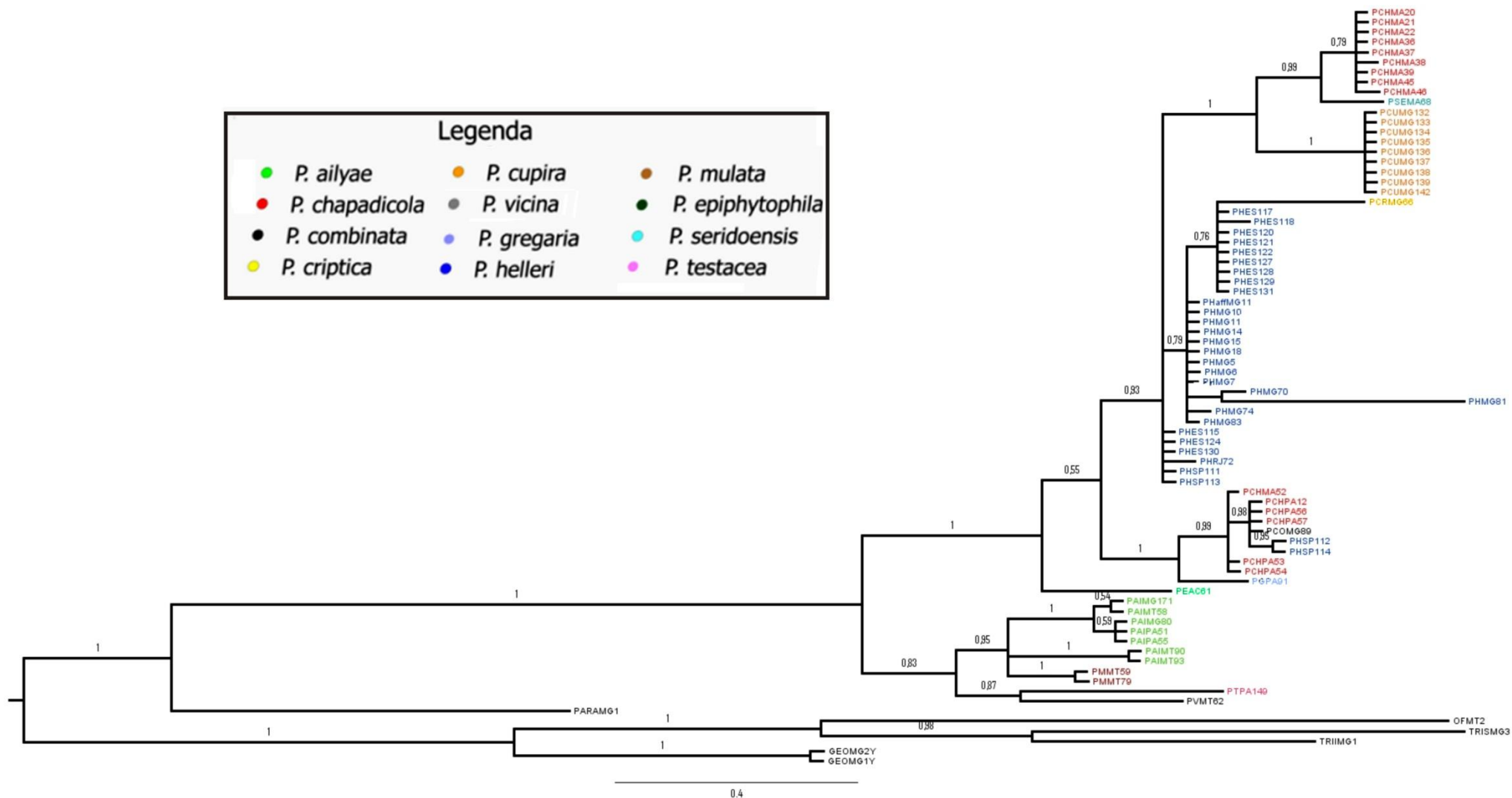


Figura 4- Filogenia bayesiana do gene CytB. Números antes dos nós representam as probabilidades posteriores. Cada cor representa uma espécie.

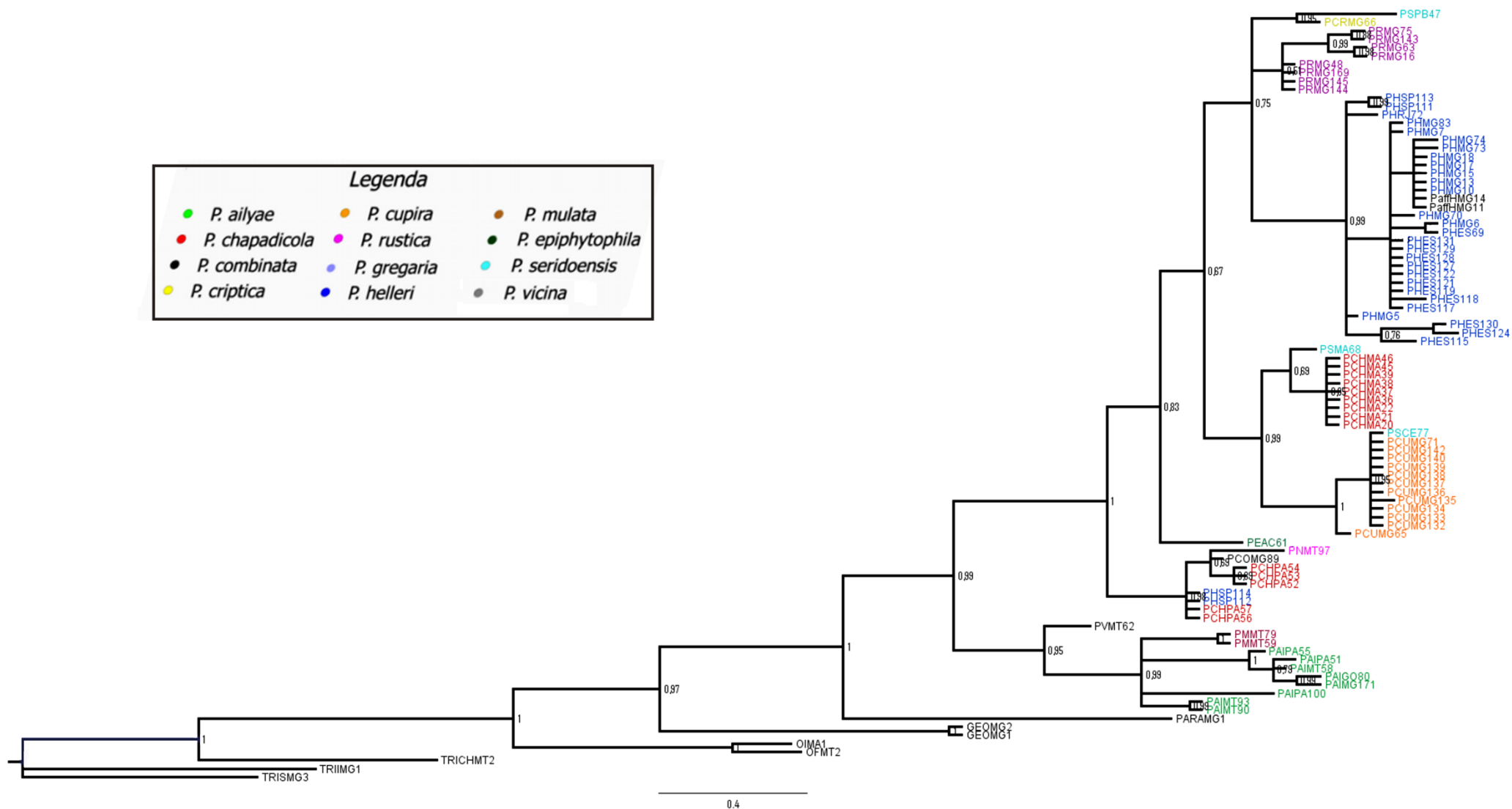


Figura 5- Filogenia bayesiana do gene COI. Números antes dos nós representam as probabilidades posteriores. Cada cor representa uma espécie.

Outra espécie que apresentou comportamento semelhante foi *P. chapadicola*, uma vez que amostras da mesma estão presentes em dois clados distintos, havendo nítida separação entre as populações do Maranhão e do Pará. A primeira população se mostra como grupo irmão de *P. seridoensis* (já mencionada) e estas duas como grupo irmão de *P. cupira*, por outro lado a população do Pará se mostra associadas à *P. combinata* (para ambos os genes mitocondriais analisados), à *P. nhambiquara* (para COI, Figura 3) e *P. gregaria* (para Cytb, Figura 5).

Algumas espécies morfológicas são aparentemente constituídas por um par de espécies crípticas como é o caso de *P. chapadicola*, uma vez que amostras as amostras do Pará e do Maranhão, aparentemente pertencem à espécies distintas. Estas diferenças entre a caracterização taxonômica e as informações moleculares sugerem que tanto *P. seridoensis* quanto *P. chapadicola* possam compor dois grupos de espécies crípticas.

Outro aspecto a ser destacado com relação a *P. chapadicola* (população do Pará) é que esta compartilha o clado com duas amostras de *P. helleri* oriundas de Ribeirão Preto-SP (Figura 4 e 5). Dos 595 sítios do fragmento COI apenas duas diferenças do tipo transição (T↔C) foram detectadas entre elas, sendo que uma delas foi não sinônima (Treonina↔Metionina), as amostras de PHSP112 e PHSP114 são idênticas às amostras PCHPA56 e PCHPA57. Já para o fragmento de CytB, dos 607 sítios analisados apenas 4 foram sítios variáveis, sendo que a amostra de PHSP112 (*P. helleri*) e PCHPA12 (*P. chapadicola*) foram idênticas e as amostras PHSP 114 (*P. helleri*) e PCHPA53, PCHPA 56 e PCHPA 57 (*P. chapadicola*) também foram idênticas (Figura6). Esta alta similaridade entre as sequências mitocondriais encontradas aqui apontam para um possível processo de introgressão entre *P. helleri* e *P. chapadicola*. O processo de introgressão é relativamente bem relatado entre espécies próximas (ver revisão em Arnold, 2006) e um possível cenário para explicar este resultado envolveria basicamente dois pressupostos: 1) colônias de *P. helleri* e *P. chapadicola* necessariamente teriam que estar em contato e 2) as populações envolvidas não poderiam estar em um estágio avançado de especiação que impedisse o intercruzamento. O cruzamento entre fêmeas de *P. chapadicola* e machos de *P. helleri* e posterior cruzamento de *P. helleri*

por várias gerações, poderia levar à situação atual. Neste cenário, poderíamos explicar como as amostras de *P. helleri* poderiam compartilhar porções do genoma mitocondrial (fragmentos de CytB e COI) com *P. chapadicola*. Se este cenário está correto, as colônias PHSP112 e PHSP114 podem ser consideradas relíquias de um passado no qual ambas as espécies inter cruzaram-se.

Ferreira (2011) utilizando um fragmento de CytB estudou 39 colônias de *P. helleri* coletadas no campus Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto (Ribeirão Preto-SP) e encontrou 4 haplótipos distintos. Dois deles mais frequentes e muito semelhantes entre si e outros dois menos frequentes e mais diferenciados sendo que um deles formado por três amostras apresentou um alto grau de divergência em relação à todos os demais. Segundo a autora, a existência destes dois haplótipos distintos em uma área relativamente pequena pode ser explicado pela introdução de meliponídeos de todo o país no campus, uma vez que seu apiário é um notório local de estudo destes organismos. Darlling (2011), alerta para o fato de que a introdução feita pelo homem de espécies possibilita o cruzamento interespecífico podendo alterar a integridade genética e a viabilidade evolucionária da espécie nativa, em muitos casos levando à perda do valor adaptativo (*fitness*) da espécie nativa colocando-a em rota de extinção (Rhymer e Simberloff, 1996).

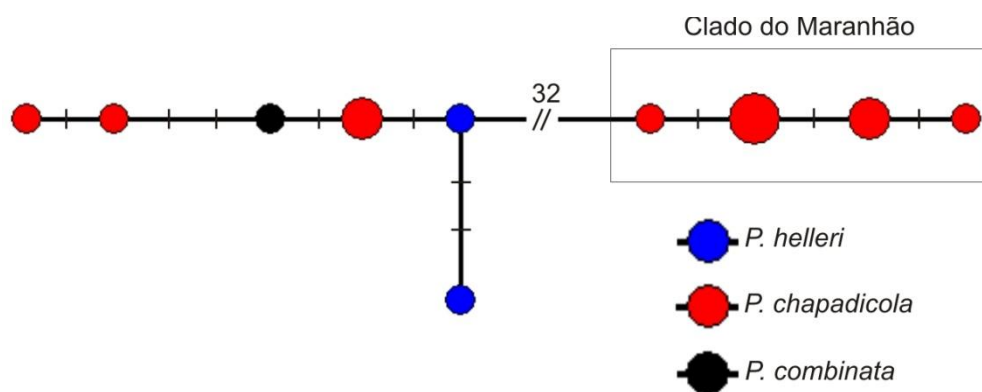


Figura 6. Rede de haplótipos construída a partir de fragmento do gene COI e CytB (total de 1813 sites). Em destaque a estruturação de um clado composto pelas amostras de *P. chapadicola* provenientes do Maranhão e outro clado no qual se encontra as amostras de *P. chapadicola* do Pará bem como as amostras de *P. combinata* e *P. helleri* de Ribeirão Preto.

4.4. Relógio Molecular, Cladogênese e cromossomo B

Os tempos de divergência entre os clados foram estimados e apontam para um antigo evento de cladogênese dentro do gênero *Partamona* que teria ocorrido a aproximadamente 35 milhões de anos no qual teríamos a separação do gênero em dois grupos, sendo que em um deles contém as espécies *P. vicina*, *P. testacea*, *P. mulata* e *P. ailyae* (Figura 7). De acordo com Camargo e Pedro (2003) e Pedro e Camargo (2003) a característica comum a todas estas espécies é o fato de nidificarem em associação a cupins (sejam terrestres ou epígeos) porém, esta não é uma característica exclusiva deste clado. Quanto ao hábitat, *P. vicina*, *P. testacea* e *P. ailyae* são encontradas basicamente associadas ao bioma amazônico, porém *P. mulata* é encontrada apenas em regiões de cerrado do Brasil central até a Bolívia. Aparentemente, nenhuma característica morfológica ou ecológica se apresenta como exclusiva do grupo.

Assumindo que as espécies que apresentam a sequência típica de indivíduos portadores de cromossomos B (identificados via marcador SCAR) também tenham esses cromossomos, duas são as possibilidades para a origem dos cromossomos B presentes em *P. helleri*, *P. cupira*, *P. rustica*, *P. criptica* e *P. seridoensis*: 1) Origem comum, na qual o ancestral destas espécies possuía este caráter e o transmitiu à elas, ou 2) Transmissão por cruzamentos interespecíficos, tendo o caráter surgido em apenas uma linhagem e foi transmitida às demais espécies por cruzamentos interespecíficos. Ambas as explicações para a origem do cromossomo B são plausíveis e encontram precedentes. Porém os dados produzidos por este trabalho para a origem do cromossomo B em *Partamona* estar relacionada a um único evento de origem seguido de transmissão deste cromossomo por cruzamentos interespecíficos. Apoio a esta teoria reside no fato de que fragmentos do cromossomo B sequenciados de três espécies (*P. cupira*, *P. rustica* e *P. criptica*), apresentaram baixíssima variação (Marthe, 2008). Em teoria, o DNA presente nos cromossomos B está isento de pressões de seleção natural (Camacho, 2005), de maneira que mutações não eliminadas pelo mecanismo de reparo do processo de replicação sejam incorporadas ao cromossomo B. Associado a essa grande conservação das sequências deste cromossomo entre as espécies analisadas, encontramos um tempo

relativamente grande para sua origem no ancestral comum a todas as espécies que apresentam a sequência (aproximadamente 24 milhões de anos, Figura 7), sendo assim poderíamos esperar uma taxa maior de incorporação de mutações ao B de cada linhagem após a cladogênese, mas este fato não é verificado.

Logo a incompatibilidade entre o longo tempo de origem do ancestral supostamente portador do cromossomo B e sua altíssima conservação nos inclina a refutar que a presença deste cromossomo em várias espécies esteja relacionada à sua transmissão direta do ancestral comum a elas. Somado à isso, pelo menos um caso de hibridização interespecífica recente foi observado entre as espécies de *P. helleri* e *P. chapadicola* (Figuras 4 e 5).

Em linhas gerais concluímos que os genes mitocondriais proporcionaram reconstruções das relações entre as espécies analisadas, o que nos possibilitou inferir sobre a existência de possíveis cruzamentos interespecíficos ocorrendo entre *P. helleri* e *P. chapadicola* e que cruzamentos desta natureza poderiam estar relacionados com a transmissão do cromossomo B entre as espécies do gênero. As reconstruções filogenéticas também apontam para a ocorrência de um marcante evento de cladogênese ocorrido há aproximadamente 35 milhões de anos que dividiu o grupo em dois clados. Os dados moleculares sugerem que tanto a espécie *P. seridoensis* quanto *P. chapadicola* possam compor dois grupos de espécies crípticas.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos às Fundações de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso (FAPEMAT), de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro e à Dr^a Silvia Regina de Menezes Pedro pela identificação das espécies no trabalho.

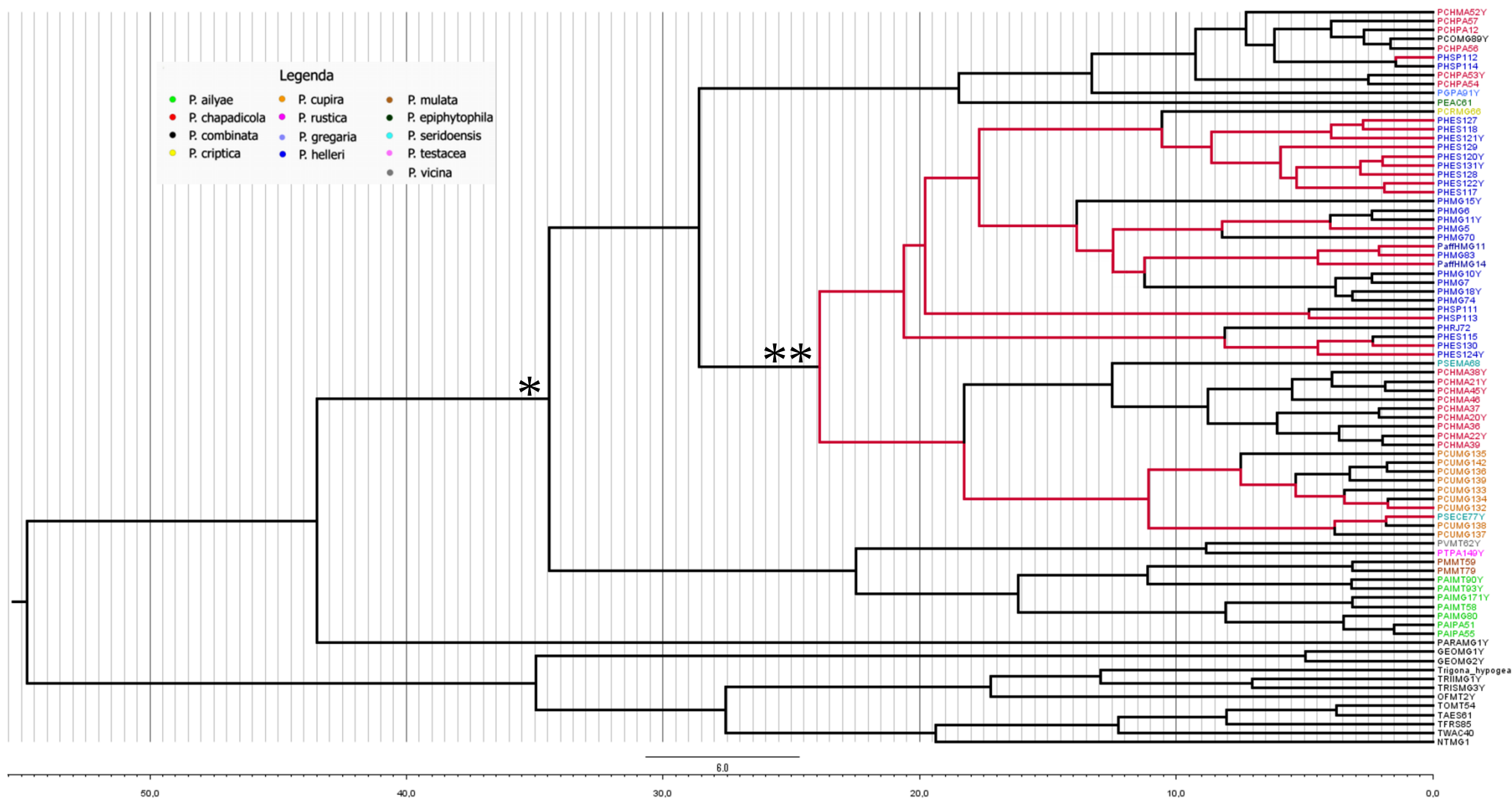


Figura 7- Reconstrução filogenética bayesiana do gene CytB calibrada utilizando o tempo de separação entre o gênero *Partamona* e *Paratrigona* estimado em 43,5 Milhões de anos (Rasmussen e Cameron, 2010). Espécies estão representadas por mesma cor e ramos em vermelho representam linhagens portadoras de cromossomo B. * Antigo evento de cladogênese do gênero *Partamona*. ** Ancestral comum à todas as linhagens portadoras de cromossomo B.

5. REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL SF, MADDEN TL, SCHÄFFER AA, ZHANG J, ZHANG Z, MILLER W and LIPMAN DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25: 3389-3402.
- ARNOLD ML. 2006. *Evolution Through Genetic Exchange*. Oxford University Press, pp. 252.
- BANDELT HJ, FORSTER P and RÖHL A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16(1): 37-48.
- BATALHA-FILHO H, WALDSCHMIDT AM, CAMPOS LAO, TAVARES MG and FERNANDES-SALOMÃO TM. 2010. Phylogeography and historical demography of the Neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae): incongruence between morphology and mitochondrial DNA. *Apidologie*, 41: 534-547.
- CAMARGO JMF and PEDRO SRM. 2003. Meliponini Neotropicais: O gênero *Partamona* Schwarz, 1939 (Hymenoptera, Apidae, Apinae). *Revista Brasileira de Entomologia*, 47(3): 311-372.
- CROZIER RH and CROZIER YC. 1993. The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: Complete sequence and the genome organization. *Genetics*, 133: 97-117.
- DARLING JA (2011) Interspecific Hybridization and Mitochondrial Introgression in Invasive Carcinus Shore Crabs. *PLoS ONE* 6(3): e17828.
- DICK CW, ROUBIK DW, GRUBER KK and BERMINGHAM E. 2004. Long-distance gene flow and across-Andean dispersal of lowland rainforest bee (Apidae: Euglossini) revealed by comparative mitochondrial DNA phylogeography. *Molecular Ecology*, 13: 3775-3785.
- DRUMMOND AJ and RAMBAUT. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7, 214.
- FERREIRA KM. 2011. A colonização de uma área por espécies de abelhas sem ferrão. Um estudo de caso: *Partamona helleri* (Friese, 1900) (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). Dissertação - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP.
- HIGGINS D, THOMPSON J, GIBSON T, THOMPSON JD, HIGGINS DG and GIBSON TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673-4680.
- MOURE JS, URBAN D, MELO, GAR (Orgs). 2007. *Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the neotropical region*. Sociedade Brasileira de Entomologia, Curitiba. pp 1054.
- NAKAMINE H and TAKEDA M. 2008. Molecular phylogenetic relationships of flightless beetles belonging to the genus *Mesochthistatus* Breuning, (Coleoptera: Cerambycidae) inferred from mitochondrial COI gene sequences. *Journal of Insect Science*, 8(70): 1-11.
- KAWAKITA A, SOTA T, ASCHER JS, ITO M, TANAKA H and KATO M. 2003. Evolution and phylogenetic utility of alignment gaps within intron sequences of three nuclear genes in bumble bees (*Bombus*). *Molecular Biology Evolution*, 20: 87-92.
- LIBRADO P and ROZAS J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25: 1451-1452.
- PEDRO SRM and CAMARGO JMF. 2003. Meliponini Neotropicais: O gênero *Partamona* Schwarz, 1939 (Hymenoptera, Apidae, Apinae). *Revista Brasileira de Entomologia*, 47(suppl. 1): 1-117.
- POMPOLO SG. 1992. Estudos citogenéticos em Meliponinae. *Naturalia (special ed.)*: 62-66.
- POSADA D and CRANDALL KA. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14: 817-818.
- RAMBAUT A. 2009. *Tree Figure Drawing Tool*, Version 1.3.1. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, UK.
- RHYMER JM and SIMBERLOFF D. 1996. Extinction by Hybridization and Introgression. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 2: 83-109.
- RASMUSSEN, C and CAMERON SA. 2010. Global stingless bee phylogeny supports ancient divergence, vicariance, and long distance dispersal. *Biological Journal of the Linnean Society*, 99: 206-232.
- RONQUIST F, HUELSENBECK JP. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19: 1572-1574.
- SHIN HT, HUNG HC, SCHUBART CD, CHEN CA and CHANG HW. 2006. Intraspecific genetic diversity of the endemic freshwater crab *Candidi potamon rathbunae*

- (Decapoda, Brachyura, Potamidae) reflects five million years of the geological history of Taiwan. *Journal of Biogeography*, 33: 980-989.
- SILVESTRE D, DOWTON M and ARIAS MC. 2008. The mitochondrial genome of the stingless bee *Melipona bicolor* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): Sequence, gene organization and a unique tRNA translocation event conserved across the tribe Meliponini. *Genetics and Molecular Biology*, 31(2): 451-460.
- TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, STECHER G, NEI M and KUMAR S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology Evolution*, 28: 2731-2739.
- WALDSCHMIDT AM, Fernandes-Salomão TM, Barros EG and Campos LAO (1997). Extraction of genomic DNA from *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponae). *Brazilian Journal of Genetics*, 20(3): 421-423

**CAPÍTULO 2: EVIDÊNCIAS DE NUMTSENVOLVENDO O GENE
CITOCROMO B EM ABELHAS DO GÊNERO *Partamona* (Hymenoptera,
Apidae)**

1. RESUMO

Numts são cópias do DNA mitocondrial presentes no genoma nuclear. Se forem confundidos com as sequência mitocondriais do gene alvo, podem ser um problema na obtenção de hipóteses filogenéticas e análises populacionais quando estas os envolvem. No presente trabalho sugerimos a presença que algumas sequências obtidas de *numts* associados a gene Citocromo B em pelo menos seis espécies do gênero *Partamona* (*P. ailyae*, *P. helleri*, *P. mulata*, *P. rustica*, *P. cupirae* e *P. seridoensis*). A presença de deleções, códons putativos de terminação e indícios de ausência de seleção são fortes indicativos de que existe pelo menos um fragmento do DNA mitocondrial integrado ao genoma nuclear nestas espécies. A hipótese filogenética proposta (Figura 3) evidenciou que as amostras que possuem os *numts* formam um clado e estão em uma politomia juntamente com as demais espécies de *Partamona* e *Paratrígona*, indicando que o evento de migração do fragmento mitocondrial para o núcleo é antigo, anterior à separação destes dois gêneros.

2. INTRODUÇÃO

O DNA mitoncodrial (mtDNA) tem sido extensivamente utilizado na obtenção de hipóteses filogenéticas e análises populacionais (Avise, 2009). Em contraste às suas vantagens (genoma pequeno, haploide, herança materna, ausência de recombinação e um mosaico de sequências possuindo altas e baixas taxas de conservação), ele pode apresentar alguns problemas em relação à sua utilização, como por exemplo, a herança biparental (em alguns casos), heteroplasmia, relógio molecular variável, regiões gênicas sob pressão de seleção purificadora e presença de cópias de partes de seus genes localizadas no genoma nuclear como pseudogenes (De-Xing e Hewitt, 1996). Em especial, este último aspecto vem sendo alvo de vários estudos, sendo que a primeira exposição envolvendo pseudogenes mitocondriais (*numts*) integrados no genoma nuclear foi realizada em 1967 envolvendo DNA de *Leishmania* e ratos (Du Buy e Riley, 1967) e desde então existem relatos de mais 77 outros eucariotos que os possuem, dentre eles fungos, plantas, vertebrados e invertebrados (Bensasson et al., 2001; De-Xing e Hewitt, 1996). Para os insetos, mais especificamente, para a ordem Hymenoptera os relatos de *numts* são restritos a poucas espécies de abelhas (Bensasson et al., 2001 e Cristiano et al., 2012) e uma espécie de formiga (Martins et al., 2007).

O uso da técnica de PCR para o estudo do DNA mitoncodrial utilizando o DNA total (sem separação entre o genoma nuclear e mitocondrial) tem ocasionado a amplificação acidental de *numts* (Lopes et al., 1994), uma vez que em alguns casos, os *primers* utilizados se anelam às sequências dos *numts* tão bem como, e às vezes, até de melhor forma que nas sequências mitocondriais de interesse. Grande parte do problema de se analisar filogeneticamente as sequências de *numts* juntamente às sequências de mtDNA legítimas é que elas apresentam taxas de substituições de bases diferentes e por consequência histórias evolutivas distintas, os quais comprometem as reconstruções filogenéticas. Cristiano et al. (2012), sugerem um *checklist* com vários passos para se tentar reconhecer uma sequência de *numts*. A princípio a presença de códons

putativos de terminação (*putativestop codons*), deleções envolvendo 1 ou 2 pares de bases (*indels*) na sequência e ausência de seleção indicada pelas distâncias-*p* são seus principais indicadores.

Este trabalho tem como objetivo relatar a descoberta de um possível *numt* em abelhas do gênero *Partamona*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Amostras, extração de DNA, amplificação e sequenciamento

Foram coletados indivíduos adultos de 31 colônias de 14 espécies do gênero *Partamona*, duas do gênero *Geotrigona* e uma do gênero *Paratrigona* (Tabela 1). As amostras foram imersas em etanol absoluto e estocadas em freezer a -20°C. As espécies foram identificadas pela Dr^a Silvia Regina de Menezes Pedro do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto (Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) e amostras testemunhas se encontram depositados na Coleção Camargo (Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da USP) bem como na coleção do museu de entomologia da Universidade Federal de Viçosa (Viçosa-MG, Brasil).

Tabela 1- Relação de espécies amostradas no estudo, codificação utilizada por colônia, local de coleta e coordenadas geográficas.

Espécie	Código	Cidade-Estado	Coordenadas Lat.; Long.
<i>P. ailyae</i>	PAIMT58	Nova Xavantina-MT	-52,3554; -14,6676
	PAIMG171F	Araguari-MG	-18,6470; -48,1827
<i>P. chapadicola</i>	PCHMA21	Urbano Santo-MA	-43,4039; -3,20778
<i>P. combinata</i>	PCOMG89	Uberlândia-MG	-48,2622; -18,9113
<i>P. criptica</i>	PCRMG66	Itamarati-MG	-41,4278; -15,5939
<i>P. epiphytophila</i>	PEAC61	Rio Branco-AC	-67,8076; -9,974
<i>P. gregaria</i>	PGPA91	Novo Progresso-PA	-55,3785; -7,1447
<i>P. helleri</i>	PHES118	Nova Venécia- ES	-40,3982; -18,7056
	PHMG73F	São Gonçalo do Rio Abaixo-MG	-19,8280; -43,3819
<i>P. mulata</i>	PMMG150F	Guimarães-MG	-46,7631; -18,8345
	PMMT59	Cuiabá-MT	-56,0949; -15,5988
<i>P. rustica</i>	PRMG143F	Januária-MG	-15,4956; -44,3625
	PRUMG63F	Januária-MG	-15,4956; -44,3625
	PRMG48F	Nova Porteirinha-MG	-15,8040; -43,3000
	PRMG144F	Nova Porteirinha-MG	-15,8040; -43,3000
	PRMG145F	Nova Porteirinha-MG	-15,8040; -43,3000
	PRMG170	Lontra-MG	-43,3833; -21,2667
	PRUMG152F	Lontra-MG	-43,3833; -21,2667
	PRUMG153F	Lontra-MG	-43,3833; -21,2667
	PRUMG154F	Lontra-MG	-43,3833; -21,2667

	PRUMG155F	Lontra-MG	-43,3833; -21,2667
	PRUMG166F	Lontra-MG	-43,3833; -21,2667
	PRUMG167F	Lontra-MG	-43,3833; -21,2667
	PRUMG168F	Lontra-MG	-43,3833; -21,2667
	PRUMG169F	Lontra-MG	-43,3833; -21,2667
<i>P. cupira</i>	PCUMG133	Guimarânia-MG	-46,7631; -18,8345
	PCUMG146F	Patrocínio-MG	-18,9436; -46,9929
<i>P. seridoensis</i>	PSEMA68	Mirador-MA	-06,3619; -44,3489
	PSPB47F	Areia-PB	-06,9617; -35,6952
<i>P. testacea</i>	PTPA149	Novo Progresso-PA	-07,1447; -55,3785
<i>P. vicina</i>	PVMT62	Nova Xavantina-MT	-52,3554; -14,6676
<i>Geotrigona sp1</i>	GEOMG1	Lontra-MG	-43,3833; -21,2667
<i>Geotrigona sp1</i>	GEOMG2	Lontra-MG	-43,3833; -21,2667
<i>Paratrigona sp1</i>	PARAMG1	Lontra-MG	-43,3833; -21,2667

A extração do DNA total das operárias foi realizada conforme o protocolo proposto por Waldschmidt et al. (1997). Para as inferências filogenéticas entre as espécies, foram obtidas sequências do gene mitocondrial Citocromo b (CytB).

Para a amplificação dos fragmentos foram utilizadas as seguintes condições de reação de cadeia da polimerase (PCR): uma mistura de 50 µL contendo MgCl₂ 2,0 mM; Tris/HCl 10 mM/50 mM; 2 mM de cada desoxirribonucleosídeo trifosfato (dATP, dTTP, dGTP, dCTP); 4 mM de cada um dos *primers* (Reverse: 5'-TCGTTTAATTCAATTAATGGAGC-3' e Forward: 5'-ATTACWCCTCCTAATTTATTWGAAT-3'), uma unidade de Taqpolimerase (Promega®) e 50ng de DNA genômico. A reação foi realizada em um termociclador Eppendorf® (Modelo Master Cycler Gradient) seguindo as seguintes etapas: um passo inicial de 3 min. a 95°C, 35 ciclos de 1 min. a 95°C para desnaturação do DNA, 1 min. e 20 seg. a 52°C para anelamento dos *primers* e 1 min. e 20 seg. a 72°C para alongamento. Ao final dos 35 ciclos um passo extra de extensão (10 min. a 72°C). Uma alíquota de 5 µL dos produtos PCR foram corados com GelRed™ (Biotium), submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% para averiguar a qualidade e concentração do produto de PCR. Posteriormente estes foram sequenciados em um seqüenciador automático (Mega Bace™ 500, GE Healthcare) pela empresa Macrogen Inc. (Seul, Coréia do Sul).

3.2. Análise das sequências

Os cromatogramas das fitas *forward* e *reverse* de cada amostra foram analisadas e editado pelo programa DNA Baser™ (versão 3.5.0), apenas os

seguimentos de alta qualidade foram selecionados para a análise. O alinhamento das seqüências foi obtido por meio do algoritmo Clustal W (Higgins et al., 1994, Thompson et al., 1994) implementado pelo programa Mega versão 5.05 (Tamura et al., 2011). Este programa também foi utilizado para o cálculo das distâncias *p* (proporção de bases nitrogenadas substituídas por sítio do códon). A relação entre as espécies foi inferida por meio do software MRBAYES, versão 3.1.2 (Ronquist e Huelsenbeck, 2003) que utiliza o método de inferência Bayesiana. O modelo de substituição de bases GTR+I+G foi escolhido baseado no critério de Akaike fornecido pelo programa MODELTEST, versão 3.7 (Posada e Crandall, 1998).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quando comparado ao gene CytB completo (Silveira et al., 2008), foi verificada a presença de duas classes de fragmentos amplificados pelos *primers* específicos para o gene Citocromo B (CytB), uma com 595 pb de comprimento presente na colônias apresentadas na tabela 2 e outro com 306 pb com características que indicaram tratar-se de *numts*, encontrados nas colônias referidas na tabela 2.

Um *indel* envolvendo uma base localizada na posição 10942, bem como dois códons putativos de terminação (posições 10891-10893 e 11080-11082) foram encontrados (Figura 1). Outra evidência de que as seqüências obtidas nas amplificações de indivíduos presentes nas colônias apresentadas na tabela 2 sejam *numts* reside no fato de que as distâncias-*p*, encontram-se desviadas das proporções esperadas para regiões de atividade gênica sob pressão de seleção. Em tese, espera-se uma maior proporção de substituição de bases envolvendo a 3ª posição do códon (de fato espera-se a seguinte proporção de substituição de bases por sítio: $3^a > 1^a > 2^a$). Quando comparamos as distâncias-*p* dos fragmentos de mtDNA maiores (595 pb) provenientes do CytB amplificado no presente trabalho, verificamos que a proporção de substituição está de acordo com a esperada (Figura 2). Todavia ao analisarmos os fragmentos menores (306 pb) verificamos que estes não apresentam o mesmo padrão de substituição, tendo inclusive a 3ª posição do códon a menor taxa de substituição (0,002).

Tabela 2- Relação das espécies, colônias e tamanho dos fragmentos amplificados.

Espécies	Código	Frag. Amplificado (pb)
<i>P. ailyae</i>	PAIMT58	595
<i>P. chapadicola</i>	PCHMA21	
<i>P. combinata</i>	PCOMG89	
<i>P. criptica</i>	PCRMG66	
<i>P. epiphytophila</i>	PEAC61	
<i>P. gregaria</i>	PGPA91	
<i>P. helleri</i>	PHES118	
<i>P. mulata</i>	PMMT59	
<i>P. rustica</i>	PRMG170	
<i>P. cupira</i>	PCUMG133	
<i>P. seridoensis</i>	PSEMA68	
<i>P. testacea</i>	PTPA149	
<i>P. vicina</i>	PVMT62	
<i>Geotrigona sp1</i>	GEOMG1	
<i>Geotrigona sp1</i>	GEOMG2	
<i>Paratrigona sp1</i>	PARAMG1	
<i>P. ailyae</i>	PAIMG171F	306
<i>P. helleri</i>	PHMG73F	
<i>P. mulata</i>	PMMG150F	
<i>P. rustica</i>	PRMG143F	
	PRUMG63F	
	PRMG48F	
	PRMG144F	
	PRMG145F	
	PRUMG152F	
	PRUMG153F	
	PRUMG154F	
	PRUMG155F	
	PRUMG166F	
	PRUMG167F	
	PRUMG168F	
	PRUMG169F	
<i>P. criptica</i>	PCUMG146F	
<i>P. seridoensis</i>	PSPB47F	

Seis espécies apresentaram o *numt* (*P. ailyae*, *P. helleri*, *P. mulata*, *P. rustica*, *P. cupirae* *P. seridoensis*) e verificou-se que a distribuição espacial das amostras que apresentaram o *numt* se concentrou na região norte de Minas Gerais, 89% das colônias portadoras estão localizadas nesta região, sendo que *P. rustica* apresentou maior número de colônias portadoras de *numts*(72%).

A hipótese filogenética proposta (Figura 3) evidencia que as amostras que possuem os *numts* formam um clado e estão em uma politomia juntamente com as demais espécies de *Partamona* e *Paratrigona*. Este fato sugere que a migração do fragmento do gene CytB pode ser um evento antigo, anterior à diversificação do gênero *Partamona*, que de acordo com os

cálculos de Rasmussen e Cameron (2010), teria ocorrido há aproximadamente 5 milhões de anos, já a separação entre os gêneros *Partamona* e *Paratrígona* data de 35 milhões de anos.

A presença de deleções, códons putativos de terminação e indícios de ausência de seleção são fortes indicadores de que o fragmento do gene CytB de algumas espécies do gênero *Partamona* seja um *numt* integrado ao genoma nuclear. Já a filogenia nos revela uma maior similaridade entre este fragmento e o gene CytB de *Paratrígona* quando comparado com o mesmo gene de outras espécies do gênero *Partamona*, indicando que o evento de migração do fragmento mitocondrial para o núcleo talvez seja um evento antigo, anterior a separação destes dois gêneros.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos às Fundações de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso (FAPEMAT), de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro e ao técnico Fernando Mendes Barbosa (IFET, *campus* de Januária) pelo auxílio nas coletas.

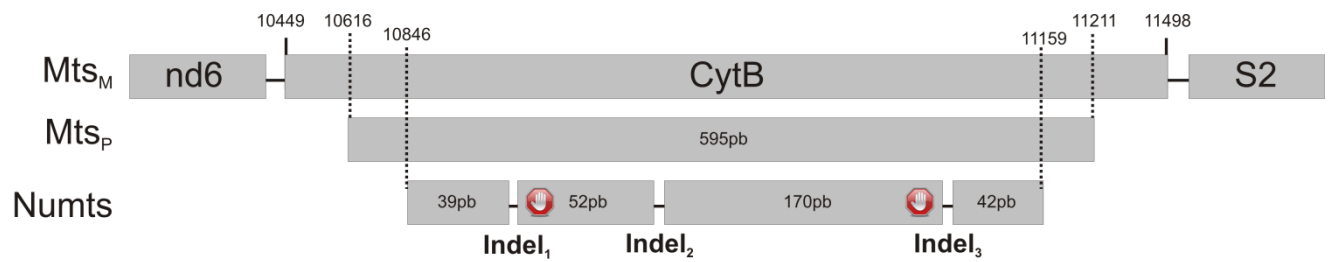


Figura 1- Esquema comparado da estrutura do gene Citocromo B (CytB). Mts_M: esquema do CytB em *Melipona bicolor*, iniciando-se na posição 10449, terminando na posição 11498 (tamanho: 1050pb). Este gene encontra-se intercalado entre os genes NADH desidrogenase subunidade 6 (nd6) e tRNA^{SER} (S2) (Silveira et al., 2008). Mts_P: esquema para o fragmento de CytB utilizado nas análises que apresentou 597pb de comprimento. Numts: esquema do fragmento de Cytb encontrado que possui três indels e dois códons putativos de terminação representados pelos símbolos vermelhos (posições: 10891-10893 e 11080-11082). Indel₁ (3 pares de bases posição: 10886-10988), Indel₂ (1 par de base, posição: 10942), Indel₃ (3 pares de bases posição: 11114-11116).

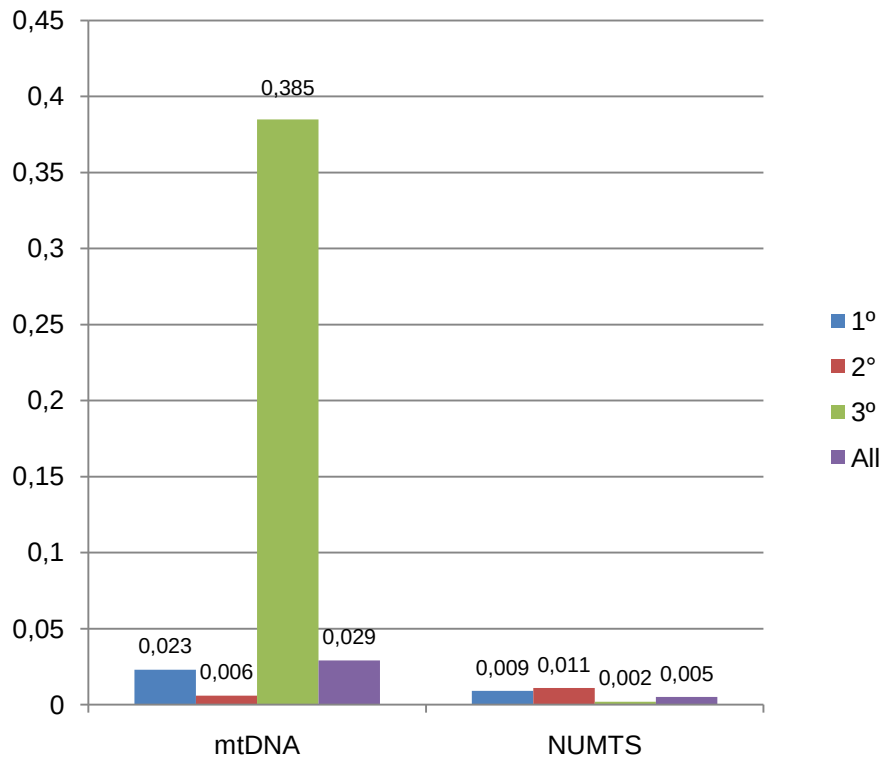


Figura 2- Distâncias p da 1ª, 2ª e 3ª posição do códon e global (All) dos fragmentos de CytB mitocondrial (mtDNA) e nuclear (*Numt*).

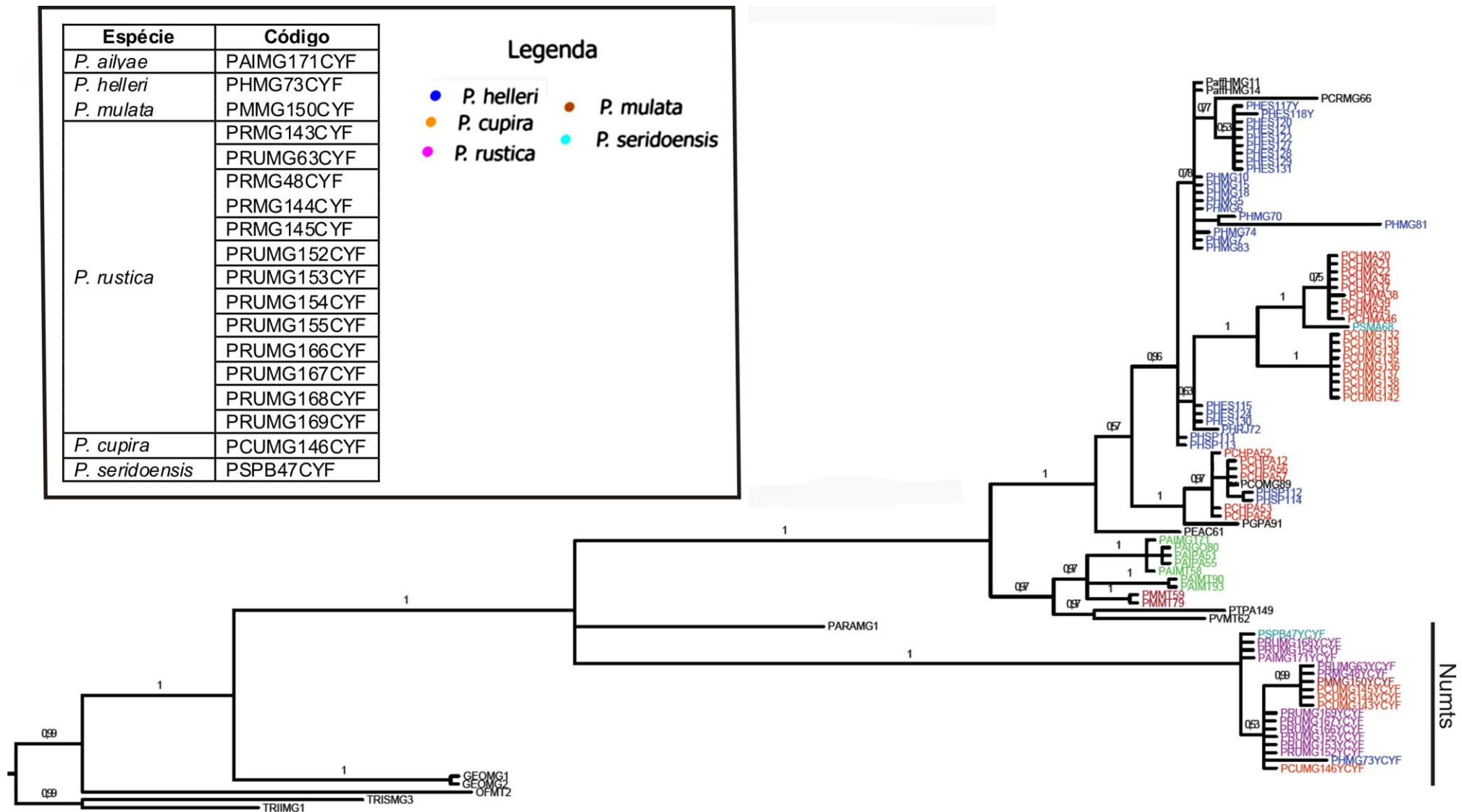


Figura 3- Filogenia bayesiana para algumas espécies do gênero *Partamona*. 18 amostras envolvendo 6 espécies formam um clado consistente e mais relacionado à amostra da espécie *Paratrigena* do que com o próprio gênero *Partamona*.

5. REFERÊNCIAS

- AVISE JC (2009). Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography*, 36: 3-15.
- BENSASSON D, PETROV DA, ZHANG DX, HARTL DL and HEWITT GM (2001). Genomic gigantism: DNA loss is slow in mountain grasshoppers. *Molecular Biology and Evolution*, 18(2): 246-253.
- CRISTIANO MP, FERNANDES-SALOMÃO TM and YOTOKO KSC (2012). Nuclear mitochondrial DNA: an Achilles' heel of molecular systematics, phylogenetics, and phylogeographic studies of stingless bees. *Apidologie*, 40(5): 515-594.
- DE-XING Z and HEWITT GM (1996) Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers. *Trends in Ecology and Evolution*, 11(6): 247-251.
- DU BUY HG and RILEY FL (1967) Hybridization between the nuclear and kinetoplast DNA's of *Leishmania enriettii* and between nuclear and mitochondrial DNA's of mouse liver. *Proceedings of the National Academy of Science*, 57: 790-797.
- HIGGINS D, THOMPSON J, GIBSON T, THOMPSON JD, HIGGINS DG and GIBSON TJ (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673-4680.
- LOPEZ JV, YUHKI N, MASUDA R, MODI W and O'BRIEN SJ (1994). *Numt*, a recent transfer and tandem amplification of mitochondrial DNA to the nuclear genome of the domestic cat. *Journal of Molecular Evolution* 39, 174-190.
- MARTINS Jr, SOLOMON J, MIKHEYEV SE, MUELLER AS, ORTIZ UG and BACCI JrA (2007). Nuclear mitochondrial-like sequences in ants: evidence from *Atta cephalotes* (Formicidae: Attini). *Insect Molecular Biology*, 16, 777-784.
- POSADA D and CRANDALL KA (1998). Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-818.
- RASMUSSEN C and CAMERON SA (2010). Global stingless bee phylogeny supports ancient divergence, vicariance, and long distance dispersal. *Biological Journal of the Linnean Society*, 99: 206-232.
- RONQUIST F, and HUELSENBECK JP (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- SILVESTRE D, DOWTON M and ARIAS MC (2008). The mitochondrial genome of the stingless bee *Melipona bicolor* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): Sequence, gene organization and a unique tRNA translocation event conserved across the tribe Meliponini. *Genetics and Molecular Biology*, 31(2):451-460.
- TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, STECHER G, NEI M and KUMAR S (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731-2739.

- THOMPSON JD, HIGGINS DG and GIBSON TJ (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673-4680.
- WALDSCHIMIDT AM, FERNANDES-SALOMÃO TM, BARROS EG AND CAMPOS LAO (1997). Extraction of genomic DNA from *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponae). *Brazilian Journal of Genetics*, 20(3): 421-423.

**CAPÍTULO 3: DIFERENTES TIPOS DE CROMATINA EM TRÊS ESPÉCIES
DO GÊNERO *Partamona* (HYMENOPTERA, APIDAE)**

1. RESUMO

Apenas 9 das 33 espécies do gênero *Partamon* possuem o cariótipo descrito. Com o intuito de aumentar o número de espécies estudadas, colônias da espécie *P. chapadicola*, *P. nhambiquara* e *P. rustica* foram estudadas mediante a utilização das técnicas de coloração convencional, Banda C, fluorocromos DAPI e CMA₃. Todas as espécies apresentaram 2n=34 cromossomos. A análise dos resultados da técnica de banda C e a utilização de programas de Análise de Imagens (AI) indicou a existência de cromossomos que possuem três regiões com intensidades de coloração distintas. Assim, os cromossomos com este padrão foram classificados como A^{Mn} e a fórmula cariotípica foi estabelecida como $2K=8A^M+22A^{Mn}+4M^{ct}$, $2K=18A^M+14A^{Mn}+2M^{ct}$ e $2K=14A^M+20A^{Mn}$, respectivamente para *P. chapadicola*, *P. nhambiquara* e *P. rustica*. O fluorocromo DAPI marcou fortemente a heterocromatina visualizada pela banda C e o CMA₃ marcou a extremidade de dois pares de cromossomos de todas as espécies. Sugerimos que a marcação com CMA₃ esteja associadas às Regiões Organizadoras de Nucléolo nestas espécies. O aumento no número de espécies citogenotipadas pode auxiliar a taxonomia do grupo e os indícios da existência de uma nova classe de cromatina corada com tonalidade intermediária entre a eu e a heterocromatina demonstra que a informações obtidas por esta técnica podem ser melhor exploradas, fazendo necessário, uma revisão dos dados obtidos até este momento para o grupo de abelhas.

2. INTRODUÇÃO

As abelhas da tribo Meliponini são importantes ecológica e economicamente, pois são responsáveis por grande parte da polinização de plantas nativas e cultivadas nas áreas onde ocorrem (MICHENER, 2000). Dentre os 33 gêneros de Meliponini (reconhecidos por Moure et al., 2007) encontramos o gênero *Partamona* Schwarz, 1939. Este possui 33 espécies de distribuição exclusivamente neotropical, sendo encontradas do México ao Sul do Brasil (CAMARGO E PEDRO, 2003).

Os estudos citogenéticos deste gênero iniciaram-se em 1973 com Tarelho e desde então, das 33 espécies descritas, apenas nove possuem dados citogenéticos conhecidos, a saber: *Partamona cupira* (MARTHE et al., 2010), *P. helleri* (TARELHO, 1973 e BRITO, 1998), *P. aff nigrior* (BRITO, 1998), *P. pearsoni* (TARELHO, 1973), *P. peckolti* (BRITO et al., 2003), *P. vicina*, *P. mulata*, *P. ailyae* e *Partamona* sp. n. (BRITO-RIBON et al., 1999).

Uma das técnicas mais comuns utilizada no estudo citogenético é a banda C, a qual evidencia a região de heterocromatina constitutiva (SUMNER, 2003). Esta heterocromatina é caracterizada por possuir grandes quantidades de sequências de DNA repetitivo e por apresentar notada inatividade gênica. Porém, outra modalidade de heterocromatina, dita facultativa, também é reconhecida. Nesse caso, a cromatina pode ser transcrita, porém os genes ali presentes estão silenciados em alguns tipos celulares ou em momentos diferentes devido à expressão diferencial. Em geral, essa inativação ocorre devido à metilação diferencial da histona H₃ associadas à heterocromatina (GREWAL e JIA, 2007).

Os padrões de distribuição da heterocromatina constitutiva em Hymenoptera estão intimamente relacionados aos processos de evolução cromossômica. O mecanismo mais aceito para explicar a evolução cariotípica do grupo foi o proposto por Imai et al (1986) (revisado posteriormente por Imai et al. 1988 e Imai et al. 1994). Em seus trabalhos Imai postulou a Teoria da Interação Mínima (TIM) que prevê a ocorrência de modificações nos cariótipos das espécies de Hymenoptera e outros organismos no sentido de minimizar as interações deletérias entre os cromossomos. Esta minimização ocorreria em consequência de fissões cêntricas que diminuiria o tamanho dos cromossomos, reduzindo a

probabilidade de rearranjos entre eles. Porém, segundo a teoria, estas fissões cêntricas gerariam instabilidade telomérica, que levaria à incorporação de heterocromatina na extremidade recém criada. Em consequência dessa incorporação, a maior parte dos cromossomos presentes nos cariótipos dos Hymenoptera apresentaria um braço cromossômico eucromático e outro heterocromático (morfologia cromossômica nomeada de pseudo-acrocêntrica ou A^M) como pode ser constatado, por exemplo em diversas espécies de abelhas já analisadas (ROCHA et al., 2003). Alguns dados recentes para outros grupos de abelhas (FERNANDES et al., 2012) se mostram incompatíveis com a TIM indicando que para abelhas devem existir outros mecanismos complementares àqueles propostos por Imai.

Para auxiliar as análises, o desenvolvimento de softwares voltados à análise de imagens vem impulsionando a citogenética, levando o estudo dos padrões de bandamento a um novo grau de aprofundamento e confiabilidade. Esse avanço permite uma melhor análise das informações tais como aquelas obtidas por meio de medidas cromossômicas e de intensidade das colorações possibilitando inclusive análises estatísticas desses parâmetros (KRINSK et al., 2012).

Assim, este trabalho tem por objetivo a caracterização cromossômica de três espécies do gênero *Partamona* (*P. chapadicola*, *P. nhambiquara* e *P. rustica*), utilizando técnicas citogenéticas e ferramentas de análise de imagem para estudos mais precisos dos padrões de bandamento dos cromossomos dessas abelhas sem-ferrão.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Larvas pós-defecantes das três espécies (Tabela 1) foram coletadas e processadas de acordo com a metodologia descrita por Imai et al. (1988) para a obtenção dos cromossomos mitóticos metafásicos. A coloração convencional foi realizada usando Giemsa diluído em tampão Sörensen (0,06M; pH 6,8) na concentração de 4% por 20 minutos. Os fluorocromos (Cromomicina A₃ - CMA₃ e 4'-6-diamino-2-phenylindole - DAPI) foram utilizados de acordo com a metodologia sugerida por Schweizer (1980).

Para a técnica de banda C foram utilizados os seguintes passos sugeridos por Rocha e Pompolo (1998):

- Imersão das lâminas em 0,2 N HCl por 6 min;
- Lavagem rápida em água destilada;
- 5% Ba(OH)₂ a 60°C em banho-maria por 13 min;
- Lavagem com 0,2 N HCl por aproximadamente 30 s;
- Lavagem rápida em água destilada;
- Imersão em 2 x SSC, pH 7.0, por 60°C em banho-maria por 15 min.

Após estes passos, as lâminas foram coradas com Giemsa a 8% diluído em tampão Sørensen pH 6.8.

Tabela 1- Relação das espécies por local de coleta, número de colônias e indivíduos analisados.

Espécie	Nº colônias	Nº de indivíduos	Localidade	Coordenadas Geográficas
<i>P. chapadicola</i>	5	10	Urbano Santos-MA	3°12'29"S 43°24'18"W
<i>P. nhambiquara</i>	5	10	Tangará da Serra-MT	14°39'0.667"S 57°26'02.31"W
<i>P. rustica</i>	9	10	Lontra-MG	21°16'0.00"S 43°22'60.00"W

As imagens das metáfases foram capturadas em um microscópio Olympus BX60 com objetiva de 100x. Os cariótipos foram montados de acordo com a proposta de classificação cromossômica apresentada por Imai (1991), na qual é usado o padrão da distribuição da heterocromatina evidenciada pela técnica de banda C.

O programa de análise de imagens Image-Pro PlusTM (versão 6.3, Media Cybernetics®, 2009) foi utilizado para a montagem dos cariótipos e confecção dos histogramas. Para isso, foram relacionados a posição de cada pixel ao longo do eixo longitudinal do cromossomo e sua intensidade numa escala de tons de cinza variando de 0 (branco) à 255 (preto). Para cada região diferenciada pela banda C foram calculadas as médias das intensidades de tons a partir de 20 mensurações por região. A análise de variância e o teste de Tukey (à 1% de probabilidade) foram executados pelo programa Genes (CRUZ et al., 2006) a fim de verificar se as diferenças nas médias de cada região eram estatisticamente significativas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a coloração convencional foi constatado o número cromossômico de $2n=34$ para as fêmeas (Figura 1) e $n=17$ para os machos (dados não mostrados), para todas as três espécies estudadas no presente trabalho sendo este o número predominante encontrado para a tribo Meliponini (ROCHA et al., 2003).

Outro aspecto a ser destacado em relação ao número cromossômico ($2n=34$) é sua constância para todas as 12 espécies de *Partamona* estudadas citogeneticamente até o momento (TARELHO, 1972, BRITO, 1998; BRITO et al., 1997; BRITO-RIBON et al., 1999; BRITO et al., 2003, BRITO et al., 2005 e MARTHE et al., 2010). Essa constância encontrada para o gênero também pode ser verificada para outros gêneros da tribo Meliponini. Em *Melipona*, 22 das 23 espécies estudadas apresentaram $2n=18$ (ROCHA et al., 2007; LOPES et al., 2008; LOPES et al., 2011 e FRANCINI et al., 2011) e em *Frieseomelitta* as cinco espécies estudadas, de um total de 16 espécies descritas (MOURE et al., 2007) apresentaram $2n=30$ cromossomos (ROCHA et al., 2003 e NASCIMENTO, 2005). Constância no número cromossômico também foi encontrada para os gêneros *Plebeia*, *Tetragonisca* e *Scaptotrigona* (ROCHA et al., 2003, BARTH et al., 2010). As exceções, tanto para o gênero *Partamona* quanto para *Melipona* e *Tetragonisca* estão associadas às espécies que apresentam populações portadoras de cromossomos supra-numerários (COSTA et al., 1992; BRITO et al., 1997; BRITO, 1998; ROCHA, 2002; LOPES et al., 2008; MARTHE et al., 2010 e BARTH et al., 2010).

Com base na Banda C, foi possível verificar que a maior parte dos cromossomos apresentou um braço eucromático e outro heterocromático, morfologia conhecida com pseudo-acrocêntrica (A^M) (Figura 2). Uma análise preliminar dos cromossomos de morfologia A^M indicou a existência de três tonalidades de coloração ao longo de alguns destes cromossomos para todas as três espécies. Utilizando programas de Análise de Imagens (AI) foi confeccionado um histograma mostrando a presença das três regiões com intensidades de coloração distintas (Figura 3 A e B). A comparação das médias das tonalidades destas regiões pelo Teste de Tukey (1% de probabilidade) confirmou estatisticamente a existência de três regiões com

tonalidades médias diferentes entre si. Analisando os gráficos da figura 3B pode-se visualizar uma porção do cromossomo com coloração mais clara (região 1 equivalente à região de eucromatina, com intensidade média de 104,04 na escala de tons), outra região mais intensamente corada na porção central dos cromossomos (região 2 equivalente à região de heterocromatina constitutiva, em média 232,19 na escala de tons) e uma terceira região que possui uma coloração de tonalidade intermediária às duas anteriores (região 3, em média 150,90 na escala de tons).

Esta nova classe de cromatina visualizada no presente trabalho não possui nomenclatura dos trabalhos de Imai (IMAI et al 1986; IMAI et al. 1988 e IMAI et al. 1994). Portanto, propomos a criação de uma sub-classe dos cromossomos A^M , na qual seria levada em consideração os dois tipos de heterocromatinas encontrada no presente trabalho. Desta forma, apresentamos nova morfologia na qual teríamos um cromossomo pseudo acrocêntrico clássico composto por um braço cromossômico eucromático e outro heterocromático (A^M). Assim a nova tipologia cromossômica seria representada por A^{Mn} , sendo as fórmulas cariotípicas de *P. chapadicola*, *P. nhambiquara* e *P. rustica* encontradas no presente trabalho, respectivamente, $2K=8A^M+22A^{Mn}+4M^{ct}$, $2K=18A^M+14A^{Mn}+2M^{ct}$ e $2K=14A^M+20A^{Mn}$.

Todas as três espécies estudadas aqui apresentaram cromossomos com a morfologia A^{Mn} . Nenhum estudo citogenético para esse gênero ou mesmo para a ordem Hymenoptera relata resultados semelhantes. Porém, vale ressaltar que abordagens citogenéticas utilizando ferramentas computacionais de análise de imagens ainda são escassos (ver revisão em KRISNK et al., 2012) sendo possível que este tipo de heterocromatina (visualizado via Banda C/AI) seja encontrado em outras espécies, inclusive no próprio gênero *Partamona*.

Não foi possível inferir a respeito da atividade gênica desta cromatina de coloração intermediária, o que poderia informar se esta região se trata de uma região de heterocromatina constitutiva, com pouca ou nenhuma atividade gênica, ou facultativa sendo silenciada somente em alguns momentos. Porém sabe-se que a compactação da heterocromatina está relacionada à metilação de histonas H_3 e estudos tem apresentado

diferenças entre a organização desses dois tipos de heterocromatina. Na heterocromatina constitutiva predominam tri metilações na lisina 9 ($H_3 K_9$ tri-methylation) e mono metilações na lisina 27 ($H_3 K_{27}$ mono-methylation) enquanto que na facultativa predominam mono e di metilações na lisina 9 (mono- and di-methylated $H_3 K_9$) e mono, di e tri metilações na lisina 27 ($H_3 K_{27}$ mono, di e tri methylation) (GREWALE JIA, 2007; DILLON, 2004). Assim, a heterocromatina constitutiva estaria organizada em uma matriz regular e por isso mais compacta devido a uma menor possibilidade de combinação das metilações nas lisinas de suas histonas H_3 , enquanto que para a heterocromatina facultativa o maior número de possibilidades de metilação confeririam uma matriz menos regular e por isso menos compacta (GREWALE JIA, 2007; DILLON, 2004). Teoricamente, este fato poderia favorecer o ataque alcalino durante o procedimento de Banda C, o que justificaria a coloração intermediária (entre a região de eucromatina e heterocromatina constitutiva) observada na região 3 dos cromossomos A^{Mcf} .

O fluorocromo DAPI marcou a maioria dos blocos de heterocromatina apontada pela técnica de Banda C independentemente de se tratarem de heterocromatina constitutiva ou facultativa, indicando que esta é rica em pares de bases AT (Figura 3C, E e G) para todas as três espécies. Resultados semelhantes foi encontrado para *P. cupira* (MARTHE et al., 2010), *P. helleri*, *P. aff nigror* (Brito, 1998) e *P. peckolti* (BRITO et al., 2003).

Foi possível verificar quatro blocos heterocromáticos teloméricos fortemente marcados pelo fluorocromo CMA_3 , indicando que estas regiões são ricas em pares de bases CG (Figura 3D, F e I). Tais marcações CMA_3^+ provavelmente estão associadas às Regiões Organizadoras de Nucléolo (NOR). A correlação entre marcações banda C^+ , CMA_3^+ e NOR já foi relatada para o gênero *Partamona* (BRITO et al., 1997, BRITO, 1998), para outras espécies da tribo Meliponini (ROCHA, 2002; LOPES et al., 2011; ROCHA et al., 2007, DUARTE et al., 2009, MAFFEI et al., 2001) e também para outros organismos como vespas (MENEZES, et al., 2011), Hemiptera (CRINITI et al., 2009), moluscos (PETROVIC et al., 2009), plantas (SILVA et al., 2010) e peixes (SWARÇA et al., 2004).

Com o aumento no número de espécies caracterizadas citogeneticamente, um padrão de composição da heterocromatina vem se

apresentando constante para a tribo Meliponini. A maior parte da heterocromatina encontrada é DAPI⁺ e alguns pequenos e poucos blocos CMA₃⁺ estão associados às NORs nessas espécies (BRITO et al., 1997; BRITO, 1998; MAFFEI et al., 2001; ROCHA et al., 2003; ROCHA et al., 2007; DUARTE et al., 2009; MARTINS, et al., 2009; LOPES, et al., 2008; BARTH et al., 2011 e LOPES et al., 2011).

O número cromossômico conservado encontrado para o gênero *Partamona* reforça a uniformidade do grupo, também verificada para caracteres morfológicos. Já os indícios da existência de uma nova classe de cromatina com tonalidade intermediária entre a eu e heterocromatina demonstra que as informações obtidas pela técnica de banda C podem ser melhor exploradas, fazendo necessário inclusive uma revisão dos dados obtidos até o momento em especial para o grupo de abelhas.

Agradecemos às fontes de fomento à pesquisa: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e às Fundações de Amparo à Pesquisa do Mato Grosso (FAPEMAT) e de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo suporte financeiro.

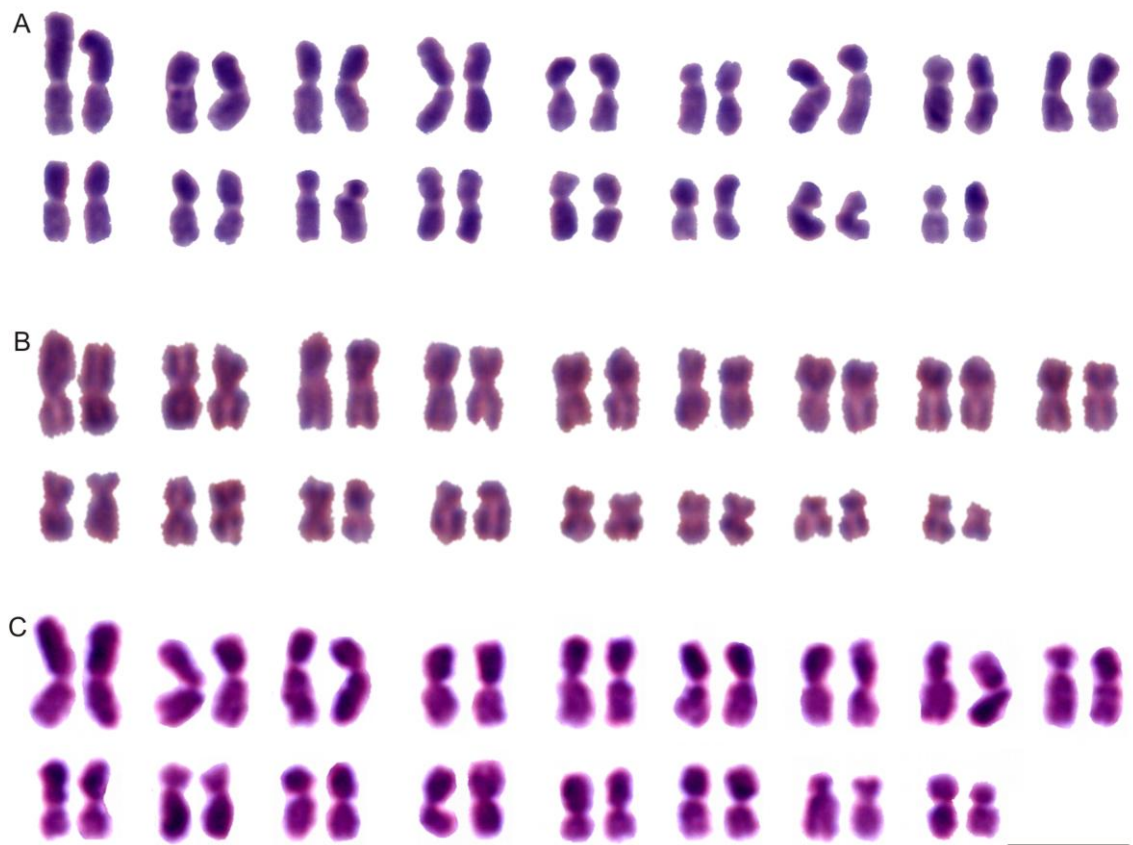


Figura 1- Cariótipos de operárias de A) *P. chapadicola*, *P. nhambiquara* e *P. rustica*. Todas as espécies apresentaram $2n=34$ cromossomos. Barra=5 μ m.

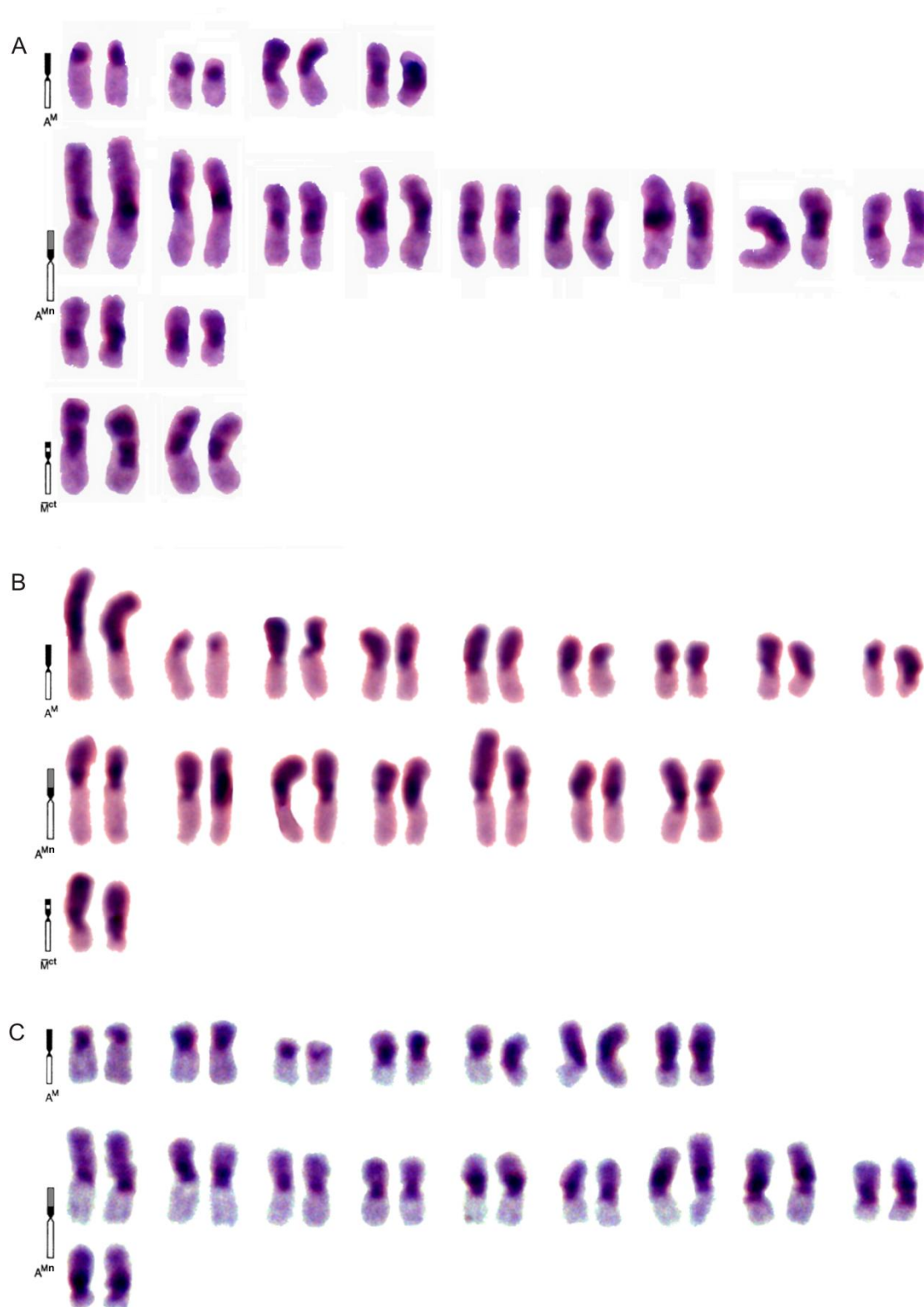


Figura 2- Banda c nos cromossomos de fêmeas, organizado de acordo com a distribuição de heterocromatina, os cromossomos foram classificados conforme proposta de Imai (1991) parcialmente modificada com a inclusão da classe A^{Mn} . A) *P. chapadicola*, B) *P. nhambiquara* e C) *P. rustica*. Ao lado de cada classe de cromossomos se encontra uma representação da distribuição de heterocromatina, porções brancas do esquema representam as regiões de eucromatina, as porções pretas, a região de heterocromatina constitutiva e porção cinza, as regiões de heterocromatina facultativa. Barra= 5 μ m.

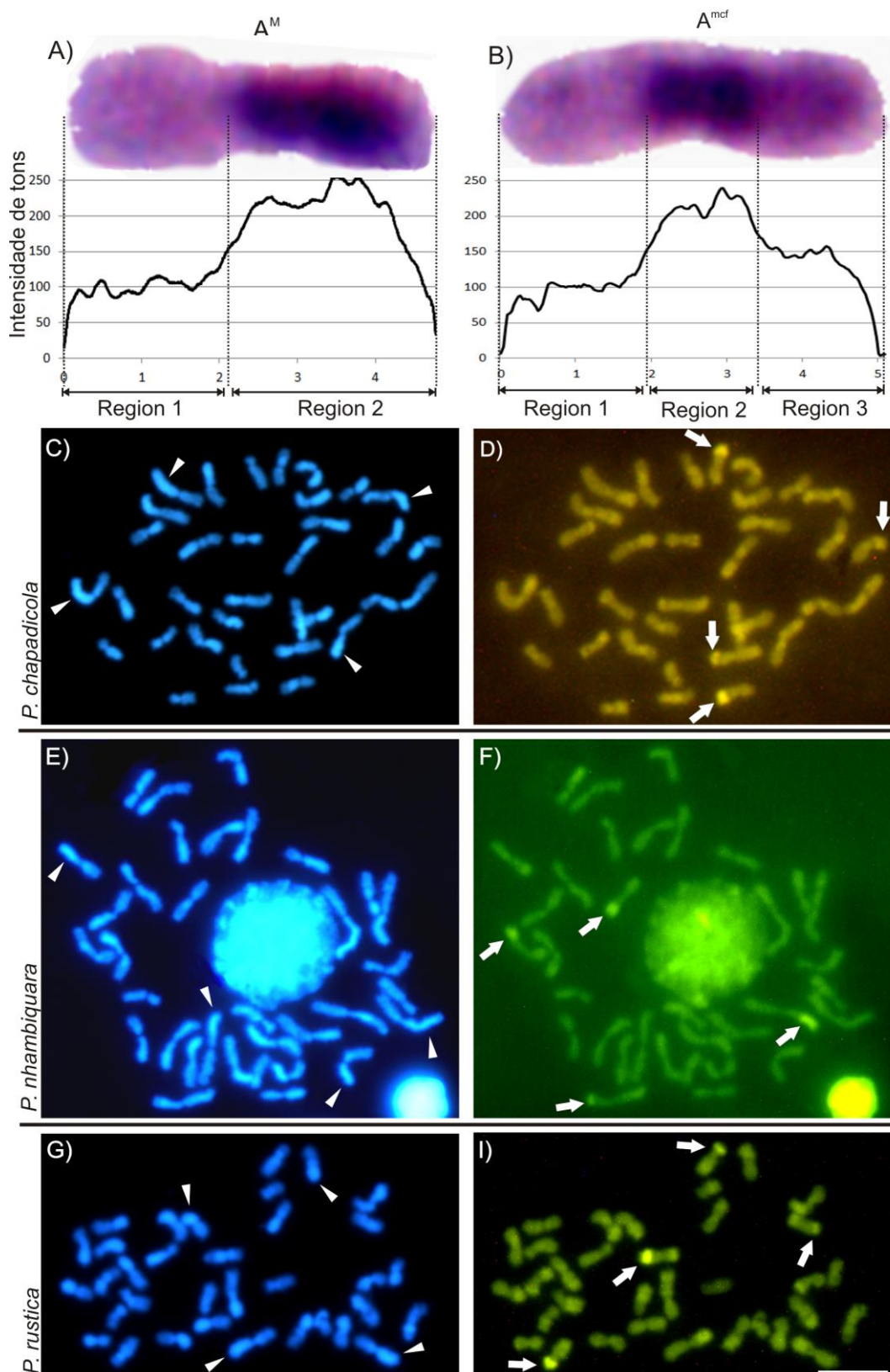


Figura 3- Exemplos de histogramas de cromossomos A^{Mcf} de *P. chapadicola*. Note que para o cromossomo A^M é possível reconhecer duas regiões de acordo com a intensidade de coloração da banda C. Já para os cromossomos A^{Mcf} três regiões distintas são reconhecidas. Em C), E) e G) metáfases tratadas com DAPI e em D), F) e I) tratadas com CMA₃. Cabeças de setas indicam regiões DAPI positiva e setas indicam regiões CMA₃positiva. Barra=5μm.

5. REFERÊNCIAS

- BARTH A, FERNANDES A, POMPOLO SG and COSTA MA. 2011. Occurrence of B chromosomes in *Tetragonisca* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): a new contribution to the cytotaxonomy of the genus. *Genetics and Molecular Biology*, 34 (1): 77-79.
- BRITORM. 1998. Caracterização citogenética de duas espécies do gênero *Partamona* Schwarz, 1939 (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 97p.
- BRITO RM, COSTA MA and POMPOLO SG. 1997. Characterization and distribution of supernumerary chromosomes in 23 colonies of *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Brazilian Journal of Genetics*, 20:185-188.
- BRITO-RIBON RM, MIYAZAWA CS and POMPOLO SG. 1999. First karyotype characterization of Four Species of *Partamona* (Fries, 1980) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) in Mato Grosso State - Brazil. *Cytobios*, 100:19-26.
- BRITO RM, CAIXEIRO APA, POMPOLO SG and AZEVEDO GG. 2003. Cytogenetic data of *Partamona peckolti* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) by C banding and fluorochrome staining with DA/CMA3 and DA/DAPI. *Genetics and Molecular Biology*, 26:53-57.
- BRITO RM, POMPOLO SG, MAGALHÃES MFM, BARROS EG and SAKAMOTO-HOJO ET. 2005. Cytogenetic characterization of two *Partamona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) by fluorochrome staining and localization of 18S rDNA clusters by FISH. *Cytologia* 70:373-380.
- CAMARGO JMF and PEDRO SRM. 2003. Meliponini Neotropicais: O gênero *Partamona* Schwarz, 1939 (Hymenoptera, Apidae, Apinae). *Revista Brasileira de Entomologia*, 47(3): 311-372.
- COSTA MA, POMPOLO SG and CAMPOS LAO. 1992. Supernumerary Chromosomes In *Partamona cupira* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Revista Brasileira de Genética*, 15: 801-806.
- CRINITI A, SIMONAZZI G, CASSANELLI S, FERRARI M, BIZZARO D and MANICARDI GC. 2009. Distribution of heterochromatin and rDNA on the holocentric chromosomes of the aphids *Dysaphis plantaginea* and *Melanaphis pyraia* (Hemiptera: Aphididae). *European Journal of Entomology*, 106: 153-157.
- CRUZ CD. 2006. Programa Genes - Estatística Experimental e Matrizes. 1ª ed. Viçosa: Editora UFV, 285p.
- DILLON N. 2004. Heterochromatin structure and function. *Biology of the Cell*, 96:631-637.
- DUARTE OM, MARTINS CC, WALDSCHMIDT AM and COSTA MA. 2009. Occurrence of multiple nucleolus organizer regions and intraspecific karyotype variation in *Scaptotrigona xanthotricha* Moure (Hymenoptera, Meliponini). *Genetics and Molecular Biology* 8(3): 831-839.
- FRANCINI IB, GROSS MC; NUNES-SILVA CG and CARVALHO-ZILSE, GA. 2011. Cytogenetic analysis of the Amazon stingless bee *Melipona seminigra merrillae* reveals different chromosome number for the genus. *Scientia Agricola*, 68(5): 592-593.
- FERNANDES A, WERNECK H, CAMPOS LAO, LOPES DM. 2012. Evidence of separate karyotype evolutionary pathway in *Euglossa* orchid bees by conventional and molecular cytogenetic analyses. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences* (in press).
- GREWAL SIS and JIA S. 2007. Heterochromatin revisited. *Nature*, 8: 35-46.
- IMAI HT, MARUYAMA T, GOJOBORI T, INOUE Y, CROZIER RH. 1986. Theoretical bases for karyotype evolution. The minimum-interaction hypothesis. *American Naturalist*, 128: 900-920.
- IMAI HT, TAYLOR RW and CROZIER RH. 1988. Modes of spontaneous chromosomal mutation and karyotype evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis. *Japanese Journal of Genetics*, 63:159-185.
- IMAI HT, TAYLOR RW and CROZIER RH. 1994. Experimental bases for the minimum interaction theory. Chromosome evolution in ants of the *Myrmecia pilosula* species complex (Hymenoptera: Formicidae: Myrmecinae). *Japanese Journal of Genetics* 69:137-182.

- IMAI HT. 1991. Mutability of constitutive heterochromatin (C-band) during eukaryotic chromosomal evolution and their cytological meaning. *Japanese Journal of Genetics*, 66: 635-661.
- KRINSK, D, FERNANDES A and PIUMBINI MR. 2012. Cytogenetic analysis: a new era of procedures and precision. In: *Recent Trends in Cytogenetic Studies - Methodologies and Applications*. Editora: InTech, 107-124.
- LOPES, DM, POMPOLO, SG, CAMPOS, LAO and TAVARES, MG. 2008. Cytogenetic characterization of *Melipona rufiventris* Lepeletier 1836 and *Melipona mondury* Smith 1863 (Hymenoptera, Apidae) by C banding and fluorochromes staining. *Genetics and Molecular Biology* 31: 49-52.
- LOPES DM, FERNANDES A, PRAÇA-PONTES MM, WERNECK HA, RESENDE HR and CAMPOS LAO. 2011. Cytogenetics of three *Melipona* Species (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Sociobiology*, 58(1): 185-194.
- NASCIMENTO 2005. Caracterização citogenética da espécie *Frieseomelitta trichocerata* Moure, 1988 (Hymenoptera; Apidae; Meliponina) coletada em Tangará da Serra-MT. Monografia - Universidade do estado de Mato Grosso, 42p.
- MAFFEI EM, POMPOLO SG, SILVA-JUNIOR JC and CAIXEIRO AP. 2001. Silver staining of nucleolar organizer regions (NOR) in some species of Hymenoptera (bees and parasitic wasp) and Coleoptera (lady-beetle). *Cytobios* 104: 119-125.
- MARTHE JB, POMPOLO SG, CAMPOS LAO, SALOMÃO TMF and TAVARES, MG. 2010. Cytogenetic characterization of *Partamona cupira* (Hymenoptera, Apidae) by fluorochromes. *Genetics and Molecular Biology*, 33(2):253-255.
- MARTINS CCC, DUARTE OMP, WALDSCHMIDT AM, ALVES RMO and COSTA MA. 2009. New occurrence of B chromosomes in *Partamona helleri* (Friese, 1900) (Hymenoptera, Meliponini). *Genetics and Molecular Biology*, 32(4):782-785.
- MENEZES R, CARVALHO AF, SILVA JG and COSTA MA. 2011. Molecular characterization of constitutive heterochromatin in three species of *Trypoxylon* (Hymenoptera, Crabronidae, Trypoxylini) by CMA3/DAPI staining. *Comparative Cytogenetics*, 5(2): 71-80.
- Michener CD. 2007. *The bees of the world*. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 953 p.
- MOURE JS, URBAN D, MELO, GAR (Orgs). 2007. *Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the neotropical region*. Sociedade Brasileira de Entomologia, Curitiba. 1054 p.
- PETROVIĆ V, PÉREZ-GARCÍA C, PASANTES JJ, ŠATOVIĆ E, PRATS E and PLOHL M. 2009. A GC-rich satellite DNA and karyology of the bivalve mollusk *Donax trunculus*: a dominance of GC-rich heterochromatin. *Cytogenetic and Genome Research*, 124: 63-71.
- ROCHA MP and POMPOLO SG. 1998. Karyotypes and heterochromatin variation (C-bands) in *Melipona* species (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). *Genetics and Molecular Biology*, 21: 41-45.
- ROCHA MP, POMPOLO SD, DERGAM JA, FERNANDES A and CAMPOS, LAO. 2002. DNA characterization and karyotypic evolution in the bee genus *Melipona* (Hymenoptera, Meliponini). *Hereditas*, 136: 19-27.
- ROCHA MP, POMPOLO SG and CAMPOS LAO. 2003. Citogenética da Tribo Meliponini (Hymenoptera, Apidae). In: *Apoidea Neotropica: Homenagem aos 60 anos de Jesus Santiago Moure* (Melo GAR and Alves-dos-Santos I, eds.). Editora UNESC, Criciúma, 311-320.
- ROCHA MP, POMPOLO SG, FERNANDES A and CAMPOS LAO. 2007. *Melipona*: Six decade of cytogenetic. *Bioscience Journal Supplement*, 1: 111-117.
- SILVA AEB, MARQUES A, SANTOS KGB and GUERRA M. 2010. The evolution of CMA₃ bands in *Citrus* and related genera. *Chromosome Research*, 18: 503-514.
- SWARÇA AC, FENOCCHIO AS, CESTARI MM; DIAS AL. 2003. Analysis of heterochromatin by combination of C-banding and CMA₃ and DAPI staining in two fish species (Pimelodidae, Siluriformes). *Genetica*, 119: 87-92.
- Schweizer D. 1980. Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA-DAPI bands) in human chromosomes. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 27: 190-193.
- Sumner AT. 2003. *Chromosomes: organization and function*. Blackwell Publishing, London, 287p.
- TARELHO ZVS. 1973. *Contribuição ao estudo citogenético dos Apoidea*. Dissertação - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

CONCLUSÕES GERAIS

- ✓ *P. cupira*, *P. helleri*, *P. affhelleri*, *P. rustica* e *P. seridoenses* apresentaram marcação positiva para o marcador SCAR, sinalizando que provavelmente todas estas espécies possuam o cromossomo Bou fragmento do mesmo;
- ✓ A reconstrução filogenética das espécies analisadas possibilitou inferir sobre a existência de possíveis cruzamentos interespecíficos ocorrendo entre *P. helleri* e *P. chapadicolae* que cruzamentos desta natureza poderiam estar relacionados com a transmissão do cromossomo B entre as espécies do gênero;
- ✓ As reconstruções filogenéticas também apontam para a ocorrência de um antigo evento de cladogênese ocorrido a aproximadamente 35 milhões de anos que dividiu o grupo em dois clado.
- ✓ Desacordos entre a caracterização taxonômica e as informações moleculares sugerem que tanto a espécie *P. seridoensis* quanto *P. chapadicola* possam compor grupos distintos de espécies crípticas;
- ✓ O sequenciamento de fragmentos do gene Cytocromo B revelou a existência de *numts* nas espécies *P. ailyae*, *P. helleri*, *P. mulata*, *P. rustica*, *P. cupira* e *P. seridoensi*;
- ✓ A hipótese filogenética proposta evidenciou que as amostras que possuem os *numts* formam um clado e estão em uma politomia juntamente com as demais espécies de *Partamona* e *Paratrigona*, indicando que o evento de migração do fragmento mitocondrial para o núcleo possa ser um evento antigo, anterior a separação destes dois gêneros.
- ✓ O número constante de $2n=34$ cromossomos foi encontrado para *P. chapadicola*, *P. nhambiquara* e *P. rustica*;
- ✓ A análise dos resultados da técnica de banda C por meio da utilização de programas de Análise de Imagens (AI) e análises estatísticas indicaram a existência de cromossomos que possuíam três regiões com intensidades de coloração distintas o que nos possibilitou sugerir a criação de um novo tipo de morfologia cromossômica (A^{Mn});

✓ As fórmula cariotípica estabelecidas foram de $2K=8A^M+22A^{Mn}+4M^{ct}$, $2K=18A^M+14A^{Mn}+2M^{ct}$ e $2K=14A^M+20A^{Mn}$, respectivamente para *P. chapadicola*, *P. nhambiquara* e *P. rustica*.

✓ O fluorocromo DAPI marcou fortemente a heterocromatina visualizada pela banda C indicando que estas regiões deviam ser ricas em pares de base AT;

✓ O fluorocromo CMA₃ marcou a extremidade de dois pares de cromossomos e sugerimos que estas marcações podem estar associadas às Regiões Organizadoras de Nucléolo destas espécies.

ANEXO 1

Tabela 1. Relação de amostras do gênero *Partamona* analisadas.

nº	Nome Científico	Código	Localidade/Estado
1	<i>P. aff helleri</i>	PaffHMG15	Paraopeba-MG
2	<i>P. aff helleri</i>	PaffHMG18	Paraopeba-MG
3	<i>P. aff helleri</i>	PaffHMG74	Paraopeba-MG
4	<i>P. aff helleri</i>	PaffHMG148	Viçosa-MG
5	<i>P. ailyae</i>	PAIPA51	Redenção-PA
6	<i>P. ailyae</i>	PAIPA55	Redenção-PA
7	<i>P. ailyae</i>	PAIMT58	Nova Xavantina-MT
8	<i>P. ailyae</i>	PAIMT79	Nova Xavantina-MT
9	<i>P. ailyae</i>	PAIGO80	Catalão-GO
10	<i>P. ailyae</i>	PAIMT86	Paraopeba-MG
11	<i>P. ailyae</i>	PAIMT90	Tangará da Serra-MT
12	<i>P. ailyae</i>	PAIMT93	Tangará da Serra-MT
13	<i>P. ailyae</i>	PAIPA100	Novo Progresso-PA
14	<i>P. ailyae</i>	PAIMG171	Araguari-MG
15	<i>P. chapadicola</i>	PCHMA25	Maranhão-MA
16	<i>P. chapadicola</i>	PCHPA12	Santa Maria das Barreiras-PA
17	<i>P. chapadicola</i>	PCHMA19	Urbano Santo-MA
18	<i>P. chapadicola</i>	PCHMA20	Urbano Santo-MA
19	<i>P. chapadicola</i>	PCHMA21	Urbano Santo-MA
20	<i>P. chapadicola</i>	PCHMA22	Urbano Santo-MA
21	<i>P. chapadicola</i>	PCHMA23	Urbano Santo-MA
22	<i>P. chapadicola</i>	PCHMA24	Urbano Santo-MA
23	<i>P. chapadicola</i>	PCHMA26	Urbano Santo-MA
24	<i>P. chapadicola</i>	PCHMA27	Urbano Santo-MA
25	<i>P. chapadicola</i>	PCHMA28	Urbano Santo-MA
26	<i>P. chapadicola</i>	PCHMA29	Urbano Santo-MA
27	<i>P. chapadicola</i>	PCHMA30	Urbano Santo-MA
28	<i>P. chapadicola</i>	PCHMA31	Urbano Santo-MA
29	<i>P. chapadicola</i>	PCHMA32	Urbano Santo-MA
30	<i>P. chapadicola</i>	PCHMA33	Urbano Santo-MA
31	<i>P. chapadicola</i>	PCHMA34	Urbano Santo-MA
32	<i>P. chapadicola</i>	PCHMA35	Urbano Santo-MA
33	<i>P. chapadicola</i>	PCHMA36	Urbano Santo-MA
34	<i>P. chapadicola</i>	PCHMA37	Urbano Santo-MA
35	<i>P. chapadicola</i>	PCHMA38	Urbano Santo-MA
36	<i>P. chapadicola</i>	PCHMA39	Urbano Santo-MA
37	<i>P. chapadicola</i>	PCHMA40	Urbano Santo-MA
38	<i>P. chapadicola</i>	PCHMA41	Urbano Santo-MA
39	<i>P. chapadicola</i>	PCHMA42	Urbano Santo-MA
40	<i>P. chapadicola</i>	PCHMA43	Urbano Santo-MA
41	<i>P. chapadicola</i>	PCHMA44	Urbano Santo-MA
42	<i>P. chapadicola</i>	PCHMA45	Urbano Santo-MA
43	<i>P. chapadicola</i>	PCHMA46	Urbano Santo-MA
44	<i>P. chapadicola</i>	PCHPA52	Redenção-PA
45	<i>P. chapadicola</i>	PCHPA53	Redenção-PA
46	<i>P. chapadicola</i>	PCHPA54	Redenção-PA
47	<i>P. chapadicola</i>	PCHPA56	Santa Maria das Barreiras-PA
48	<i>P. chapadicola</i>	PCHPA57	Santa Maria das Barreiras-PA
49	<i>P. chapadicola</i>	PHMG103	Tangará da Serra-MT

50	<i>P. combinata</i>	PCOGO88	Catalão-GO
51	<i>P. combinata</i>	PCOMG89	Uberlândia-MG
52	<i>P. combinata</i>	PCOGO108	Catalão-GO
53	<i>P. criptica</i>	PCRMG66	Itamarati-MG
54	<i>P. criptica</i>	PCRES67	Guarapari-ES
55	<i>P. cupira</i>	PCUMG1	Guimarães- MG
56	<i>P. cupira</i>	PCUMG65	Brasilândia de Minas-MG
57	<i>P. cupira</i>	PCUMG71	Guimarães- MG
58	<i>P. cupira</i>	PCUMG75	Januária- MG
59	<i>P. cupira</i>	PCUES78	Marechal Floriano- ES
60	<i>P. cupira</i>	PCUMG104	Guimarães- MG
61	<i>P. cupira</i>	PCUMG106	Patrocínio-MG
62	<i>P. cupira</i>	PCUMG132	Guimarães-MG
63	<i>P. cupira</i>	PCUMG133	Guimarães-MG
64	<i>P. cupira</i>	PCUMG134	Guimarães-MG
65	<i>P. cupira</i>	PCUMG135	Guimarães-MG
66	<i>P. cupira</i>	PCUMG136	Guimarães-MG
67	<i>P. cupira</i>	PCUMG137	Guimarães-MG
68	<i>P. cupira</i>	PCUMG138	Guimarães-MG
69	<i>P. cupira</i>	PCUMG139	Guimarães-MG
70	<i>P. cupira</i>	PCUMG140	Guimarães-MG
71	<i>P. cupira</i>	PCUMG141	Patrocínio-MG
72	<i>P. cupira</i>	PCUMG142	Guimarães-MG
73	<i>P. cupira</i>	PCUMG143	Januária-MG
74	<i>P. cupira</i>	PCUMG144	Nova Porteirinha-MG
75	<i>P. cupira</i>	PCUMG145	Nova Porteirinha-MG
76	<i>P. cupira</i>	PCUMG146	Patrocínio-MG
77	<i>P. cupira</i>	PCUMG147	Patrocínio-MG
78	<i>P. cupira</i>	PCUMG147	Patrocínio-MG
79	<i>P. cupira</i>	PCUMG60	Patrocínio-MG
80	<i>P. epiphitophyta</i>	PEAC87	Rio Branco-AC
81	<i>P. epiphytophila</i>	PEAC61	Rio Branco-AC
82	<i>P. gregaria</i>	PGPA91	Novo Progresso-PA
83	<i>P. gregaria</i>	PGPA98	Novo Progresso-PA
84	<i>P. helleri</i>	PHMG05	Viçosa-MG
85	<i>P. helleri</i>	PHMG06	Viçosa-MG
86	<i>P. helleri</i>	PHMG07	Viçosa-MG
87	<i>P. helleri</i>	PHMG09	Viçosa-MG
88	<i>P. helleri</i>	PHMG17	Sabará-MG
89	<i>P. helleri</i>	PHSP49	Ribeirão Preto- SP
90	<i>P. helleri</i>	PHES50	São Mateus- ES
91	<i>P. helleri</i>	PHES69	Nova Venécia- ES
92	<i>P. helleri</i>	PHMG70	Poté- MG
93	<i>P. helleri</i>	PHRJ72	Silva Jardim- RJ
94	<i>P. helleri</i>	PHMG73	São Gonçalo do Rio Abaixo-MG
95	<i>P. helleri</i>	PHCE76	Fortaleza-CE
96	<i>P. helleri</i>	PHMG81	Poté- MG
97	<i>P. helleri</i>	PHMG82	Inhaí-MG
98	<i>P. helleri</i>	PHMG83	Mendanha-MG
99	<i>P. helleri</i>	PHMG84	Inhaí-MG
100	<i>P. helleri</i>	PHMG85	Inhaí-MG
101	<i>P. helleri</i>	PHSP111	Ribeirão Preto- SP
102	<i>P. helleri</i>	PHSP112	Ribeirão Preto- SP

103	<i>P. helleri</i>	PHSP113	Ribeirão Preto- SP
104	<i>P. helleri</i>	PHSP114	Ribeirão Preto- SP
105	<i>P. helleri</i>	PHES115	Nova Venécia- ES
106	<i>P. helleri</i>	PHES117	Governador Lindenberg- ES
107	<i>P. helleri</i>	PHES118	Nova Venécia- ES
108	<i>P. helleri</i>	PHES119	Nova Venécia- ES
109	<i>P. helleri</i>	PHES120	Nova Venécia- ES
110	<i>P. helleri</i>	PHES121	Nova Venécia- ES
111	<i>P. helleri</i>	PHES122	Nova Venécia- ES
112	<i>P. helleri</i>	PHES123	Nova Venécia- ES
113	<i>P. helleri</i>	PHES124	Nova Venécia- ES
114	<i>P. helleri</i>	PHES127	Nova Venécia- ES
115	<i>P. helleri</i>	PHES128	Nova Venécia- ES
116	<i>P. helleri</i>	PHES129	Nova Venécia- ES
117	<i>P. helleri</i>	PHES130	Nova Venécia- ES
118	<i>P. helleri</i>	PHES131	Nova Venécia- ES
119	<i>P. helleri</i>	PMG172	Tiros-MG
120	<i>P. helleri</i>	PHMG10	Paraopeba-MG
121	<i>P. helleri</i>	PHMG11	Paraopeba-MG
122	<i>P. helleri</i>	PHMG13	Paraopeba-MG
123	<i>P. helleri</i>	PHMG14	Paraopeba-MG
124	<i>P. mulata</i>	PMUMT59	Cuiabá-MT
125	<i>P. mulata</i>	PMUMG150	Guimarânia-MG
126	<i>P. mulata</i>	PMUMG151	Guimarânia-MG
127	<i>P. nhambiquara</i>	PNHMT92	Tangará da Serra-MT
128	<i>P. nhambiquara</i>	PNHMT94	Tangará da Serra-MT
129	<i>P. nhambiquara</i>	PNHMT95	Tangará da Serra-MT
130	<i>P. nhambiquara</i>	PNHMT96	Tangará da Serra-MT
131	<i>P. nhambiquara</i>	PNHMT97	Tangará da Serra-MT
132	<i>P. rustica</i>	PRUMG2	Nova Porteirinha- MG
133	<i>P. rustica</i>	PRUMG3	Nova Porteirinha- MG
134	<i>P. rustica</i>	PRUMG16	Januária- MG
135	<i>P. rustica</i>	PRUMG48	Nova Porteirinha- MG
136	<i>P. rustica</i>	PRUMG63	Januária- MG
137	<i>P. rustica</i>	PRMG152	Lontra-MG
138	<i>P. rustica</i>	PRMG153	Lontra-MG
139	<i>P. rustica</i>	PRMG154	Lontra-MG
140	<i>P. rustica</i>	PRMG155	Lontra-MG
141	<i>P. rustica</i>	PRMG166	Lontra-MG
142	<i>P. rustica</i>	PRMG167	Lontra-MG
143	<i>P. rustica</i>	PRMG168	Lontra-MG
144	<i>P. rustica</i>	PRMG169	Lontra-MG
145	<i>P. rustica</i>	PRMG170	Lontra-MG
146	<i>P. seridoensis</i>	PSPB47	Areia-PB
147	<i>P. seridoensis</i>	PSPB64	João Pessoa-PB
148	<i>P. seridoensis</i>	PSMA68	Mirador-MA
149	<i>P. seridoensis</i>	PSCE77	Camocim- CE
150	<i>P. seridoensis</i>	PSPB99	João Pessoa-PB
151	<i>P. testacea</i>	PTPA149	Novo Progresso-PA
152	<i>P. vicina</i>	PVMT62	Nova Xavantina-MT
153	<i>Partamona sp.</i>	P107	Amazônia