

NATÁLIA MARTINS TRAVENZOLI

**CITOGENÉTICA CLÁSSICA E MOLECULAR COM ÊNFASE  
NA EVOLUÇÃO CROMOSSÔMICA EM MELIPONINI**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2018

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

T

T779c Travenzoli, Natália Martins, 1987-  
2018 Citogenética clássica e molecular com ênfase na evolução cromossômica em Meliponini / Natália Martins Travenzoli. – Viçosa, MG, 2018.  
xii, 110f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Texto em português e inglês.

Inclui anexos.

Orientador: Tânia Maria Fernandes Salomão.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Melipona - Citogenética. 2. Heterocromatina. 3. Sondas DNA. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural. II. Título.


CDD 22. ed. 595.799

NATÁLIA MARTINS TRAVENZOLI

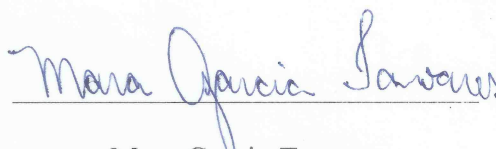
**CITOGENÉTICA CLÁSSICA E MOLECULAR COM ÊNFASE  
NA EVOLUÇÃO CROMOSSÔMICA EM MELIPONINI**

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

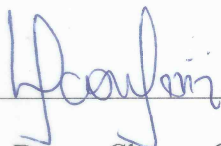
APROVADA: 31 de julho de 2018.



Lucio Antônio de Oliveira Campos



Mara Garcia Tavares



Danon Clêmes Cardoso



Jorge Abdala Dergam dos Santos



Denilce Meneses Lopes  
(Presidente)

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus pais, Imaculada Martins e Antônio Travenzoli, e ao meu irmão Thálisson pelo amor, paciência, esforço e dedicação, indispensáveis para minha formação pessoal e profissional.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por colocar pessoas especiais em minha vida e por seu alicerce.

Aos meus pais Antônio Travenzoli e Maria Imaculada agradeço pelo amor, carinho, paciência e pelas orações.

Ao meu irmão Thálisson pela amizade, cuidado e compreensão nesses anos.

Aos meus avós, tios, tias e primos da família Martins e Travenzoli pelas orações e torcida durante esses anos em Viçosa.

Aos órgãos financeiros (CAPES, CNPq e FAPEMIG) pelos recursos financeiros.

À Universidade Federal de Viçosa pela acolhida e pelo ensino de qualidade.

Ao programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural pela oportunidade profissional.

A Beth agradeço pelas conversas, disponibilidade e atenção nesses quatro anos.

Ao Leandro, Gustavo e a Adriana pela atenção e disponibilidade.

A técnica do laboratório de Biologia Molecular de Insetos, Renata Barbosa pela disponibilidade em sempre ajudar, principalmente com os reagentes.

Aos colegas de trabalho do laboratório de Biologia Molecular de Insetos (Renata Barbosa, Raquel Maia, Samira Komoli, Carol Macedo, Tales Vicari, Hugo Werneck, Renan Araújo e Henrique Silva) pelas conversas e convivência nesses quatro anos.

Ao Hugo Werneck pela ajuda com a análise filogenética e de evolução.

A Silvia Pompolo por disponibilizar o laboratório e pelas conversas sobre *Melipona*.

A professora Gislene Almeida Carvalho-Zilse do Grupo de Pesquisas em Abelhas, Departamento de Ciências Agrônomicas, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (IMPA), agradeço pelas amostras de *Melipona (Melikerria) interrupta*.

Ao Lúcio Campos agradeço por compartilhar todo o conhecimento acadêmico e de vida nesses 4 anos. As conversas sobre abelha, *Melipona*, *Austroplebeia*, DNA

repetitivo e heterocromatina foram importantes para o meu amadurecimento. Com certeza passei o doutorado tentando responder à pergunta que me fez quando analisei os primeiros resultados de DNA repetitivo: o que tem na heterocromatina de *Melipona*? Um dos principais questionamentos que me instigaram durante as análises.

A Mara Tavares agradeço pelos ensinamentos nesses anos do doutorado. A disponibilidade e as conversas sobre *Melipona*, cariótipos, heterocromatina e DNA repetitivo ao analisarmos os resultados da tese foram importantíssimos para o meu aprendizado acadêmico. Muito obrigada!

Ao Danon agradeço pela disponibilidade em participar das bancas ao longo do meu doutorado, principalmente na defesa da tese quando interrompeu as férias. Também agradeço pela parceria nos trabalhos e pelas conversas sobre DNA repetitivo e de FISH que contribuíram para meu amadurecimento científico.

Ao Jorge Abdala Dergam, também conhecido como Capitão do Beagle, agradeço pela confiança e oportunidade ao longo desses anos. Fazer parte da família “Beagle” foi importantíssimo para o meu amadurecimento. Lembro-me de quando cheguei no seu laboratório sem conhecer nada sobre citogenética e agora tenho a oportunidade de participar nas bancas de monografias. Jorge, obrigada por sempre acreditar e incentivar meu crescimento acadêmico. A sua prestatividade, atenção, disponibilidade, doação (reagentes, sondas e até um galão de água destilada (rsrs)) nunca serão esquecidos. Sua colaboração foi de grande importância para o desenvolvimento da minha tese. Obrigada!

Aos marujos do Beagle (Manuela Granja, Simone Duarte, Mariane Alves, Késsia Souza, Frederico Machado, Frederico Fernandes e ao Fillipe Schitini) agradeço pela ajuda em todos os momentos quando precisei. Foram tantas histórias, coletas,

metáfases e risadas nesses últimos 8 anos. O meu muito obrigada por sempre estarem dispostos a me ajudarem, com certeza todos vocês que foram importantes para minha formação!

A Tânia Fernandes muito obrigada por aceitar em me orientar nesse estudo. Foram tantas conversas e ensinamento ao longo desses anos. Agradeço por compartilhar os conhecimentos, pelos conselhos e pela disponibilidade em discutir e corrigir os resultados das análises da tese. Guardei todos os ensinamentos para minha vida!

A Denilce Lopes, primeiramente, agradeço por aceitar a me orientar e pela confiança em desenvolver esse estudo com uma aluna que não conhecia a Teoria da Interação Mínima (rsrs). Obrigada por acreditar que conseguiríamos estudar a heterocromatina de *Melipona*. Gostamos tanto de analisar a heterocromatina, que descobrimos uma espécie (*Austroplebeia*) com um padrão mais interessante ainda! Foram tantos momentos (no Brasil ou na mina de sal na Colômbia), histórias (Me queres? (☺)), conversas sobre heterocromatina, FISH, DNA repetitivo, *Melipona*, Meliponini, eventos de fissão e fusão, aulas de Biologia Celular, concursos e tantos outros assuntos. E para finalizar o doutorado, uma tese com seis capítulos! Poder compartilhar esses momentos profissionais e pessoais da minha vida, assim como acompanhar o nascimento e o crescimento dos seus filhos, foram importantes para o meu amadurecimento como pessoa. Muito obrigada!

As amigas e amigos do Laboratório de Citogenética de Insetos: Rúdo Paiva, Martinha Capoco, Bárbara Amoroso, Wagner Sampaio, Marina Cunha, Camila Novaes, Jaqueline Amorim, Priscila Marchioro, Gisele Amaro e a Alessandra Faustino. Como agradecer a ajuda de todos vocês? Talvez o meu “Muito obrigada” seja pouco. Ao ler o arquivo final da tese consigo descrever a ajuda de cada um de vocês, sejam pelos inúmeros FISH, pelas correções dos capítulos 1, 2, 3, 4, 5 e 6

(rsrsrsrs), ajuda em fazer e fotografar o DAPI-CMA<sub>3</sub> e tantos outros momentos. Com o passar dos anos, o laboratório se tornou o clube da Luluzinha, nos tornamos “As meninas de Denilce”! Com certeza, consegui desenvolver essa tese porque sabia que poderia contar com todas vocês! Foram tantos momentos, tantos cafés, risadas e faxinas nos laboratórios (rsrs). Espero que essa amizade permaneça e que possamos nos encontrar nas bancas dos orientandos de cada uma e dos futuros orientandos de Denilce!

As amizades que fiz em Viçosa: Nicole Ibagón, Marinha Cunha, Camila Novaes, Glaucia Cordeiro, Juliana Fialho e Manuela Garanja, o meu muito obrigada por todos os momentos e conversas! Foram tantos cafés, risadas, sertanejos e aniversários! Com certeza, esses anos em Viçosa foram bons porque sabia que poderia contar com todas vocês

Ao Junior Buonicontro agradeço por toda ajuda, tanto na minha vida pessoal quanto, profissional! Obrigada pela disponibilidade em procurar e coletar as abelhas. Foram tantas tentativas de coletas (em casa, nas ruas e em sítios) e logo na última veio uma ferroadada (rsrs)! Com sua ajuda, consegui montar minha primeira caixa entomológica, que sempre levo para os cursos. Ah, ainda teve um quadro de abelha que hoje fica na sala da minha casa, mas que um dia ficará na minha sala de trabalho. Muito obrigada!

As amizades que a vida me deu. A Gilda Alvarenga, Deyse Mara, Thamara Bastos, Graziela Domingues e Camila Mariângela (e ao marido Samuel) como agradecer vocês em poucas frases? Obrigada por sempre serem amigas e amigo, principalmente nos momentos quando mais precisei. Obrigada pelo apoio, pelas as conversas e conselhos quando precisei. Agradeço a Deus por ter colocado pessoas tão especiais na minha vida!



A todos os amigos, colegas, professores, profissionais da área, que de alguma forma me incentivaram.

Muito obrigada!

## SUMÁRIO

RESUMO .....	ix
ABSTRACT .....	xi
INTRODUÇÃO GERAL .....	1
ARTIGO 2 .....	36
ARTIGO 3 .....	48
ARTIGO 4 .....	56
ARTIGO 5 .....	83

## RESUMO

TRAVENZOLI, Natália Martins, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2018. **Citogenética clássica e molecular com ênfase na evolução cromossômica em Meliponini**. Orientadora: Tânia Maria Fernandes Salomão. Coorientadora: Denilce Meneses Lopes.

Os Meliponini são um grupo é monofilético, em que as espécies Neotropicais formam um grupo irmão com as espécies Afrotropicais e Indo-Malaia-Australásia. Citogeneticamente, a maioria dos estudos está relacionada à descrição do número de cromossomos nas espécies Neotropicais ( $n=8$  a 22 cromossomos, predominando  $n=17$  e  $n=18$ ). Para as demais espécies da Tribo, essa descrição está restrita a cinco espécies Afrotropicais ( $n=17$  e  $n=18$ ) e uma única espécie da região Indo-Malaia-Australásia ( $n=20$ ). Baseada nos números cromossômicos dessas espécies, a Teoria da Interação Mínima (TIM) passou a ser a mais aceita para explicar a evolução cromossômica em abelhas dessa Tribo. Segundo essa proposta, o ancestral das espécies viventes apresentaria baixo número cromossômico, o qual aumentaria ao longo da evolução por fissões com posterior acúmulo de heterocromatina. Conseqüentemente os cromossomos dessas espécies apresentaria um braço cromossômico eucromático e outro heterocromático. Uma exceção ao padrão foi observada em *Melipona*, que possui espécies com baixo e alto teor de heterocromatina. Nesse contexto, os padrões heterocromáticos em *Meliponini* e a predominância do alto número cromossômico ( $n=17$  e  $n=18$ ) são características de interesse a serem investigadas nessa Tribo. Assim, os objetivos desse estudo foram: (i) inferir o número cromossômico ancestral entre as espécies de Meliponini, bem como a do grupo irmão Bombini, a fim de propor hipóteses de evolução relacionadas às alterações cromossômicas; (ii) descrever o cariótipo de *Austroplebeia australis* baseados no número cromossômico, padrão heterocromático, riqueza em pares de base Citosina-Guanina e Adenina-Timina e o mapeamento dos sítios de rDNA, microssatélites GA<sub>(15)</sub>, GAG<sub>(10)</sub>, CAA<sub>(10)</sub> CGG<sub>(10)</sub> e as regiões teloméricas TTAGG<sub>(6)</sub>; (iii) caracterizar o cariótipo de *Melipona (Melikerria) interrupta* com base nos padrões heterocromáticos e as regiões ricas em pares de base Citosina-Guanina (CG) e Adenina-Timina (AT) nos cromossomos, bem como o mapeamento dos sítios de rDNA, microssatélites GA<sub>(15)</sub>, GAG<sub>(10)</sub>, CAA<sub>(10)</sub> CGG<sub>(10)</sub> e as regiões teloméricas TTAGG<sub>(6)</sub>; (iv) realizar uma análise comparativa das informações citogenéticas

existentes para *Melipona* e um mapeamento cromossômico das sequências de DNA repetitivas; (v) inferir o padrão heterocromático do ancestral comum das espécies de *Melipona*, para melhor entender o surgimento da heterocromatina e a diversificação cariotípica do gênero. Os resultados obtidos sugerem: (i) que o cariótipo ancestral entre Meliponini e Bombini possuía  $n=18$  cromossomos e o dos Meliponini  $n=17$  cromossomos, sendo que os números haploides inferiores se originaram por fusões adicionais; (ii) O cariótipo de *A. australis* possui  $2n=36$  cromossomos, os quais são constituídos por grande quantidade de heterocromatina. Os padrões de DAPI<sup>+</sup>-CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> divergiram do encontrado para a tribo e as sequências de DNA repetitivo hibridizaram apenas em regiões de eucromatina; (iii) *Melipona (Melikerria) interrupta* apresentou  $2n=18$  cromossomos, alto teor de heterocromatina, marcações do CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> e DNA ribossomal 18S foram observadas na região intersticial próxima a junção da eucromatina e heterocromatina do primeiro par cromossômico cromossômico; (iv) *Melipona* possui espécies com número cromossômico conservado ( $2n=18$ ) e as regiões de heterocromatina são importantes marcadores para separar as espécies do Grupo I e II, assim como o DAPI-CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> e o 18S. As sondas de DNA repetitivos foram restritas à eucromatina dos cromossomos, com padrões de distribuição distintos entre as espécies de baixo e alto teor de heterocromatina. A sequência TTAGG<sub>(6)</sub> foi observada nos telômeros dos cromossomos de *Melipona*; (v) observamos que o ancestral comum de *Melipona* possuía baixo conteúdo de heterocromatina, o qual aumentou no ancestral comum de *Michmelia* e independentemente em *Melikerria*, com diferentes constituições heterocromáticas. Concluímos que o número cromossômico ancestral  $n=18$  se manteve ao longo da evolução em diferentes espécies da Tribo, sendo os eventos de fusão os principais responsáveis pelas variações dos números haploides. O baixo número de cromossomos encontrado em *Melipona* é uma apomorfia do gênero. Em *A. australis*, a grande quantidade de heterocromatina é semelhante ao cariótipo das espécies do Grupo II de *Melipona*. Entretanto, a constituição da cromatina baseada na riqueza de bases AT e CG é mais semelhante ao observado em espécies solitárias. As espécies de *Melipona* possuem características citogenéticas conservadas, o que possivelmente é resultado do tempo recente de diversificação dessas espécies. O baixo conteúdo heterocromático é o caráter ancestral do gênero e a alta quantidade de heterocromatina o resultado de sua amplificação a partir da região centromérica, surgindo em momentos independentes nas espécies.

## ABSTRACT

TRAVENZOLI, Natália Martins, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2018. **Classical and molecular cytogenetics with emphasis in chromosomal evolution in Meliponini.** Adviser: Tânia Maria Fernandes Salomão. Co-adviser: Denilce Meneses Lopes.

The Meliponini were group is monophyletic, which the Neotropical species form a sister group with the species Afrotropical / Indo-Malay-Australasian. Cytogenetically most studies are related to the chromosomes' number description in Neotropical species ( $n=8$  to  $n=22$  chromosomes, predominating  $n=17$  and  $n=18$ ). For the other Tribe species this description is restricted to five Afrotropical species ( $n=17$  and  $n=18$ ) besides one from the Indo-Malay-Australasian region ( $n=20$ ). Based on Meliponini chromosome numbers, the Theory of Minimum Interaction (MIT) became the most accepted to explain the chromosomal evolution in bees this tribe. It proposes that the ancestor of living species would present a low chromosome number that would increase throughout the evolution by fissions with later accumulation of heterochromatin. Consequently the chromosomes present the species as an euchromatic chromosome and another heterochromatic. An exception to the standard was observed in *Melipona* which has species with low and high heterochromatin content. In this context, the heterochromatic patterns in Meliponini and the predominance of the high number of chromosomes of  $n=17$  and  $n=18$  are characteristics of interest to be investigated in this Tribe. Thus, the objectives of this study were: (i) to infer the ancestral chromosome number among the Meliponini species as well as that of the Bombini sister group, in order to propose evolutionary hypotheses related to chromosomal alterations; (ii) To describe the karyotype of *Austroplebeia australis* based on chromosome number, heterochromatic pattern, richness in base pairs Cytosine-Guanine and Adenine-Thymine and mapping of rDNA  $GA_{(15)}$ ,  $GAG_{(10)}$ ,  $CAA_{(10)}$   $CGG_{(10)}$  and telomeric regions  $TTAGG_{(6)}$ ; (iii) characterize the karyotype of *Melipona (Melikerria) interrupta* based on heterochromatic patterns and regions rich in pairs of cytosine-Guanine (CG) and Adenine-Thymine (AT) bases on chromosomes, as well as the mapping of rDNA, microsatellites  $GA_{(15)}$ ,  $GAG_{(10)}$ ,  $CAA_{(10)}$   $CGG_{(10)}$  and the telomeric regions  $TTAGG_{(6)}$ ; (iv) to perform a comparative analysis of the existing cytogenetic information for *Melipona* and a chromosomal mapping of the repetitive sequences of DNA; (v) the heterochromatic pattern's inference of the *Melipona* species' common

ancestral, for better understanding the heterochromatin's emergence and the genus karyotypic diversification. The results suggest that: (i) the ancestral karyotype between Meliponini and Bombini had  $n=18$  while Meliponini's had  $n=17$  chromosomes which the lower haploid numbers were caused by additional fusions; (ii) the *A. australis* karyotype has  $2n=36$  chromosomes which are composed of a large amount of heterochromatin. The DAPI<sup>+</sup>-CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> patterns diverged from what was found for the tribe and repetitive DNA sequences hybridized only to euchromatin regions; (iii) *Melipona (Melikerria) interrupta* presented  $2n=18$  chromosomes, high heterochromatin content, CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> and 18S ribosomal DNA were observed in the interstitial region near the junction of euchromatin and heterochromatin of the first chromosomal pair; (iv) *Melipona* has species with a conserved chromosome number ( $2n=18$ ) and the heterochromatin regions are important markers for separating the species from Group I and II as well as DAPI-CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> and 18S. Repetitive DNA probes were restricted to chromosomes' euchromatin with distinct distribution patterns between low and high heterochromatin species. The sequence TTAGG<sub>(6)</sub> are observed in the telomeres of *Melipona*; (v) it was observed that the *Melipona* common ancestor had low heterochromatin content which increased in the common ancestor of *Michmelia* and independently in *Melikerria* with different heterochromatic constitutions. We conclude that the ancestral chromosomal number  $n=18$  was maintained throughout the evolution in different species of the Tribe, being the fusion events the main responsible for the haploid numbers variations. The low number of chromosomes found in *Melipona* is a genus' apomorphy. In *A. australis* the large amount of heterochromatin is similar to the karyotype of *Melipona* Group II species. However, the chromatin's constitution based on the richness of AT and CG bases is more similar to that observed in solitary species. The *Melipona* species have conserved cytogenetic characteristics which possibly is a result of the recent time of these species diversification. The low heterochromatic content is the genus ancestral character and the high amount of heterochromatin is the result of its amplification from the centromeric region which appears at independent moments in the species.

### 1.1 Evolução cromossômica em Meliponini

As abelhas ocorrem nas regiões Afrotropical, Indo-Malaia, Australásia, Neoártica, Paleoártica e Neotropical (Michener, 2007; Rasmussen & Cameron, 2010; Camargo & Pedro, 2013; Ascher & Pickering, 2016). Dentre as espécies, encontram-se os corbiculados, que compreendem as tribos Apini, Euglossini, Bombini e Meliponini. A história evolutiva desses táxons tem sido abordada por meio de estudos morfológicos (Michener, 2007; Camargo & Pedro, 2008; França *et al.*, 2016), filogenéticos (Costa *et al.*, 2003; Hines *et al.*, 2006; Cameron *et al.*, 2007; Rasmussen & Cameron, 2010; Branstetter *et al.*, 2017) e citogenéticos (Hoshiba & Kusanag, 1978; Owen *et al.*, 1995; Fernandes *et al.*, 2013; Tavares *et al.*, 2017).

Os Meliponini são abelhas popularmente conhecidas como “abelhas sem ferrão” (Camargo & Pedro, 2013). Com mais de 500 espécies descritas, distribuídas em 36 gêneros, a tribo possui maior diversidade comportamental e morfológica entre as abelhas eussociais (Michener, 2007; Camargo & Pedro, 2013). Filogeneticamente, formam um grupo monofilético em que as espécies da linhagem Neotropical (Novo Mundo) são um grupo irmão com as espécies das linhagens Afrotropical/Indo-Malaia-Australásia (Velho Mundo) (Rasmussen & Cameron, 2010).

Citogeneticamente, os estudos em espécies das linhagens Afrotropical e Indo-Malaia-Australásia estão restritos apenas à descrição do número cromossômico que varia de  $n=08$  a  $20$  e  $n=20$  cromossomos, respectivamente (Hoshiba & Imai, 1993). Para as espécies da linhagem Neotropical, análises realizadas incluem a descrições do número cromossômico (revisado em Tavares *et al.*, 2017), padrão de distribuição da heterocromatina (Rocha & Pompolo, 1998; Rocha *et al.*, 2002), localização de regiões ricas em bases AT (adenina-timina) e CG (citosina-guanina) (Barth *et al.*, 2011; Carvalho & Costa, 2011), mapeamento físico de genes ribossomais 18S (Brito *et al.*, 2005; Cunha *et al.*, 2018 *no prelo*) e de sequências de DNA repetitivos (Piccoli *et al.*, 2018), pintura cromossômica (Lopes *et al.*, 2014).

Em relação ao número e estrutura cromossômica, dois caminhos evolutivos foram propostos para explicar as alterações cariotípicas observadas em Meliponini. A primeira proposta foi sugerida por Kerr & Silveira (1972) e considerava a poliploidia como o principal evento na evolução cromossômica dessas abelhas, surgindo independentemente em diferentes gêneros. Com o resultado de novos estudos citogenéticos, esta hipótese foi descartada e a Teoria da Interação Mínima (TIM) (Imai

*et al.*, 1978; 1986, 1988, 1994, 2001; Hoshiba & Imai, 1993) passou a ser a mais aceita para explicar a evolução cromossômica em Hymenoptera (abelhas, vespas e formigas) (Hoshiba & Imai, 1993; Rocha *et al.*, 2003). Essa teoria foi inicialmente proposta para formigas australianas do complexo *Myrmecia pilosula* Frederick Smith, 1858 e que as modificações nos cariótipos das espécies ocorrem no sentido de minimizar os efeitos deletérios das interações cromossômicas, o que ocorreria por meio de fissões cêntricas e, conseqüentemente, minimizar as chances de rearranjos deletérios entre os cromossomos, no núcleo. No entanto, elas geram uma instabilidade nos regiões ficcionadas que então tende a ser minimizada pela incorporação de heterocromatina (Imai *et al.*, 1977; Imai *et al.*, 1986, 1988, 1994; Hoshiba & Imai, 1993).

Baseados nessa teoria o ancestral comum das espécies viventes dos Meliponini apresentaria baixo número cromossômico o qual aumentaria ao longo do tempo evolutivo por meio de fissões com posterior aumento de heterocromatina (Costa *et al.*, 2004; Krinski *et al.*, 2010; Godoy *et al.*, 2013; Miranda *et al.*, 2013). Em uma revisão citogenética considerando 104 espécies de Meliponini, observou-se que o número cromossômico dessas espécies varia de  $n=08$  a  $n=18$  cromossomos, sendo os mais frequentes  $n=9$ , 15, 17. Baseado nessas informações, três grupos foram considerados dentro dessa tribo: o primeiro grupo de  $n=15$  cromossomos, compreende espécimes em gêneros não relacionados filogeneticamente, o que indica que este número surgiu várias vezes independentemente ao longo da evolução dos Meliponini. O segundo grupo com  $n=9$  cromossomos, presente em espécies de *Melipona* e o terceiro grupo com  $n=17$  cromossomos, encontrado na maioria das espécies avaliadas (Tavares *et al.*, 2017). Como a maioria das espécies de Meliponini apresento alto número cromossômico propôs-se que o número ancestral da tribo estaria entre  $n=17$  a 20 cromossomos e que eventos de fusão cêntrica explicariam espécies com menor número cromossômico (Tavares *et al.*, 2017).

Apesar da constância, do número cromossômico entre espécies do mesmo gênero de Meliponini, características citogenéticas, tais como, morfologia cromossômica, quantidade e distribuição da heterocromatina apresentam diferentes padrões e essas características são úteis para análises evolutivas e de inferências taxonômicas nesta tribo (Tavares *et al.*, 2017). Neste contexto, os estudos citogenéticos podem fornecer importantes informações dos comparações dos processos evolutivos que moldaram a diversificação das espécies de Meliponini.



## 1.2 Citogenética clássica

Em abelhas, uma das técnicas da citogenética clássica mais utilizada em análises cariotípicas é o bandeamento C, que consiste em evidenciar a distribuição da heterocromatina nos cromossomos (Miranda *et al.*, 2013; Cunha *et al.*, 2018 *no prelo*). Os resultados obtidos por essa técnica demonstraram que os cromossomos de Meliponini, em geral, possuem um braço cromossômico eucromático e outro heterocromático (Costa *et al.*, 2004; Carvalho & Costa, 2011; Godoy *et al.*, 2013; Miranda *et al.*, 2013). Entretanto, uma exceção desse padrão heterocromático foi observada em *Melipona*. Com base na distribuição da heterocromatina, esse gênero pode ser dividido em dois grupos: um composto por espécies com baixa (Grupo I) e outro com alta (Grupo II) quantidade de heterocromatina em seu cariótipo (Rocha & Pompolo, 1998; Rocha *et al.*, 2002; Rocha *et al.*, 2003). Essas diferenças na quantidade de heterocromatina observadas nos cariótipos das espécies de *Melipona* podem contribuir para o conhecimento das relações filogenéticas das espécies (Rocha & Pompolo, 1998), uma vez que propõe-se que o aumento de heterocromatina seria o evento principal na evolução cariotípica das abelhas e que os baixos níveis heterocromáticos, observado em algumas espécies, poderiam indicar uma condição ancestral do gênero (Rocha *et al.*, 2002). Uma comparação dos dados de distribuição de heterocromatina nos cromossomos dessas espécies sob um contexto filogenético sugeriu que a heterocromatina apareceu mais de uma vez em diferentes momentos da história evolutiva do grupo (Lopes *et al.*, 2011), sendo uma característica de interesse para novos estudos.

Outra região cromossômica muito utilizada em estudos de evolução cariotípica é conhecida como região organizadora de nucléolo (NOR) (Almeida-Toledo, 1998). Em espécies de Meliponini, foi observado a relação entre essas regiões e as evidenciadas pelo bandamento com fluorocromo base-específico de riqueza em Citosina-Guanina (CMA<sub>3</sub>) em espécies de *Melipona* Illiger, 1806, *Partamona* Schwarz, 1939 e *Scaptotrigona* Moure, 1942 (Rocha *et al.*, 2002; Brito *et al.*, 2005; Duarte *et al.*, 2009; Cunha *et al.*, 2018 *no prelo*). Além dessa correspondência entre as NORs e CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>, foi observado que essas regiões também são coincidentes com os sítios gênicos de DNA ribossomal (rDNA) 18S (Rocha *et al.*, 2002; Brito *et al.*, 2003; Rocha *et al.*, 2003; Brito *et al.*, 2005; Duarte *et al.*, 2009; Lopes *et al.*, 2011; Godoy *et al.*, 2013; Cunha *et al.*, 2018 *no prelo*). Nessas espécies de abelhas sem ferrão, análises com fluorocromos indicaram que a heterocromatina é rica em pares de bases de AT (Adenina-Timina) (regiões DAPI<sup>+</sup>), enquanto a eucromatina é rica em CG (Citocina-Guanina) (regiões

CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>) (Rocha *et al.*, 2003; Miranda *et al.*, 2013; Godoy *et al.*, 2013; Cunha *et al.*, 2018 *no prelo*).

### 1.3 Citogenética Molecular

Em estudos de citogenética molecular, análises utilizando a técnica de hibridação fluorescente *in situ* (FISH) no mapeamento de sítios ribossomais, assim como de sequências de DNA repetitivo, tem fornecido importantes informações sobre a estrutura cariotípica e de evolução em diferentes táxons (Cabrero *et al.*, 2009; Cabral-de Mello *et al.*, 2011; Kavalco *et al.*, 2013; Palacios-Gimenez & Cabral-de-Melo, 2014; Peixoto *et al.*, 2016; Cunha *et al.*, 2016). Essas sequências de DNA repetitivos são segmentos de tamanhos variados que se repetem dezenas a milhares de vezes no genoma (Martins *et al.*, 2011). De acordo com o tamanho de suas unidades de repetição, essas sequências que se repetem *in tandem* podem ser classificadas em satélite (100 a 300 pb), microssatélites (10 a 100 pb) e minissatélites (1 a 6 nucleotídeos) (revisado em Martins *et al.*, 2011), podendo ocorrer em todas as regiões dos cromossomos, tais como: telômeros, centrômeros, em *locus* ou braços cromossômicos específicos, em ambos os braços cromossômicos ou dispersas pelos cromossomos (Figura 1) (revisado em Martins *et al.*, 2011).

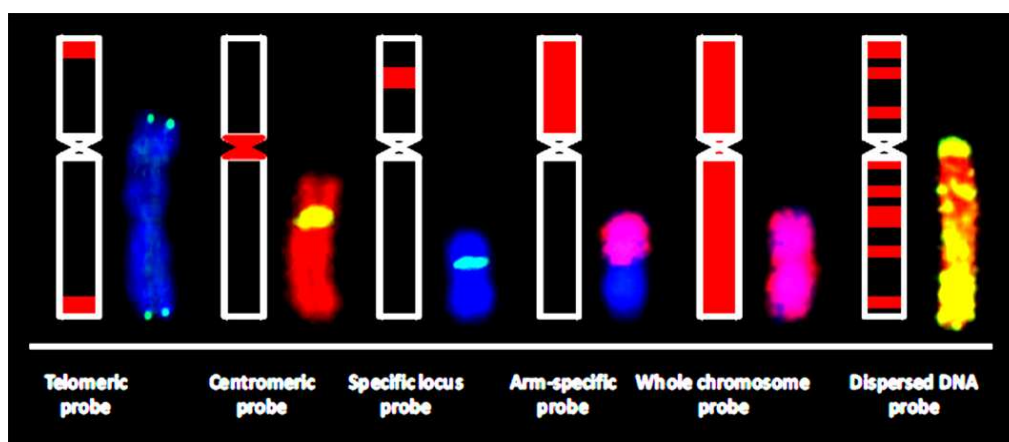


Figura 1. Principais padrões de marcações das sondas de sequências de DNA repetitivo. Fonte: Martins *et al.*, 2011.

Embora essas sequências de DNA repetitivo nos cromossomos forneçam importantes *insights* para a compreensão da estrutura e evolução do genoma (Cioffi *et al.*, 2009; Martins *et al.*, 2006; Schneider *et al.*, 2015), em abelhas esses estudos são escassos. Até o momento, apenas em 11 espécies da tribo Meliponini foram conduzidos estudos quanto às sequências repetitivas de DNA, seja ribossomal (*Melipona asilvai* Moure, 1971, *Melipona puncticollis* Friese, 1902, *Melipona bicolor* Lepeletier, 1836,

*Partamona helleri* (Friese, 1900) e *Partamona seridoensis* Pedro & Camargo, 2003) (Brito *et al.*, 2005; Cunha *et al.*, 2018 *no prelo*) ou microssatélite (*Melipona fasciculata* Smith, 1854, *Melipona quadrifasciata* Lepeletier, 1836, *Melipona rufiventris* Lepeletier, 1836, *Melipona scutellaris* Latreille, 1811, *Melipona seminigra* Moure & Kerr, 1950) (Piccoli *et al.*, 2018). Essas análises utilizando a técnica de FISH, demonstraram que o mapeamento de diferentes sequências de DNA repetitivo, ( $AG_{(15)}$ ,  $CA_{(15)}$ ,  $GAC_{(10)}$ ,  $GAG_{(10)}$ ,  $CGG_{(10)}$  e  $TAA_{(10)}$ ) hibridizaram apenas em regiões de eucromatina e que o conteúdo heterocromático de *Melipona scutellaris* e *Melipona seminigra* diferem das demais espécies dos subgêneros (Piccoli *et al.*, 2018).

Nesse contexto, considerando a importância dos estudos citogenéticos para elucidar as questões relacionadas à evolução cromossômica das espécies da tribo Meliponini, esse estudo teve como objetivos: (i) inferir o número cromossômico ancestral da tribo Meliponini e do seu grupo irmão, a tribo Bombini, a fim de avaliar e propor hipóteses de evolução relacionadas e subjacentes às alterações cromossômicas em Meliponini; (ii) descrever o cariótipo de *Austroplebeia australis* baseados no número cromossômico, padrão heterocromático, riqueza em pares de base Citosina-Guanina e Adenina-Timina, bem como o mapeamento dos sítios de rDNA, microssatélites  $GA_{(15)}$ ,  $GAG_{(10)}$ ,  $CAA_{(10)}$   $CGG_{(10)}$  e as regiões teloméricas  $TTAGG_{(6)}$ ; (iii) caracterizar o cariótipo de *Melipona (Melikerria) interrupta* com base nos padrões heterocromáticos e as regiões ricas em pares de base Citosina-Guanina (CG) e Adenina-Timina (AT) nos cromossomos, bem como o mapeamento dos sítios de rDNA, microssatélites  $GA_{(15)}$ ,  $GAG_{(10)}$ ,  $CAA_{(10)}$   $CGG_{(10)}$  e as regiões teloméricas  $TTAGG_{(6)}$ ; (iv) realizar uma análise comparativa das informações citogenéticas existentes em *Melipona* e um mapeamento físico de diferentes sequências repetitivas ( $GA_{(15)}$ ,  $GAG_{(10)}$ ,  $CAA_{(10)}$  e  $CGG_{(10)}$ ) e telomérica ( $TTAGG_{(6)}$ ) em espécies dos diferentes subgêneros de *Melipona*, a fim de que novos marcadores citogenéticos possam auxiliar no entendimento da evolução cariotípica do grupo; (v) inferir o caráter heterocromático do ancestral comum mais recente (baixo ou alto conteúdo de heterocromatina) das espécies de *Melipona* e entender a composição e similaridades da heterocromatina, bem como a localização dos sítios de DNA ribossomal 18S, para melhor entender a evolução da heterocromatina nesse gênero.

#### 4. Referências bibliográficas

- Almeida-Toledo, L.F. 1998. Cytogenetic markers in neotropical freshwater fishes. In: Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, Z.M., Lucena, C.A.S. 1998. Phylogeny and classification of neotropical fishes, EDIPUCRS. Porto Alegre 583-588.
- Ascher J.S., Pickering J. 2016. Discover Life bee species guide and world checklist (Hymenoptera: Apoidea: Anthophila). Disponível em: <http://www.discoverlife.org/mp/20q?search=Apoidea> (Acesso: Mai/05/2018).
- Barth, A., Fernandes, A., Pompolo, S.D.G., Costa, M.A. 2011. Occurrence of B chromosomes in *Tetragonisca* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): a new contribution to the cytotaxonomy of the genus. Genet Mol Biol. 34: 77-79.
- Branstetter, M.G., Danforth, B.N., Pitts, J.P., Faircloth, B.C., Ward, P.S., Buffington, M.L., Gates, M.G., Kula, R.R., Brady, S.G. 2017. Phylogenomic insights into the evolution of stinging wasps and the origins of ants and bees. Curr Biol. 27: 1019-1025.
- Brito, R.M., Caixeiro, A.P.A., Pompolo, S.G., Azevedo, G.G. 2003. Cytogenetic data of *Partamona peckolti* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) by C banding and fluorochrome staining with DA/ CMA<sub>3</sub> and DA/DAPI. Genet Mol Biol. 26: 53-57.
- Brito, R.M., das Graças Pompolo, S., Magalhães, M.F.M., de Barros, E.G., Sakamoto-Hojo, E.T. 2005. Cytogenetic characterization of two *Partamona* species (Hymenoptera, Apinae, Meliponini) by fluorochrome staining and localization of 18S rDNA clusters by FISH. Cytologia. 70: 373-380.
- Cabral-de-Mello, D.C., Martins, C., Souza, M.J., Moura, R.C. 2011. Cytogenetic mapping of 5S and 18S rRNAs and H3 histone genes in 4 ancient Proscopiidae grasshopper species: contribution to understanding the evolutionary dynamics of multigene families. Cytogenet Genome Res. 132: 89-93.
- Cabrero, J., López-León, M.D., Ruíz-Estévez, M., Gómez, R., Petitpierre, E., Rufas, J.S., Massa, B., Halima, M.K.B., Camacho, J.P.M. 2014. B<sub>1</sub> was the ancestor B chromosome variant in the western Mediterranean area in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. Cytogenet Genome Res. 142: 54-58.

- Camargo, J.M., Pedro, S.R. 2008. Revision of the species of the group *Melipona fuliginosa* (Hymenoptera, Apoidea, Apidae, Meliponini). Ver Bras Entomol. 52: 411-427.
- Camargo, J.M.F., Pedro, S.R.M. 2013. Meliponini Lepeletier, 1836. In Moure, J. S., Urban, D. & Melo, G. A. R. (Orgs). Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region - online version. Available at <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Accessed Mai/18/2018.
- Cameron, S.A., Hines, H.M., Williams, P.H. 2007. A comprehensive phylogeny of the bumble bees (*Bombus*). Biol J Linnean Soc. 91: 161-188.
- Carvalho, A.F., Costa, M.A. 2011. Cytogenetic characterization of two species of *Frieseomelitta* Ihering, 1912 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). Genet Mol Biol. 34: 237-239.
- Cioffi, M.B., Martins, C., Bertolo, L.A.C. 2009. Comparative chromosome mapping of repetitive sequences. Implications for genomic evolution in the fish, *Hoplias malabaricus*. BMC Genet. 10: 34
- Costa, K.F., Brito, R.M., Miyazawa, C.S. 2004. Karyotypic description of four species of *Trigona* (Jurine, 1807) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) from the State of Mato Grosso, Brazil. Genet Mol Biol. 27: 187-190.
- Costa, M.A., Del Lama, M.A., Melo, G.A.R., Sheppard, W.S. 2003. Molecular phylogeny of the stingless bees (Apidae, Apinae, Meliponini) inferred from mitochondrial 16S rDNA sequences. Apidologie. 34: 73-84.
- Costa, M.A., Pompolo, S.G., Campos, L.A.O. 1992. Supernumerary chromosomes in *Partamona cupira* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). Ver Bras Genet. 15: 801-806.
- Cunha, M.S., Reis, V.J.C., Dergam, J.A. 2016. Closely related syntopic cytotypes of *Astyanax taeniatus* (Jenyns, 1842) from the Upper Piranga River, Upper Doce Basin in Southeastern Brazil. Zebrafish. 13: 112-117.
- Cunha, M.S., Travenzoli, N.M., Ferreira, R.P., Cassinela, E.K., Silva, H., Salomão, T.M.F., Lopes, D.M. 2018. Comparative cytogenetics in three *Melipona* species (Hymenoptera: Apidae) with two divergent heterochromatic patterns. Genet Mol Biol. (no prelo).
- Duarte, O.M.P., Martins, C.C.C., Waldschmidt, A.M., Costa, M.A. 2009. Occurrence of multiple NORs and intraspecific karyotype variation in *Scaptotrigona xanthotricha* Moure (Hymenoptera, Meliponini). Genet Mol Res. 8: 831-839.

- Fernandes, A., Werneck, H.A., Pompolo, S.G., Lopes, D.M. 2013. Evidence of separate karyotype evolutionary pathway in *Euglossa* orchid bees by cytogenetic analyses. *An Acad Bras Cienc.* 85: 937-944.
- Françoso, E., Oliveira, F.F., Arias, M.C. 2016. An interactive approach identifies a new species of bumblebee (Hymenoptera: Apidae: Bombini) from northeastern Brazil. *Epidologie.* 47: 171-185.
- Godoy, D.C., Ferreira, R.P., Lopes, D.M. 2013. Chromosomal Variation and Cytogenetics of *Plebeia lucii* and *P. phrynostoma* (Hymenoptera: Apidae). *Fla Entomol.* 96: 1559-1566.
- Hines, H.M. 2008. Historical biogeography, divergence times, and diversification patterns of bumble bees (Hymenoptera: Apidae: *Bombus*). *Syst Biol.* 57: 58-75.
- Hines, H.M., Cameron, S.A., Williams, P.H. 2006. Molecular phylogeny of the bumble bee subgenus *Pyrobombus* (Hymenoptera: Apidae: *Bombus*) with insights into gene utility for lower-level analysis. *Invertebr Syst* 20: 289-303.
- Hoshiaba, H., Imai, H.T. 1993. Chromosome evolution of bees and wasps (Hymenoptera, Apocrita) on the basis of C-banding pattern analyses. *Jpn J Entomol.* 61: 465-492.
- Hoshiaba, H., Kusanagi, A. 1978. Karyological study of honeybee. *J Apic Res.* 17: 105-109.
- Imai, H.T., 1978. On the origin of telocentric chromosomes in Mammals. *J Theor Biol.* 71: 619-637.
- Imai, H.T., Crozier, R.H., Taylor, R.W. 1977. Karyotype evolution in Australian ants. *Chromosoma.* 59: 341-393.
- Imai, H.T., Maruyama, T., Gojobori, T., Inoue, Y., Crozier, R.H. 1986. Theoretical bases for karyotype evolution. The minimum-interaction hypothesis. *Am Nat* 128: 900-920.
- Imai, H.T., Satta, Y., Takahata, N. 2001. Integrative study on chromosome evolution of mammals, ants and wasps based on the minimum interaction theory. *J Theor Biol.* 210: 475-497.
- Imai, H.T., Satta, Y., Takahata, N. 2001. Integrative study on chromosome evolution of mammals, ants and wasps based on the minimum interaction theory. *J Theor Biol.* 210: 475-497.
- Imai, H.T., Taylor, R.W., Crozier, R.H. 1988. Modes of spontaneous chromosomal mutation and karyotype evolution in ants with reference to the Minimum Interaction Hypothesis. *Japn J Genet.* 63: 159-185.

- Imai, H.T., Taylor, R.W., Crozier, R.H. 1994. Experimental bases for the minimum interaction theory. I. Chromosome evolution in ants of the *Myrmecia pilosula* species complex (Hymenoptera: Formicidae: Myrmeciinae). *Jpn J Genet.* 69: 137-182.
- Kavalco, K.F., Pazza, R., de Oliveira, Brandão, K., de Almeida-Toledo, L.F. 2013. Biogeographic patterns in the chromosomal distribution of a satellite DNA in the banded tetra *Astyanax fasciatus* (Teleostei: Characiformes). *Org. Divers. Evol.* 13: 67-76.
- Kerr, W.E., Silveira, Z.V. 1972. Karyotypic evolution of bees and corresponding taxonomic implications. *Evolution* 26: 197-202.
- Kerr, W.E., Araújo, V.P. 1957. Contribuição ao estudo citológico dos Apoidea. *Garcia de Orta.* 5: 431-433.
- Krinski, D., Fernandes, A., Rocha, M.P., Pompolo, S.D.G. 2010. Karyotypic description of the stingless bee *Oxytrigona cf. flaveola* (Hymenoptera, Apidae, Meliponina) of a colony from Tangará da Serra, Mato Grosso State, Brazil. *Genet Mol Biol* 33: 494-498.
- Lopes, D.M., Fernandes, A., Diniz, D., Scudeler, P.E.S., Foresti, F., Campos, L.A.O. 2014. Similarity of heterochromatic regions in the stingless bees (Hymenoptera: Meliponini) revealed by chromosome painting. *Caryologia.* 67: 222-226.
- Lopes, D.M., Fernandes, A., Praça-Fontes, M.M., Werneck, H.A., Resende, H.C., Campos, L.A.O. 2011. Cytogenetics of three *Melipona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Sociobiology.* 58: 185-194.
- Lorite, P., Torres, M.I., Palomeque, T. 2013. Characterization of two unrelated satellite DNA families in the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera, Chrysomelidae). *Bull Entomol Res.* 103: 538-546.
- Martins, C., Cabral-de-Mello, D.C., Valente, G.T., Mazzuchelli, J., Oliveira., S.G. 2011. "Cytogenetic mapping and its contribution to the knowledge of animal genomes," in *Advances in Genetics Research*, K. V. Urbano, Ed., p. 82, Nova Science Publishers, New York, NY, USA.
- Martins, C., Ferreira, I.A., Oliveira, C., Foresti, F., Galetti, P.E. 2006. A tandemly repetitive centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) is derived from 5S rDNA. *Genetica.* 127: 133-141.
- Michener, C.D. 2007. *The bees of the world.* 2nd ed. The John Hopkins University Press, Baltimore, Maryland. 953 p.

- Miranda, R.V., Fernandes, A., Lopes, D.M. 2013. Karyotype description of *Cephalotrigona femorata* Smith (Hymenoptera: Apidae) and the C-banding pattern as a specific marker for *Cephalotrigona*. *Sociobiology*. 60: 131-134.
- Owen, R.E., Richards, K.W., Wilkes, A. 1995. Chromosome numbers and karyotypic variation in Bumble bees (Hymenoptera: Apidae; Bombini). *J Kans Entomol Soc*. 68: 290-302.
- Peixoto, M.A.A., Oliveira, M.P., Feio, R.N., Dergam, J.A. 2016. Karyological study of *Ololygon tripui* (Lourenço, Nascimento and Pires, 2009), (Anura, Hylidae) with comments on chromosomal traits among populations. *Comp Cytogenet*. 10: 505.
- Piccoli, M.C.A., Bardella, V.B., Cabral-de-Mello, D.C. 2018. Repetitive DNAs in *Melipona scutellaris* (Hymenoptera: Apidae: Meliponidae): chromosomal distribution and test of multiple heterochromatin amplification in the genus. *Apidologie*. 1: 8.
- Pompolo, S.G., 1992. Estudos citogenéticos em Meliponinae. *Naturalia*, Special ed. 62-66.
- Rasmussen, C., Cameron, A.S. 2010. Global stingless bee phylogeny supports ancient divergence, vicariance, and long distance dispersal. *Biol. J. Linn. Soc*. 206-232.
- Rocha, M.P., Pompolo, S.G. 1998. Karyotypes and heterochromatin variation (C-bands) in *Melipona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Genet Mol Biol*. 21: 41-45.
- Rocha, M.P., Cruz, M.P., Fernandes, A., Waldschmidt, A.M., Silvajúnior, J.C., Pompolo, S.G. 2003. Longitudinal differentiation in *Melipona mandacaia* (Hymenoptera, Meliponini) chromosomes. *Hereditas*. 26: 133-137.
- Rocha, M.P., Pompolo, S.G., Dergam, J.A., Fernandes, A., Campos, L.A.O. 2002. DNA characterization and karyotypic evolution in the bee genus *Melipona* (Hymenoptera, Meliponini). *Hereditas*. 136: 19-27.
- Schneider, C.H., Gross, M.C., Terencio, M.L., de Tavares, É.S.G.M., Martins, C., Feldberg, E. 2015. Chromosomal distribution of microsatellite repeats in Amazon cichlids genome (Pisces, Cichlidae). *Comp Cytogenet* 9: 595.
- Tavares, M.G., Lopes, D.M., Campos, L.A.O. 2017. An overview of cytogenetics of the tribe Meliponini (Hymenoptera: Apidae). *Genetica*. 145: 241-258.



### Chromosomal evolution in Meliponini: a phylogenetic approach

#### Abstract

Bees, as well as other Hymenoptera (wasps and ants), present great variation in chromosome number. Two evolutionary mechanisms are used to explain the processes that gave rise to this variation: the first one points that polyploidy is the main cause of chromosome evolution, while the second, known as Minimum Interaction Theory (MIT), is used much more frequently to explain chromosomal changes in Meliponini and suggests that centric fission is responsible for karyotype variations. Under the considerations of MIT the ancestor of Meliponini species should have a low chromosome number which increases throughout evolution because of centric fission events, with subsequent accumulation of heterochromatin. However, differences in chromosome number between Meliponini and its sister taxa, and the karyotype patterns of species of genus *Melipona*, cannot be explained by MIT, suggesting that other events were involved in the chromosomal evolution in bees of that tribe. Thus, the purpose of this study was to infer the ancestral chromosome number of the Meliponini tribe and its sister group Bombini in order to evaluate and propose hypotheses of the evolutionary pathways underpinning chromosome changes in Meliponini. To do this, we assembled the cytogenetical information of species with known karyotypes. In order to put these data in a phylogenetic context, we reconstructed a phylogenetic hypothesis using partial sequences of the genes ArgK, opsin, EF1- $\alpha$ , 28S, and 16S rRNA, obtained from GenBank. The Meliponini showed haploid number variation between  $n=8$  and  $n=18$  chromosomes, with haploid number of 17 chromosomes being predominant. In the sister group Bombini the haploid chromosome number varied from  $n=12$  to  $n=20$  chromosomes, with haploid number of 18 chromosomes being predominant. The reconstruction of ancestral chromosome number indicated  $n=18$  chromosomes for the ancestor of the Meliponini tribe, and for the ancestor of between Meliponini and Bombini. The data indicate that the karyotype with  $n=17$  chromosomes was maintained in several species of Meliponini, that variations of haploid numbers possibly originated through additional fissions and fusions robertsonian, and that repeated fusions led to the reduction of chromosome number in *Melipona*. We conclude that fusions are the type of chromosomal rearrangement that originated the current karyotypes in Meliponini.

**Keywords:** Centric fission, chromosomal variations, phylogeny, repetitive fusion

## 1. Introduction

The Meliponini, Bombini, Apini, and Euglossini tribes comprise the bees known as "corbiculate", and their evolutionary history has been studied through morphological, phylogenetic, and cytogenetic analyses (Hoshiba and Kusanag, 1978; Owen et al., 1995; Hines et al., 2006; Cameron et al., 2007; Michener, 2007; Camargo and Pedro, 2013; Rasmussen and Cameron, 2010; Fernandes et al., 2013; Françoso et al., 2016; Tavares et al., 2017). Cytogenetic analyses, in particular, represent an important tool for understanding the macro-scale genomic organization of different any species. These analyses comprise descriptions of chromosome number (Hoshiba and Imai, 1993; Owen et al., 1995; Fernandes et al., 2013), heterochromatin distribution pattern (Cunha et al., 2018 *in press*), characterization of regions rich in AT and CG bases (Cristiano et al., 2014; Cunha et al., 2018 *in press*), localization of 18S ribosomal genes (Brito et al., 2005; Cunha et al., 2018 *in press*), mapping of repetitive DNA sequences (Piccoli et al., 2018), and inferences about karyotype evolution (Hoshiba and Imai, 1993; Tavares et al., 2017).

In bees, two main hypotheses were proposed to explain changes related to chromosome number and structure. The first one, indicates that changes in ploidy, through whole-genome duplication, are the main mechanism involved in chromosome evolution (Kerr and Silveira, 1972). On the other hand, a second hypothesis, known as Minimum Interaction Theory (MIT), suggests centric fission as the main mechanism responsible for chromosome variation (Imai, 1978; Imai et al., 1986, 1988, 1994, 2001; Hoshiba and Imai, 1993). According to the MIT, modifications in the karyotypes that occur through centric fission in different species evolve in order to minimize the deleterious effects of chromosomal interactions. However, they generate instability in the break regions of fictional chromosomes, which then tends to be minimized by the incorporation of heterochromatin (Imai et al., 1988, 1994, 2001). This would generate chromosomes presenting one heterochromatic arm and one euchromatic arm, and we would expect to find this as a common pattern in the Meliponini (Costa et al., 2004; Krinski et al., 2010; Godoy et al., 2013).

Based on this theory, the ancestor of the living species of the Meliponini tribe would present a low chromosome number and this number would increase throughout evolution by fission, with later accumulation of heterochromatin. However, when we

analyzed the karyotype of other corbiculate tribes phylogenetically close to Meliponini (predominates  $n=17$ ), such as Bombini ( $n=18-20$ ), Apini ( $n=17$ ) and Euglossini ( $n=20-21$ ), we observed that they have a high chromosome number (Hoshiba and Kusanagi, 1978; Owen et al., 1995; Fernandes et al., 2013). In addition, the heterochromatin distribution patterns of several *Melipona* species (Rocha et al., 2003b) seem to have arisen from events different from those proposed by MIT.

Thus, the MIT, although widely used to explain the chromosomal evolution in Meliponini, does not seem to explain the numerical observed in this tribe and structural variations or heterochromatic patterns in *Melipona*. Therefore, the objective of this study was to infer the ancestral chromosome number of the Meliponini tribe and its sister group Bombini in order to evaluate the MIT as the main evolution force shaping the karyotypic changes and based on this phylogenetic approach propose hypotheses for the evolutionary processes underpinning chromosomal changes in bees.

## 2. Material and Methods

### 2.1 Phylogenetic analysis and Molecular dating

A total of 67 species representing 28 genera with haploid chromosome numbers described in the literature, including 50 Meliponini and 17 Bombini species, were selected to compose our dataset (Supplementary Material Table A.2). To the phylogenetic analysis, were considered as ingroup Meliponini and Bombini tribes, and to outgroup *Apis dorsata* Fabricius, 1793, *Euglossa imperialis* (Cockerell, 1922), *Eulaema boliviensis* (Friese, 1898), and *Exaerete smaragdina* (Guérin-Méneville, 1845). Partial sequences of the following nuclear genes were used to infer the phylogenetic tree: arginine kinase (ArgK), long-wavelength rhodopsin copy 1 (Opsin), elongation factor-1 $\alpha$  F2 (EF1- $\alpha$ ), 28S (28S rDNA), and the mitochondrial 16S rRNA. The GenBank accession number of the gene sequences can be found in Table A.2. Sequences were aligned using MAFFT (Katoh and Standley, 2014) and visually verified in MEGA v7.0 (Tamura et al., 2013). The nuclear genes EF-1 $\alpha$ , Opsin and ArgK were partitioned into exons and introns (Tomita et al., 1996; Kawakita et al., 2003), while 28S and 16S were considered as a single partition each one. The final alignments were concatenated into a single matrix in the Sequence Matrix v.1.7.8 (Vaidya et al., 2011). The analyses were performed on the CIPRES Science Gateway online server (Miller et al., 2010) using Bayesian inference, performed in the MrBayes v3.2.2 software (Ronquist et al., 2012), with two independent runs and four Markov Chain Monte Carlo (MCMC) in each one. The mixed model (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) was

implemented for all partitions with a proportion of invariable sites and a Gamma correction. We used 50,000,000 generations of MCMC, with trees sampled every 1000 generations. The convergence of the Markov chains was verified in Tracer v.1.5 (Rambaut and Drummond, 2009). Twenty-five percent of the initial trees were discarded and the remaining ones were used to generate the consensus tree. The trees were viewed and edited in FigTree v.1.3.1 (Rambaut, 2009).

The same data matrix from phylogenetic analyses was used for the molecular dating. The divergence times were estimated using a Bayesian approach implemented in BEAST 2.0 (Bouckaert et al., 2014) on the CIPRES server (Miller et al., 2010). The molecular clock model *Relaxed Clock lognormal* was used as it allows evolutionary rates to vary between trees branches (Drummond et al., 2006). The nucleotide substitution model was GTR+G+I for all partitions and the Yule process was used as *a priori* probability for the trees (Drummond and Rambaut, 2007). We used 300,000,000 generations of MCMC and the convergence was checked in Tracer v.1.5 (Rambaut and Drummond, 2009). A maximum clade credibility tree was created in the program TreeAnnotator v2.4.1 (implemented in BEAST) using 25% burn-in, and was visualized and edited in FigTree v.1.3.1 (Rambaut, 2009). To the calibration points we based on Rasmussen & Camaron (2010) and Martins et al. (2014).

## 2.2 Reconstruction of the ancestral state

The reconstruction of the ancestral chromosome number was performed using Maximum Likelihood analysis in the Mesquite software v.3.04 (Madison and Madison, 2011) using the last 1000 trees from the Bayesian MCMC analyses as input. In this analysis, the different haploid numbers ( $n$ ) of each species were considered as character states (Table A.1) and the values referring to the analysis of the ancestral chromosome number were represented by percentages (%).

## 3. Results

### 3.1 Chromosome number, phylogenetic analyses and molecular dating

Meliponini species showed variation of haploid number ranging from  $n=8$  to  $n=18$  chromosomes, with  $n=17$  being the predominant chromosome number. The Old World species presented only  $n=17$  and  $n=18$  chromosomes, and in the New World species the number of chromosomes ranged from  $n=8$  to  $n=18$ . In Bombini species, on the other hand, the haploid number varied from  $n=12$  to  $n=20$  chromosomes, with  $n=18$  predominating (Table A.1).

The concatenated dataset resulted in 3,263 aligned base pairs and the phylogenetic tree obtained from Bayesian inference analysis agrees with the phylogeny proposed by Rasmussen and Cameron (2010) (Supplementary Material Fig. A.1). According to this phylogeny, the Old World clade is formed by the Meliponini of the Afrotropical, Australasian, and Indo-Malayan regions, and the New World clade is formed by the species of the Neotropical region. The Neotropical Meliponini initially diverged into two clades, separating *Trigonisca* sensu lato (clade *Trigonisca* s.l.) which includes the genera *Dolichotrigona* Moure, 1950, *Trigonisca* Moure, 1950, *Celetrigona* Moure, 1950 and *Leurotrigona* Moure, 1950 from the remaining species. Subsequently, there was a second split between *Melipona* sensu lato (*Melipona* s.l.) and the other Meliponini (also see Rasmussen and Cameron, 2010).

According to the molecular dating, the most recent common ancestor between Bombini and Meliponini is dated to about 79.1 (95% HPD = 74-83.3) million years ago (mya) in the upper Cretaceous. Among the Meliponini, the common ancestor dates to about 65.5 (95% HPD = 65-66.6) mya, corresponding to the Paleocene, and, between species of the genus *Melipona*, to about 18.1 (95% HPD = 12-26) mya, corresponding to the Miocene (Fig. A.1; Supplementary Material Fig. B.1).

### 3.2 Reconstruction of the ancestral chromosome number

The ancestral reconstruction indicated  $n=18$  as the ancestral chromosome number of the tribe Meliponini (73%, node A), and  $n=18$  (75%, node B) as the ancestral chromosome number of Meliponini and Bombini (Fig. A.1; Supplementary Material Fig. C.1). In the Meliponini species belonging to the Old World clade,  $n=18$  chromosomes remained in most of the lineages (97%, node C), whereas in the New World clade there was reduction from  $n=18$  (37%, node D) to  $n=17$  chromosomes (50%, node E). One exception was *Melipona*, with a reduction to half the number of chromosomes (from  $n=18$  to  $n=9$ ) (100%, node F). In Bombini,  $n=18$  chromosomes remained the most common number (100%, node G), with a reduction to  $n=17$  and  $n=16$  chromosomes in the subgenera *Subterraneobombus* and *Thoracobombus*, respectively. All values referring to the probabilities of each character found in the ancestor nodes of the Meliponini and Bombini species are indicated in the Supplementary Material (Supplementary Material Table A.3).

#### 4. Discussion

This is the first study reconstructing the ancestral chromosome number in Meliponini based on cytogenetic and molecular data. Our results indicate that the common ancestor of the Meliponini tribe had  $n=18$  chromosomes and that, in the Neotropical species, this chromosome number decreased to  $n=17$ . According to karyotype descriptions, Meliponini can be separated into three groups based on the most frequent number of chromosomes in the species (reviewed in Tavares et al., 2017). The first group consists of Meliponini species with  $n=17$  chromosomes. Although different species have the same chromosome number ( $n=17$ ), the morphological variation observed in the karyotypes (Table A.1) indicates that rearrangements such as inversions and translocations were responsible for variations in chromosomal variation (Kerr and Silveira, 1972; Rocha et al., 2003b; Barth et al., 2011). A variation in the number of chromosomes was observed in *Trigona* sp., possibly *Trigona braueri* Friese, 1900 (described as *Trigona fulviventris* Guérin, 1844 in Domingues et al., 2005a) with  $2n=32$  chromosomes, unlike the other *Trigona* species with  $2n=34$ . This reduction of the chromosome number is the result of centric fusion of two pseudoacrocentric chromosomes which generated a larger metacentric chromosome with heterochromatin restricted to the pericentromeric region (Domingues et al., 2005a). The second group is formed by species with  $n=15$  chromosomes, a chromosomal number which would have appeared independently several times during the evolution of Meliponini. The third group is composed of species of the genus *Melipona* that typically have  $n=9$  chromosomes. The only variation within this group is *Melipona seminigra* Friese, 1903 ( $n=11$ ), for which chromosome number could have arisen by fission from an ancestor with  $n=9$  (Francini et al., 2011) and *Melipona quinquefasciata* Lepeletier, 1836 and *Melipona rufiventris* Lepeletier, 1836 due to the presence of chromosomes B. The low number of chromosomes found in the genus would be an apomorphy of that group.

Initial studies in bees revealed that some species had a low chromosome number, between  $n=8$  and  $n=9$  (Hoshiba and Imai, 1993; Pompolo and Campos, 1995; Rocha and Pompolo, 1998), and a pattern of heterochromatin distribution in the chromosomes similar to that observed in ant species of the genus *Myrmecia* Fabricius, 1804 (Rocha et al., 2002; Rocha et al., 2003a; Costa et al., 2004; Barth et al., 2011). Based on cytogenetic data *Myrmecia pilosula* complex, Imai et al. (1986, 1988, 1994) observed that the ancestor of this group had a lower chromosome number when compared to species that had recently diverged. They also observed that there was an increase of heterochromatin in one of the chromosome arms in the species with the highest diploid

number. Thus, considering the cytogenetic information and phylogenetic relationships between these species, they proposed that the ancestral karyotype of this group should have a low chromosome number (*i.e.*  $n=3$ ) and that centric fissions would be the main rearrangement responsible for the increase in chromosome numbers (Imai et al., 1986, 1988, 1994). Such cytogenetic patterns led the researchers to suggest that the same mechanism would be involved in chromosome evolution in bees, and that the ancestral species would have a chromosome number smaller than that found in species that diverged more recently (Pompolo, 1992; Costa et al., 1992; Hoshiba and Imai, 1993; Rocha and Pompolo, 1998; Rocha et al., 2002; Rocha et al., 2003b; Costa et al., 2004; Krinski et al., 2010; Godoy et al., 2013). However, our analysis indicates that the ancestral karyotype of Meliponini had a high chromosomal number ( $n=18$ ), which was maintained in many species, and that, possibly as a result of fusion events, this number decreased from  $n=18$  to  $n=17$  in the Neotropical Meliponini, contrary to the pattern indicated by the MIT for chromosome evolution in bees.

In addition to a decrease from the ancestral chromosome number in the Meliponini, some structural characteristics of the chromosomes of bees from *Melipona* also suggest that this group does not follow the evolutionary model proposed by MIT. Species of *Melipona* have unique characteristics that distinguish them from other Meliponini species, such as: a caste differentiation system that is based on genetic characteristics shaped by the environment rather than the amount of food received (Kerr, 1948; Kerr and Nielsen, 1966), phylogenetically the genus is monophyletic in relation to the other Neotropical Meliponini (Rasmussen and Cameron, 2007, 2010; Ramírez et al., 2010) and cytogenetically the species present a haploid number of nine chromosomes and variation in the amount and pattern of distribution of heterochromatin, with species with less than 50% of heterochromatin and other species with more than 50% of heterochromatin in their karyotype (Rocha and Pompolo, 1998; Rocha et al., 2002; Rocha et al., 2003a).

Phylogenetic reconstructions and the time of divergence suggest that the species of *Melipona* diverged more recently ( $\pm 20$  Ma) than those Meliponini with a high number of chromosomes ( $\pm 54$  Ma) (Rasmussen and Cameron, 2010). Thus, the unique characteristics of the genus in relation to its divergence time suggest that *Melipona* followed a "different" path from the other Meliponini, and underwent different evolutionary processes from the rest of the species of the tribe; the decrease in the number of chromosomes in *Melipona* may have been the result of repetitive centric fusions.

Centric fusion is considered one of the major chromosomal rearrangements in animal karyotype evolution (White, 1973). Rearrangements of this type were used to explain the karyotype evolution in Epiponini tribe wasps (Menezes et al., 2014), parasitic wasps (*Minotetrastichus frontalis* (Nees, 1834) and *Chrysocharis laomedon* (Walker, 1839) (Gokhman, 2004), and ants (*Mycetophylax morschi* (Emery, 1888)) (Cardoso et al., 2014). In other taxonomic groups, fusions have also been suggested as the main mechanism responsible for changes in chromosome numbers, as in locusts of the Ehippigerini tribe (Warchałowska-Śliwa et al., 2013), and in several species of mammals (*Elaphodus cephalophus* Milne-Edwards, 1873, *Muntiacus reevesi* (Ogilby, 1839) and *Muntiacus muntjak vaginalis* (Boddaert, 1785)) (Wang and Lan, 2000; Hartmann and Scherthan, 2004; Chi et al., 2005; Tsipouri et al., 2008).

On the other hand, in different taxa such as ants, fish, mammals, and frogs fissions are also important events in chromosome rearrangement throughout evolutionary time (Imai and Taylor, 1977; Imai et al., 2001; Busin et al., 2000; Primo et al., 2017). In Meliponini, an example of chromosome fission was observed in *Melipona seminigra* Friese, 1903, which has  $n=11$  chromosomes (Francini et al., 2011; Cunha et al., 2018 *in press*). According to our findings this chromosome number observed today likely originated by fission events from an ancestor with  $n=9$ . Similar events may have shaped chromosome number evolution in *Trigona cilipes* (Fabricius, 1804), so that fission in an ancestor with  $n=17$  led to the karyotype with  $n=18$  chromosomes. However, chromosome fission requires the formation of new centromeres and telomeres for the new chromosomes (Robinson et al., 2006), and therefore may not be the most common mechanism in karyotype evolution in different groups.

The results of this study, with cytogenetic evidence and ancestral states, also suggest that the ancestor between Meliponini and Bombini had  $n=18$  chromosomes. Cytogenetic descriptions found for the other corbiculate tribes show a range in chromosome number between  $n=8$  and  $n=21$ . For example, in Apini ( $n=17$ ) (Hoshiba and Kusanagi, 1978), Euglossini ( $n=20-21$ ), Bombini ( $n=18-20$ ) (Hoshiba and Imai, 1993; Owen et al., 1995; Fernandes et al., 2013), and Meliponini ( $n=8-18$ , with the most common  $n=17$ ) (Tavares et al., 2017). Owen et al. (1995) considered the ancestral number to be  $n=18$  for *Bombus*, and that variations of  $n=16$  (*Bombus Subterraneo appositus* Cresson, 1878 and *Bombus Subterraneo borealis* Kirby, 1837),  $n=17$  (*Bombus Thoracobombus pseudobaicalensis* Vogt, 1911 and *Bombus Thoracobombus schrenck* Morawitz, 1881) and  $n=20$  (*Bombus Thoracobombus pauloensis* Friese, 1913) would be the result of chromosomal fusions and fissions. Our results suggest that the



ancestor of the Bombini tribe had a high chromosomal number ( $n=18$ ), and that this chromosome number was maintained throughout evolution in several species, which contradicts what was expected from MIT (Hoshihara and Imai, 1993).

Based on the cytogenetic information, as well as in insights into chromosome evolution using a phylogenetic approach in Meliponini, we suggest that the ancestral chromosome number between the Meliponini and Bombini tribes is  $n=18$  chromosomes. This chromosome number remained in the common ancestor of the Meliponini, and, by chromosomal fusion robertsonian, decreased from  $n=18$  to  $n=17$  in the Neotropical Meliponini. We also conclude that chromosome fission processes, as predicted by MIT, are not the main mechanism in the karyotype evolution of eliponini and Bombini, that the ancestral chromosome number (i.e.  $n=18$ ) was maintained throughout evolution in different species, and that the variation in haploid chromosome numbers, was possibly shaped by chromosomal fusion. The low number of chromosomes found in *Melipona* an apomorphy of that clade.

## 6. Acknowledgments

The authors would like to thank the “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)”, “Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)” and the students of the Laboratory of Citogenética de Insetos of the Universidade Federal de Viçosa (UFV) for laboratory assistance.

## 7. References

- Barth, A., Fernandes, A., Pompolo, S.D.G., Costa, M.A., 2011. Occurrence of B chromosomes in *Tetragonisca* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): a new contribution to the cytotaxonomy of the genus. *Genet. Mol. Biol.* 34, 77-79.
- Bouckaert, R., Heled, J., Kühnert, D., Vaughan, T., Wu, C-H., Xie D., Suchard, M.A., Rambaut, A., Drummond, A. J., 2014. BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis. *PLoS Comput. Biol.* 10, e1003537.
- Brito, R.M., Pompolo, S.G., Magalhães, M.F.M., Barros, E.G., Sakamoto-Hojo, E.T. 2005. Cytogenetic characterization of two *Partamona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) by fluorochrome staining and localization of 18 S rDNA clusters by FISH. *Cytologia* 70: 73-380.

- Busin, C.S., Vinciprova, G., Recco-Pimentel, S.M., 2000. Chromosomal rearrangements as the source of variation in the number of chromosomes in *Pseudis* (Amphibia, Anura). *Genetica*. 110, 131-141.
- Caixeiro, A.P., 1999. Caracterização citogenética da heterocromatina constitutiva e sua implicação na evolução do cariótipo de espécies do gênero *Plebeia* (Hymenoptera: Apinae: Meliponini). Dissertation. Universidade Federal de Viçosa.
- Camargo, J.M.F., Pedro, S.R.M., 2013. Meliponini Lepeletier, 1836. In Moure, J.S., Urban, D., Melo, G.A.R. (Orgs). Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region - online version. Available at <http://www.moure.cria.org.br/catalogue> (accessed 16.06.2018).
- Cameron, S.A., Hines, H.M., Williams, P.H. 2007. A comprehensive phylogeny of the bumble bees (*Bombus*). *Biol. J. Linn. Soc.* 91, 161-188.
- Cardoso, D.C., Pompolo, S.G., Cristiano, M.P., Tavares, M.G., 2014. The role of fusion in ant chromosome evolution: insights from cytogenetic analysis using a molecular phylogenetic approach in the genus *Mycetophylax*. *PLoS One*. 9, e87473.
- Chi, J.X., Huang, L., Nie, W., Wang, J., Su, B., Yang, F., 2005. Defining the orientation of the tandem fusions that occurred during the evolution of *Indian muntjac* chromosomes by BAC mapping. *Chromosoma*. 114, 167-172.
- Costa, K.F., Brito, R.M., Miyazawa, C.S., 2004. Karyotypic description of four species of *Trigona* (Jurine, 1807) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) from the State of Mato Grosso, Brazil. *Genet. Mol. Biol.* 27, 187-190.
- Costa, M.A., Del Lama, M.A., Melo, G.A.R., Sheppard, W.S., 2003. Molecular phylogeny of the stingless bees (Apidae, Apinae, Meliponini) inferred from mitochondrial 16S rDNA sequences. *Apidologie*. 34, 73-84.
- Costa, M.A., Pompolo, S.G., Campos, L.A.O., 1992. Supernumerary chromosomes in *Partamona cupira* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Rev. Bras. Genet.* 15, 801-806.
- Cristiano, M.P., Simões, T.G., Lopes, D.M., das Graças Pompolo, S. 2014. Cytogenetics of *Melitoma segmentaria* (Fabricius, 1804) (Hymenoptera, Apidae) reveals differences in the characteristics of heterochromatin in bees. *Comp. Cytogenet.* 8: 223.
- Cunha, M.S., Travenzoli, N.M., Ferreira, R.P., Cassinela, E.K., Silva, H., Salomão, T.M.F., Lopes, D.M., 2018. Comparative cytogenetics in three *Melipona* species

- (Hymenoptera: Apidae) with two divergent heterochromatic patterns. Genet. Mol. Biol. (*no prelo*).
- Domingues, A.M.T., Waldschmidt, A.M., Andrade, S.E., Andrade-Souza, V., Alves, R. M.D.O., Silva Junior, J.C.D., Costa, M.A. 2005a. Karyotype characterization of *Trigona fulviventris* Guérin, 1835 (Hymenoptera, Meliponini) by C banding and fluorochrome staining: Report of a new chromosome number in the genus. Genet. Mol. Biol. 28: 390-393.
- Domingues, A.M.T., 2005b. Estudos citogenéticos comparativos entre espécies de *Scaura* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). Dissertation. Universidade Estadual de Santa Cruz. Dominican amber. Science. 273, 1850-1852.
- Drummond, A.J., Ho, S.Y.W., Phillips, M.J., Rambaut, A., 2006. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. PloS Biol. 4, 699-710.
- Drummond, A.J., Rambaut, A., 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. BMC Evol. Biol. 7, 214.
- Fernandes, A., Werneck, H.A., Pompolo, S.G., Lopes, D.M., 2013. Evidence of separate karyotype evolutionary pathway in *Euglossa* orchid bees by cytogenetic analyses. An. Acad. Bras. Ciênc. 85, 937-944.
- Ferreira, R.P., 2015. Análise citogenética de abelhas do gênero *Trigona* Jurine, 1807 (Hymenoptera, Meliponini). Thesis. Universidade Federal de Viçosa.
- Francini, I.B., Gross, M.C., Nunes-Silva, C.G., Carvalho-Zilse, G.A., 2011. Cytogenetic analysis of the Amazon stingless bee *Melipona seminigra merrillae* reveals different chromosome number for the genus. Sci. Agric. 68, 592-593.
- Françoso, E., Oliveira, F.F., Arias, M.C., 2016. An interactive approach identifies a new species of bumblebee (Hymenoptera: Apidae: Bombini) from northeastern Brazil. Apidologie. 47, 171-185.
- Godoy, D.C., Lopes, D.M., Ferreira, R.P., 2014. Caracterização cariotípica de duas espécies de Meliponini da região Amazônica. In: Anais do Simpósio de Integração Acadêmica de 2014 da Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, Minas Gerais.
- Godoy, D.C., Ferreira, R.P., Lopes, D.M., 2013. Chromosomal variation and cytogenetics of *Plebeia lucii* and *P. phrynostoma* (Hymenoptera: Apidae). Fla. Entomol. 96, 1559-1566.
- Gokhman, V.E., 2004. Karyotype Evolution in Parasitic Wasps (Hymenoptera). Zool. Zhurnal. 83, 961-970.

- Hartmann, N., Scherthan, H., 2004. Characterization of ancestral chromosome fusion points in the *Indian muntjac* deer. *Chromosoma*. 112, 213-220.
- Hines, H.M., Cameron, S.A., Williams, P.H., 2006. Molecular phylogeny of the bumble bee subgenus *Pyrobombus* (Hymenoptera: Apidae: *Bombus*) with insights into gene utility for lower-level analysis. *Invertebr. Syst.* 20, 289-303.
- Hoshihara, H., Imai, H.T., 1993. Chromosome evolution of bees and wasps (Hymenoptera, Apocrita) on the basis of C-banding pattern analyses. *Jpn. J. Entomol.* 61, 465-492.
- Hoshihara, H., Kusanagi, A., 1978. Karyological study of honeybee. *J. Apic. Res.* 17, 105-109.
- Imai, H.T., 1978. On the origin of telocentric chromosomes in Mammals. *J. Theor. Biol.* 71, 619-637.
- Imai, H.T., Crozier, R.H., Taylor, R.W. 1977. Karyotype evolution in Australian ants. *Chromosoma* 59: 341-393.
- Imai, H.T., Maruyama, T., Gojobori, T., Inoue, Y., Crozier, R.H., 1986. Theoretical bases for karyotype evolution. The minimum-interaction hypothesis. *Am. Nat.* 128, 900-920.
- Imai, H.T., Satta, Y., Takahata, N., 2001. Integrative study on chromosome evolution of mammals, ants and wasps based on the minimum interaction theory. *J. Theor. Biol.* 210, 475-497.
- Imai, H.T., Taylor, R.W., Crosland, M.W., Crozier, R.H., 1988. Modes of spontaneous chromosomal mutation and karyotype evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis. *J. Gen.* 63, 159-185.
- Imai, H.T., Taylor, R.W., Crozier, R.H., 1994. Experimental bases for the minimum interaction theory. I. Chromosome evolution in ants of the *Myrmecia pilosula* species complex (Hymenoptera: Formicidae: Myrmeciinae). *J. Gen.* 69, 137-182.
- Katoh, K., Standley, D.M., 2014. MAFFT: iterative refinement and additional methods. *Methods Mol. Biol.* 1079, 131-146.
- Kawakita, A., Sota, T., Ascher, J.S., Ito, M., Tanaka, H., Kato, M., 2003. Evolution and phylogenetic utility of alignment gaps within intron sequences of three nuclear genes in bumble bees (*Bombus*). *Mol. Biol. Evol.* 20, 87-92.
- Kerr, W.E., 1948. Estudos sobre o gênero *Melipona*. *Na. Esc. Super. Agric. Luiz de Queiroz.* 5, 182-276.

- Kerr, W.E., 1972. Numbers of chromosomes in some species of bees. *J Kansas Entomol. Soc.* 45, 11-122.
- Kerr, W.E., Nielsen, R.A., 1966. Evidence that genetically determined *Melipona* queens can become workers. *Genetics.* 54, 859-865.
- Kerr, W.E., Silveira, Z.V., 1972. Karyotypic evolution of bees and corresponding taxonomic implications. *Evol. Int. J. Org Evol.* 26, 197-202.
- Krinski, D., Fernandes, A., Rocha, M.P., Pompolo, S.D.G., 2010. Karyotypic description of the stingless bee *Oxytrigona* cf. *flaveola* (Hymenoptera, Apidae, Meliponina) of a colony from Tangará da Serra, Mato Grosso State, Brazil. *Genet. Mol. Biol.* 33, 494-498.
- Lopes, D.M., Fernandes, A., Praça-Fontes, M.M., Werneck, H.A., Resende, H.C., Campos, L.A.O., 2011. Cytogenetics of three *Melipona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Sociobiology.* 58, 185-194.
- Madison, W.P., Madison, D.R., 2011. Mesquite: A modular system for evolutionary analysis, version 2.75. <http://mesquiteproject.org> (accessed 02.06.2018).
- Mampumbu, A.R., 2002. Análise citogenética da heterocromatina e da NOR em populações de abelhas sem ferrão *Friesella schrottkyi* (Friese, 1900) (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). Dissertation. Universidade Estadual de Campinas UNICAMP, Campinas, Brasil.
- Martins, A.C., Melo, G.A.R., Renner, S.S., 2014. The corbiculate bees arose from New World oil-collecting bees: Implications for the origin of pollen baskets. *Mol. Phylogenet Evol.* 80, 88-94.
- Menezes, R.S.T., Carvalho, J.P.S.O., Silva, T.S., Somovilla, A., Costa, M.A., 2014. Evolutionary trends in the chromosome numbers of swarm-founding social wasps. *Insec. Soc.* 61, 385-393.
- Michener, C.D., 2007. *The Bees of the World*. The John Hopkins University Press, London, p.913.
- Miller, M.A., Pfeiffer, W., Schwartz, T., 2010. "Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees" in *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*, New Orleans, LA pp 1, 8.
- Nascimento, S., 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.

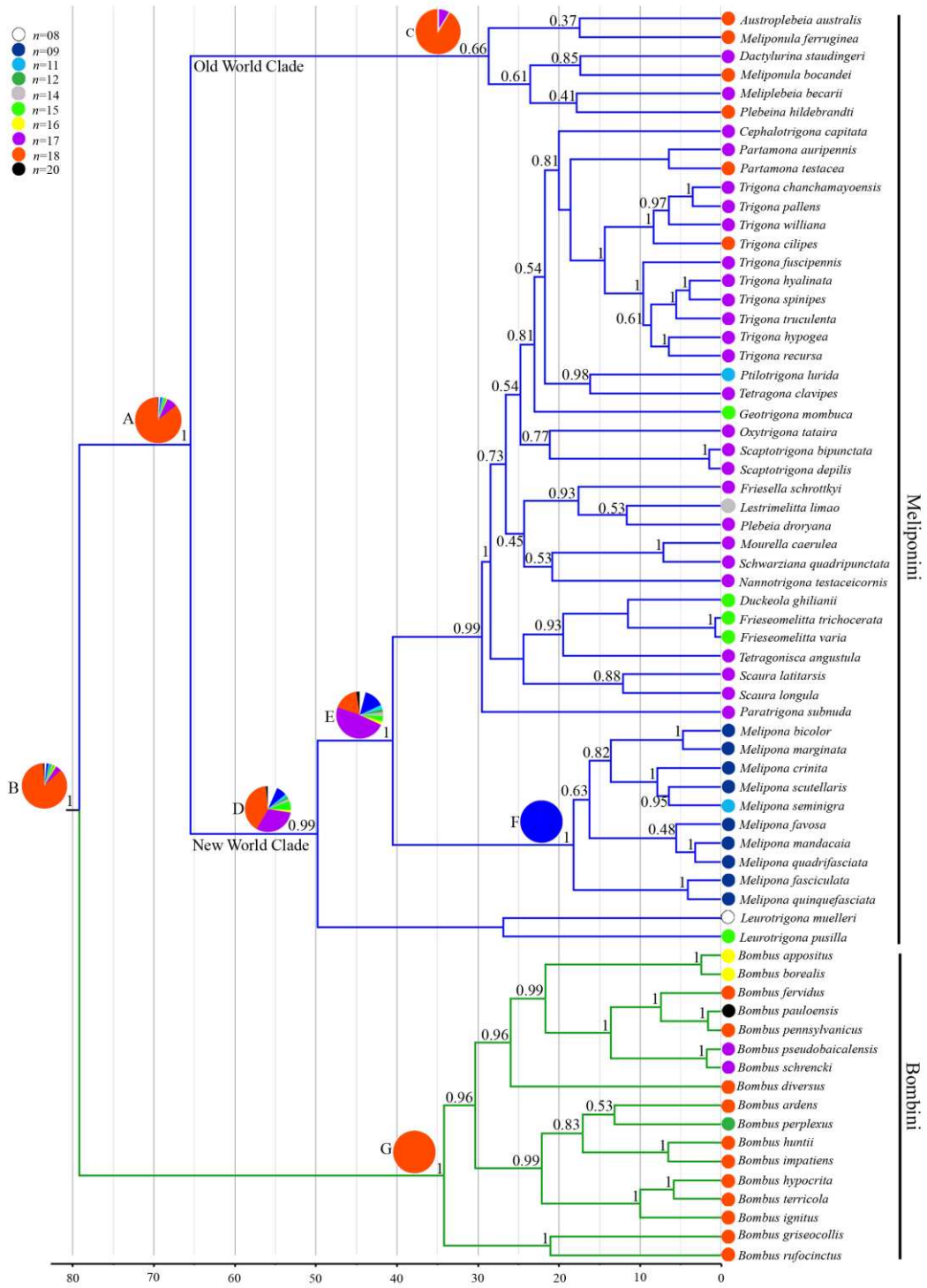
- Owen, R.E., Richards, K.W., Wilkes, A., 1995. Chromosome numbers and karyotypic variation in Bumble bees (Hymenoptera: Apidae; Bombini). *J. Kans. Entomol. Soc.* 68, 290-302.
- Piccoli, M.C. A., Bardella, V.B., Cabral-de-Mello, D.C. 2018. Repetitive DNAs in *Apidologie* 1, 8.
- Pompolo, S.G., 1992. Estudos citogenéticos em Meliponinae. *Naturalia*, Special ed. 62-66.
- Pompolo, S.G., Campos, L.A.O., 1995. Karyotypes of two species of stingless bees, *Leurotrigona muelleri* and *Leurotrigona pusilla* (Hymenoptera, Meliponinae). *Rev. Bras. Genet.* 18, 181-184.
- Primo, C.C., Glugoski, L., Almeida, M.C., Zawadzki, C.H., Moreira-Filho, O., Vicari, M. R., Nogaroto, V., 2017. Mechanisms of chromosomal diversification in species of *Rineloricaria* (Actinopterygii: Siluriformes: Loricariidae). *Zebrafish.* 14, 161-168.
- Rambaut A (2009) FigTree, ver. 1.3.1. [Online]. Available: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/> (accessed 02.05.2018).
- Rambaut, A., Drummond, A., 2009. Tracer, Version 1.5. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/> (accessed 02.05.2018).
- Ramírez, S.R., Nieh, J.C., Quental, T.B., Roubik, D.W., Imperatriz-Fonseca, V.L.I., Pierce, N.E., 2010. A molecular phylogeny of the stingless bee genus *Melipona* (Hymenoptera: Apidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 56, 519-525.
- Rasmussen, C., Cameron, S.A., 2007. A molecular phylogeny of the old world stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) and the non-monophyly of the large genus *Trigona*. *Syst. Entomol.* 32, 26-39.
- Rasmussen, C., Cameron, S.A., 2010. Global stingless bee phylogeny supports ancient divergence, vicariance, and long distance dispersal. *Biol. J. Linn. Soc. Lond.* 99, 206-232.
- Robinson, T.J., Ruiz-Herrera, A., Froenicke, L., 2006. Dissecting the mammalian genome – new insight into chromosomal evolution. *Trends Genet.* 22, 297-301.
- Rocha, M.P., Cruz, M.P., Pompolo, S.G., Fernandes, A., Silva, J.C. J.R., Waldschmidt, A.M., 2003a. Longitudinal differentiation in *Melipona mandacaia* (Hymenoptera, Meliponini) chromosomes. *Hereditas.* 138, 133-137.
- Rocha, M.P., Pompolo, S.G., 1998. Karyotypes and heterochromatin variation (C-bands) in *Melipona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Genet. Mol. Biol.* 21, 41-45.

- Rocha, M.P., Pompolo, S.G., Campos, L.A.O., 2003b. Citogenética da tribo Meliponini (Hymenoptera, Apidae). In: Melo GAR, Santos IA (eds) Apoidea Neotropica. Homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure. UNESC, Santa Catarina, pp 311-320.
- Rocha, M.P., Pompolo, S.G., Dergam, J.A., Fernandes, A., Campos, L.A.O., 2002. DNA characterization and karyotypic evolution in the bee genus *Melipona* (Hymenoptera, Meliponini). *Hereditas*. 136, 19-27.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatic*. 19, 1572-1574.
- Ronquist, F., Klopfstein, S., Vilhelmsen, L., Schulmeister, S., Murray, D.L., Rasnitsyn, A.P., 2012. A total-evidence approach to dating with fossils, applied to the early radiation of the Hymenoptera. *Syst. Biol.* 61, 973-99.
- Silveira, Z.V., 1971. Número de cromossomos em meliponídeos brasileiros. *Ciênc. Cult.* 23, 105-106.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725-2729.
- Tarelho, Z.V.S., 1973. Contribuição ao estudo citogenético dos Apoidea. Dissertation. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. pp 7- 112.
- Tavares, M.G., Lopes, D.M., Campos, L.A.O., 2017. An overview of cytogenetics of the tribe Meliponine (Hymenoptera: Apidae). *Genetica*. 145, 1-18.
- Tomita, M., Shimizu, N., Brutlag, D.L., 1996. Introns and Reading frames: correlation between splicing sites and their codon positions. *Genome Biol. Evol.* 13, 1219-1223.
- Tsipouri, V., Schueler, M. G., Hu, S., Dutra, A., Pak, E., Riethman, H., Green, E.D., 2008. Comparative sequence analyses reveal sites of ancestral chromosomal fusions in the *Indian muntjac* genome. *Genome Biol.* 9: R155.
- Vaidya, G., Lohman, D.J., Meier, R., 2011. Sequence Matrix: concatenation software for the fast assembly of multigene datasets with character set and codon information. *Cladistics*. 27, 171-180.
- Waldschmidt, A.M., Duarte, O.M.P., Martins, C.C.C., Santana, S.E.A., Miranda, E.A., Alves, R.N.O., Silva-Junior, J.C., Carneiro, P.L.S., 2005. Análises citogenéticas em espécies de abelhas da subtribo Meliponina (Hymenoptera: Meliponina) da região sudoeste da Bahia. In: Anais do 51º Congresso Brasileiro de Genética. Águas de Lindoia, São Paulo, p 253.

- Wang, W., Lan, H., 2000. Rapid and parallel chromosomal number reductions in muntjac deer inferred from mitochondrial DNA phylogeny. *Mol. Biol. Evol.* 17, 1326-1333.
- White, M.J.D., 1973. *Animal cytology and evolution*. 3rd ed. Cambridge University Press. 375p.

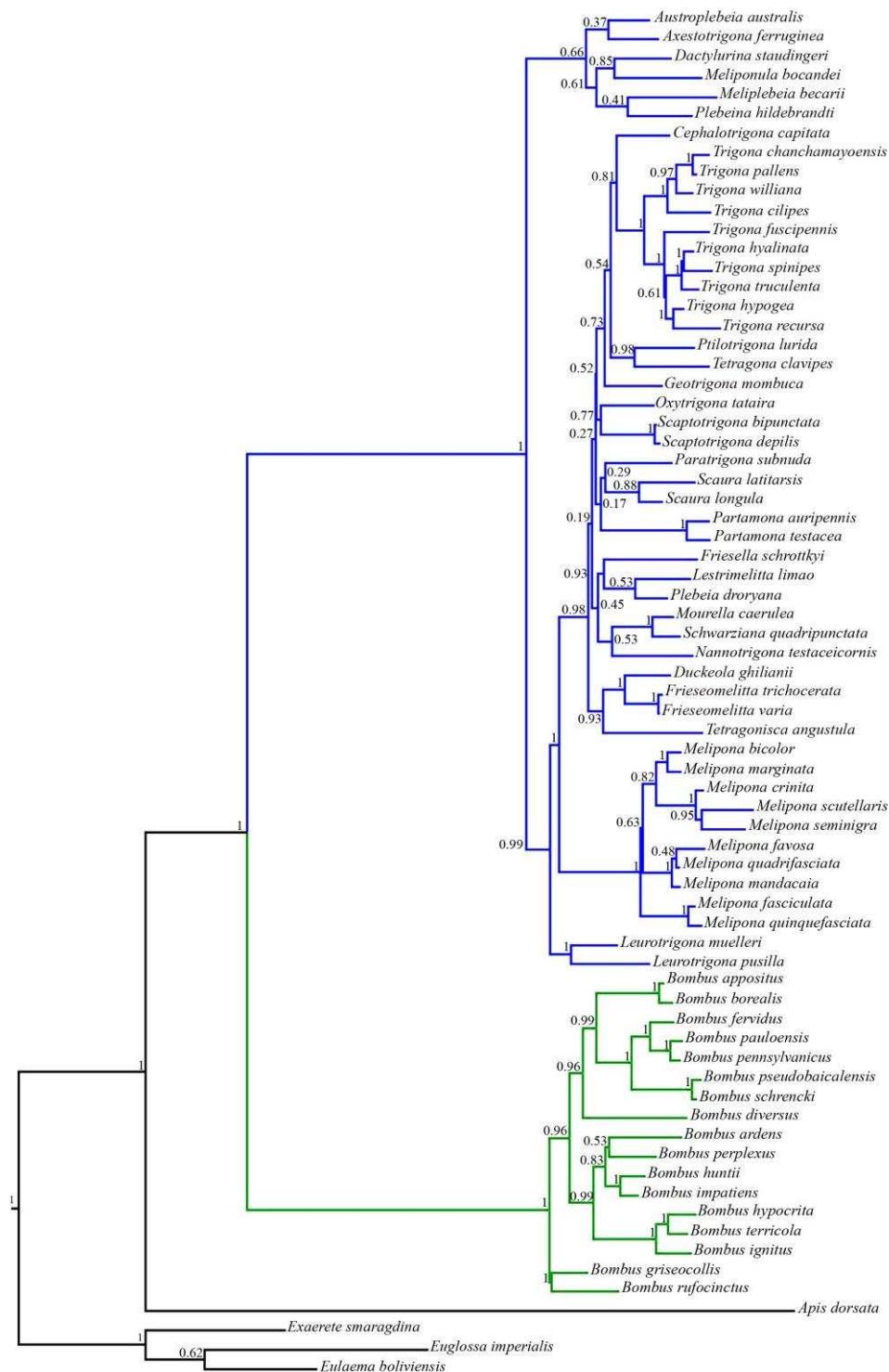


Figure

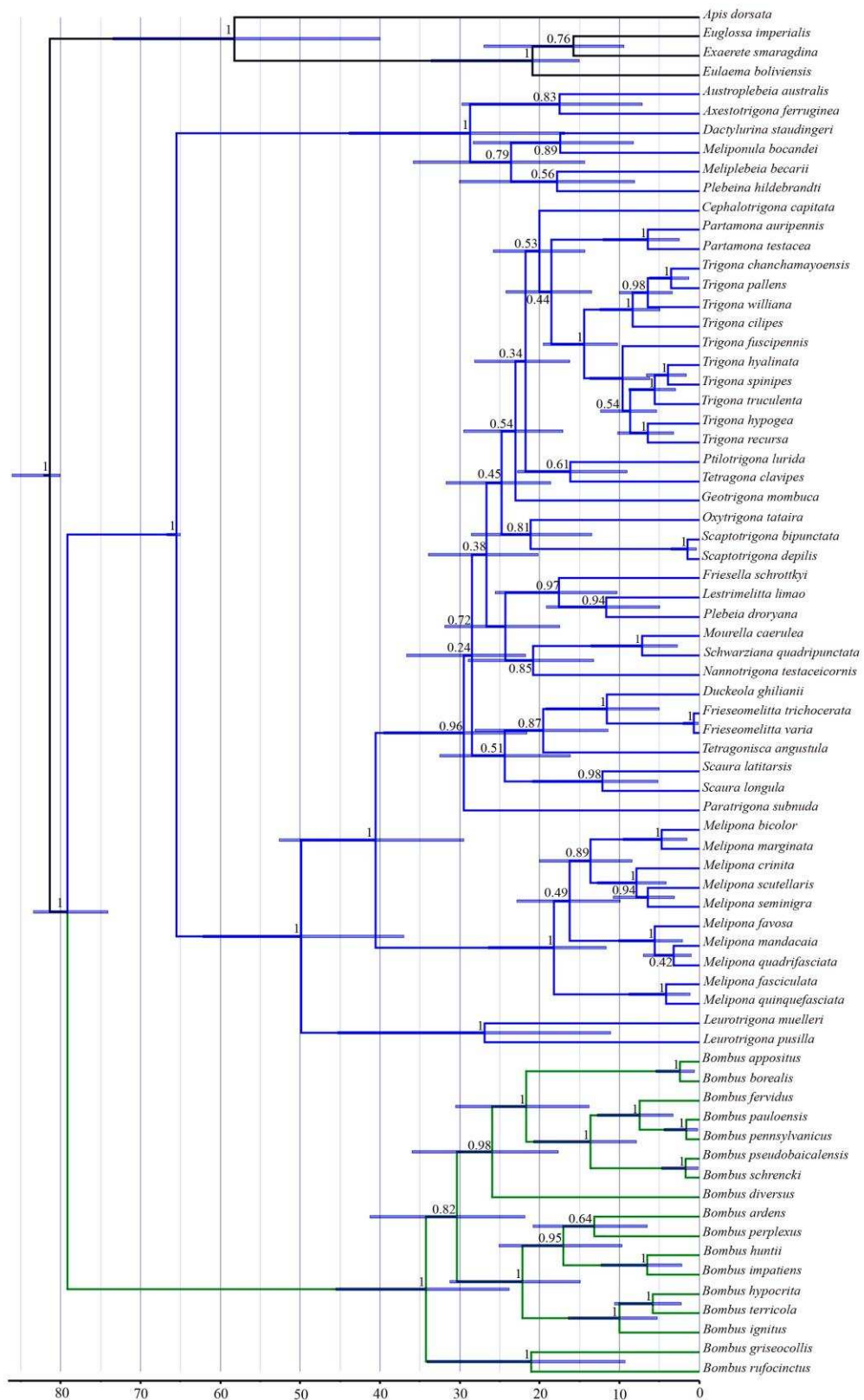


**Fig. A.1.** Consensus tree obtained from the Bayesian analysis of concatenated data based on partial sequences of the Arg-K, Opsin, EF1- $\alpha$ , 28S and 16S genes from Meliponini and Bombini species, including molecular dating and ancestral chromosome number inference. The colored circles in the terminal branches represent the different haploid numbers and the ancestor nodes indicate the probabilities of ancestral states. The blue and green branches represent the Meliponini and Bombini tribes, respectively.

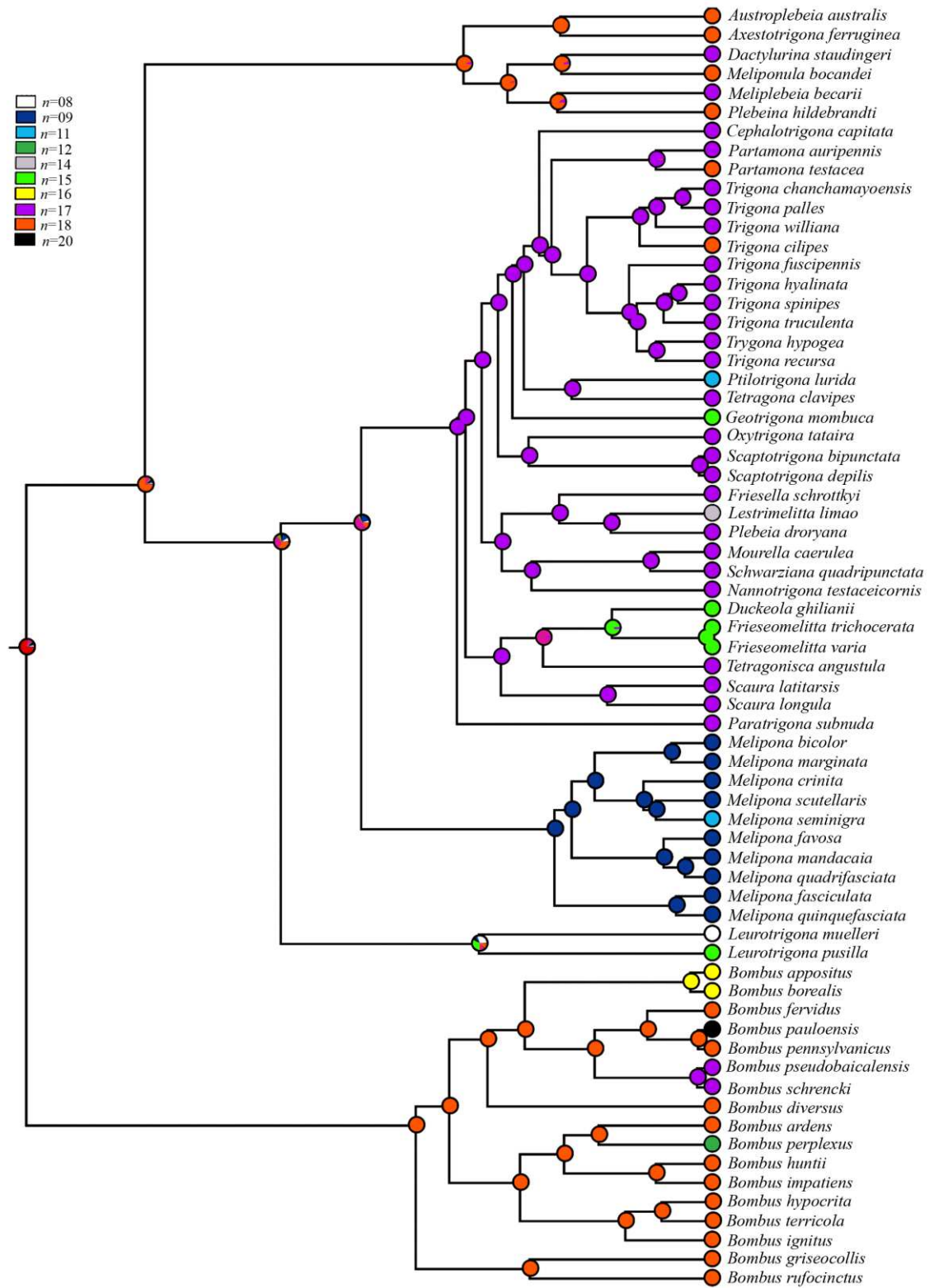
## Supplementary Material



**Supplementary Material Fig. A.1.** Consensus tree of Bayesian analysis, based on partial sequences of the Arg-K, Opsin, EF1- $\alpha$ , 28S and 16S concatenated genes of the Meliponini and Bombini. The numbers after the nodes represent the later probabilities, blue branches represent the tribe Meliponini, while the green ones, the Bombini. The outgroups was represented by *Exaerete smaragdina*, *Eulaema boliviensis* and *Euglossa imperialis*.



**Supplementary Material Fig. B.1.** Consensus tree of Bayesian analysis, based on partial sequences of the Arg-K, Opsin, EF1- $\alpha$ , 28S and 16S concatenated genes of the Meliponini and Bombini species including the times of divergence estimated in the Beast program. The bars indicate 95% confidence. Outgroups was represented by *Exaerete smaragdina*, *Eulaema boliviensis* and *Euglossa imperialis*.



**Supplementary Material Fig. C.1.** Reconstruction of the ancestral chromosomal state of the species. The colored circles in the terminal branches represent the different haploid numbers and the ancestor nodes indicate the probabilities of each ancestral state.

**Table A.1.** Species of bees, haploid number (*n*), karyotype formula and references

Species	<i>n</i>	Karyotypic formula	References
<i>Austroplebia australis</i>	18	–	Personal communication Denilce Lopes, 2018
<i>Bombus (Bombus) hypocrita</i>	18	4A <sup>m</sup> +2A+1A <sup>mi</sup> +6M <sup>c</sup> +2M+2M <sup>ci</sup> +1M <sup>t</sup>	Hoshiba and Imai, 1993
<i>Bombus (Bombus) ignitus</i>	18	4A <sup>m</sup> +1A <sup>c</sup> +1A+1A <sup>i</sup> +5M <sup>c</sup> +3M+1M <sup>i</sup> +1M <sup>c</sup> +1M <sup>t</sup>	Hoshiba and Imai, 1993
<i>Bombus (Bombus) terricola</i>	18		Owen et al., 1995
<i>Bombus (Cullumanobombus) griseocollis</i>	18		Owen et al., 1995
<i>Bombus (Cullumanobombus) rufocinctus</i>	18		Owen et al., 1995
<i>Bombus (Megabombus) diversus</i>	18	1A <sup>m</sup> +1A <sup>Mc</sup> +5A <sup>c</sup> +1A+1A <sup>i</sup> +1A <sup>ci</sup> +2M <sup>c</sup> +1M+1M <sup>CC</sup> +1M <sup>i</sup> +1M <sup>ci</sup> +1M <sup>t</sup>	Hoshiba and Imai, 1993
<i>Bombus (Pyrobombus) ardens</i>	18	3A <sup>M</sup> +4A <sup>Mc</sup> +1A <sup>c</sup> +1A+5M <sup>c</sup> +1M+2M <sup>CC</sup> +1M <sup>CCT</sup>	Hoshiba and Imai, 1993
<i>Bombus (Pyrobombus) huntii</i>	18		Owen et al., 1995
<i>Bombus (Pyrobombus) impatiens</i>	18		Owen et al., 1995
<i>Bombus (Pyrobombus) perplexus</i>	12		Owen et al., 1995
<i>Bombus (Subterraneo) appositus</i>	16		Owen et al., 1995
<i>Bombus (Subterraneo) borealis</i>	16		Owen et al., 1995
<i>Bombus (Thoracobombus) fervidus</i>	18		Owen et al., 1995
<i>Bombus (Thoracobombus) pauloensis</i>	20		Personal communication Denilce Lopes, 2018
<i>Bombus (Thoracobombus) pensylvanicus</i>	18		Owen et al., 1995
<i>Bombus (Thoracobombus) pseudobaicalensis</i>	17	1A <sup>Mc</sup> +1A+1A <sup>i</sup> +1A <sup>Mi</sup> +1A <sup>Mt</sup> +5M <sup>c</sup> +3M <sup>CC</sup> +2M <sup>c</sup> +2M <sup>ci</sup>	Hoshiba and Imai, 1993
<i>Bombus (Thoracobombus) schrencki</i>	17	10M <sup>c</sup> +1M+5M <sup>i</sup> +1M <sup>ci</sup>	Hoshiba and Imai, 1993
<i>Cephalotrigona capitata</i>	17	18A+16A <sup>m</sup>	Rocha et al., 2003a
<i>Dactylurina staudingeri</i>	17	–	Kerr, 1969,1972
<i>Duckeola ghilianii</i>	15	–	Kerr, 1969,1972
<i>Friesella schrottkyi</i>	17	–	Pompolo, 1992; Mampumbu, 2002
<i>Frieseomelitta trichocerata</i>	15	4M+16A+10A <sup>m</sup>	Nascimento, 2005
<i>Frieseomelitta varia</i>	15	4M+4A+22A <sup>m</sup>	Kerr, 1969; Tarelho, 1973; Pompolo, 1992; Rocha et al., 2003a
<i>Geotrigona mombuca</i>	15	2M+6A+7A <sup>m</sup>	Kerr, 1969; Pompolo, 1992; Rocha et al., 2003a
<i>Lestrimelitta limao</i>	14	6M+6A+16A <sup>m</sup>	Silveira, 1971; Tarelho, 1973; Rocha et al., 2003a
<i>Leurotrigona muelleri</i>	08	–	Kerr, 1969; Tarelho, 1973; Pompolo, 1992; Pompolo and Campos, 1995
<i>Leurotrigona pusilla</i>	15	–	Pompolo and Campos, 1995
<i>Meliplebeia becarii</i>	17	–	Kerr, 1969, 1972

## Continuation

Species	<i>n</i>	Karyotypic formula	References
<i>Melipona Eomelipona bicolor</i>	09	–	Pompolo, 1992; Rocha and Pompolo, 1998; Rocha et al., 2002
<i>Melipona Eomelipona marginata</i>	09	–	Pompolo, 1992; Rocha and Pompolo, 1998, Rocha et al., 2002
<i>Melipona (Melikerria) fasciculata</i>	09	–	Kerr, 1969; Rocha et al., 2002; Lopes et al., 2011.
<i>Melipona (Melikerria) quinquefasciata</i>	09	–	Kerr, 1969, 1972; Pompolo, 1992; Rocha et al., 2002
<i>Melipona (Melipona) favosa</i>	09	–	Hoshiba, 1988; Hoshiba and Imai, 1993
<i>Melipona (Melipona) mandacaia</i>	09	–	Rocha et al., 2003b
<i>Melipona (Melipona) quadrifasciata</i>	09	–	Kerr, 1948; Pompolo, 1992; Rocha and Pompolo, 1998
<i>Melipona (Michmelia) crinita</i>	09	–	Rocha et al., 2002
<i>Melipona (Michmelia) scutellaris</i>	09	–	Pompolo, 1994; Rocha and Pompolo, 1998; Rocha et al., 2002
<i>Melipona (Michmelia) seminigra</i>	11	–	Francini et al., 2011
<i>Meliponula bocandei</i>	18	–	Kerr and Araújo, 1957
<i>Meliponula ferruginea</i>	18	–	Kerr and Araújo, 1957
<i>Mourella caerulea</i>	17	11 <sup>a</sup> +6A <sup>m</sup>	Rocha et al., 2003a
<i>Nannotrigona testaceicornis</i>	17	18A+16A <sup>m</sup>	Pompolo, 1992; Hoshiba and Imai, 1993; Rocha et al., 2003a
<i>Oxytrigona tataira</i>	17	–	Kerr, 1969, 1972
<i>Paratrigona subnuda</i>	17	24A+10A <sup>m</sup>	Kerr, 1969, 1972; Pompolo, 1992; Rocha et al. 2003a
<i>Partamona auripennis</i>	17	–	Personal communication Camila Novaes, 2018
<i>Partamona testacea</i>	18	–	Kerr, 1969
<i>Plebeia droryana</i>	17	–	Kerr, 1952, 1969, 1972; Pompolo, 1992; Hoshiba and Imai, 1993; Caixeiro, 1999
<i>Plebeina hildebrandti</i>	18	–	Kerr, 1969, 1972
<i>Ptilotrigona lurida</i>	11	6M+3A+2A <sup>m</sup>	Rocha et al., 2003a
<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	17	2A+30A <sup>m</sup> +2M	Godoy, 2014
<i>Scaptotrigona depilis</i>	17	26A+8A <sup>m</sup>	Tarelho, 1973; Rocha et al., 2003a
<i>Scaura latitarsis</i>	17	1M+2A+14A <sup>m</sup>	Silveira, 1972; Tarelho, 1973; Rocha et al., 2003a; Rocha et al., 2003b; Domingues, 2005b
<i>Scaura longula</i>	17	3A+14A <sup>m</sup>	Domingues, 2005b
<i>Schwarziana quadripunctata</i>	17	18A+16A <sup>m</sup>	Tarelho, 1973; Pompolo, 1992; Rocha et al., 2003a
<i>Tetragona clavipes</i>	17	6A+28A <sup>m</sup>	Tarelho, 1973; Rocha et al., 2003a
<i>Tetragonisca angustula</i>	17	34A <sup>m</sup>	Tarelho, 1973; Pompolo, 1992; Hoshiba e Imai, 1993; Rocha et al., 2003a; Barth et al., 2011
<i>Trigona chanchamayoensis</i>	17	18 <sup>a</sup> +2A <sup>e</sup> +12A <sup>m</sup>	Costa et al., 2004
<i>Trigona cilipes</i>	18	–	Kerr, 1969

*Continuation*

Species	<i>n</i>	Karyotypic formula	References
<i>Trigona fuscipennis</i>	17	–	Tarelho, 1973; Waldschmidt et al., 2005
<i>Trigona hyalinata</i>	17	4A+2A <sup>e</sup> +30A <sup>m</sup>	Costa et al., 2004; Ferreira, 2015
<i>Trigona hypogea</i>	17	2A+24A <sup>m</sup> +8A <sup>mc</sup>	Ferreira, 2015
<i>Trigona pallens</i>	17	2A <sup>e</sup> +32A <sup>m</sup>	Ferreira, 2015
<i>Trigona recursa</i>	17	12A+2A <sup>e</sup> +30A <sup>m</sup>	Tarelho, 1973; Rocha et al., 2003a; Ferreira, 2015
<i>Trigona spinipes</i>	17	6A+28A <sup>m</sup>	Tarelho, 1973; Rocha et al., 2003a; Ferreira, 2015
<i>Trigona truculenta</i>	17	4A <sup>e</sup> +24A <sup>m</sup> +6A <sup>mc</sup>	Ferreira, 2015
<i>Trigona williana</i>	17	2A <sup>e</sup> +2A+30A <sup>m</sup>	Ferreira, 2015

**Supplementary Material Table A.2.** Species of bees and the external group analyzed, collection site, gene access number in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) and references

Species	Collection site	16S	ArgK	EF1- $\alpha$	Opsin	28S	References
<b>Ingroup</b>							
<i>Austroplebia australis</i>	Duaringa, Australia	AF343112	-	-	-	-	Costa et al., 2003
<i>Axestotrigona ferruginea</i>	Cameroon, Ngaoundere	DQ790450	DQ813032	DQ813109	DQ813187	FJ042175	Rasmussen and Cameron, 2010
<i>Bombus (Bombus) hypocrita</i>	Kyushu, Japan	AY737347	AF492889	JQ820913	DQ7888209	-	Hines et al., 2006
<i>Bombus (Bombus) ignitus</i>	Beijing, China	AY737348	AF492898	DQ788207	AF493032	-	Hines et al., 2006
<i>Bombus (Bombus) terricola</i>	Ontário, Canada	AY737387	AF492885	AY739606	AF493019	-	Hines et al., 2006
<i>Bombus (Cullumanobombus) griseocollis</i>	Illinois, USA	AY737341	AF492905	DQ788196	AF493039	-	Hines et al., 2006
<i>Bombus (Cullumanobombus) rufocinctus</i>	Alberta, Canada	AY737377	AF492900	DQ788268	AF493034	-	Hines et al., 2006
<i>Bombus (Megabombus) diversus</i>	Kyushu, Japan	DQ788000	AF492894	AF492961	AF493028	HM750236	Cameron et al., 2007; Cardinal et al., 2010
<i>Bombus (Pyrobombus) ardens</i>	Dae-Dong, South Korea	DQ787966	AF492897	DQ788149	AF493031	HM750237	Hines et al., 2006; Cardinal et al., 2010
<i>Bombus (Pyrobombus) huntii</i>	Washington, USA	AY737344	AF492911	DQ788203	AF493045	-	Hines et al., 2006
<i>Bombus (Pyrobombus) impatiens</i>	Illinois, USA	AY737349	AF492875	DQ788209	AF493009	-	Hines et al., 2006
<i>Bombus (Pyrobombus) perplexus</i>	Ontário, Canada	AY737373	AF492878	DQ788254	AF493012	-	Hines et al., 2006
<i>Bombus (Subterraneobombus) appositus</i>	Utah, USA	DQ787965	DQ788395	DQ788148	DQ788314	-	Cameron et al., 2007
<i>Bombus (Subterraneobombus) borealis</i>	Maine, USA	DQ787981	AF492909	AF492976	AF493043	-	Cameron et al., 2007
<i>Bombus (Thoracobombus) fervidus</i>	Missouri, USA	AY268406	AF492863	AF492930	AF492997	-	Cameron et al., 2007
<i>Bombus (Thoracobombus) pauloensis</i>	Minas Gerais, Brazil	-	KT187910	KT187930	-	-	Françoso et al., 2016
<i>Bombus (Thoracobombus) pennsylvanicus</i>	Missouri, USA	EF032352	DQ788479	EF032374	AF492996	-	Cameron et al., 2007



## Continuation

Species	Collection site	16S	ArgK	EF1- $\alpha$	Opsin	28S	References
<i>Bombus (Thoracobombus) pseudoabaicalensis</i>	Primorskiy Kray, USA	EF032357	AY267171	EF032372	AY267155	-	Cameron et al., 2007
<i>Bombus (Thoracobombus) schrencki</i>	W. Khentey, Mongolia	AF364828	AF492866	AF492933	AF493000	-	Cameron et al., 2007
<i>Cephalotrigona capitata</i>	San Martín, Peru	FJ041915	FJ042191	FJ042292	FJ042394	FJ042015	Rasmussen and Cameron, 2010
<i>Dactylurina staudingeri</i>	Cameroon, Yaoundé	DQ790451	DQ813034	DQ813111	DQ813189	FJ042176	Rasmussen and Cameron, 2010
<i>Duckeola ghilianii</i>	Amazonas, Brazil	FJ041917	FJ042193	FJ042294	FJ042396	FJ042018	Rasmussen and Cameron, 2010
<i>Friesella schrottkyi</i>	São Paulo, Brazil	FJ041922	FJ042198	FJ042299	FJ042401	FJ042023	Rasmussen and Cameron, 2010
<i>Frieseomelitta trichocerata</i>	Loreto, Peru	FJ041923	FJ042199	FJ042300	FJ042402	FJ042024	Rasmussen and Cameron, 2010
<i>Frieseomelitta varia</i>	São Paulo, Brazil	FJ041924	FJ042200	FJ042301	FJ042403	FJ042025	Rasmussen and Cameron, 2010
<i>Geotrigona mombuca</i>	São Paulo, Brazil	FJ041928	FJ042204	FJ042305	FJ042407	FJ042029	Rasmussen and Cameron, 2010
<i>Lestrimelitta limao</i>	São Paulo, Brazil	FJ041931	FJ042207	FJ042308	FJ042410	FJ042032	Rasmussen and Cameron, 2010
<i>Leurotrigona muelleri</i>	São Paulo, Brazil	FJ041933	FJ042209	FJ042310	FJ042412	FJ042034	Rasmussen and Cameron, 2010
<i>Leurotrigona pusilla</i>	San Martín, Peru	FJ041932	FJ042208	FJ042309	FJ042411	FJ042033	Rasmussen and Cameron, 2010
<i>Meliplebeia beccarii</i>	Mgahinga, Uganda	AF343109	-	-	-	-	Costa et al., 2003
<i>Melipona (Eomelipona) bicolor</i>	Minas Gerais, Brazil	FJ041919	FJ042195	FJ042296	FJ042398	FJ041919	Rasmussen and Cameron, 2010
<i>Melipona (Eomelipona) marginata</i>	São Paulo, Brazil	FJ041920	EU163072	EU163240	FJ042399	FJ042021	Rasmussen and Cameron, 2010
<i>Melipona (Melikerria) fasciculata</i>	São Paulo, Brazil	FJ041946	FJ042223	FJ042324	FJ042426	FJ042048	Rasmussen and Cameron, 2010
<i>Melipona (Melikerria) quinquefasciata</i>	Brazil	EU162989	EU163074	EU163242	-	-	Ramírez et al., 2010
<i>Melipona (Melipona) favosa</i>	French Guiana	EU162961	EU163046	EU163214	-	-	Ramírez et al., 2010
<i>Melipona (Melipona) mandacaia</i>	Brazil	EU162990	EU163075	EU163243	-	-	Ramírez et al., 2010
<i>Melipona (Melipona) quadrifasciata</i>	Minas Gerais, Brazil	AF343100	EU163069	EU163237	-	-	Costa et al., 2003
<i>Melipona (Michmelia) crinita</i>	Madre de Díos, Peru	FJ041942	FJ042219	FJ042320	FJ042422	FJ042044	Rasmussen and Cameron, 2010
<i>Melipona (Michmelia) scutellaris</i>	Minas Gerais, Brazil	FJ041939	FJ042216	FJ042317	FJ042419	FJ042041	Rasmussen and Cameron, 2010
<i>Melipona (Michmelia) seminigra</i>	Amazonas, Brazil	FJ041940	FJ042217	FJ042318	FJ042420	FJ042042	Rasmussen and Cameron, 2010
<i>Meliponula bocandei</i>	Bwindi, Uganda	DQ790452	DQ813052	DQ813131	DQ813209	FJ042177	Rasmussen and Cameron, 2010
<i>Mourella caerulea</i>	Rio Grande do Sul, Brazil	FJ041950	FJ042227	FJ042328	FJ042430	FJ042052	Rasmussen and Cameron, 2010
<i>Nannotrigona testaceicornis</i>	São Paulo, Brazil	FJ041953	FJ042230	FJ042331	FJ042433	FJ042056	Rasmussen and Cameron, 2010
<i>Oxytrigona tataira</i>	São Paulo, Brazil	FJ041960	FJ042237	FJ042338	FJ042440	FJ042062	Rasmussen and Cameron, 2010
<i>Paratrigona subnuda</i>	Espírito Santo, Brazil	AF343105	-	-	-	-	Costa et al., 2003
<i>Partamona auripennis</i>	San Martín, Peru	DQ790463	DQ813056	DQ813135	DQ813213	EU049746	Rasmussen and Cameron, 2010
<i>Partamona testacea</i>	San Martín, Peru	FJ041961	FJ042238	FJ042339	FJ042441	FJ042063	Rasmussen and Cameron, 2010
<i>Plebeia droryana</i>	São Paulo, Brazil	FJ041974	FJ042252	FJ042353	FJ042455	FJ042078	Werneck, 2016
<i>Plebeina hildebrandti</i>	L. Trichardt, South Africa	DQ790455	DQ813061	DQ813140	DQ813218	FJ042180	Rasmussen and Cameron, 2010
<i>Ptilotrigona lurida</i>	San Martín, Peru	FJ041980	FJ042258	FJ042359	FJ042460	FJ042085	Rasmussen and Cameron, 2010
<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	São Paulo, Brazil	FJ041987	FJ042265	FJ042366	FJ042467	FJ042092	Rasmussen and Cameron, 2010
<i>Scaptotrigona depilis</i>	São Paulo, Brazil	FJ041988	FJ042266	FJ042367	FJ042468	FJ042093	Rasmussen and Cameron, 2010
<i>Scaura latitarsis</i>	San Martín, Peru	FJ041991	FJ042269	FJ042370	FJ042471	FJ042096	Rasmussen and Cameron, 2010



*Continuation*

Species	Collection site	16S	ArgK	EF1- $\alpha$	Opsin	28S	References
<i>Scaura longula</i>	San Martín, Peru	FJ041989	FJ042267	FJ042368	FJ042469	FJ042094	Rasmussen and Cameron, 2010
<i>Schwarziana quadripunctata</i>	São Paulo, Brazil	FJ041992	FJ042270	FJ042371	FJ042472	FJ042097	Rasmussen and Cameron, 2010
<i>Tetragona clavipes</i>	San Martín, Peru	FJ042010	FJ042287	FJ042389	FJ042490	FJ042117	Rasmussen and Cameron, 2010
<i>Tetragonisca angustula</i>	São Paulo, Brazil	DQ790470	DQ813076	DQ813155	DQ813233	FJ042107	Rasmussen and Cameron, 2010
<i>Trigona chanchamayoensis</i>	San Martín, Peru	EU049698	EU049748	EU049769	EU049793	EU049719	Rasmussen and Cameron, 2010
<i>Trigona cilipes</i>	San Martín, Peru	EU049699	EU049749	EU049771	EU049794	EU049721	Rasmussen and Cameron, 2010
<i>Trigona fuscipennis</i>	Limón, Costa Rica	EU049709	EU049759	EU049783	EU049804	HM750238	Rasmussen and Cameron, 2010
<i>Trigona hyalinata</i>	São Paulo, Brazil	EU049718	EU049768	EU049792	EU049813	EU049742	Rasmussen and Cameron, 2010
<i>Trigona hypogea</i>	San Martín, Peru	EU049714	EU049764	EU049788	EU049809	EU049738	Rasmussen and Cameron, 2010
<i>Trigona pallens</i>	San Martín, Peru	EU049702	EU049752	EU049775	EU049797	EU049725	Rasmussen and Cameron, 2010
<i>Trigona recursa</i>	São Paulo, Brasil	EU049715	EU049765	EU049789	EU049810	EU049739	Rasmussen and Cameron, 2010
<i>Trigona spinipes</i>	São Paulo, Brasil	EU049716	EU049766	EU049790	EU049811	EU049740	Rasmussen and Cameron, 2010
<i>Trigona truculenta</i>	Madre de Díos, Peru	EU049708	EU049758	EU049782	EU049803	EU049732	Rasmussen and Cameron, 2010
<i>Trigona williana</i>	Loreto, Peru	EU049713	EU049763	EU049787	EU049808	EU049737	Rasmussen and Cameron, 2010
<b>Outgroups</b>							
<i>Apis dorsata</i>	Bangalore, India	L22893	AY267178	AY267146	AF091733	FJ042186	Rasmussen and Cameron, 2010
<i>Euglossa imperialis</i>	São Paulo, Brazil	AJ581085	AY267176	AY267144	AY267144	FJ042183	Rasmussen and Cameron, 2010
<i>Eulaema boliviensis</i>	La Paz, Bolivia	DQ788139	DQ788523	DQ788307	DQ788387	FJ042184	Rasmussen and Cameron, 2010
<i>Exaerete smaragdina</i>	-	AJ581101	EU421585	AJ582379	AJ581738	FJ042185	Rasmussen and Cameron, 2010

**Supplementary Material Table A.3.** Probabilities (in percentage) of the haploid numbers in the reconstruction of the ancestral state between the clades.

Clado	Probabilidades (%) de número haploide ( $n$ )									
	08	09	11	12	14	15	16	17	18	20
A	3	5	1	1	1	3	1	11	73	1
B	3,5	3,5	1	1	1	4	1	9	75	1
C	0	0	0	0	0	0	0	3	97	0
D	9	10	1	1	1	9	1	30	37	1
E	5	20	2	2	2	5	2	50	10	2
F	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0
G	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0

### Descrição cariotípica e mapeamento de DNA repetitivo em *Austroplebeia australis* (Friese, 1898), Meliponini da Austrália

#### Resumo

Filogeneticamente os Meliponini são um grupo monofilético em que as espécies da linhagem Neotropical formam um grupo irmão com as espécies das linhagens Afrotropical, Indo-Malaia e da Austrália. Vários estudos citogenéticos foram realizados com Meliponini Neotropicais, entretanto apenas uma espécie (*Tetragonula minangkabau*) da região australiana foi analisada tendo somente a descrição do número cromossômico. O gênero *Austroplebeia* Moure, 1961 é formado por espécies endêmicas da região da Austrália e Nova Guiné e inclui cinco espécies. Considerando a escassez de dados citogenéticos para os Meliponini da região da Austrália, o objetivo deste estudo foi descrever o cariótipo de *Austroplebeia australis* baseados no número cromossômico, padrão heterocromático, riqueza em pares de base Citosina-Guanina e Adenina-Timina, bem como o mapeamento dos sítios de rDNA, microssatélites GA<sub>(15)</sub>, GAG<sub>(10)</sub>, CAA<sub>(10)</sub> CGG<sub>(10)</sub> e as regiões teloméricas TTAGG<sub>(6)</sub>. *Austroplebeia australis* apresentou 2n=36 cromossomos, com um cariótipo constituído por grande quantidade de heterocromatina e um polimorfismo no primeiro par cromossômico. Marcações DAPI<sup>+</sup> foram observadas em regiões intersticiais e terminais de alguns cromossomos, enquanto que o CMA<sub>3</sub> marcou levemente a heterocromatina dos cromossomos. Os sítios de rDNA 18S localizaram-se na região terminal em três pares cromossômicos e a eucromatina apresentou uma riqueza dos microssatélites GA<sub>(15)</sub>, GAG<sub>(10)</sub>, CAA<sub>(10)</sub>, CGG<sub>(10)</sub> e TTAGG<sub>(6)</sub>. O número cromossômico foi semelhante ao encontrado em espécies da linhagem Afrotropical, grupo ao qual a espécie está filogeneticamente próxima. A grande quantidade de heterocromatina observada no cariótipo de *A. australis* é semelhante a espécies com alto conteúdo heterocromático de *Melipona* (Meliponini, Neotropical). No entanto, os padrões de DAPI<sup>+</sup> - CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> no cariótipo divergem do encontrado nas demais espécies da tribo estudadas, o que demonstra uma diferença na constituição da cromatina entre as espécies e que a heterocromatina parece ser uma característica importante para evolução cromossômica da tribo. Possivelmente, passe por processos de crescimento independentes em cada gênero.

**Palavras-chave:** Eucromatina, Fluorocromos base-específicos, Heterocromatina, Hibridação *in situ* Fluorescente, Microsatélite

## 1. Introdução

A tribo Meliponini possui espécies com grande diversidade morfológica e comportamental (Michener, 2013). Com mais de 500 espécies descritas, são conhecidas como “abelhas sem ferrão” e sua distribuição abrange as regiões Afrotropicais, Indo-Malaia, Australásia, Neoártica, Paleoártica e Neotropical (Rasmussen & Cameron, 2010; Camargo & Pedro, 2013; Michener, 2013; Ascher & Pickering, 2016). Filogeneticamente, Meliponini é um grupo monofilético em que as espécies da linhagem Neotropical (Novo Mundo) formam um grupo irmão das espécies das linhagens Afrotropical e Indo-Malaia/Australásia (Velho Mundo) (Rasmussen & Cameron, 2010).

Na região da Indo-Malaia e Australásia, são descritas 89 espécies de abelhas agrupadas em 15 gêneros, sendo que apenas os gêneros *Tetragonula* Smith, 1854 e *Austroplebeia* Moure, 1961 ocorrem na Austrália (Dollin *et al.*, 1997; Rasmussen, 2008; Michener, 2013). O gênero *Austroplebeia* é um grupo de abelhas endêmico da Austrália e da Nova Guiné (Camargo & Pedro, 2013), sendo representado por apenas cinco espécies: *Austroplebeia assingtoni* (Cockerell 1905), *Austroplebeia australis* (Friese, 1898), *Austroplebeia cincta* (Mocsary, 1898), *Austroplebeia cassiae* (Cockerell, 1910) e *Austroplebeia magna* (Michener, 1990) (Dollin *et al.*, 2015; Halcroft *et al.*, 2015).

Citogeneticamente o gênero *Austroplebeia* não foi analisado até o momento. Em espécies da linhagem Indo-Malaia/Australásia, as análises cromossômicas se restringem a descrição do número diploide de *Tetragonula minangkabau* ( $2n=40$ ) (Hoshiba & Imai, 1993). A maior parte dos estudos está relacionada as espécies Neotropicais com descrição do número de cromossomos (revisado em Tavares *et al.*, 2017), distribuição e quantidade de heterocromatina (Rocha *et al.*, 1998; Rocha *et al.*, 2002), localização de regiões ricas em pares de base adenina-timina e citosina-guanina (Carvalho & Costa, 2011), pintura cromossômica (Lopes *et al.*, 2014), mapeamento físico de gene ribossomal 18S (Brito *et al.*, 2004; Cunha *et al.*, 2018 *no prelo*) e de sequências de DNA repetitivos (Piccoli *et al.*, 2018). Em Meliponini, encontramos pouca variação numérica e as informações obtidas por técnicas de citogenéticas clássica sugeriam uma semelhança na constituição da cromatina entre os gêneros (Rocha & Pompolo, 1998, Brito *et al.*, 2005; Rocha *et al.*, 2003b). No entanto, o uso de novas ferramentas de

biologia molecular, por exemplo, em técnicas de Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH) e de cinética de reassociação ( $C_0t$ ), tem possibilitado encontrar variações na constituição não observadas anteriormente (Piccoli *et al.*, 2018).

Assim, considerando a escassez de dados citogenéticos para os Meliponini da região da Austrália, o objetivo deste estudo foi descrever o cariótipo de *Austroplebeia australis* baseados no número cromossômico, padrão heterocromático, riqueza em pares de base Citosina-Guanina e Adenina-Timina, bem como o mapeamento dos sítios de rDNA, microssatélites  $GA_{(15)}$ ,  $GAG_{(10)}$ ,  $CAA_{(10)}$   $CGG_{(10)}$  e as regiões teloméricas  $TTAGG_{(6)}$ , buscando informações que auxiliem no entendimento da evolução cromossômica dos Meliponini.

## 2. Material e Métodos

Larvas de duas colônias (A2Q e A3Q) de *Austroplebeia australis* foram cedidas da criação da pesquisadora Megan Halcroft da Universidade do Oeste de Sydney, Austrália. Os exemplares adultos de rainhas, machos e operárias foram depositados na coleção científica do Apiário Central no Museu Regional de Entomologia na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Gânglios cerebrais de larvas no final do último instar larval foram utilizadas para obtenção dos cromossomos mitóticos, conforme descrito por Imai *et al.* (1988). As lâminas foram coradas com Giemsa para observação do número cromossômico e morfologia. Para identificação das regiões de heterocromatina foi utilizada a técnica de banda-C (Sumner, 1972). Para as análises dos fluorocromos base específicos (DAPI/CMA<sub>3</sub>) seguiu-se o protocolo de Schweizer (1980). Foram analisados 10 indivíduos e 10 metáfases em média por lâmina, por colônia. As imagens foram obtidas em microscópio de epifluorescência Olympus BX60, usando o software Q-Color3 Olympus ® images.

Sondas de DNA ribossomal 18S e de microssatélites foram utilizadas para hibridação *in situ* Fluorescente (FISH) segundo Pinkel *et al.* (1986), com modificações (formamida 70% em 2xSSC a 75 °C por 5 min para desnaturação dos cromossomos). A sonda rDNA 18S foi amplificada utilizando os *primers* F1 (5'-GTCATATGTTGTCTCAAAGA-3') e 18SR1.1 (3'-TCTAATTTTTTCAAAGTAAACGC-5') (Pereira, 2006). Esta sonda foi marcada com digoxigenina-11-dUTP (Roche Applied Science) e o sinal detectado por anti-digoxigenina-rodamina (Roche Applied Science). As sondas de DNA repetitivo  $GA_{(15)}$ ,  $GAG_{(10)}$ ,  $CAA_{(10)}$ ,  $CGG_{(10)}$  e  $TTAGG_{(6)}$  foram marcadas diretamente com Cy3 durante a síntese (Sigma - St. Louis, MO, USA). Todas as metáfases foram fotografadas em microscópio Olympus BX53

com a câmera DP73F Olympus com o software CellSens Imaging. Uma média de 10 metáfases foi analisada para determinar os padrões das técnicas citogenéticas usadas neste estudo.

### 3. Resultados

O número cromossômico observado para *A. australis* foi  $2n=36$  (Fig. 1a). O padrão heterocromático obtido pela técnica de banda-C revelou um cariótipo em *A. australis* constituído por 14 pares cromossômicos com grande quantidade de heterocromatina, destes seis pares em que metade do cromossomo é heterocromático e a outra metade é eucromático e oito pares apresentam heterocromatina distribuída em quase toda extensão dos cromossomos com exceção das regiões terminais eucromáticas e quatro pares totalmente eucromáticos (Fig. 1b). A grande quantidade de heterocromatina dificultou a visualização do centrômero, não sendo possível identificar a morfologia dos cromossomos e, conseqüentemente, a fórmula cariotípica da espécie. Um polimorfismo morfológico com diferenças de tamanhos entre os cromossomos homólogos foi observado no primeiro par cromossômico (Fig. 1a-b).

A coloração com fluorocromos base específicos, o DAPI<sup>+</sup> apresentou riqueza em pares de base Adenina-Timina (AT) em regiões eucromáticas (Fig. 1c; Fig. 2), enquanto o CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> marcações de pares de base em Citosina-Guanina (CG) mais claras na heterocromatina dos cromossomos (Fig. 1d; Fig. 2).

Baseados no FISH, os genes ribossomais 18S hibridizaram na região terminal de um dos braços em três pares cromossômicos (Fig. 3a) e as sequências dos microssatélites GA<sub>(15)</sub>, GAG<sub>(10)</sub>, CAA<sub>(10)</sub> e CGG<sub>(10)</sub> apresentaram marcações apenas na região eucromática dos cromossomos de *A. australis* (Fig. 2b-e). A sequência telomérica TTAGG<sub>(6)</sub> marcou todos os sítios teloméricos dos cromossomos (Fig. 3f).

### 4. Discussão

O número cromossômico observado neste estudo para *A. australis* ( $n=18$ ) é semelhante ao sugerido para o ancestral comum das espécies da região Indo-Malaia/Australásia. Baseado em uma inferência do número cromossômico ancestral para as espécies de Meliponini foi sugerido que o ancestral comum entre as linhagens dessa tribo possuía  $n=18$  cromossomos, que se manteve no ancestral comum das espécies Afrotropicais, Indo-Malaia/Australásia e, por fusão cromossômica, diminuiu para  $n=17$  nas espécies Neotropicais (Travenzoli, 2018). Além disso, *A. australis* apresentam um número de cromossomos ( $n=18$ ) mais próximo ao observado nas

espécies de Meliponini Afrotropicais estudadas, variando de  $n=17$  em *Dactylurina staudingeri* (Gribodo, 1893) a  $n=18$  em *Cleptotrigona cubiceps* (Friese, 1912) e *Plebeina hildebrandti* (Friese, 1903) (Kerr & Araújo, 1957; Kerr, 1969), do que e na única espécie australiana estudada até o momento *Tetragonula minangkabau* com  $n=20$  (Hoshiba & Imai, 1993), o que corrobora as análises de filogenia molecular que indicam que *Austroplebeia* seja estreitamente relacionada com espécies da linhagem africana (Rasmussen & Cameron, 2010).

O cariótipo de *A. australis* constituído por grande quantidade de heterocromatina é semelhante ao observado em algumas espécies de um único gênero de Meliponini. Em abelhas neotropicais dessa tribo é possível observar diferentes padrões de distribuição e quantidade de heterocromatina. De maneira geral, as espécies apresentam cromossomos apresentam com um braço eucromático e outro heterocromático (Costa *et al.*, 2004; Godoy *et al.*, 2013; Miranda *et al.*, 2013), exceto o gênero *Melipona* que apresenta padrões característicos do grupo. Baseado na distribuição da heterocromatina, as espécies de *Melipona* podem ser dividido em dois grupos: um composto por espécies com baixa (Grupo I) e outro com alta (Grupo II) quantidade de heterocromatina em seu cariótipo (Rocha & Pompolo, 1998; Rocha *et al.*, 2002). Quando correlacionamos esses padrões heterocromáticos com o cariótipo de *A. australis* observamos uma grande semelhança com essas espécies de *Melipona* do Grupo II, o que sugere que a alta quantidade de heterocromatina pode não ser exclusiva deste gênero neotropical

Diferentemente de *Melipona* que apresenta dois grupos distintos de espécies com características heterocromáticas conservadas dentro de cada grupo, em *A. australis* observa-se uma variação no padrão de heterocromatina entre os pares cromossômicos que consiste na presença cromossomos pequenos totalmente eucromáticos e cromossomos de tamanho maior com grande quantidade de heterocromatina. Uma possível explicação para esses dados seria um crescimento diferencial de heterocromatina em cada cromossomo, o que também foi sugerido para explicar o padrão exclusivo heterocromático observado em *Melipona* (Travenzoli, 2018). Esse crescimento heterocromático diferenciado também é uma possível explicação para o polimorfismo no tamanho entre os os cromossomos homólogos do primeiro par em *A. australis*, o que também foi sugerido para explicar o as variações no tamanho entre os cromossomo homólogos do primeiro par em *Melipona flavolineata* e *Melipona capixaba* (Travenzoli, 2018). Assim como observados nessas espécies de abelhas, em formigas as alterações na quantidade de heterocromatina, são consideradas um os principais mecanismos envolvidos na evolução cariotípica, que resultou nos

polimorfismos em certos pares de cromossomos (Imai *et al.*, 1988; Lorite & Palomeque, 2010).

Os dados obtidos com os fluoróforos base-específicos DAPI-CMA<sub>3</sub> para *A. australis* mostram que a heterocromatina rica em pares de bases (CG) e a eucromatina rica em pares de bases Adenina-Guanina (AT), difere do observado para a maioria dos Meliponini estudados, em que a heterocromatina geralmente apresenta uma riqueza em pares de bases AT, evidenciadas pelo DAPI<sup>+</sup>, enquanto as regiões de eucromatina são ricas em pares de bases CG, evidenciadas pelas marcas CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> (Brito *et al.*, 2003; Rocha *et al.*, 2003; Lopes *et al.*, 2011; Godoy *et al.*, 2013; Cunha *et al.*, 2018 *no prelo*). Um padrão semelhante de heterocromatina rica em CG também foi observado na espécie de abelha solitária *Melitoma segmentaria* (Fabricius, 1804) (Cristiano *et al.*, 2014) e *Euglossa carolina* Nemésio, 2009 (Fernandes *et al.*, 2013).

Outro padrão observado em *A. australis* que difere dos demais Meliponini foi que a localização dos genes rDNA 18S não coincidiram com as marcações obtidas com o fluorocromo CMA<sub>3</sub>. Essa correspondência já foi observada em alguns gêneros de Meliponini Neotropical como *Melipona* Illiger, 1806, *Partamona* Schwarz, 1939 e *Scaptotrigona* Moure, 1942 (Rocha *et al.*, 2002; Brito *et al.*, 2005; Duarte *et al.*, 2009). Geralmente esses sítios ribossomais são ricas em pares de bases GC (Sumner, 2003), sendo comum a localização dos genes rDNA corresponderem às marcações com o fluorocromo CMA<sub>3</sub>. A não correlação entre as regiões de 18S rDNA e CMA<sub>3</sub> também já foi evidenciada em espécies de vespas (Menezes *et al.*, 2014) e em formigas (Santos *et al.*, 2016). Estes resultados demonstram que esses genes não são ricos em bases GC, nessa espécie.

Em geral, os cromossomos caracterizam-se por apresentar uma grande quantidade de DNA repetitivo em regiões de heterocromatina (Yamada *et al.*, 2016). Mas, embora os cromossomos de *A. australis* possuam grande quantidade de heterocromatina, as sondas de microssatélites hibridizaram apenas nas regiões eucromáticas. Em abelhas, estudos de mapeamento dessas regiões ainda são escassos. Até o momento, apenas as espécies *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Piccoli *et al.*, 2018), *Melipona interrupta* Latreille, 1811 (Travenzoli, 2018), *Partamona helleri* (Friese, 1900) e *Partamona seridoensis* (Pedro & Camargo, 2003) (Comunicação Pessoal, Denilce Lopes) foram estudadas empregando-se uma ou mais sondas de microssatélites (GA<sub>(15)</sub>, CA<sub>(15)</sub>, GAC<sub>(10)</sub>, GAG<sub>(10)</sub>, CAA<sub>(10)</sub>, TAA<sub>(10)</sub> e CGG<sub>(10)</sub>). Nesses estudos, essas espécies também apresentaram marcações de DNA repetitivo unicamente nas regiões eucromáticas, indicando que outros tipos de DNA repetitivo como DNA

satélite ou elementos transponíveis sejam encontrados na heterocromatina de Meliponini.

Estudos revelaram a presença dessa sequência conservada em telômeros de várias espécies de Hymenoptera, incluindo *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 e *Melipona* Illiger, 1806 (Meyne *et al.*, 1995; Sahara, 1999; Lorite *et al.*, 2002; Frydrychova *et al.*, 2004; Robertson *et al.*, 2006; Travenzoli, 2018). Em *A. australis*, as marcações de TTAGG somente na região terminal dos cromossomos, somadas a manutenção do número cromossômico ancestral ( $n=18$ ), confirmam a não ocorrência de rearranjos cromossômicos alterando o número de cromossomos nessa espécie.

Baseados nessas informações verificamos que o número cromossômico de *A. australis* é próximo ao de espécies da linhagem Afrotropical, corroborando dados filogenéticos. A quantidade de heterocromatina dessa espécie, entretanto, é mais semelhante a observada nos cariótipos de algumas espécies de *Melipona*, da linhagem Notropical e a constituição da cromatina baseadas na riqueza de bases AT e CG é mais semelhante ao observado em espécies solitárias. Nosso dados, portanto, demonstram que a quantidade e padrão da distribuição da heterocromatina parece ser uma característica importante para evolução cromossômica da tribo. Possivelmente, passe por processos de crescimento independentes em cada gênero.

#### 4. Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro.

#### 5. Referências

- Ascher, J.S., Pickering, J. 2016. Discover Life bee species guide and world checklist (Hymenoptera: Apoidea: Anthophila). Disponível em: <http://www.discoverlife.org/mp/20q?search=Apoidea> (Acessado em 10/03/2018).
- Brito, R.M., Caixeiro, A.P.A., Pompolo, S.G., Azevedo, G.G. 2003. Cytogenetic data of *Partamona peckolti* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) by C banding and fluorochrome staining with DA/ CMA<sub>3</sub> and DA/DAPI. *Genetics and Molecular Biology* 26: 53-57.
- Brito, R.M., Pompolo, S.G., Magalhães, M.F.M., Barros, E.G., Sakamoto-Hojo, E.T. 2005. Cytogenetic characterization of two *Partamona* species (Hymenoptera,



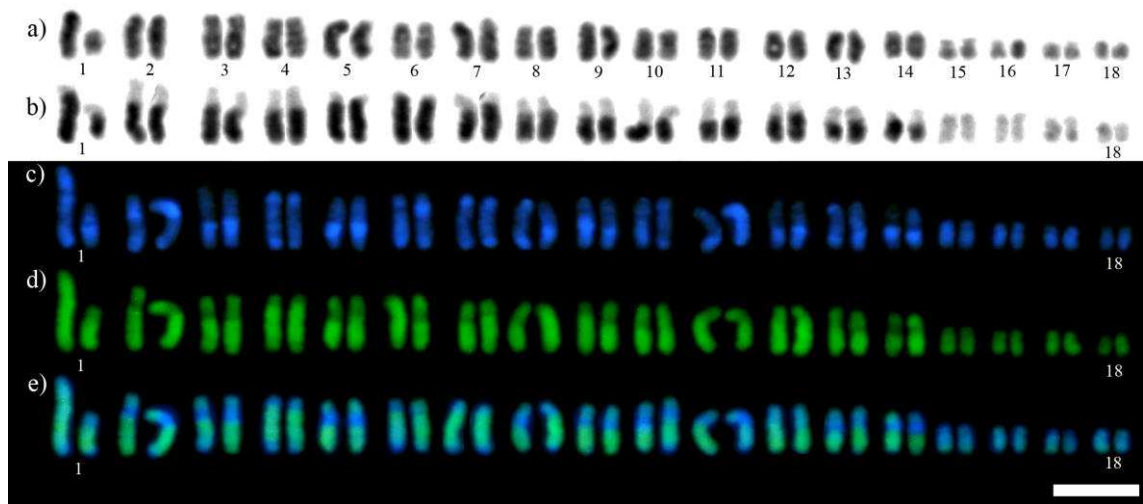
- Apidae, Meliponini) by fluorochrome staining and localization of 18 S rDNA clusters by FISH. *Cytologia* 70: 73-380.
- Camargo, J.M.F., Pedro, S.R.M. 2013. Meliponini Lepeletier, 1836. In Moure, J. S., Urban, D., Melo, G. A. R. (Orgs). Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region - online version. Available at <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Accessed Jan/20/2018.
- Costa, M.A., Pompolo, S.G., Campos, L.A.O. 1992. Supernumerary chromosomes in *Partamona cupira* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Revista Brasileira de Genética*. 15: 801-806.
- Cristiano, M.P., Simões, T.G., Lopes, D.M., das Graças Pompolo, S. 2014. Cytogenetics of *Melitoma segmentaria* (Fabricius, 1804) (Hymenoptera, Apidae) reveals differences in the characteristics of heterochromatin in bees. *Comparative cytogenetics* 8: 223.
- Cunha, M.S., Travenzoli, N.M., Ferreira, R.P., Cassinela, E.K., Silva, H., Salomão, T.M.F., Lopes, D.M. 2018. Comparative cytogenetics in three *Melipona* species (Hymenoptera: Apidae) with two divergent heterochromatic patterns. *Genetics Molecular Biology (no prelo)*.
- Dollin, A.E., Dollin, L. J., Rasmussen, C. 2015. Australian and New Guinean Stingless Bees of the Genus *Austroplebeia* Moure (Hymenoptera: Apidae) a revision. *Zootaxa* 4047: 001-073.
- Dollin, A.L., Dollin, S.F. Sakagami. 1997. Australian stingless bees of the genus *Trigona* (Hymenoptera: Apidae). *Invertebrate Taxonomy* 11: 861-896.
- Duarte, O.M.P., Martins, C.C.C., Waldschmidt, A.M., Costa, M.A. 2009. Occurrence of multiple NORs and intraspecific karyotype variation in *Scaptotrigona xanthotricha* Moure (Hymenoptera, Meliponini). *Genetics and Molecular Research* 8: 831-839.
- Fernandes, A., Werneck, H.A., Pompolo, S.G., Lopes, D.M. 2013. Evidence of separate karyotype evolutionary pathway in *Euglossa* orchid bees by cytogenetic analyses. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 85: 937-944.
- Frydrychová, R., Grossmann, P., Trubac, P., Vítková, M., Marec, F.E. 2004. Phylogenetic distribution of TTAGG telomeric repeats in insects. *Genome* 47: 163-178.
- Godoy, D.C., Ferreira, R.P., Lopes, D.M. 2013. Chromosomal Variation and Cytogenetics of *Plebeia lucii* and *P. phrynostoma* (Hymenoptera: Apidae). *Florida Entomologist* 96: 1559-1566.

- Halcroft, M.T., Dollin, A., Francoy, T.M., King, J.E., Riegler, M., Haigh, A.M., Spooner-Hart, R.N. 2015. Delimiting the species within the genus *Austroplebeia*, an Australian stingless bee, using multiple methodologies. *Apidologie* 47: 76-89.
- Hoshiba, H., Imai, H.T. 1993. Chromosome evolution of bees and wasps (Hymenoptera, Apocrita) on the basis of C-banding pattern analyses. *Japanese Journal of Entomology* 61: 465-492.
- Imai, H.T., Taylor, R.W., Crosland, M.W., Crozier, R.H. 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.
- Lopes, D.M., Fernandes, A., Diniz, D., Scudeler, P.E.S., Foresti, F., Campos, L.A.O. 2014. Similarity of heterochromatic regions in the stingless bees (Hymenoptera: Meliponini) revealed by chromosome painting. *Caryologia* 67:222-226.
- Lopes, D.M., Fernandes, A., Praça-Fontes, M.M., Werneck, H.D.A., Resende, H.C., Campos, L.A.D.O. 2011. Cytogenetics of three *Melipona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Sociobiology* 58: 185-194.
- Lorite, P., Carrillo, J.A., Palomeque, T. 2002. Conservation of (TTAGG)<sub>n</sub> telomeric sequences among ants (Hymenoptera, Formicidae). *Journal of Heredity* 93: 282-285.
- Lorite, P., Palomeque, T. 2010. Karyotype evolution in ants (Hymenoptera: Formicidae), with a review of the known ant chromosome numbers. *Myrmecological News* 13: 89-102.
- Menezes, R.S.T., Carvalho, A.F., Correia, J.P.S.O., Silva, T.S., Somavilla, A., Costa, M.A. 2014. Evolutionary trends in the chromosome numbers of swarm-founding social wasps. *Insectes sociaux* 61: 385-393.
- Meyne, J., Hirai, H., Imai, H.T. 1995. FISH analysis of the telomere sequences of bulldog ants (Myrmecia: Formicidae). *Chromosoma* 104: 14-18.
- Michener, C.D. 1990. Classification of the Apidae (Hymenoptera). *University of Kansas Science Bulletin* 54: 75-164.
- Miranda, R.V., Fernandes, A., Lopes, D.M. 2013. Karyotype description of *Cephalotrigona femorata* Smith (Hymenoptera: Apidae) and the C-banding pattern as a specific marker for *Cephalotrigona*. *Sociobiology* 60: 131-134.
- Pereira, J.O.P. 2006. Diversidade genética da abelha sem ferrão *Melipona quinquefasciata* baseada no sequenciamento das regiões ITS1 parcial e 18S do DNA ribossômico nuclear (Doctoral dissertation, Tese de Doutorado. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará. 142p.

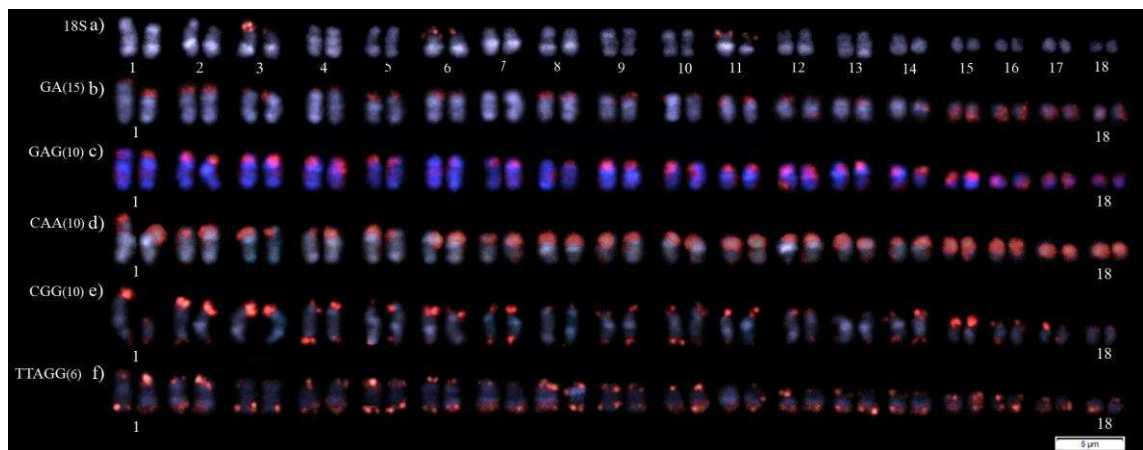
- Pinkel, D., Straume, T., Gray, J.W. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 83: 2934-2938.
- Piccoli, M.C.A., Bardella, V.B., Cabral-de-Mello, D.C. 2018. Repetitive DNAs in *Melipona scutellaris* (Hymenoptera: Apidae: Meliponidae): chromosomal distribution and test of multiple heterochromatin amplification in the genus. *Apidologie*. 1-8.
- Rasmussen, C. 2008. *Catalog of the Indo-Malayan/Australasian stingless bees* (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). Auckland: Magnolia Press.
- Rasmussen, C., Cameron, S.A. 2010. Global stingless bee phylogeny supports ancient divergence, vicariance, and long distance dispersal. *Biological Journal of the Linnean Society* 99: 206-232.
- Robertson, H.M., Gordon, K.H. 2006. Canonical TTAGG-repeat telomeres and telomerase in the honey bee, *Apis mellifera*. *Genome research* 16: 1345-1351.
- Rocha, M.P., Cruz, M.P., Pompolo, S.G., Fernandes, A., Silva, J.C.JR, Waldschmidt, A.M. 2003a. Longitudinal differentiation in *Melipona mandacaia* (Hymenoptera, Meliponini) chromosomes. *Hereditas* 138: 133-137.
- Rocha, M.P., Pompolo, S.G., Campos, L.A.O. 2003b. Citogenética da tribo Meliponini (Hymenoptera, Apidae). In: Melo GAR and Santos IA (eds) *Apoidea Neotropica: Homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure*. UNESCO, Criciúma, pp 311-320.
- Rocha, M.P., Pompolo, S.G. 1998. Karyotypes and heterochromatin variation (C-bands) in *Melipona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Genetics and Molecular Biology* 21: 41-45.
- Rocha, M.P., Pompolo, S.G., Dergam, J.A., Fernandes, A., Campos, L.A.O., 2002. DNA characterization and karyotypic evolution in the bee genus *Melipona* (Hymenoptera, Meliponini). *Hereditas* 136: 19-27.
- Sahara, K., Marec, F., Traut, W. 1999. TTAGG telomeric repeats in chromosomes of some insects and other arthropods. *Chromosome research* 7: 449-460.
- Santos, I.S., Mariano, C.S., Delabie, J.H., Costa, M.A., Carvalho, A.F., Silva, J.G. 2016. Much more than a neck": karyotype differentiation between *Dolichoderus attelaboides* (FABRICIUS, 1775) and *Dolichoderus decollatus* F. SMITH, 1858 (Hymenoptera: Formicidae) and karyotypic diversity of five other Neotropical species of *Dolichoderus* LUND, 1831. *Myrmecological News* 23: 61-69.

- Sumner, A.T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research* 75: 304-306.
- Sumner, A.T. 2003. *Chromosomes: organization and function*. 1st ed. North Berwick: Blackwell publishing, 287p.
- 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.
- Tavares, M.G., Lopes, D.M., Campos, L.A.O. 2017. An overview of cytogenetics of the tribe Meliponine (Hymenoptera: Apidae). *Genetica* 145: 1-18.
- Yamada, K., Kamimura, E., Kondo, M., Tsuchiya, K., Nishida-Umehara, C., Matsuda, Y. 2006. New families of site-specific repetitive DNA sequences that comprise constitutive heterochromatin of the Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*, Cricetinae, Rodentia). *Chromosoma* 115: 36-49.
- Travanzoli, N.M.T. 2018. *Chromosomal evolution in Meliponini: a phylogenetic approach*. Tese, Universidade Federal de Viçosa.

## Figuras



**Fig. 1.** Cromossomos metafásicos mitóticos de *Austroplebeia australis* corados com: Giemsa (a), banda-C (b), DAPI (c), CMA<sub>3</sub> (d) e DAPI-CMA<sub>3</sub> (e). Barra de escala = 5  $\mu$ m.



**Fig. 2.** Hibridização fluorescente *in situ* (FISH) de *Austroplebeia australis*: rDNA 18S (a), GA<sub>(15)</sub> (b), GAG<sub>(10)</sub> (c), CAA<sub>(10)</sub> (d), CGG<sub>(10)</sub> (e) e TTAGG<sub>(6)</sub> (f). Em azul, cromossomos corados com DAPI e em vermelhos, sondas hibridizadas.

### **Karyotypic description and repetitive DNA chromosome mapping of *Melipona interrupta* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Meliponini)**

#### **Abstract**

Cytogenetic patterns for the genus *Melipona* may vary among subgenus species. Here, we describe the karyotype of *Melipona (Melikerria) interrupta* based on the chromosomal heterochromatic patterns, AT and GC content, mapping of rDNA, microsatellites and telomeric regions. We found  $2n=18$  chromosomes, with a high heterochromatin content rich in AT and euchromatic regions in GC. Increased GC content was observed in the interstitial region near the junction of the stained euchromatin and heterochromatin of the first chromosomal pair, the same region stained for the rDNA 18S locus. Microsatellites hybridized only on euchromatin regions and the telomeric probe on terminal regions of all chromosomes. *Melipona (Melikerria) interrupta* belongs to heterochromatic Group II, suggesting there has been an increase in heterochromatin content in *Melikerria*.

**Keywords:** Stingless bee, Cytogenetics, Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH), Heterochromatin, *Melikerria*

#### **1. Introduction**

Bees of the genus *Melipona* Illiger, 1806, are eusocial insects belonging to the Meliponini tribe and are present throughout the Neotropical region (Michener 2007; Camargo and Pedro 2013). This genus is represented by 73 species, 43 of which can be found in Brazil (Camargo and Pedro 2013; Pedro 2014). Morphologically, the genus *Melipona* is grouped into four subgenera: *Eomelipona*, *Melikerria*, *Melipona stricto sensu*, and *Michmelia* (Camargo and Pedro 2013). The *Melikerria*, *Melipona stricto sensu*, and *Michmelia* subgenera are considered monophyletic, whereas *Eomelipona* is polyphyletic (Rasmussen and Cameron 2010; Ramírez et al. 2010).

Cytogenetically, only 25 of all the *Melipona* species have had their karyotypes described. These species are characterized by a conserved diploid number of  $2n=18$  chromosomes in females and  $n=9$  in males, except *M. seminigra merrilae* and *M. seminigra pernigra*, with  $2n=22$  (Francini et al. 2011), in addition to two patterns of

heterochromatin distribution that differ from that in the other species in the Meliponini tribe (reviewed in Tavares et al. 2017; Cunha et al. 2018 *in press*). The genus can be divided into two groups based on this pattern of distribution and heterochromatin content: Group I is composed of species with a low heterochromatin content present only in the pericentromeric regions, similar to that in the other Meliponini; and Group II is formed of species with a high heterochromatin content that covers large extensions of their chromosomes (Rocha and Pompolo 1998; Rocha et al. 2002).

Of all the analyzed species, all those belonging to the *Eomelipona* and *Melipona stricto sensu* subgenera present low levels of heterochromatin, whereas all those of the subgenus *Michmelia* have high levels of heterochromatin (Rocha and Pompolo 1998; Rocha et al. 2002; Rocha et al. 2003; Lopes et al. 2011; Cunha et al. 2018 *in press*). However, *Melikerria* is the only subgenus with only two species with described heterochromatic pattern: *Melipona fasciculata* Smith, 1854, with high content of heterochromatin and *Melipona quinquefasciata* Lepeletier, 1836 with a low content (Rocha et al. 2002; Lopes et al. 2011; Rocha 2002), making heterochromatic evolution in this group difficult to elucidate. Thus, cytogenetic studies with other species of the subgenus *Melikerria* are necessary since they may help to elucidate the processes leading to the chromosomal alterations in the genus.

Consequently, the objective of this study was to characterize the karyotype of *Melipona (Melikerria) interrupta* based on the heterochromatin distribution pattern and chromosomal regions rich in Guanine-Cytosine (GC) and Adenine-Thymine (AT) base pairs, as well as mapping the ribosomal 18S DNA sites, the microsatellites GA<sub>(15)</sub>, GAG<sub>(10)</sub>, CAA<sub>(10)</sub>, and CGG<sub>(10)</sub>, and the regions containing telomeric TTAGG<sub>(6)</sub> sequences.

## 2. Material and methods

Larvae of *Melipona (Melikerria) interrupta* were collected from colonies of the Meliponário of the Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, Amazônia, Brazil. Mitotic chromosomes were obtained from the larval brain ganglia at the last larval instar as described by Imai et al. (1988), and stained with Giemsa. The heterochromatin regions were visualized by the C-band technique (Sumner 1972) and the DAPI and CMA3 fluorochromes were used according to Schweizer (1980). Fifteen individuals were used, with 10 metaphases being analyzed on average for each slide. The images were obtained with an Olympus BX60 epifluorescence microscope, using Olympus Q-Color3™ software Olympus® images.

Fluorescent in situ Hybridization (FISH) was performed according to Pinkel et al. (1986), with modifications. The 18S ribosomal DNA probe was labeled with digoxigenin-11-dUTP (Roche Applied Science) and the signal was detected with anti-digoxigenin-rhodamine (Roche Applied Science). This probe was obtained by Polymerase Chain Reaction (PCR) amplification, using the primers F1(5'-GTCATATGTTGTCTCAAAGA-3') and 18SR1.1 (3'-TCTAATTTTTTCAAAGTAAACGC-5') designed for the species *Melipona quinquefasciata* (Pereira 2006). The microsatellites GA<sub>(15)</sub>, GAG<sub>(10)</sub>, CAA<sub>(10)</sub>, CGG<sub>(10)</sub>, and TTAGG<sub>(6)</sub> were labeled directly with Cy3 in the 5' regions (Sigma, St. Louis, MO, USA). The metaphase images were obtained with an Olympus BX53 microscope fitted with an Olympus DP73F camera, using the CellSens Imaging software.

### 3. Results and discussion

The chromosomal number observed in *M. (Melikerria) interrupta* was  $2n=18$  (Fig. 1a) corroborating the findings of Barbosa (2018), which does not differ from that reported by Kerr (1969, 1972) and follows the pattern of high heterochromatin content identified for most species of this genus (revised in Cunha et al. 2018 *in press*). The C-band heterochromatic pattern revealed a karyotype with a high heterochromatin content (Fig. 1b), making visualization of the centromere difficult; consequently, we could not identify chromosome morphology to determine the karyotype of the species. Based on the heterochromatic patterns, *M. (Melikerria) interrupta* can be classified as belonging to the group composed of species with more than 50% heterochromatin coverage, designated as Group II by Rocha and Pompolo et al. (1998). As *M. (Melikerria) interrupta* the species *M. (Melikerria) fasciculata* was similarly classified as belonging to this group (Lopes et al. 2011). Although it does not have a described heterochromatic pattern, the species *M. (Melikerria) grandis* contains a high amount of DNA compared with species with a low heterochromatin content (Tavares et al. 2010), suggesting it could also be classified as belonging to Group II. Unlike the other species of the *Melikerria* subgenus where the heterochromatic patterns have been studied, *M. (Melikerria) quinquefasciata* has a low heterochromatin content (Rocha et al. 2007), indicating that *M. quinquefasciata* may be evolving independently within the group and that, as in the subgenus *Michmelia*, there may have been an increase in the levels of heterochromatin in the karyotype of the *Melikerria* species.

Staining with the base-specific fluorophores, DAPI and CMA3, indicated that the heterochromatic regions were DAPI<sup>+</sup> (Fig. 1c) and the euchromatic regions were



CMA3<sup>+</sup>. Stronger labeling with CMA3 was seen in the interstitial region near the euchromatin and heterochromatin junction of the first chromosomal pair (Fig. 1d), coincident with the hybridization site of the 18S rDNA probe (Fig. 2a). Staining with DAPI has shown that heterochromatin in eusocial bees is generally AT-rich (Brito et al. 2003; Rocha et al. 2003; Lopes et al. 2011; Godoy et al. 2013) a characteristic shared by *Melipona* species that contain either high or low levels of heterochromatin. The CMA3<sup>+</sup> regions coincident with the rDNA sites differ between species and can be used to distinguish between Groups I and II, corroborating the division of *Melipona* into two groups as proposed by Rocha and Pompolo (2002).

Although the numbers of CMA3<sup>+</sup> markers and 18S ribosomal loci on a single pair of chromosomes are conserved traits in the genus (Cunha et al. 2018 *in press*), the chromosomal positions differ among species, even in those with a high heterochromatin content. According to the results of CMA3<sup>+</sup> and rDNA marker labeling, species with a low heterochromatin content exhibited pericentromeric labeling in the first chromosome pair, while Group II species showed terminal labeling (reviewed in Cunha et al. 2018 *in press*). Although *M. (Melikerria) interrupta* is classified as belonging to Group II, CMA3<sup>+</sup> and rDNA labeling was seen in the interstitial region of the first chromosomal pair. *Melipona fasciculata*, which belongs to the same subgenus, also showed CMA3<sup>+</sup> labeling in this region (Lopes et al. 2011), contrary to that observed in the other species with high heterochromatin content (reviewed in Cunha et al. 2018 *in press*). These results suggest that variation in the positions of GC- and 18S rDNA-rich sites may be the result of divergent heterochromatin evolutionary pathways in this genus.

The microsatellite probes GA<sub>(15)</sub>, GAG<sub>(10)</sub>, CAA<sub>(10)</sub>, and CGG<sub>(10)</sub> labeled only euchromatin regions (Fig. 2b-e), while the telomeric probe TTAGG<sub>(6)</sub> showed staining in the terminal regions of the chromosomes of *M. (Melikerria) interrupta* (Fig. 2f). This staining pattern in regions of euchromatin was also observed in the chromosomal mapping of *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 using different repetitive DNA sequences (CA<sub>(15)</sub>, GAC<sub>(10)</sub>, and TAA<sub>(10)</sub>) (Piccoli et al. 2018). The TTAGG<sub>(6)</sub> labeling on the terminal regions of the chromosomes indicated the presence of the TTAGG sequence in the telomeric sites in the karyotype of *M. (Melikerria) interrupta*, as has also been reported for *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Sahara et al. 1999).

We conclude that *M. (Melikerria) interrupta* is classified as belonging to Group II based on heterochromatic patterns, which suggests an increase in the amount of heterochromatin in the subgenus *Melikerria*. It further suggests that the *M. quinquefasciata* species may be evolving independently in the group, and that the

differences in the CMA3 and 18S marker regions seen only in the species of *Melikerria* with high heterochromatin content are an important feature to be investigated further.

## 5. Acknowledgment

The “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)”, “Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)” and the “Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM)”.

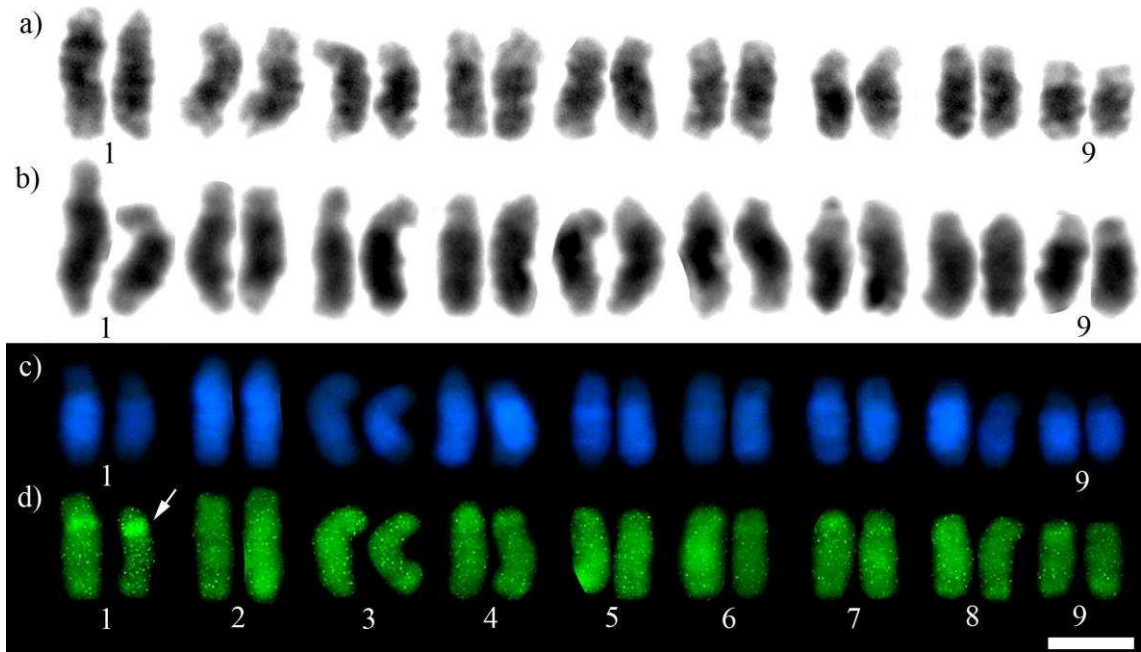
## 6. Bibliographic references

- Barbosa, I.C.O. (2018) Caracterização citogenética e análise do perfil de metilação em *Melipona seminigra* e *Melipona interrupta* (Hymenoptera, Apidae). Dissertation, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. 42pp.
- Brito, R.M., Caixeiro, A.P.A., Pompolo, S.G., Azevedo, G.G. (2003) Cytogenetic data of *Partamona peckolti* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) by C banding and fluorochrome staining with DA/ CMA<sub>3</sub> and DA/DAPI. Genet. Mol. Biol. **26** (1), 53-57.
- Camargo, J.M.F., Pedro, S.R.M. (2013) Meliponini Lepeletier, 1836. In Moure, JS, Urban, D. and Melo, GA R (Orgs). Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region - online version. Available at <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Accessed 18 May 2018.
- Cunha, M.S., Travenzoli, N.M., Ferreira, R.P., Cassinela, E.K., Silva, H., Salomão, T.M.F, Lopes, D.M. (2018) Comparative cytogenetics in three *Melipona* species (Hymenoptera: Apidae) with two divergent heterochromatic patterns. Genet. Mol. Biol. *in press*.
- Francini, I.B., Gross, M.C., Nunes-Silva, C.G., Carvalho-Zilse, G.A. (2011) Cytogenetic analysis of the Amazon stingless bee *Melipona seminigra merrillae* reveals different chromosome number for the genus. Sci. Agric. **68** (5), 592-593.
- Godoy, D.C., Ferreira, R.P., Lopes, D.M. (2013) Chromosomal Variation and Cytogenetics of *Plebeia lucii* and *P. phrynostoma* (Hymenoptera: Apidae). Fla. Entomol. **96** (4), 1559-1566.
- Imai, H.T., Taylor, R.W., Crosland, M.W., Crozier, R.H. (1988) Modes of spontaneous chromosomal mutation and karyotype evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis. JPN J. Genet. **63** (2), 159-185.
- Kerr, W.E. (1969) Some aspects of the Evolution of social bees. Evol. Biol. **3**, 119-175.

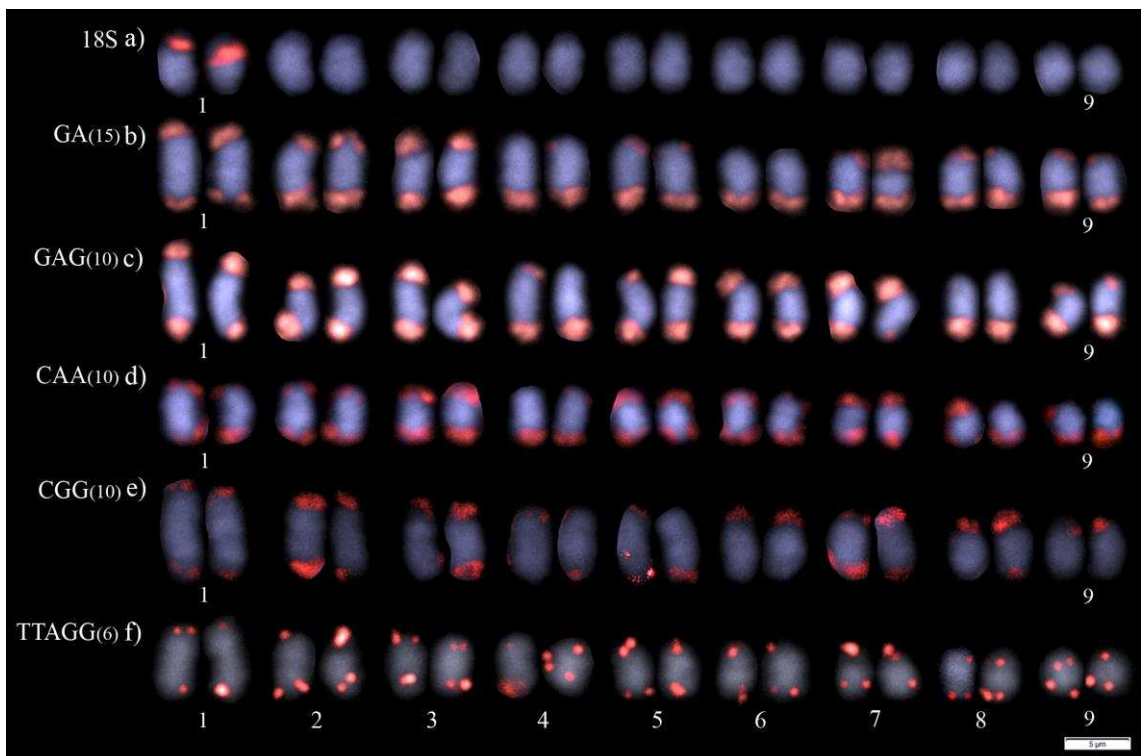
- Kerr, W.E. (1972) Number of chromosomes in some species of bees. *J. Kansas Entomol. Soc.* **45**, 111-122.
- Lopes, D.M., Fernandes, A., Praça-Fontes, M.M., Werneck, H.A., Resende, H.C., Campos, L.A.O. (2011) Cytogenetics of three *Melipona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Sociobiology* **57** (2), 185-194.
- Michener, C.D. (2007) *The bees of the world*. The John Hopkins University Press, Baltimore, Maryland.
- Pedro, S.R.M. (2014) The stingless bee fauna in Brazil (Hymenoptera: Apidae). *Sociobiology* **61** (4), 348-354.
- Pereira, J.O.P. (2006) Diversidade genética da abelha sem ferrão *Melipona quinquefasciata* baseada no sequenciamento das regiões ITS1 parcial e 18S do DNA ribossômico nuclear. Thesis, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará.
- Piccoli, M.C.A., Bardella, V.B., Cabral-de-Mello, D.C. (2018). Repetitive DNAs in *Melipona scutellaris* (Hymenoptera: Apidae: Meliponidae): chromosomal distribution and test of multiple heterochromatin amplification in the genus. *Apidologie* **49** (4), 497-504.
- Pinkel, D., Straume, T., Gray, J.W. (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83** (9), 2934-2938.
- Ramírez SR, Nieh JC, Quental TB, Roubik DW, Imperatriz-Fonseca VL, Pierce NE (2010) A molecular phylogeny of the stingless bee genus *Melipona* (Hymenoptera: Apidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* **56** (2), 519-525.
- Rasmussen, C., Cameron, A.S. (2010) Global stingless bee phylogeny supports ancient divergence, vicariance, and long distance dispersal. *Biol. J. Linn. Soc.* **99** (1), 206-232.
- Rocha, M.P. (2002) Análises citogenéticas em abelhas do gênero *Melipona* (Hymenoptera, Meliponini). Dissertation, Universidade Federal de Viçosa.
- Rocha, M.P., Cruz, M.P., Fernandes, A., Waldschmidt, A.M., Silvajúnior, J.C., Pompolo, S.G. (2003) Longitudinal differentiation in *Melipona mandacaia* (Hymenoptera, Meliponini) chromosomes. *Hereditas* **138** (2), 133-137.
- Rocha, M.P., Pompolo, S.G. (1998) Karyotypes and heterochromatin variation (C-bands) in *Melipona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Genet. Mol. Biol.* **21** (1), 41-45.

- Rocha, M.P., Pompolo, S.G., Dergam, J.A., Fernandes, A., Campos, L.A.O. (2002) DNA characterization and karyotypic evolution in the bee genus *Melipona* (Hymenoptera, Meliponini). *Hereditas* **136** (1), 19-27.
- Rocha, M.P., Pompolo, S.G., Fernandes, A., Campos, L.A.O. (2007) *Melipona*: Six decade of cytogenetic. *Biosc. J.* 1, 111-117.
- Sahara, K., Marec, F., Traut, W. (1999) TTAGG telomeric repeats in chromosomes of some insects and other arthropods. *Chromosome Research* **7** (6), 449-460.
- Schweizer, D. (1980). Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA-DAPI bands) in human chromosomes. *Cytogen. Cell. Genet.* **27** (6), 190-193.
- Sumner, A.T. (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell. Res.* **75** (1), 304-306.
- Tavares, M.G., Lopes, D.M., Campos, L.A.O. (2017) An overview of cytogenetics of the tribe Meliponine (Hymenoptera: Apidae). *Genetica* **145** (6), 1-18.

**Figures**



**Figure 1.** Mitotic metaphase chromosomes of *Melipona (Melikerria) interrupta* stained with Giemsa (a), C- banding (b), DAPI (c), and CMA<sub>3</sub> (d). Scale bar = 5  $\mu$ m.



**Figure 2.** Patterns obtained in metaphase chromosomes of *Melipona (Melikerria) interrupta* with FISH using the following repetitive DNA probes: 18S (a), GA<sub>(15)</sub> (b), GAG<sub>(15)</sub> (c), CAA<sub>(10)</sub> (d), CGG<sub>(10)</sub> (e), and TTAGG<sub>(6)</sub> (f). In blue: chromosomes stained with DAPI. In red: regions hybridized with probes.

### Revisão citogenética e mapeamento cromossômico de DNAs repetitivos em *Melipona* Illiger, 1806 (Hymenoptera: Meliponini)

#### Resumo

As espécies do gênero *Melipona* são morfologicamente subdivididas entre os subgêneros *Eomelipona*, *Melikerria*, *Melipona stricto sensu* e *Michmelia*. Citogeneticamente as espécies desse gênero possuem  $2n=18$  cromossomos e características heterocromáticas as quais permitem separá-los em dois grupos: Grupo I formado por espécies com baixo conteúdo de heterocromatina e Grupo II formado por espécies com alto conteúdo de heterocromatina. Esses padrões heterocromáticos e o número de cromossomos são características exclusivas de *Melipona* e as distinguem dos demais subgêneros da tribo Meliponini. Assim, para melhor compreender a organização cromossômica em *Melipona* e sua relação dentro dos subgêneros, foi realizado uma análise comparativa dos dados citogenéticos existentes na literatura e um mapeamento das sequências repetitivas, buscando novos marcadores citogenéticos que possam auxiliar no entendimento da organização e evolução cromossômica do gênero. A maioria das espécies de *Melipona* possuem  $2n=18$  cromossomos e cariótipos constituídos, em sua maioria, por cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, nas espécies em que foi possível visualizar o centrômero. As espécies de cada grupo compartilham entre si as mesmas características em relação às regiões de heterocromatina, marcações com os fluoróforos DAPI-CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> e o número e distribuição dos sítios de rDNA 18S. Os microssatélites marcaram apenas a região de eucromatina, com localizações distintas entre as espécies dos dois grupos e o microssatélite TTAGG<sub>(6)</sub> hibridizou em todos os sítios teloméricos. Nossos dados mostram que *Melipona*, além do número cromossômico, possui características citogenéticas conservadas e padrões compartilhados pelas espécies do Grupo I, as quais diferem do Grupo II. Além disso, as características citogenéticas em geral foram constantes dentre dos subgêneros, com exceção de *M. capixaba* e *M. scutellaris*. Nossos dados confirmam a separação morfológica em quatro subgêneros e sugerem que o subgênero *Michmelia* deva ser revisto.

**Palavras-chave:** Citogenética molecular, Constituição Nucleotídica, Eucromatina, Heterocromatina, Hibridização Fluorescente *in situ*

## 1. Introdução

As espécies do gênero *Melipona* Illiger, 1806, são insetos sociais pertencentes à tribo Meliponini e estão distribuídas em toda a região neotropical (Camargo & Pedro, 2013; Michener, 2013). Baseados nos caracteres morfológicos esse gênero pode ser dividido nos subgêneros *Eomelipona*, *Melikerria*, *Melipona stricto sensu* e *Michmelia* (Camargo & Pedro, 2007). Estudos filogenéticos indicam que *Eomelipona* é polifilético e os demais subgêneros monofiléticos (Ramírez *et al.*, 2010; Rasmussen & Cameron, 2010). Citogeneticamente *Melipona* possui o maior número de estudos entre os Meliponini (revisado em Tavares *et al.*, 2017). De acordo com as análises cariotípicas, o gênero caracteriza-se por apresentar um número cromossômico de  $2n=18$  para fêmeas e  $n=9$  para os machos (revisado em Tavares *et al.*, 2017) e padrões de distribuição e quantidade de heterocromatina que as distinguem das demais espécies de Meliponini. Baseados nesse padrão, *Melipona* possui espécies com baixa quantidade heterocromatina (Grupo I), tais como, *Melipona bicolor* Lepeletier, 1836 e *Melipona subnitida* Ducke, 1910 com 8% e 17% do cariótipo constituído por regiões heterocromáticas, respectivamente. E espécies com alta quantidade de heterocromatina (Grupo II) como *Melipona crinita* Moure & Kerr, 1950 com 54%, *Melipona fasciculata* Smith, 1854 com 61% e *Melipona fuscopilosa* Moure & Kerr, 1950, em que 73% do cariótipo é constituído de heterocromatina (Rocha *et al.*, 2002). A grande quantidade heterocromática presente nas espécies do Grupo II, não permitiu, até o momento, visualizar o centrômero desses cromossomos, o que dificulta a descrição da fórmula cariotípica e marcadores citogenéticos que possam ser utilizados para a identificação das espécies. Nesse contexto, tanto esse padrão heterocromático quanto o número cromossômico típico e exclusivo as abelhas do gênero *Melipona* ( $2n=18$ ), podem indicar uma evolução cariotípica diferente para essas espécies.

Assim, para compreender a organização cromossômica em *Melipona* e como essas características estão distribuídas nos subgêneros foi realizada uma análise comparativa das informações citogenéticas existentes na literatura para *Melipona* e um mapeamento físico de sequências repetitivas, em 16 espécies, a fim de que novos marcadores citogenéticos possam auxiliar no entendimento da evolução cariotípica do grupo.

## 2. Materiais e Métodos

Foi realizado um levantamento dos dados citogenéticos descritos na literatura para as espécies de *Melipona* baseados em estudos de número cromossômico, fórmula cariotípica, padrões de distribuição da heterocromatina, regiões ricas em pares de base AT e GC (DAPI-CMA<sub>3</sub>), rDNA e outros DNAs repetitivos.

Para a realização das análises citogenéticas moleculares foram utilizadas larvas de 16 espécies de *Melipona* (*M. asilvai*, *M. bicolor*, *M. capixaba*, *M. fasciculata*, *M. flavolineata*, *M. fuliginosa*, *M. mandacaia*, *M. mondury*, *M. paraensis*, *M. puncticollis*, *M. quadrifasciata*, *M. quinquefasciata*, *M. rufiventris*, *M. scutellaris*, *M. seminigra pernigra* e *M. subnitida*) coletadas em 10 cidades do Brasil (Tabela 1).

Os cromossomos metafásicos mitóticos foram obtidos do gânglio cerebral de larvas no último estágio do instar conforme descrito por Imai *et al.* (1988) e corados com Giemsa. Para a descrição da fórmula cariotípica seguiu-se as proporções de braço segundo Levan *et al.* (1964). As sondas de oligonucleotídeos com sequências GA<sub>(15)</sub>, GAG<sub>(10)</sub>, CAA<sub>(10)</sub>, CGG<sub>(10)</sub> e TTAGG<sub>(6)</sub> foram marcadas diretamente com Cy3 (Sigma (St. Louis, MO, USA)) e o mapeamento realizado pela técnica de Híbridação *in situ* Fluorescente (FISH) segundo Pinkel *et al.* (1986), com modifica es (as metáfases foram desnaturadas em formamida 70% a 75  C por 5 min). Em todas as análises foram utilizados 15 indivíduos por espécie e 10 metáfases, em média, para cada lâmina. Todas as imagens das metáfases foram obtidas em microscópio Olympus BX53, com câmera DP73F Olympus, utilizando-se o software CellSens Imaging.

## 3. Resultados e discussão

### 3.1 Número diploide e fórmula cariotípica

Das 73 espécies descritas para o gênero *Melipona*, 25 já foram analisadas citogeneticamente (Tabela 2). As primeiras descri es cariotípicas do gênero foram realizadas em 1948 com a descri o do número de cromossomos de  $2n=18$  para *Melipona marginata* Lepelletier, 1836. Com exce o de *Melipona seminigra merrillae* Cockerell, 1919 e *M. seminigra pernigra* Moure & Kerr, 1950 (ambas com  $2n=22$ ) todas as outras espécies apresentam  $2n=18$  cromossomos, o que evidencia que esse número cromossômico é uma característica conservada nas espécies de *Melipona* (Cunha *et al.*, 2018 *no prelo*). Em abelhas, de maneira geral, observa-se pouca varia o no número cromossômico dentro de cada gênero, tanto em espécies sociais *Bombus*



Smith, 1869 ( $n=18$ ), *Frieseomellita* Ihering, 1912 ( $n=15$ ), *Partamona* Schwarz, 1939 ( $n=17$ ) e *Trigona* Jurine, 1807 ( $n=17$ ) (Owen et al., 1995; revisado em Tavares *et al.*, 2017), quanto solitárias (*Euglossa* Nemésio 2009 ( $n=21$ )) (Fernandes *et al.*, 2013). Provavelmente, muitas alterações cromossômicas sejam pouco suportadas por esses organismos. Outra possibilidade é que por serem haplodiploides mutações sejam transmitidas mais lentamente e grandes variações sejam observadas apenas entre espécies mais distantes filogeneticamente. Entretanto, em formigas que também são haplodiploides, existe grande variação do número de cromossomos em espécies do mesmo gênero, tais como em *Dolichoderus* ( $2n=10, 18, 20, 22, 28$  e  $38$ ) (revisado em Cardoso et al., 2018), *Mycetophylax* ( $2n=13, 15$  e  $18$ ) Emery, 1913 (Cardoso *et al.*, 2014) e *Trachymyrmex* Forel, 1983 ( $2n=12, 18, 20$  e  $22$ ) (revisado em Barros *et al.*, 2018). Tais dados evidenciam que outros mecanismos devem ser responsáveis pela baixa variabilidade numérica dos cariótipos das abelhas.

Embora o número cromossômico seja conservado em *Melipona*, as diferentes fórmulas cariotípicas das espécies (Tabela 2) demonstram a ocorrência de rearranjos cromossômicos na evolução do grupo. O elevado número de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos (Rocha e Pompolo, 1998; Rocha *et al.*, 2002; Rocha *et al.*, 2003; Cunha *et al.*, 2018) nos cariótipos corroboram a sugestão de que fusões cêntricas repetidas sejam responsáveis pela diminuição do número cromossômico em *Melipona* (Travenzoli *et al.*, 2018).

### 3.2 Polimorfismo cromossômico

Em *Melipona*, dois tipos de polimorfismos cromossômicos são encontrados, os numéricos e os estruturais. Polimorfismos numéricos foram observados em *M. rufiventris* e *Melipona quinquefasciata* devido à presença de cromossomos B. Nessas duas espécies esses cromossomos são pequenos e heterocromáticos (Rocha *et al.*, 2002, Lopes *et al.*, 2008) e podem variar de um a quatro no cariótipo de *M. quinquefasciata* (Rocha, 2002) e de apenas um em *M. rufiventris* (Lopes *et al.*, 2008). O cromossomo B de *M. rufiventris* mostrou se DAPI<sup>+</sup> e CMA<sub>3</sub><sup>-</sup> semelhante à constituição da heterocromatina dos cromossomos do complemento A, sugerindo que o cromossomo ele pode ter derivado de uma fissão de região heterocromática dos cromossomos do genoma A (Lopes *et al.*, 2008) (Tabela 2). Em *M. quinquefasciata*, foi observado que embora a espécie apresente baixo conteúdo de heterocromatina o cromossomos B apresenta constituição molecular e alto conteúdo de heterocromatina assim como as espécies do Grupo II (Rocha, 2002). Possivelmente, a origem dos cromossomos B em

*M. quinquefasciata* seria por amplificação e posterior clivagem da heterocromatina em cromossomos de uma espécie semelhante às de baixo conteúdo de heterocromatina (Rocha, 2002).

Já o polimorfismo estrutural está relacionado com diferenças de tamanhos entre os cromossomos homólogos e foi observado em um número maior de espécies. Em *Melipona mondury* e *M. rufiventris*, a quantidade adicional de heterocromatina foi sugerida como a responsável pela diferença no tamanho dos cromossomos homólogos do primeiro par (Lopes *et al.*, 2008). Já em *M. scutellaris* (Piccoli *et al.*, 2018), *Melipona asilvai*, *M. bicolor*, *Melipona capixaba*, *Melipona crinita*, *Melipona fasciculata*, *M. quadrifasciata*, *M. marginata* e *M. seminigra*, foram detectados polimorfismos no tamanho das marcas CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> (Rocha *et al.*, 2002; Lopes *et al.*, 2011). Esses polimorfismos podem estar relacionados à regulação gênica entre os cromossomos homólogos, geralmente relacionadas às Regiões Organizadoras de Nucléolo (NOR) (Rocha *et al.*, 2002) visto a pequena variação no tamanho entre os cromossomos homólogos.

De todas as espécies analisadas, uma de duas colônias de *M. capixaba* e *M. flavolineata* apresentaram um polimorfismo no primeiro par cromossômico, presente em todas as metáfases dos indivíduos analisados (Fig. 2; Tabela 3). Em ambas as espécies, foi observado um cariótipo homomórfico em que o primeiro par com dois cromossomos de maior tamanho em uma colônia e um cariótipo heteromórfico, em que um dos cromossomos possui homólogos possuía metade do tamanho, em outra colônia (Fig. 2c-d, g-h). Em *M. capixaba* foi observado que o cromossomo homólogo de menor tamanho estava presente apenas nas fêmeas, diferentemente de *M. flavolineata* em que machos e fêmeas apresentavam o cromossomo de menor tamanho (Fig. 2c, g-h). A presença do polimorfismo cromossômico estrutural em *M. capixaba* e *M. flavolineata* não havia sido registrado nas descrições cariotípicas dessas espécies (Rocha & Pompolo, 1998; Rocha *et al.*, 2002; Lopes *et al.*, 2011). As variações observadas no tamanho destes cromossomos homólogos do primeiro par nestas espécies, não parecem ser explicadas pelas diferenças dos das marcações de CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> ou de rDNA. Assim a melhor explicação é que tais polimorfismos, com grande variação dos tamanhos entre os cromossomos do primeiro par, até o momento observados apenas em espécies com alto conteúdo de heterocromatina sejam provenientes do crescimento diferenciado da região de heterocromatina.

### 3.3 Padrões heterocromáticos e composição da cromatina

Os estudos citogenéticos de *Melipona* iniciaram com Kerr em 1948. Mesmo após um aumento no número de espécies com cariótipos analisados, foram encontrados sempre dois padrões de distribuição e quantidade de heterocromatina, obtido pela técnica de banda-C. Esses padrões permitem dividir o gênero em dois grupos: o primeiro reúne espécies com baixa quantidade de heterocromatina, localizadas na região pericentromérica dos cromossomos e o segundo, agrupa as espécies que apresentam alta quantidade de heterocromatina dispersa ao longo dos cromossomos (Rocha e Pompolo, 1998; Cunha *et al.*, 2018 *no prelo*). Tavares *et al.* (2010) verificaram uma variação do conteúdo de DNA entre as espécies do gênero coincide com os grupos de alto e baixo conteúdo heterocromático, indicando que essas variações são decorrentes do aumento ou perda de heterocromatina. Uma exceção foi *M. quinquefasciata*, que embora possua com baixa quantidade de heterocromatina nos cromossomos, apresentou alto teor de DNA. Os autores sugerem que esse alto valor de DNA seja devido à presença de cromossomos B encontrados no cariótipo dessa espécie (Tavares *et al.*, 2010). Dentre as espécies do Grupo I, *M. subnitida* é a que possui o cariótipo com maior quantidade de heterocromatina (17%) (Rocha *et al.*, 2002), possivelmente devido à presença de um grande bloco heterocromático na região pericentromérica de um dos pares cromossômicos, o qual não foi observado em nenhuma outra espécie de baixo conteúdo de heterocromatina. Independente do grupo, em todas as espécies a heterocromatina é rica em pares de bases AT como demonstrado pelas marcações de DAPI positivas.

Quando relacionamos esses padrões de heterocromatina com os subgêneros verificamos que todas as espécies do subgênero *Eomelipona* e *Melipona stricto sensu* possuem baixa quantidade de heterocromatina e as de *Michmelia* alta quantidade de heterocromatina. Já no subgênero *Melikerria*, duas das três espécies cariotipadas possuem alta quantidade de heterocromatina e uma, baixa quantidade (Rocha *et al.*, 2002). Estudos realizados por Lopes *et al.* (2011), Cunha *et al.* (2018 *no prelo*) e Piccoli *et al.* (2018) correlacionando esse padrão característico de *Melipona* com a proposta filogenética do gênero, em que o subgênero *Eomelipona* é polifilético e *Michmelia*, *Melikerria* e *Melipona stricto sensu* monofiléticos (Ramírez *et al.*, 2010; Rasmussen & Cameron, 2010), sugerem que, possivelmente, a heterocromatina surgiu em diferentes momentos ao longo da história evolutiva de *Melipona* e que as baixas quantidades de heterocromatina nos cromossomos indicam uma condição ancestral.

Adicionalmente, as espécies de *Melipona* analisadas citogeneticamente no presente estudo ou por outros autores apresentaram duas marcações mais evidentes em

um par de cromossomos do fluoróforo base-específico CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>, coincidentes com marcações para rDNA (Rocha *et al.*, 2002; Cunha *et al.*, 2018 *no prelo*) (Tabela 2). Outros gêneros de Meliponini (*Partamona* e *Scaptotrigona* Moure, 1942) também apresentam correlações entre as regiões DAPI<sup>+</sup> e as regiões de heterocromatina e as marcações CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> com os sítios gênicos de DNA ribossomal (rDNA) 18S (Brito *et al.*, 2005; Duarte *et al.*, 2009). Diferentemente da constância das marcações de CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> em *Melipona*, a localizações de sítios para rDNA foram diferentes entre as espécies. Nos subgêneros *Eomelipona* e *Melipona stricto sensu*, cujas espécies apresentam baixo conteúdo heterocromático, a marcação estava presente na região pericentromérica do primeiro par cromossômico. Em *Michmelia*, que engloba espécies de alto conteúdo heterocromático, as marcações encontram-se na região terminal dos cromossomos. No entanto, no subgênero *Melikerria*, as duas espécies com alta quantidade de heterocromatina (*M. fasciculata* e *M. interrupta* Latreille, 1811) apresentaram marcações na região intersticial próxima a junção da eucromatina e heterocromatina do primeiro par cromossômico, diferentemente das espécies de alto conteúdo de heterocromatina do subgênero *Michmelia*. Por outro lado, em *M. quinquefasciata*, também do mesmo subgênero *Melikerria*, a marcação foi observada na região pericentromérica do par cromossômico, assim como as demais espécies do Grupo I dos subgêneros *Eomelipona* e *Melipona stricto sensu* (Tabela 2). Essas diferenças na posição dos sítios de riqueza em CG e de rDNA 18S nos cariótipos de *Melipona* foram sugeridos como, possivelmente, resultado dos diferentes caminhos evolutivos das regiões heterocromática (Travenzoli *et al.*, 2018).

A localização dos microssatélites GA<sub>(15)</sub>, GAG<sub>(10)</sub>, CAA<sub>(10)</sub> e CGG<sub>(10)</sub> foram coincidentes com as regiões de eucromatina. Nas espécies do Grupo I as marcações localizaram-se ao longo dos braços cromossômicos, enquanto nas espécies do grupo II as marcações foram restritas as regiões terminais (Fig. 3a-c, 4a-c, 5a-c e 6a-c). Resultados semelhantes foram observados em outros Meliponini: *M. scutellaris* (Piccoli *et al.*, 2018), *M. interrupta* (Travenzoli *et al.*, 2018), *Partamona chapadicula* Pedro & Camargo, 2003, *Partamona helleri* (Friese, 1900) e *Partamona nhambiquara* Pedro & Camargo, 2003 (Lopes, com. Pessoal), *Trigona spinipes* (Ferreira *et al.*, 2015), *Nannotrigona punctata* (Smith, 1854) e em *Scaptotrigona bipunctata* (Lepeletier, 1836) (Novaes *et al.*, 2015). Em *M. quinquefasciata* não foram observadas marcações no cromossomo B heterocromático, independentemente das sondas utilizadas. Isso mostra que a heterocromatina desses cromossomos deve apresentar outros tipos de DNA repetitivo.

Estudos realizados por Lopes *et al.* (2014) demonstraram em *M. rufiventris* que a heterocromatina parece ser constituída por sequências compartilhadas por todos os cromossomos e que estas são diferentes da heterocromatina de *Tetragonisca fiebrigi*. Piccoli *et al.* (2018) obtiveram resultados semelhantes com *M. scutellaris*, indicando uma similaridade entre as sequências de heterocromatina dessa espécie. Além disso, eles observaram que essas sequências foram encontradas em espécies de alto conteúdo heterocromático pertencentes ao mesmo subgênero, mas não entre subgêneros diferentes. Análises de sequenciamento poderão indicar se essas sequências se referem a alguma família de DNA satélite ou elementos transponíveis.

Exceções a esse padrão de marcações de microssatélites repetitivos em regiões de eucromatina foram observados nos cariótipos de *M. capixaba* Moure & Camargo, 1994 e *M. scutellaris* Latreille, 1811 em que a sonda GAG<sub>(10)</sub> marcou as regiões heterocromáticas e eucromáticas (Fig. 4d). As semelhanças nos padrões de marcação entre *M. scutellaris* e *M. capixaba* deve estar relacionadas à proximidade filogenética entre essas espécies, detectadas por Resende, 2012 e sugerem que o subgênero *Michmelia* deva ser revisto.

A sonda de sequência telomérica TTAGG<sub>(6)</sub> resultou em marcas positivas nos telômeros de todos os cromossomos das espécies de *Melipona* do Grupo I e II (Fig. 7), assim como no cromossomos B de *M. quinquefasciata* (Fig. 7c). Em insetos são observadas diferentes sequências teloméricas: TTAGG (Sahara *et al.*, 1999) ou TCAGG (Mravinac *et al.*, 2011), sendo a repetição TTAGG a sequência telomérica mais comum em *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Meyne *et al.*, 1995; Sahara *et al.*, 1999) e também em espécies *Melipona*. Os telômeros são responsáveis por manterem a integridade dos cromossomos e a localização de sequências teloméricas em regiões ao longo dos braços cromossômicos podem sugerir rearranjos que ocorreram durante a evolução do cariótipo de um táxon (Nanda *et al.*, 2009; Bueno *et al.*, 2013; Rovatsos *et al.*, 2015; Lanzone *et al.*, 2016). Em *Melipona*, embora tenha sido sugerido que eventos de fusões cromossômicas repetidas foram as responsáveis pela redução do número de cromossomos, quando comparado com outros gêneros de Meliponini (Travenzoli *et al.*, 2018), não foram observadas marcações intersticiais de TTAGG<sub>(6)</sub> nos cromossomos. Resultado semelhante foi observado em uma espécie de formiga (*Acromyrmex striatus* (Roger, 1863)), em que a ausência de uma marcação intersticial indicou a fusão com inativação do telômero (Pereira *et al.*, 2018). Segundo Slijepcevic (1998) um dos pré-requisitos em eventos de fusão do tipo Robertsoniana seria a perda do telômero ou sua

inativação. Nesse contexto, a ausência de sítios intersticiais em *Melipona* indica que, possivelmente, ocorreu perda e não inativação das sequências teloméricas.

A presença de marcas de sequências teloméricas nos cromossomos também foram observadas nos cromossomos B de *M. quinquefasciata*. A natureza heterocromática do cromossomo B observada é uma característica comum desses cromossomos (Camacho, 2005) que é geralmente associada ao acúmulo de DNAs repetitivos, tais como, DNAs satélites (satDNAs), rDNAs e elementos transponíveis (Camacho *et al.*, 2000). A marcação apenas da sequência repetitiva TTAGG<sub>(6)</sub> e a ausência de marcações das sondas GA<sub>(15)</sub> e GAG<sub>(10)</sub> demonstram a semelhança heterocromática do cromossomo B e dos cromossomos do complemento A sugerido por Rocha, 2002.

#### **4. Conclusão**

As características citogenéticas das espécies do gênero *Melipona* baseadas nos padrões heterocromáticos, marcações com DAPI<sup>+</sup>-CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> e sítios ribossomais confirmam a separação de *Melipona* em dois grupos, os quais possuem características únicas e, em geral, conservadas. Espécies do grupo I apresentam baixa quantidade de heterocromatina, localizada na região pericentromérica e uma marcação CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> na região pericentromérica do primeiro par cromossômico, coincidente com sítios de rDNA e observadas entre as espécies dos subgêneros *Eomelipona* e *Melipona stricto sensu*. Espécies do grupo II possuem alto conteúdo de heterocromatina localizada ao longo de todo o cromossomo e duas regiões com marcações CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>, terminal ou intersticial próxima a junção da eucromatina e heterocromatina do primeiro par cromossômico, ambas coincidentes com rDNA, observadas nas espécies dos subgêneros *Michmelia* e *Melikerria*. Uma exceção é *M. quinquefasciata*, que parece evoluir independentemente no grupo *Melikerria*. A presença de DNA repetitivo do tipo microssatélite encontrados preferencialmente em regiões de eucromatina nos dois grupos, sugerem que outras famílias de DNA repetitivo sejam observadas na heterocromatina.

#### **5. Agradecimentos**

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG). Aos estudantes do laboratório de Citogenética de Insetos da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

## 6. Referências

- Barros, L.A.C., Teixeira, G.A., Aguiar, H.J.A.C., Lopes, D.M., Pompolo, S.G. 2018. Cytogenetic studies in *Trachymyrmex holmgreni* Wheeler, 1925 (Formicidae: Myrmicinae) by conventional and molecular methods. *Sociobiology* 65: 185-190.
- Brito, R.M., Pompolo, S.G., Magalhães, M.F.M., Barros, E.G. Sakamoto-Hojo, E.T. 2005. Cytogenetic characterization of two *Partamona* species (Hymenoptera, Apinae, Meliponini) by fluorochrome staining and localization of 18S rDNA clusters by FISH. *Cytologia*. 70: 373-380.
- Bueno, D., Palacios-Gimenez, O.M., Cabral-de-Mello, D.C. 2013. Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the grasshopper *Abracris flavolineata* reveal possible ancestry of the B chromosome and H3 histone spreading. *Plos One*. 8: e66532.
- Camacho, J.P.M. 2005. B chromosomes. In: Gregory TR (ed) The evolution of the genome, pp 223-286.
- Camacho, J.P., Sharbel, T.F., and Beukeboom, L.W. 2000. B-chromosome evolution. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 355: 163-178.
- Camargo, J.M.F., Pedro, S.R.M. 2013. Meliponini Lepeletier, 1836. In Moure, J. S., Urban, D. & Melo, G. A. R. (Orgs). Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region - online version. Available at <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Accessed May/13/2018.
- Cardoso, D.C., das Graças Pompolo, S., Cristiano, M.P., Tavares, M.G. 2014. The role of fusion in ant chromosome evolution: insights from cytogenetic analysis using a molecular phylogenetic approach in the genus *Mycetophylax*. *PloS One*. 9: e87473.
- Cardoso, D.C., Santos, H.G., Cristiano, M.P. 2018. The Ant Chromosome database – ACdb: an online resource for ant (Hymenoptera: Formicidae) chromosome researchers. *Myrmecol News*. 27: 87-91
- Cassinela, E.K., Ferreira, R.P., Oliveira, F.P.M., Lopes, D.M. 2013. Cytogenetic analysis in *Melipona paraensis* (Hymenoptera: Apidae). In: Anais do II Simpósio de Integração dos Programas de Pósgraduação em Biologia Celular e VI Simpósio de Biologia Celular da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, Minas Gerais.

- Cortopassi-Laurino, M., Imperatriz-Fonseca, V.L., Roubik, D.W., Dolin, A., Heard, T., Aguilar, I.B., Venturieri, G.C., Eardley, C., Nogueira-Neto, P. 2006. Global meliponiculture: challenges and opportunities. *Apidologie*. 37: 275-292.
- Cunha, M.S., Travenzoli, N.M., Ferreira, R.P., Cassinela, E.K., Silva, H., Salomão, T.M.F., Lopes, D.M. 2018. Comparative cytogenetics in three *Melipona* species (Hymenoptera: Apidae) with two divergent heterochromatic patterns. *Genet Mol Biol. no prelo*.
- Duarte, O.M.P., Martins, C.C.C., Waldschmidt, A.M., Costa, M.A. 2009. Occurrence of multiple NORs and intraspecific karyotype variation in *Scaptotrigona xanthotricha* Moure (Hymenoptera, Meliponini). *Genet Mol Res*. 8: 831-839.
- Fernandes, A., Werneck, H. A., Pompolo, S. G., Lopes, D.M. 2013. Evidence of separate karyotype evolutionary pathway in *Euglossa* orchid bees by cytogenetic analyses. *An. Acad. Bras. Ciênc*. 85: 937-944.
- Ferreira, R. P., Novaes, C. M., Travenzoli, N. M., Lopes D. M. 2015. Intraspecific variation revealed by chromosomal mapping of microsatellite in stingless bee *Trigona spinipes*. *Chromosome Res*. Supplement 1: 130.
- Francini, I.B., Gross, M.C., Nunes-Silva, C.G., Carvalho-Zilse, G. 2011. Cytogenetic analysis of the Amazon stingless bee *Melipona seminigra merrillae* reveals different chromosome number for the genus. *Sci Agric*. 68: 592-593.
- Heard, T.A. 1999. The role of stingless bees in crop pollination. *Annu. Rev. Entomol*. 183-206p.
- Imai, H.T., Taylor, R.W., Crosland, M.W., Crozier, R.H. 1988. Modes of spontaneous chromosomal mutation and karyotype evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis. *Jpn J Genet*. 63: 159-185.
- Kerr, W.E. 1948. Estudos sobre o gênero *Melipona*. *An Esc Super Agric Luiz de Queiroz*. 5: 182-276.
- Kerr, W.E. 1952. A variação do número de cromossomas na evolução dos Hymenoptera. *Sci Gen*. 4:182-190.
- Kerr, W.E. 1969. Some aspects of the Evolution of social bees. *Evol Biol*. 3: 119-175.
- Kerr, W.E., Carvalho, G.A., Nascimento, V.A. 1996. Abelha Uruçu – Biologia, Manejo e Conservação. 1. ed. Belo Horizonte: Fundação Acangaú. 141p.
- Lanzone, C., Labaroni, C., Suárez, N., Rodríguez, D., Herrera, M.L., Bolzán, A.D. 2015. Distribution of telomeric sequences (TTAGGG)<sub>n</sub> in rearranged chromosomes of phyllotine rodents (Cricetidae, Sigmodontinae). *Cytogenet Genome Res*. 147: 247-252.

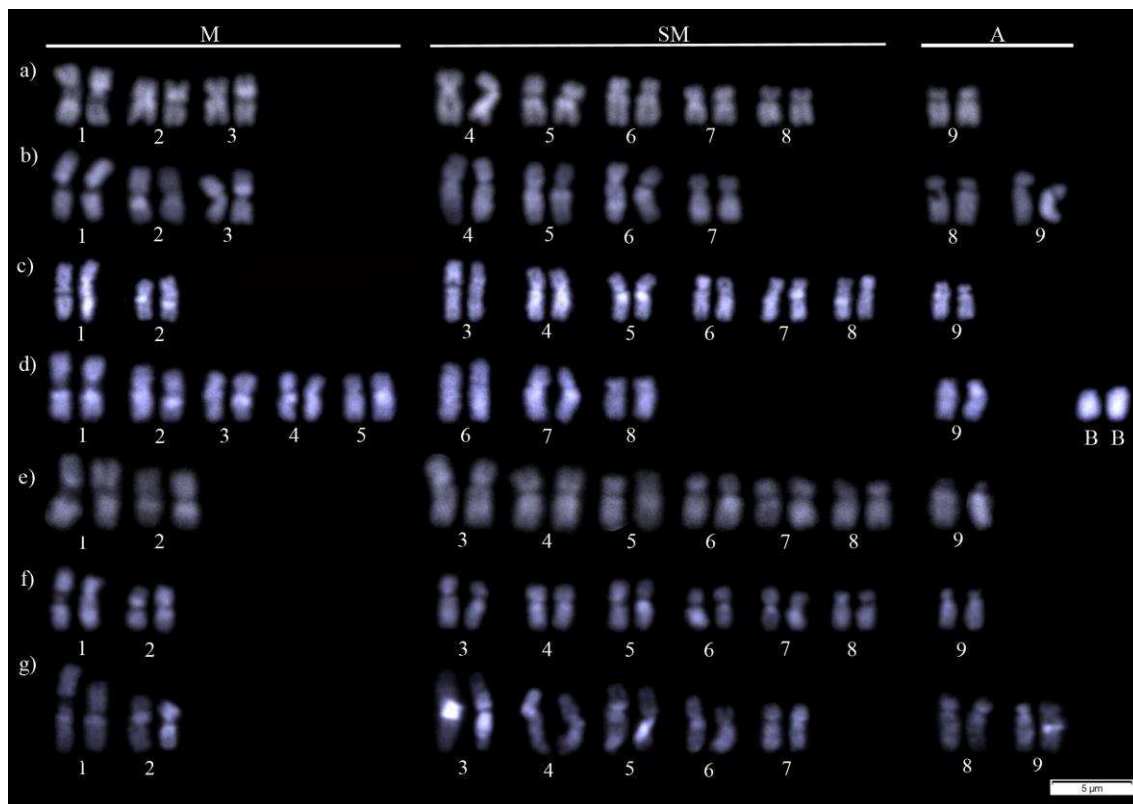


- Levan, A., Fredga, K., Sandberg, A.A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*. 52: 201-220.
- Lopes, D.M., Pompolo, S.G., Campos, L.A.O., Tavares, M.G. 2008. Cytogenetic characterization of *Melipona rufiventris* Lapeletier 1836 and *Melipona mondury* Smith 1863 (Hymenoptera, Apidae) by C banding and fluorochromes staining. *Gen Mol Biol*. 31: 49-52.
- Lopes, D.M., Carvalho, C.R., Clarindo, W.R., Praça, M.M., Tavares, M.G. 2009. Genome size estimation of three stingless bee species (Hymenoptera, Meliponinae) by flow cytometry. *Apidologie*. 40: 517-523.
- Lopes, D.M., Fernandes, A., Diniz, D., Scudeler, P.E.S., Foresti, F., Campos, L.A.O. 2014. Similarity of heterochromatic regions in the stingless bees (Hymenoptera: Meliponini) revealed by chromosome painting. *Caryologia*. 67: 222-226.
- Lopes, D.M., Fernandes, A., Praça-Fontes, M.M., Werneck, H.A., Resende, H.C., Campos, L.A.O. 2011. Cytogenetics of three *Melipona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Sociobiology*. 58: 185-194.
- Lopes, D.M., Pompolo, S.D.G., Campos, L.A.O., Tavares, M.G. 2008. Cytogenetic characterization of *Melipona rufiventris* Lapeletier 1836 and *Melipona mondury* Smith 1863 (Hymenoptera, Apidae) by C banding and fluorochromes staining. *Genet Mol Biol*. 31: 49-52.
- Mravinac, B., Meštrović, N., Čavrak, V.V., Plohl, M. 2011. TCAGG, an alternative telomeric sequence in insects. *Chromosoma*. 120: 367-376.
- Meyne, J., Hirai, H., Imai, H.T. 1995. FISH analysis of the telomere sequences of bulldog ants (Myrmecia: Formicidae). *Chromosoma*. 104: 14-18.
- Michener, C.D. 2000. Bees of the World. Baltimore, Johns Hopkins University Press.
- Michener, C.D. 2013. The Meliponini. In: Vit, P., Pedro, S.R.M., Roubik, D.W. (Eds.), Pot-honey: a legacy of stingless bees (pp. 3-17). New York: Springer, 175 p.
- Nanda, I., Schrama, D., Feichtinger, W., Haaf, T., Scharl, M., Schmid, M. 2002. Distribution of telomeric (TTAGGG)<sub>(n)</sub> sequences in avian chromosomes. *Chromosoma*. 111: 215-227.
- Novaes, C. M., Travençoli, N. M., Ferreira, R. P., Lopes D. M. 2015. Chromosomal mapping using microsatellite probes in two stingless bees species of region Amazon. *Chromosome Res.* Supplement 1: 130.
- Pereira, T.T.P., dos Reis, A.C.C.C., Cardoso, D.C., Cristiano, M.P. 2018. Molecular phylogenetic reconstruction and localization of the (TTAGG)<sub>n</sub> telomeric repeats

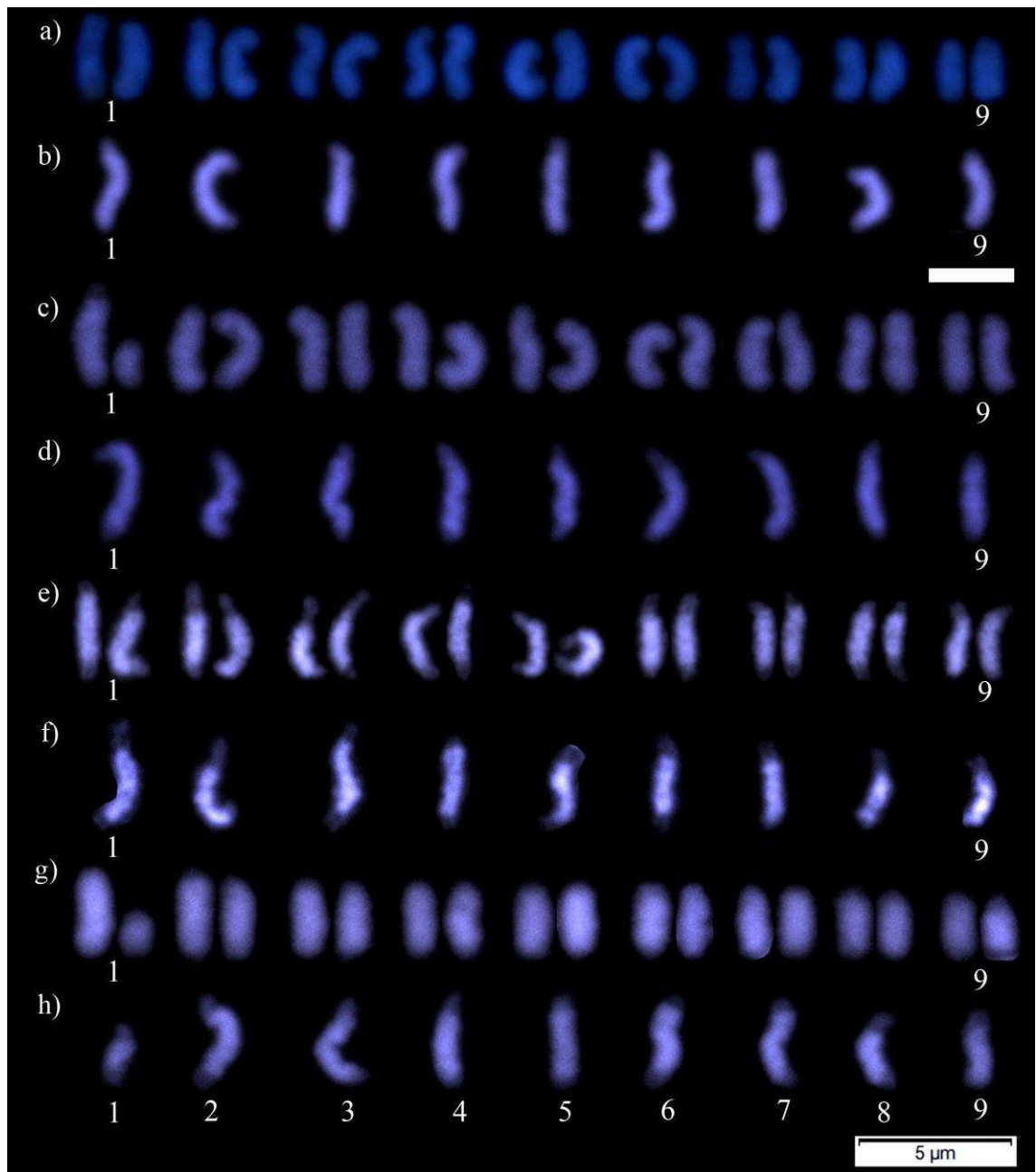
- in the chromosomes of *Acromyrmex striatus* (Roger, 1863) suggests a lower ancestral karyotype for leafcutter ants (Hymenoptera). *Comp Cytogenet.* 12: 13.
- Piccoli, M.C.A., Bardella, V.B., Cabral-de-Mello, D.C. 2018. Repetitive DNAs in *Melipona scutellaris* (Hymenoptera: Apidae: Meliponidae): chromosomal distribution and test of multiple heterochromatin amplification in the genus. *Apidologie.* 1-8.
- Pinkel, D., Straume, T., Gray, J.W. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83: 2934-2938.
- Ramírez, S.R., Nieh, J.C., Quental, T.B., Roubik, D.W., Imperatriz-Fonseca, V.L., Pierce, N. E. 2010. A molecular phylogeny of the stingless bee genus *Melipona* (Hymenoptera: Apidae). *Mol Phylogenet Evol.* 56: 519-525.
- Rasmussen, C., Cameron, S.A. 2010. Global stingless bee phylogeny supports ancient divergence, vicariance, and long distance dispersal. *Biol J Linnean Soc.* 99: 206-232.
- Resende, H.C. 2012. Filogeografia e conservação de *Melipona capixaba* Moure e Camargo, 1904 e *Melipona scutellaris* Latreille, 1911, e biogeografia do gênero *Melipona* Illiger, 1806 (Hymenoptera: Apidae). Tese, Universidade Federal de Viçosa.
- Rocha, M.P. 2002. Análises citogenéticas em abelhas do gênero *Melipona* (Hymenoptera, Meliponini). Dissertação, Universidade Federal de Viçosa.
- Rocha, M.P., Cruz, M.P., Pompolo, S.G., Fernandes, A., Silva Jr, J.C., Waldschmidt, A.M. 2003. Longitudinal differentiation in *Melipona mandacaia* (Hymenoptera, Meliponini) chromosomes. *Hereditas.* 138: 133-137.
- Rocha, M.P., Pompolo, S.G. 1998. Karyotypes and heterochromatin variation (C-bands) in *Melipona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Genet Mol Biol.* 21: 41-45.
- Rocha, M.P., Pompolo, S.G., Dergam, J.A., Fernandes, A., Campos, L.A.O. 2002. DNA characterization and karyotypic evolution in the bee genus *Melipona* (Hymenoptera, Meliponini). *Hereditas.* 136: 19-27.
- Rovatsos, M., Kratochvíl, L., Altmanová, M., Pokorná, M.J. 2015. Interstitial telomeric motifs in squamate reptiles: when the exceptions outnumber the rule. *PLoS One.* 10: e0134985.
- Sahara, K., Marec, F., Traut, W. 1999. TTAGG telomeric repeats in chromosomes of some insects and other arthropods. *Chromosome Res.* 7: 449-460.

- Silva, H.B., Ferreira, R.P., Oliveira, F.P.M., Lopes, D.M. 2013. Citogenética da abelha sem ferrão *Melipona puncticolis* (Hymenoptera, Meliponini) coletada em Altamira, Pará. In: Anais do IV Simpósio de Entomologia. Viçosa, Minas Gerais, p 147.
- Silva, H.B., Ferreira, R.P., Lopes, D.M. 2014. Análise citogenética da abelha *Melipona seminigra pernigra* (Hymenoptera, Meliponini) coletada em região de floresta amazônica. In: Anais do Simpósio de Integração Acadêmica de 2014 da Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, Minas Gerais.
- Silveira, Z.V. 1971. Número de cromossomos em meliponídeos brasileiros. *Cien Cult.* 23: 105-106.
- Slijepcevic, P. 1998. Telomeres and mechanisms of Robertsonian fusion. *Chromosoma.* 107: 136-140.
- Tavares, M.G., Carvalho, C.R., Soares, F.A.F. 2010. Genome size variation in *Melipona* species (Hymenoptera: Apidae) and sub-grouping by their DNA content. *Apidologie.* 41: 636-642.
- Tavares, M.G., Lopes, D.M. Campos, L.A.O. 2017. An overview of cytogenetics of the tribe Meliponini (Hymenoptera: Apidae). *Genetica.* 145: 241-258.
- Travanzoli, N.M.T. 2018. Citogenética clássica e molecular com ênfase na evolução cromossômica em Meliponini. Tese, Universidade Federal de Viçosa.

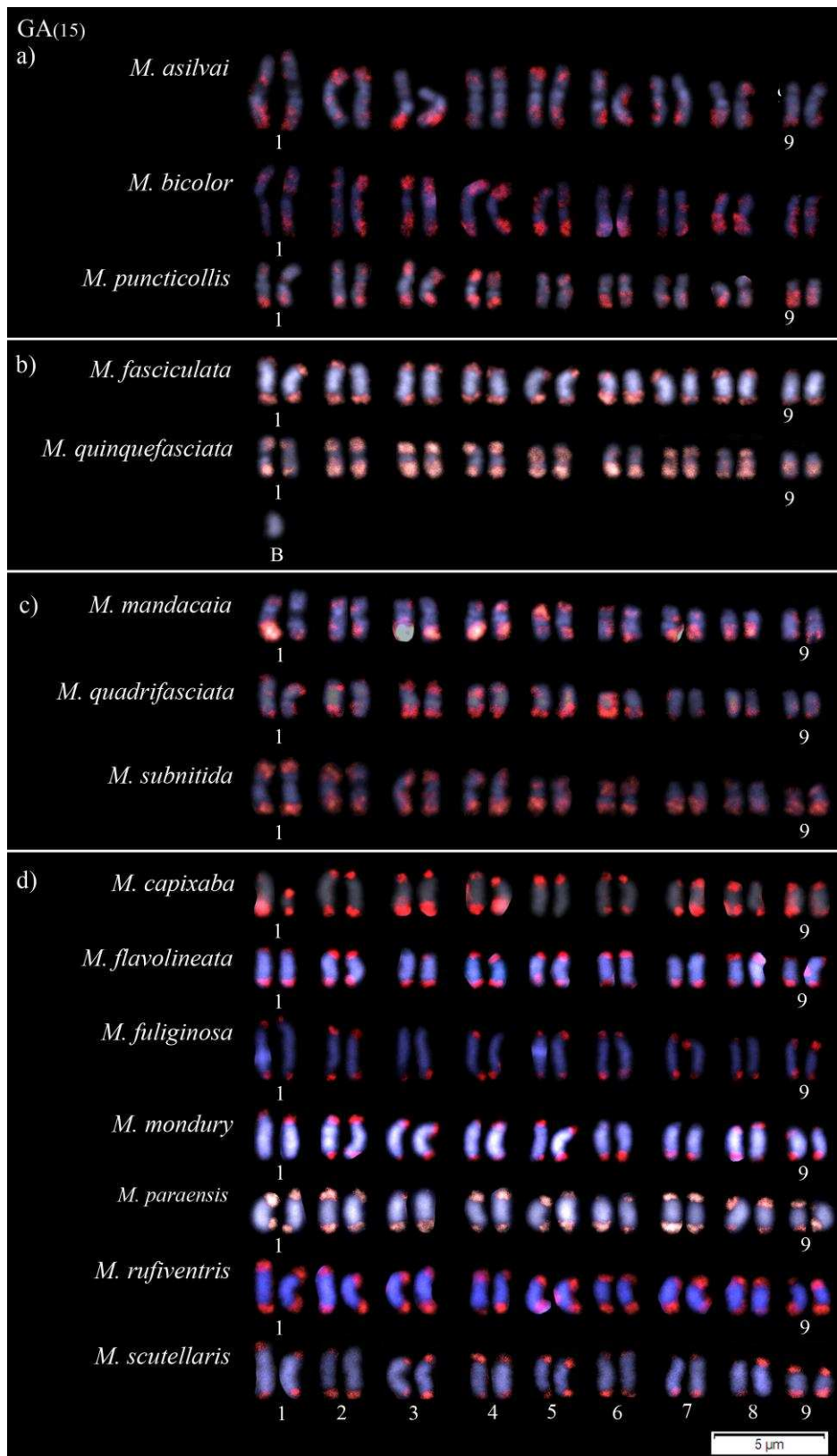
## Figuras



**Figura 1.** Cariótipo das espécies de *Melipona*: (a) *M. asilvai*, (b) *M. bicolor*, (c) *M. puncticollis*, (d) *M. quinquefasciata*, (e) *M. mandacaia*, (f) *M. quadrifasciata* e (g) *M. subnitida*. As letras representam cromossomos: (m) metacêntrico, (sm) submetacêntrico e (a) acrocêntrico. Em azul, cromossomos corados com DAPI.

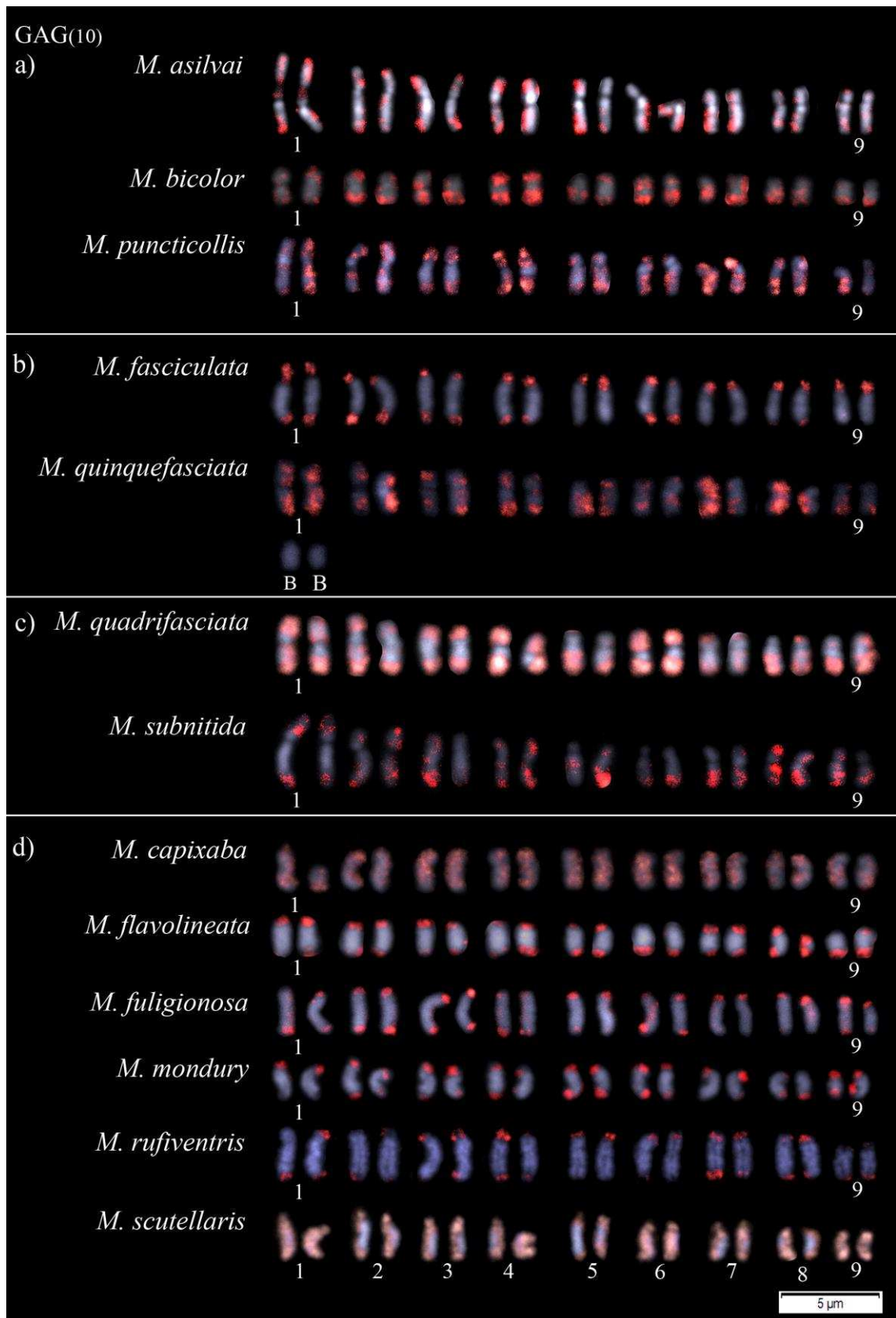


**Figura 2.** Cariótipo das espécies de *Melipona capixaba* e *Melipona flavolineata*. *M. capixaba*: indivíduos sem polimorfismo: (a) fêmea e (b) macho; indivíduos com polimorfismo (c) fêmea e (d) macho. *M. flavolineata*: indivíduos sem polimorfismo: (e) fêmea e (f) macho; indivíduos com polimorfismo (g) fêmea e (h) macho. Em azul, cromossomos corados com DAPI.

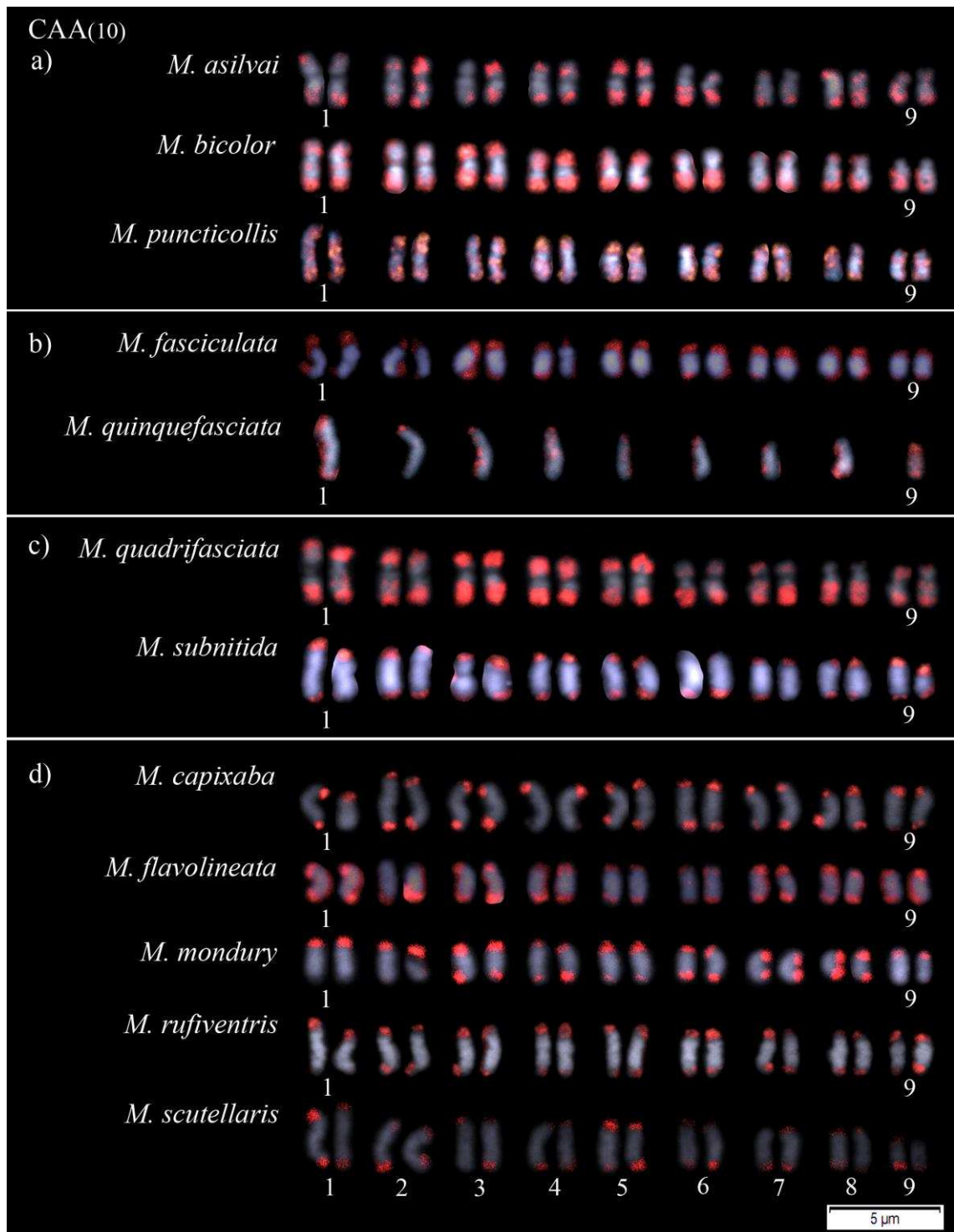


**Figura 3.** Padrões obtidos com o FISH com a sonda de DNA repetitivo GA<sub>(15)</sub> em espécies *Melipona* pertencentes aos subgêneros: (a) *Eomelipona*, (b) *Melikerria*, (c) *Melipona stricto sensu* e (d) *Michmelia*. Em azul, cromossomos corados com DAPI e em vermelho, marcação da sonda.



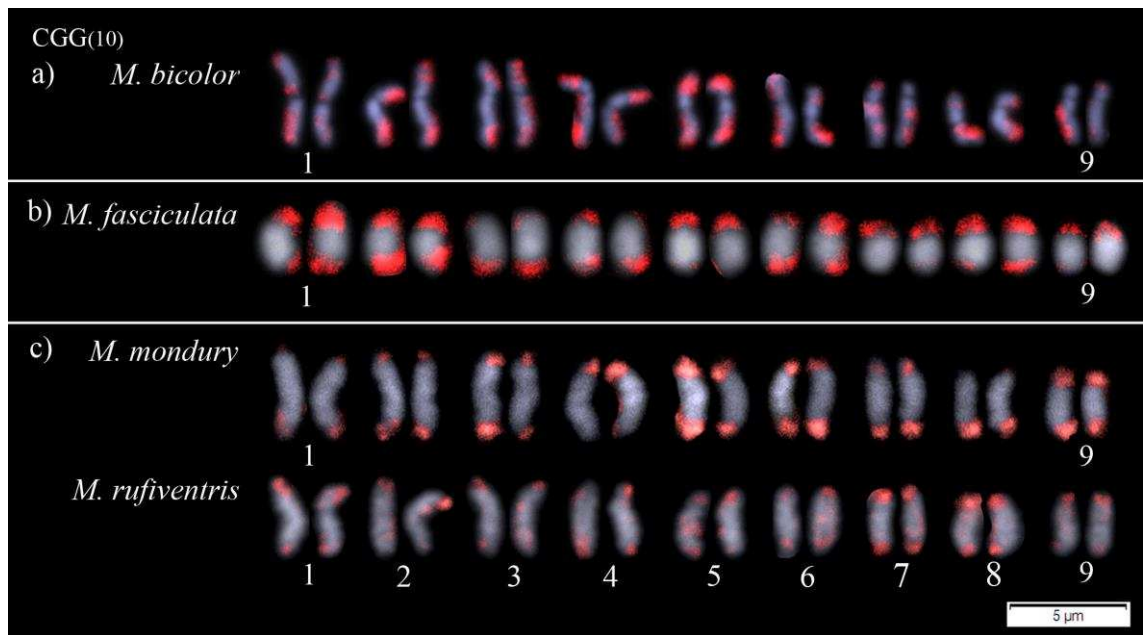


**Figura 4.** Padrões obtidos com o FISH com a sonda de DNA repetitivo GAG<sub>(15)</sub> em espécies *Melipona* pertencentes aos subgêneros: (a) *Eomelipona*, (b) *Melikerria*, (c) *Melipona stricto sensu* e (d) *Michmelia*. Em azul, cromossomos corados com DAPI e em vermelho, marcação da sonda.

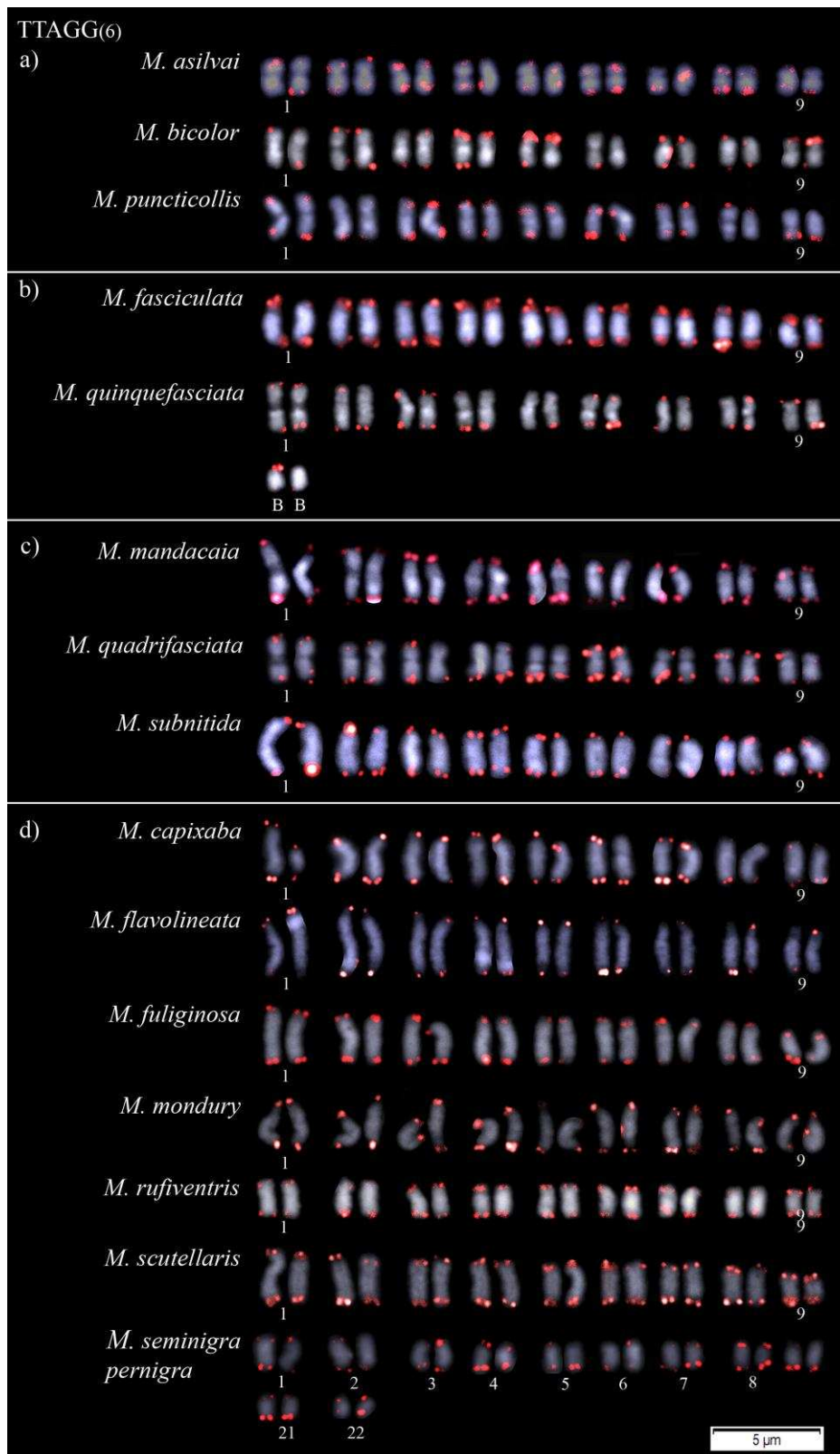


**Figura 5.** Padrões obtidos com o FISH com a sonda de DNA repetitivo CAA<sub>(10)</sub> em espécies *Melipona* pertencentes aos subgêneros: (a) *Eomelipona*, (b) *Melikerria*, (c) *Melipona stricto sensu* e (d) *Michmelia*. *Melipona quinquefasciata* é indivíduo macho. Em azul, cromossomos corados com DAPI e em vermelho, marcação da sonda.





**Figura 6.** Padrões obtidos com o FISH com a sonda de DNA repetitivo CGG<sub>(10)</sub> em espécies *Melipona* pertencentes aos subgêneros: (a) *Eomelipona*, (b) *Melikerria* e (c) *Michmelia*. Em azul, cromossomos corados com DAPI e em vermelho, marcação da sonda.



**Figura 7.** Padrões obtidos com o FISH com a sonda de DNA repetitivo TTAGG<sub>(6)</sub> em espécies *Melipona* pertencentes aos subgêneros: (a) *Eomelipona*, (b) *Melikerria*, (c) *Melipona stricto sensu* e (d) *Michmelia*. Em azul, cromossomos corados com DAPI e em vermelho, marcação da sonda.

**Tabela 1.** Espécies de *Melipona*, coordenadas geográficas e locais de coleta em diferentes estados do Brasil

Espécies	Coordenadas – GPS	Localidade
<i>M. asilvai</i> Moure, 1971	15°38'2.99"S; 44°18'55.03"O	Pedra de Maria da Cruz, Minas Gerais
<i>M. bicolor</i> Lepeletier, 1836	20°45'19.74"S; 42°52'6.92"O	Viçosa, Minas Gerais
<i>M. capixaba</i> Moure & Camargo, 1994	20°21'34.68"S; 40°39'39.78"O	Domingos Martins, Espírito Santo
<i>M. fasciculata</i> Smith, 1854	03°44'22.53"S; 52°19'39.15"O	Altamira, Pará
<i>M. flavolineata</i> Friese, 1900	03°15'10.09"S; 43°18'5.12"O	Urbano Santos, Maranhão
<i>M. fuliginosa</i> Lepeletier, 1836	03°15'10.09"S; 43°18'5.12"O	Urbano Santos, Maranhão
<i>M. mandacaia</i> Smith, 1863	11°18'12.80"S; 41°51'22.14"O	Irecê, Bahia
<i>M. mondury</i> Smith, 1863	20°45'19.74"S; 42°52'6.92"O	Viçosa, Minas Gerais
<i>M. paraensis</i> Ducke, 1916	02°52'20.05"S; 52°15'56.23"O	Altamira, Pará
<i>M. puncticollis</i> Friese, 1902	02°52'20.05"S; 52°15'56.23"O	Altamira, Pará
<i>M. quadrifasciata</i> Lepeletier, 1836	20°45'19.74"S; 42°52'6.92"O	Viçosa, MG, Brasil
<i>M. quinquefasciata</i> Lepeletier, 1836	19°53'7.00"S; 43°39'51.93"O	Caeté e Viçosa, Minas Gerais
<i>M. rufiventris</i> Lepeletier, 1836	18°51'28.76"S; 46°41'12.27"O	Guimarânia, Minas Gerais
<i>M. scutellaris</i> Latreille, 1811	12°33'39.53"S; 41°23'40.64"O	Lençóis, Bahia
<i>M. seminigra pernigra</i> Moure & Kerr, 1950	02°52'20.05"S; 52°15'56.23"O	Altamira, Pará
<i>M. subnitida</i> Ducke, 1910	6°43'36.17"S; 36°46'17.89"O	Santana do Seridó, Rio Grande do Norte

**Tabela 2.** Dados citogenéticos disponíveis para espécies de *Melipona* quanto ao cariótipo, número diploide ( $2n$ ), baixa ou alta quantidade de heterocromatina) - tamanho do genoma em pb (pares de base),  $CMA_3^+$ , sítios de DNA ribossomal 18S e microssatélites. Os subgêneros das espécies foram baseados em Camargo & Pedro, 2013

Subgêneros	Espécies	$2n$	Cariótipo	BandaC - genoma (pb)	Número e padrões de marcações nos pares cromossômicos						Referências	
					$CMA_3$	18S	Microssatélites					
							GA <sub>(15)</sub>	GAG <sub>(10)</sub>	CAA <sub>(10)</sub>	CGG <sub>(10)</sub>		TTAGG <sub>(6)</sub>
<i>Eomelipona</i>	<i>M. asilvai</i> <sup>a</sup>	18 <sup>1</sup>	6m+10sm+2a*	Baixo <sup>1</sup> 0.29 – 283.62 <sup>2</sup>	2 Intersticiais <sup>3</sup>	2 Intersticiais*	Dispersos – eucromatina*	Dispersos – eucromatina*	Dispersos – eucromatina*	Dispersos – eucromatina*	Terminais*	Rocha & Pompolo, 1998 <sup>1</sup> ; *Neste estudo; Tavares et al., 2010 <sup>2</sup> ; Rocha <i>et al.</i> , 2002 <sup>3</sup>
	<i>M. bicolor</i> <sup>a</sup>	18 <sup>1</sup>	6m+8sm+4a*	Baixo <sup>1</sup> 0.28 – 273.84 <sup>2</sup>	2 Intersticiais <sup>3</sup>	-	Dispersos – eucromatina*	Dispersos – eucromatina*	Terminais – eucromatina*	-	Terminais*	Rocha & Pompolo, 1998 <sup>1</sup> ; *Neste estudo Tavares et al., 2010 <sup>2</sup> ; Rocha <i>et al.</i> , 2002 <sup>3</sup>
	<i>M. marginata</i> <sup>a</sup>	18 <sup>4</sup>	-	Baixo <sup>1</sup> 0.28 – 273.84 <sup>2</sup>	2 Intersticiais <sup>3</sup>	2 Intersticiais	-	-	-	-	-	Kerr, 1948 <sup>4</sup> ; Rocha & Pompolo, 1998 <sup>1</sup> ; Tavares et al., 2010 <sup>2</sup> ; Rocha <i>et al.</i> , 2002 <sup>3</sup> ;
	<i>M. puncticollis</i>	18 <sup>5</sup>	2m+14sm+2a <sup>6</sup>	Baixo <sup>6</sup>	2 Intersticiais <sup>6</sup>	2 Intersticiais <sup>6</sup>	Dispersos – eucromatina*	Dispersos – eucromatina*	Terminais – eucromatina*	-	Terminais*	Silva et al., 2013 <sup>5</sup> ; Cunha <i>et al.</i> , 2018 <sup>6</sup> ; *Neste estudo
Subgêneros	Espécies	$2n$	Cariótipo	BandaC - genoma	Número e padrões de marcações nos pares cromossômicos						Referências	

<b>(pb)</b>														
<b>Microsatélites</b>														
			<b>CMA<sub>3</sub></b>		<b>18S</b>									
							<b>GA<sub>(15)</sub></b>	<b>GAG<sub>(10)</sub></b>	<b>CAA<sub>(10)</sub></b>	<b>CGG<sub>(10)</sub></b>	<b>TTAGG<sub>(6)</sub></b>			
<i>Melikerria</i>	<i>M. fasciculata</i> <sup>a</sup>	18 <sup>7</sup>	-	Alto <sup>8</sup> 0.78 – 762.84 <sup>2</sup>	2	Intersticial próxima a junção da eucromatina e heterocromatina <sup>8</sup>	2	Intersticial próxima a junção da eucromatina e heterocromatina*	Terminais – eucromatina*	Terminais – eucromatina*	Terminais – eucromatina*	Terminais – eucromatina*	Terminais*	Kerr, 1952 <sup>7</sup> ; Lopes <i>et al.</i> , 2011 <sup>8</sup> ; Tavares <i>et al.</i> , 2010 <sup>2</sup> ; *Neste estudo
	<i>M. interrupta</i>	18 <sup>9</sup>	-	Alto <sup>10</sup>	2	Intersticial próxima a junção da eucromatina e heterocromatina <sup>10</sup>	2	Intersticial próxima a junção da eucromatina e heterocromatina <sup>10</sup>	Terminais – eucromatina <sup>10</sup>	Terminais – eucromatina <sup>10</sup>	Terminais – eucromatina <sup>10</sup>	Terminais – eucromatina <sup>10</sup>	Terminais <sup>10</sup>	Kerr, 1969 <sup>9</sup> ; Travenzoli <i>et al.</i> , 2018 <sup>10</sup>
	<i>M. quinquefasciata</i> <sup>a</sup>	18 <sup>9</sup>	10m+6sm+2a <sup>11</sup>	Baixo <sup>11</sup> 0.70 – 684.6 <sup>2</sup>	2	Intersticiais <sup>11</sup>	-	-	Dispersos – eucromatina*	Dispersos – eucromatina*	-	-	Terminais*	Kerr, 1969 <sup>9</sup> ; Rocha, 2002 <sup>11</sup> ; Tavares <i>et al.</i> , 2010 <sup>2</sup> ; *Neste estudo
<i>Melipona</i>	<i>M. favosa</i>	18 <sup>12</sup>	2m+4sm+2a <sup>12</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Hoshiba, 1988 <sup>12</sup>
	<i>M. mandacaia</i>	18 <sup>13</sup>	2m+14sm+2a <sup>13</sup>	Baixo <sup>13</sup> 0.35 – 342.3 <sup>2</sup>	2	Intersticiais <sup>13</sup>	-	Dispersos – eucromatina*	-	-	-	-	Terminais*	Rocha <i>et al.</i> , 2003 <sup>13</sup> ; Tavares <i>et al.</i> , 2010 <sup>2</sup> ; *Neste estudo
	<i>M. quadrifasciata</i> <sup>a</sup>	18 <sup>4</sup>	4m+12sm+2a <sup>14</sup>	Baixo <sup>1</sup> 0.27 –	2	Intersticiais <sup>3</sup>	2	Intersticiais	Dispersos – eucromatina*	Dispersos – eucromatina*	Terminais – eucromatina	-	Terminais*	Kerr, 1948 <sup>4</sup> ; Silva <i>et al.</i> , 2002 <sup>14</sup> ; Rocha & Pompolo, 1998 <sup>1</sup> ; Rocha <i>et al.</i> , 2002 <sup>3</sup> ;

			264.06 <sup>2</sup>									Tavares et al., 2010 <sup>2</sup> ; *Neste estudo
<i>M. subnitida</i>	18 <sup>15</sup>	4m+10sm+4a*	Baixo <sup>3</sup> 0.27 – 264.06 <sup>2</sup>	2 Intersticiais <sup>3</sup>	-	Dispersos – eucromatina*	Dispersos – eucromatina*	Terminais – eucromatina*	-	Terminais*		Silveira, 1971 <sup>15</sup> ; Rocha <i>et al.</i> , 2002 <sup>3</sup> ; Tavares et al., 2010 <sup>2</sup> ; *Neste estudo
<i>M. capixaba</i> <sup>a</sup>	18 <sup>1</sup>	-	Alto <sup>1</sup> 1.38 – 1349.64 2	Terminal – todos cromossomos <sup>3</sup>	-	Terminais – eucromatina*	Terminais – eucromatina / disperso no cromossomos*	Terminais – eucromatina*	-	Terminais*		Rocha & Pompolo, 1998 <sup>1</sup> ; Tavares et al., 2010 <sup>2</sup> ; Rocha <i>et al.</i> , 2002 <sup>3</sup> ; *Neste estudo
<i>M. captiosa</i>	18 <sup>1</sup>	-	Alto <sup>1</sup>	-	-	-	-	-	-	-		Rocha & Pompolo, 1998 <sup>1</sup>
<i>M. crinita</i>	18 <sup>3</sup>	-	Alto <sup>3</sup> 0.73 – 713.94 <sup>2</sup>	Terminal – todos cromossomos <sup>3</sup>	-	-	-	-	-	-		Rocha <i>et al.</i> , 2002 <sup>3</sup> ; Tavares et al., 2010 <sup>2</sup>
<i>M. flavolineata</i>	18 <sup>8</sup>	-	Alto <sup>8</sup>	Terminal – todos cromossomos <sup>8</sup>	-	Terminais – eucromatina*	Terminais – eucromatina*	Terminais – eucromatina*	-	Terminais*		Lopes <i>et al.</i> , 2011 <sup>8</sup> ; *Neste estudo
<i>M. fuliginosa</i>	18 <sup>8</sup>	-	Alto <sup>8</sup>	Terminal – todos cromossomos <sup>8</sup>	-	Terminais – eucromatina*	Terminais – eucromatina*	-	-	-		Lopes <i>et al.</i> , 2011 <sup>8</sup> ; *Neste estudo
<i>M. fuscopilosa</i>	18 <sup>1</sup>	-	Alto <sup>1</sup> 1.10 – 1075.8 <sup>2</sup>	Terminal – todos cromossomos <sup>3</sup>	-	-	-	-	-	-		Rocha & Pompolo, 1998 <sup>1</sup> Tavares et al., 2010; Rocha <i>et al.</i> , 2002 <sup>3</sup>
<i>M. mondury</i> <sup>a</sup>	18 <sup>15</sup>	-	Alto 0.95 –	Terminal – todos	-	Terminais – eucromatina*	Terminais – eucromatina*	Terminais – eucromatina*	Terminais – eucromatina*	Terminais*		Lopes <i>et al.</i> , 2008 <sup>15</sup> ; Lopes et al., 2009 <sup>16</sup> ;

			929.1 <sup>16</sup>	cromossomos <sup>15</sup>								*Neste estudo
<i>M. paraensis</i> <sup>a</sup>	18 <sup>17</sup>	-	Alto <sup>6</sup>	Terminal – todos cromossomos <sup>6</sup>	2 Terminal <sup>6</sup>	Terminais – eucromatina*	-	Terminais – eucromatina*	-	-	-	Cassinela et al., 2013; Cunha et al., 2018 <sup>6</sup> ; *Neste estudo
<i>M. rufiventris</i> <sup>a</sup>	18 <sup>4</sup>	-	Alto <sup>15</sup> 0.93 – 909.54 <sup>16</sup>	Terminal – todos cromossomos <sup>16</sup>	-	Terminais – eucromatina*	Terminais – eucromatina*	Terminais – eucromatina*	Terminais – eucromatina*	Terminais*		Kerr, 1948 <sup>4</sup> ; Lopes et al., 2008 <sup>15</sup> ; Lopes et al., 2009 <sup>16</sup> ; *Neste estudo
<i>M. scutellaris</i>	18 <sup>1</sup>	-	Alto <sup>1</sup> 1.08 – 1056.24 <sub>2</sub>	Terminal – todos cromossomos <sup>3</sup>	-	Terminais – eucromatina	Terminais – eucromatina / disperso no cromossomos*	Terminais – eucromatina*	-	Terminais*		Rocha & Pompolo, 1998 <sup>1</sup> ; Tavares et al., 2010 <sup>2</sup> ; Rocha et al., 2002 <sup>3</sup> ; *Neste estudo
<i>M. seminigra merrillae</i>	22 <sup>17</sup>	-	Alto <sup>17</sup> 0.85 – 831.3 <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	-	-		Francini et al., 2011 <sup>17</sup> ; Tavares et al., 2010 <sup>2</sup> ;
<i>M. seminigra pernigra</i>	22 <sup>18</sup>	-	Alto <sup>6</sup>	Terminal – todos cromossomos <sup>6</sup>	2 Intersticiais <sup>6</sup>	-	-	Terminais – eucromatina*	-	Terminais*		Silva et al., 2014 <sup>18</sup> ; Cunha et al., 2018 <sup>6</sup> ; *Neste estudo

<sup>a</sup> espécies com polimorfismo

**Tabela 3.** Espécies de *Melipona* analisadas com e sem polimorfismo cromossômico em indivíduos (machos e fêmeas) e o número de metáfases analisadas

Espécie	Cariótipo	Indivíduos		Metáfases	
		Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
<i>Melipona capixaba</i>	Sem polimorfismo	1	8	18	50
	Com polimorfismo	2	13	20	50
<i>Melipona flavolineata</i>	Sem polimorfismo	1	16	17	50
	Com polimorfismo	1	9	11	50



### **Tendências evolutivas nas características heterocromáticas em espécies de *Melipona* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)**

#### **Resumo**

As espécies do gênero *Melipona*, possuem na maioria um número cromossômico característico de  $2n=18$  para fêmeas e  $n=9$  para machos, e apresentam um padrão de distribuição e quantidade de heterocromatina, que as distinguem dos demais Meliponini. Em *Melipona*, o cariótipo é composto por menos de 50% de heterocromatina em algumas espécies e por mais de 50% em outras, sendo esse padrão uma característica importante a ser investigada quanto a sua evolução neste táxon. Assim, esse estudo teve como objetivo inferir, com base em análises citogenéticas e moleculares, a quantidade de heterocromatina (baixa ou alta) presente no ancestral das espécies de *Melipona*, e correlacioná-la com a evolução heterocromática ao longo da diversificação deste gênero. Para isso, foram usadas todas as espécies de *Melipona* com padrão heterocromático descritos na literatura que possuíssem sequências parciais dos genes ArgK, Opsin, EF1- $\alpha$ , 28S e 16S rRNA disponíveis no Genbank. A reconstrução da quantidade de heterocromatina indica o baixo conteúdo heterocromático como característico no ancestral *Melipona* e que permaneceu nos subgêneros *Eomelipona* e *Melipona stricto sensu*. Assim, o alto conteúdo heterocromático surgiu independentemente no ancestral das espécies de *Melikerria*. Entretanto, *Melipona (Melikerria) quinquefasciata* parece ter passado por processos diferentes pois possui baixo conteúdo de heterocromatina, uma vez que, as outras espécies do subgênero *Melikerria* possuem alto conteúdo. Nossos resultados confirmam que o baixo conteúdo heterocromático é uma característica plesiomórfica em *Melipona* e que o alto conteúdo é resultado da adição de heterocromatina ao longo da evolução deste gênero.

**Palavras chave:** Cytogenetics, Reconstrução do estado ancestral, Stingless bees.

#### **1. Introdução**

As abelhas do gênero *Melipona* Illiger, 1806, pertencem a tribo Meliponini, são insetos eussociais que ocorrem por toda a região neotropical (Michener, 2000; Camargo e Pedro, 2013). O gênero é representado por 73 espécies, sendo que destas 43 ocorrem

no Brasil (Michener, 2007; Camargo e Pedro, 2013). Do ponto de vista citogenético, apenas 18 espécies foram analisadas e apresentam número diploide conservado de  $2n=18$  cromossomos em fêmeas e  $n=9$  em machos, exceto em *Melipona seminigra merillae* Cockerell, 1919 e *Melipona seminigra pernigra* Moure & Kerr, 1950 com  $2n=22$  (Rocha et al., 2002; 2003; revisado em Tavares et al., 2017; Cunha et al., 2018). Outras variações do número cromossômico foram registradas em *Melipona quinquefasciata* Lepeletier, 1836 e em *Melipona rufiventris* Lepeletier, 1836 devido a presença de cromossomos B's (Rocha et al., 2007; Lopes et al., 2008).

Além do número cromossômico característico, *Melipona* também apresenta um padrão de distribuição e quantidade de heterocromatina que a difere dos demais Meliponini. Enquanto nos outros gêneros, os cromossomos são caracterizados, em grande parte, por possuírem um braço cromossômico heterocromático e outro eucromático (Rocha et al., 2003; Costa et al., 2004; Godoy et al., 2013; Miranda et al., 2013). Em *Melipona*, algumas espécies possuem pouquíssima heterocromatina nos cromossomos, tais como em *Melipona bicolor* Lepeletier, 1836 e *Melipona subnitida* Ducke, 1910 com 8% e 17% do cariótipo constituído de heterocromatina, respectivamente. E espécies com muita quantidade de heterocromatina, por exemplo: *Melipona crinita* Moure & Kerr, 1950 com 54 %, *Melipona compressipes* (Fabricius, 1804) com 61 % e *Melipona seminigra fuscopilosa* Moure & Kerr, 1950 com 73 % do cariótipo constituído de heterocromatina (Rocha et al., 2002).

Considerando as características morfológicas *Melipona* pode ser subdividida em quatro subgêneros: *Eomelipona*, *Melikerria*, *Melipona* e *Michmelia* (Ramirez et al., 2010; Rasmussen e Cameron, 2010). Filogeneticamente, os subgêneros *Melikerria*, *Melipona* e *Michmelia* são considerados monofiléticos, enquanto *Eomelipona* é polifilético (Ramirez et al., 2010; Rasmussen e Cameron, 2010). Estudos correlacionando a proposta filogenética do gênero com análises citogenéticas dos padrões de distribuição heterocromática, foi sugerido que, possivelmente, a heterocromatina possa ter surgido em diferentes momentos ao longo da história evolutiva de *Melipona* (Lopes et al., 2011; Cunha et al., 2018; Piccoli et al., 2018).

Análises citogenéticas envolvendo a heterocromatina em diferentes grupos taxonômicos demonstraram que os padrões de distribuição heterocromáticos no cariótipo podem fornecer informações importantes sobre diferenciação de espécies (Vicari et al., 2010), caracterização cariotípica (Imai et al., 1988; Imai, 1991; Imai et al., 2001), análises comparativas (Rocha e Pompolo, 1998; Rocha et al., 2002), marcador citogenético na identificação de espécies (Silva et al., 2012; Travenzoli et al.,

2015) e de evolução cromossômica (Yamada *et al.*, 2006; revisado em Tavares *et al.*, 2017). Desta forma, considerando que estudos da heterocromatina são úteis como ferramentas para definir padrões evolutivos dos cromossomos, a evolução da heterocromatina em *Melipona*, parece ser uma importante característica a ser investigada nas espécies dos quatro subgêneros. Nesse sentido, o objetivo desse estudo foi inferir a quantidade de heterocromatina (baixa ou alta) presente no ancestral das espécies de *Melipona*, e correlacioná-la com a evolução heterocromática ao longo da diversificação dos subgêneros.

## 2. Materiais e métodos

### 2.1. Amostragem citogenética, análise filogenética e datação molecular

Foram selecionadas 17 espécies de *Melipona* com número haploide e conteúdo heterocromático descritos na literatura (Tabela 1). Para análise de inferência filogenética, todas as espécies de *Melipona* foram utilizadas como grupo interno e as espécies *Austroplebeia symei*, *Celetrigona euclidiana*, *Hypotrigona gribodoi*, *Hypotrigona ruspolii*, *Leurotrigona muelleri*, *Liotrigona madecassa*, *Lisotrigona furva*, *Meliponula bocandei*, *Trigonisca buyssoni* e *Trigonisca townsendi* consideradas como grupo externo. Foram utilizadas sequências parciais de DNA dos genes nucleares codificadores de proteína Arginine Kinase (ArgK), Rodopsina verde (Opsin), Fator de Alongamento 1 Alfa (EF1- $\alpha$ ), 28S (28S rDNA) e do gene mitocondrial 16S (16S rRNA) das espécies disponíveis no GenBank (Material suplementar Tabela S1). Todas as sequências foram alinhadas no MAFFT (Katoh e Standley, 2014) e inspecionadas visualmente no MEGA v 7.0 (Tamura *et al.*, 2013). Os genes nucleares foram particionados em exons e introns, enquanto os mitocondriais considerados cada um como uma única partição (Tomita *et al.*, 1996; Kawakita *et al.*, 2003). Os alinhamentos finais foram concatenados em uma única matriz no programa Sequence Matrix v. 1.7.8 (Vaidya *et al.*, 2011) e a inferência bayesiana foi realizada no software MrBayes v 3.2.2 (Ronquist *et al.*, 2012) com duas corridas independentes e cada uma com quatro cadeias de Markov. Para todas as partições foi implementado o modelo misto (Ronquist e Huelsenbeck, 2003), com proporção de invariáveis e correção Gamma. Foram utilizadas **50.000.000** de gerações da MCMC, com as árvores sendo amostradas a cada 1.000 gerações. A convergência das cadeias de Markov foi verificada no programa Tracer v.1.5 (Rambaut e Drummond, 2009). Vinte e cinco por cento das gerações iniciais foram descartados e as restantes utilizadas para gerar a árvore consenso. As análises

foram feitas no servidor CIPRES (Miller *et al.*, 2010), utilizando o MrBayes (Ronquist *et al.*, 2012) e as árvores editadas no programa FigTree v. 1.3.1 (Rambaut, 2009).

Para a datação molecular foi utilizada a mesma matriz de dados da reconstrução filogenética. Os tempos de divergência foram estimados usando uma abordagem Bayesiana implementada no BEAST 2.0 (Bouckaert *et al.*, 2014) no servidor CIPRES (Miller *et al.*, 2010). Foi utilizado o modelo de relógio molecular *Relaxed Clock Lognormal*, por permitir que as taxas de evolução variem entre os ramos da árvore (Drummond *et al.*, 2006). O modelo de substituição de nucleotídeos foi GTR+G+I para todas as partições e o processo de Yule utilizado como probabilidade a priori para as árvores (Drummond e Rambaut, 2007), de acordo com o proposto por Ramirez *et al.* (2010). No total, foram realizadas 50,000,000 milhões de gerações da MCMC e a convergência dos valores foi avaliada no Tracer v.1.5 (Rambaut e Drummond, 2009). Uma árvore consenso com burn-in de 25% foi criada no programa TreeAnnotator v2.4.1 (implementado no BEAST) e editada no FigTree v.1.3.1 (Rambaut, 2009). Os pontos de calibração foram baseados em Ramirez *et al.* (2010).

## 2.2. Reconstrução do estado ancestral

A reconstrução da quantidade de heterocromatina presente no ancestral das espécies de *Melipona* foi realizada pela análise de verossimilhança no software Mesquite v. 3.04 (Madison e Madison, 2011), utilizando as últimas 1000 árvores da análise Bayesiana MCMC. Consideramos como estados de caráter as diferentes quantidades de heterocromatina, baixo e alto (Tabela 1), e os valores referentes à análise foram representados em porcentagens (%) (Tabela S2).

## 3. Resultados

### 3.1. Amostragem citogenética, análise filogenética e datação molecular

Das espécies de *Melipona* analisadas citogeneticamente, nove possuem alto conteúdo de heterocromatina e sete apresentam baixo conteúdo no cariótipo segundo os padrões heterocromáticos descritos por Rocha *et al.* (2002) (Tabela 1; Fig. 1).

O conjunto dos dados concatenados resultou em 3.231 pares de bases alinhados e a árvore filogenética concorda com a filogenia proposta por Ramirez *et al.* (2010) e Rasmussen e Cameron (2010) (Fig. 1; Material Suplementar Figura S1). Segundo essas propostas filogenéticas os subgêneros *Melikerria*, *Melipona* e *Michmelia* são monofiléticos e *Eomelipona* polifilético.

De acordo com a datação molecular, o subgênero *Eomelipona* divergiu dos demais em  $\pm 23$  milhões de anos atrás (Ma) e *Michmelia* divergiu dos subgêneros *Melikerri* e *Melipona* em  $\pm 21$  Ma. E as espécies de *Melikerri* e *Melipona* divergiram-se em  $\pm 18$  Ma (Fig. 1; Material Suplementar Figura S2).

## 2.2. Reconstrução do estado ancestral

A análise da reconstrução indica que o ancestral (node A) de todas as espécies de *Melipona* possuíam baixo conteúdo de heterocromatina (75%). Esse caráter foi mantido nas espécies do subgênero *Eomelipona* e no ancestral (node B, 60%) dos outros três subgêneros. Na diversificação de *Michmelia* ocorreu um aumento da heterocromatina mostrando o ancestral desse grupo (C) com 84% de probabilidade desse caráter. Por outro lado, os dados indicam que o ancestral (D) de *Melipona* e *Melikerria* continuou com baixo conteúdo (63%) e que ocorreu um novo aumento de heterocromatina na separação destes dois subgêneros visto nas espécies de *Melikerria*. Isso mostra que a heterocromatina surgiu em momentos diferentes nas espécies de alto conteúdo do gênero *Melipona*. Considerando isso, *Melipona (Melikerria) quinquefasciata* Lepeletier, 1836 parece ter passado por processos diferentes pois possui baixo conteúdo de heterocromatina enquanto as outras espécies do subgênero *Melikerria* possuem alto conteúdo (Fig. 1; Material Suplementar Figura S3).

## 4. Discussão

Esse é o primeiro estudo de inferência da quantidade de heterocromatina presente no ancestral de *Melipona* utilizando informações citogenéticas e moleculares. Nossas análises confirmam que o baixo conteúdo heterocromático é uma condição plesiomórfica em *Melipona* (Cunha *et al.*, 2018), que se manteve nas espécies dos subgêneros *Eomelipona*, *Melipona* e independentemente em *M. quinquefasciata*. E a alta quantidade de heterocromatina, presente nos cromossomos das espécies de *Melikerria* e *Michmelia*, surgiu duas vezes ao longo da evolução do gênero.

Em uma comparação da distribuição da heterocromática com a filogenia do grupo proposta por Ramirez *et al.* (2010), foi sugerido que a heterocromatina tenha surgido em diferentes momentos e mais de uma vez ao longo da história evolutiva deste gênero e que as baixas quantidades heterocromáticas nos cromossomos indicam uma condição ancestral (Rocha *et al.*, 2002; Lopes *et al.*, 2011; Cunha *et al.*, 2018; Picolli *et al.*, 2018). Tavares *et al.* (2010) observaram, que além do padrão de distribuição da heterocromatina, que agrupa espécies com menos de 50% e com mais de 50% em seu

cariótipo (Rocha e Pompolo, 1998; Rocha *et al.*, 2002; Rocha *et al.*, 2003), a quantidade de DNA também separa as espécies de *Melipona*, em dois grupos. No primeiro grupo estão as espécies que possuem baixo conteúdo de DNA (variando de 0,27 a 0,35 pg de DNA), com representantes nos subgêneros *Melipona* e *Eomelipona*. E no segundo grupo, encontram-se as espécies com alto teor de DNA (variando de 0,70 a 1,38 pg de DNA), com representantes nos subgêneros *Melikerria* e *Michmelia* (Tavares *et al.*, 2010). Uma exceção em *Melikerria*, foi *M. quinquefasciata* com baixa quantidade de heterocromatina e alto teor de DNA. No entanto, esse alto valor de DNA é devido a presença de cromossomos B's em seu cariótipo (Tavares *et al.*, 2010; Tavares *et al.*, 2017). Além das espécies desses dois subgêneros, em *Eomelipona*, *Melipona marginata* Lepeletier, 1836 destaca-se por apresentar características morfológicas ancestrais e baixa quantidade de heterocromatina e de DNA (Camargo *et al.*, 1967; Rocha *et al.*, 2007; Tavares *et al.*, 2010). Desta forma, essas análises confirmam que o genoma com baixo conteúdo de DNA é uma característica plesiomórfica no gênero e que, tanto as diferenças na quantidade de heterocromatina ou de DNA presentes nos cromossomos, indicam o aumento dessas regiões.

A adição de heterocromatina e os padrões de distribuição dos blocos heterocromáticos nos cromossomos, assim como em *Melipona*, foram utilizados para explicar os diferentes caminhos evolutivos nas espécies de Meliponini, inicialmente com base na Teoria da Interação Mínima (TIM). Essa teoria, foi postulada com bases os padrões de distribuição dos blocos heterocromáticos de formigas do complexo de espécies do gênero *Myrmecia* e sugere que a heterocromatina estaria envolvida na recuperação da estabilidade telomérica após eventos de fissões cêntricas e diretamente ligada à evolução cromossômica pelo acúmulo de heterocromatina encontrada em um dos braços cromossomos (Imai *et al.*, 1986; Imai *et al.*, 1988; Imai, 1991; Pompolo, 1992; Hoshiba e Imai, 1993; Imai *et al.*, 1994, Pompolo e Campos, 1995; Imai *et al.*, 2001). Entretanto, diferentemente das demais espécies, no gênero *Melipona* parece ter ocorrido a adição de heterocromatina sem ter sido precedida por eventos de fissão, já que a heterocromatina está restrita aos centros dos cromossomos e não somente a um braço cromossômico (Rocha e Pompolo, 1998; Rocha *et al.*, 2003), e que eventos de fusão cêntrica teriam sido os mais importantes na evolução tanto desse gênero, como na tribo Meliponini (Travanzoli *et al.*, 2018).

De acordo com a datação molecular, *Melipona*  $\pm$  20 Ma é um grupo que divergiu recentemente quando relacionado aos ancestrais comuns das espécies de Meliponini que divergiram em  $\pm$  54 Ma (Rasmussen e Cameron, 2010, Ramirez *et al.*, 2010). O tempo

de divergência dos ancestrais comum entre os subgêneros sugere que o ancestral comum do grupo *Michmelia*, que possui espécies com alto teor de heterocromatina, datava  $\pm 18$  Ma e ancestral comum de *Melikerria*, datando  $\pm 8$  Ma, demonstram que a alta quantidade de heterocromatina surgiu mais de uma vez em um curto período de tempo. E desta forma, como o gênero apresenta espécies com baixo teor heterocromático, em que a heterocromatina está presente nas regiões pericentromérica e no braço curto dos cromossomos acrocêntricos e espécies com alto teor, em que a heterocromatina está presente ao longo de quase todo o cromossomo, sendo a eucromatina restrita às regiões subtelomérica (Rocha *et al.*, 2002), indicamos que o aumento dessas regiões heterocromáticas nos cromossomos de *Melipona* ocorreram com adição de heterocromatina a partir das regiões pericentroméricas em direção aos telômeros. Ou seja, a adição de heterocromatina nos cromossomos ocorreu a partir de um cariótipo com baixo conteúdo heterocromático presente no ancestral comum de *Michmelia* que surgiu independentemente no ancestral de *Melikerria*, o que não aconteceu nos cromossomos das espécies dos subgêneros *Eomelipona*, *Melipona stricto sensu* e em *M. quinquefasciata*, o que demonstra os diferentes caminhos evolutivos no crescimento heterocromático. E que a caracterização citogenética de outras espécies de *Melikerria* permitirão melhor compreensão dos processos que moldaram a evolução da cromatina neste subgênero.

O aumento de regiões heterocromáticas dos cromossomos também ocorreram na evolução de outros grupos taxonômicos. Em espécies de camundongos transgênicos, por exemplo, observou-se que o aumento do trinucleótido GAA estimula a heterocromatinização de genes próximos (Saveliev *et al.*, 2003), uma vez que, essas repetições podem formar estruturas secundárias que interferem na replicação e podem desencadear formação de heterocromatina (Mirkin, 2007). Por outro lado, em *Mytilus* (Mollusca) foi sugerido a transformação da heterocromatina em eucromatina, ou vice-versa, para explicar as diferenças cariotípicas observadas neste gênero (Martínez-Lage *et al.*, 1995). Já em espécies de *Drosophila*, tem sido observado que múltiplas cópias de um gene podem causar a formação de heterocromatina (Henikoff, 1998; Hsieh e Fire, 2000). E em espécies de formiga *Solenopsis invicta*, observou-se o crescimento de sequências repetitivas que constituem a região centromérica nos cromossomos, com posterior expansão do centrômero (Huang *et al.*, 2016), demonstrando que o crescimento de sequências repetitivas no DNA pode ocorrer em estruturas e regiões dos cromossomos. Além disso, o envolvimento de heterocromatina constitutiva em eventos de evolução cromossômica é discutido em vários estudos, sugerindo que essas regiões

atuam como pontos críticos que permitem o cromossomo estruturar rearranjos (Chaves *et al.*, 2004, Louzada *et al.*, 2008, Ventura *et al.*, 2009; Martins *et al.*, 2011). Assim, novas análises utilizando sondas específicas que marquem a região da heterocromatina podem ter resultados promissores para evidenciar sua composição, natureza e origem em cada gênero.

Dentre esses estudos, destacam-se as análises utilizando enzimas de restrição (REs), que clivam o DNA em sequências específicas (Lorite *et al.*, 2004; Amor *et al.*, 2009; Saksouk *et al.*, 2015; Milani *et al.*, 2017), e estudos envolvendo sequências de DNA repetitivo têm revelado informações sobre a organização do genoma, além de já estarem sendo utilizadas em estudos evolutivos em diferentes táxons como: roedores (Pieczarka *et al.*, 1998; Paço *et al.*, 2009), primatas (Pieczarka *et al.*, 1996), lagarto (Pokorná *et al.*, 2011), peixes (Cioffi *et al.* 2011, Kavalco *et al.* 2013; Yano *et al.*, 2014; Cunha *et al.*, 2016), grilos (Milani e Cabral de Mello, 2014; Palacios-Gimenez e Cabral de Mello, 2014) e formigas (Aguiar *et al.*, 2015; Pereira *et al.*, 2018). Além dessas análises, os estudos de identificação de proteínas relacionadas as regiões de heterocromatina também estão fornecendo importantes informações a respeito da constituição dessas regiões heterocromáticas e do genoma de espécies (Mteirek *et al.*, 2014; Saksouk *et al.*, 2015; revisado em Nikolov e Taddei, 2016). Desta forma, essas análises são promissoras para caracterizar a constituição e os processos envolvidos na formação da heterocromatina no genoma das espécies de *Melipona*.

Portanto, com base nas informações citogenéticas e moleculares da reconstrução quantidade de heterocromatina ancestral de *Melipona*, confirmamos que o baixo conteúdo heterocromático presente no cariótipo ancestral é uma característica plesiomórfica, que se manteve, independentemente, em *M. quinquefasciata*. Que o alto conteúdo heterocromático é resultado da adição de heterocromatina a partir de regiões pericentroméricas, ao longo da evolução, surgindo apareceu mais de uma vez durante a diversificação dos subgêneros *Michmelia* e *Melikerria*.

## **6. Agradecimentos**

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).



## 7. Referências

- Acosta MJ, Marchal JA, Fernández-Espartero C, Romero-Fernández I, Rovatsos MT, Giagia-Athanasopoulou EB, Gornung E, Castiglia R and Sánchez A (2010) Characterization of the satellite DNA Msat-160 from species of *Terricola* (Microtus) and *Arvicola* (Rodentia, Arvicolinae). *Genetica* 138:1085-1098.
- Acosta MJ, Marchal JA, Fernandez-Espartero CH, Bullejos M and Sanchez A (2008) Retroelements (LINEs and SINEs) in vole genomes: differential distribution in the constitutive heterochromatin. *Chromosome Res* 16:949-959.
- Amor N, Odierna G, Chinali G, Said K and Picariello O (2009) Unusual chromosomal distribution of a major satellite DNA from *Discoglossus pictus* (Amphibia, Anura). *Cytogenet Genome Res* 127:33-42.
- Bouckaert R, Heled J, Kühnert D, Vaughan T, Wu CH, Xie D, Suchard MA, Rambaut, A and Drummond AJ (2014) BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis. *PLoS Comput Biol* 10:e1003537.
- Camargo JMF and Pedro SRM (2013) Meliponini Lepeletier, 1836. In Moure, J. S., Urban, D., Melo, G. A. R. (Orgs). *Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region - online version*. Online version available at <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Last Accessed Jan/20/2018.
- Camargo JMF, Kerr WE and Lopes CR (1967) Morfologia externa de *Melipona* (*Melipona*) *marginata* Lepeletier (Hymenoptera – Apoidea). *Pap Avulsos Zool, São Paulo*, 20:229-258.
- Carvalho AF and Costa MA (2011) Cytogenetic characterization of two species of *Frieseomelitta* Ihering, 1912 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Genet Mol Biol* 34:237-239.
- Cioffi MB, Kejnovsky E and Bertollo LAC (2011) The chromosomal distribution of microsatellite repeats in the genome of the wolf fish *Hoplias malabaricus*, focusing on the sex chromosomes. *Cytogenet Genome Res* 132:289-296.
- Costa KF, Brito RM and Miyazawa CS (2004) Karyotypic description of four species of *Trigona* (Jurine, 1807) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) from the State of Mato Grosso, Brazil. *Genet Mol Biol* 27:187-190.
- Cunha MS, Travenzoli NM, Ferreira RP, Cassinela EK, Silva, H, Salomão, TMF and Lopes, DM (2018) Comparative cytogenetics in three *Melipona* species (Hymenoptera: Apidae) with two divergent heterochromatic patterns. *Genetics and Molecular Biology (no prelo)*.

- Cunha MS, Reis VJC and Dergam JA (2016) Closely Related Syntopic Cytotypes of *Astyanax taeniatus* (Jenyns, 1842) from the Upper Piranga River, Upper Doce Basin in Southeastern Brazil. *Zebrafish* 13:112-117.
- de Aguiar HJAC, Barros LAC, Alves DR, Mariano CDSF, Delabie JHC and das Graças Pompolo S (2017) Cytogenetic studies on populations of *Camponotus rufipes* (Fabricius, 1775) and *Camponotus renggeri* Emery, 1894 (Formicidae: Formicinae). *PloS one* 12: e0177702.
- Drummond AJ and Rambaut A (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol* 7:214.
- Drummond AJ, Ho SYW, Phillips MJ and Rambaut A (2006) Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PloS Biol* 4:699-710.
- Fernandes A, Werneck HA, Pompolo SG and Lopes DM (2013). Evidence of separate karyotype evolutionary pathway in *Euglossa* orchid bees by cytogenetic analyses. *An Acad Bras Cienc* 85:937-944.
- Giribet G and Wheeler WC (1998) On Gaps. *Mol Phylogenet Evol* 13:132-143.
- Godoy DC, Ferreira RP and Lopes DM (2013) Chromosomal Variation and Cytogenetics of *Plebeia lucii* and *P. phrynostoma* (Hymenoptera: Apidae). *Fla Entomol* 96:1559-1566.
- Hoshiba H and Imai HT (1993) Chromosome evolution of bees and wasps (Hymenoptera, Apocrita) on the basis of C-banding pattern analyses. *Jap J Entol* 61:465-492.
- Hoshiba H and Kusanagi A (1978) Karyological study of honeybee. *J Apic Res* 17:105-109.
- Imai HT (1991) Mutability of constitutive heterochromatin (C-bands) during eukaryotic chromosomal evolution and their cytological meaning. *Jpn J Genet* 66:635-661.
- Imai HT, Maruyama T, Gojobori T, Inoue Y and Crozier RH (1986) Theoretical bases for karyotype evolution. The minimum-interaction hypothesis. *Am Nat* 128:900-920.
- Imai HT, Satta Y and Takahata N (2001) Integrative study on chromosome evolution of mammals, ants and wasps based on the minimum interaction theory. *J Theor Biol* 210:475-497.
- Imai HT, Taylor RW and Crozier RH (1994) Experimental bases for the minimum interaction theory. I. Chromosome evolution in ants of the *Myrmecia pilosula* species complex (Hymenoptera: Formicidae: Myrmeciinae). *Japn J Gen* 69:137-182.

- Imai HT, Taylor RW, Crosland MW and Crozier RH (1988) Modes of spontaneous chromosomal mutation and karyotype evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis. *Japn J Gen* 63:159-185.
- Katoh K and Standley DM (2014) MAFFT: iterative refinement and additional methods. *Methods Mol Biol* 1079:131-146.
- 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*). *Mol Biol Evol* 20:87-92.
- Kerr WE (1948) Estudos sobre o gênero *Melipona*. *An Esc Super Agric Luiz de Queiroz* 5:182-276.
- Kerr WE (1969) Some aspects of the evolution of the social bees. *Evolutionary Biology* 3:119-175.
- Kerr WE and Araújo VP (1957) Contribuição ao estudo citológico dos Apoidea. *Garcia da Orta* 5:431-433.
- Kerr WE and Nielsen, RA (1966) Evidence that genetically determined *Melipona* queens can become workers. *Genetics* 54:859-865.
- Kerr WE, Carvalho, GA and Nascimento VA (1996) *Abelha Uruçu - Biologia, Manejo e Conservação*. 1st edition. Fundação Acangaú, Belo Horizonte, 157 p.
- Kerr WE, Silveira ZV (1972) Karyotypic evolution of bees and corresponding taxonomic implications. *Evol Int J org Evol* 26:197-202.
- Lopes DM, Fernandes A, Diniz D, Scudeler PES, Foresti F and Campos LAO (2014) Similarity of heterochromatic regions in the stingless bees (Hymenoptera: Meliponini) revealed by chromosome painting. *Caryologia* 67:222-226.
- Lopes DM, Fernandes A, Praça-Fontes MM, Werneck HDA, Resende HC and Campos LADO (2011) Cytogenetics of three *Melipona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Sociobiology* 58:185-194.
- 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. *Genet Mol Biol* 131:49-52.
- Lorite P, Carrillo JA, Aguilar JA and Palomeque T (2004) Isolation and characterization of two families of satellite DNA with repetitive units of 135 bp and 2.5 kb in the ant *Monomorium subopacum* (Hymenoptera, Formicidae). *Cytogenet Genome Res* 105:83-92.

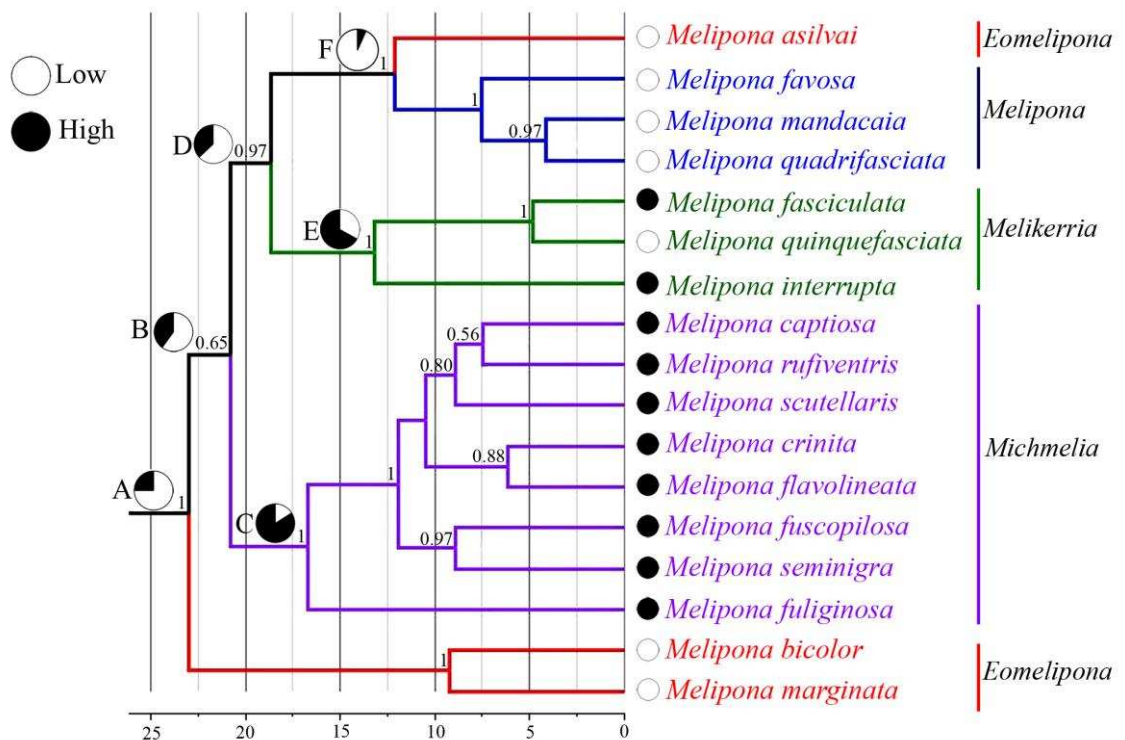
- Madison WP, Madison DR (2011). Mesquite: A modular system for evolutionary analysis, version 2.75. Online version available at <http://mesquiteproject.org>. Last Accessed Mar/02/2018.
- Martínez-Lage A, González-Tizón A and Méndez J (1995) Chromosomal markers in three species of the genus *Mytilus* (Mollusca: Bivalvia). *Heredity* 74:369.
- Michener CD (2000) *Bees of the World*. Baltimore, Johns Hopkins University Press.
- Michener CD (2007) *The Bees of the World*. The John Hopkins University Press, London, 913 p.
- Milani D and Cabral-de-Mello DC (2014) Microsatellite organization in the grasshopper *Abracris flavolineata* (Orthoptera: Acrididae) revealed by FISH mapping: remarkable spreading in the A and B chromosomes. *PloS one* 9: e97956.
- Miller MA, Pfeiffer W and Schwartz T (2010) "Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees" in *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*, New Orleans, LA, 1-8 p.
- Miranda RV and Fernandes A, Lopes DM (2013) Karyotype description of *Cephalotrigona femorata* Smith (Hymenoptera: Apidae) and the C-banding pattern as a specific marker for *Cephalotrigona*. *Sociobiology* 60:131-134.
- Palacios-Gimenez OM and Cabral-de-Mello DC (2015) Repetitive DNA chromosomal organization in the cricket *Cycloptiloides americanus*: a case of the unusual X 1 X 2 0 sex chromosome system in Orthoptera. *Mol Genet Genomics* 290:623-631.
- Pereira TTP, dos Reis ACCC, Cardoso DC and Cristiano MP (2018) Molecular phylogenetic reconstruction and localization of the (TTAGG)<sub>n</sub> telomeric repeats in the chromosomes of *Acromyrmex striatus* (Roger, 1863) suggests a lower ancestral karyotype for leafcutter ants (Hymenoptera). *Comp Cytogenet* 12:13.
- Piccoli, M. C. A., Bardella, V. B., & Cabral-de-Mello, D. C. Repetitive DNAs in *Melipona scutellaris* (Hymenoptera: Apidae: Meliponidae): chromosomal distribution and test of multiple heterochromatin amplification in the genus. *Apidologie* 1-8.
- Pieczarka JC, Nagamachi CY, Barros RMS and Mattevi MS (1996) Analysis of constitutive heterochromatin by in situ digestion with restriction enzymes in species of the group *Callithrix argentata* (Callitrichidae, Primates). *Cytogenet Cell Genet* 72:325±330.
- Pieczarka JC, Nagamachi CY, Muniz JAPC and Barros RMS (1998) Analysis of constitutive heterochromatin of *Aotus* (Cebidae, Primates) by restriction enzyme

- Pompolo SG (1992) Estudos citogenéticos em Meliponinae. *Naturalia*, Special ed. 62-66.
- Pompolo SG and Campos LAO (1995) Karyotypes of two species of stingless bees, *Leurotrigona muelleri* and *Leurotrigona pusilla* (Hymenoptera, Meliponinae). *Rev Bras Genet* 18:181-184.
- Rambaut A (2009) FigTree, ver. 1.3.1. Online version available at <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/> Last Accessed Feb/02/2018).
- Rambaut A and Drummond A (2009) Tracer, Version 1.5. Online version available at <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>. Last Accessed Feb/02/2018).
- Ramirez SR, Nieh JC, Quental TB, Roubik DW, Imperatriz-Fonseca VL and Pierce NE (2010) A molecular phylogeny of the stingless bee genus *Melipona* (Hymenoptera: Apidae). *Mol Phylog Evol* 56:519-525.
- Rasmussen C and Cameron SA (2010) Global stingless bee phylogeny supports ancient divergence, vicariance, and long distance dispersal. *Biol J Linn Soc* 99:206-232.
- Rocha MP and Pompolo SG (1998) Karyotypes and heterochromatin variation (C-bands) in *Melipona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Genet Mol Biol* 21:41-45.
- Rocha MP and Pompolo SG (1998) Karyotypes and heterochromatin variation (C-bands) in *Melipona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Genet Mol Biol* 21:41-45.
- Rocha MP, Cruz MP, Pompolo SG, Fernandes A, Silva JCJR and Waldschmidt AM (2003) Longitudinal differentiation in *Melipona mandacaia* (Hymenoptera, Meliponini) chromosomes. *Hereditas* 138:133-137.
- Rocha MP, Pompolo SG and Campos LAO (2003) Citogenética da tribo Meliponini (Hymenoptera, Apidae). In: Melo GAR, Santos IA (eds) *Apoidea Neotropica. Homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure*. UNESC, Santa Catarina, 311-320 p.
- Rocha MP, Pompolo SG, 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, Fernandes A, Campos LAO (2007) *Melipona*: Six decade of cytogenetic. *Biosc J* 1:111-117.
- Ronquist F and Huelsenbeck JP (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatic* 19:1572-1574.

- Ronquist F, Klopfstein S, Vilhelmsen L, Schulmeister S, Murray DL, Rasnitsyn AP (2012) A total-evidence approach to dating with fossils, applied to the early radiation of the Hymenoptera. *Syst Biol* 61:973-99.
- Saksouk N, Simboeck E and Déjardin J (2015) Constitutive heterochromatin formation and transcription in mammals. *Epigenetics Chromatin* 8:3.
- Saveliev A, Everett C, Sharpe T, Webster Z and Festenstein R (2003) DNA triplet repeats mediate heterochromatin-protein-1-sensitive variegated gene silencing. *Nature* 422:909.
- Silva PC, Santos U, Travenzoli NM, Zanuncio JC, Cioffi MDB and Dergam JA (2012) The unique karyotype of *Hemichilus wheatlandii*, a critically endangered fish living in a fast-developing region in Minas Gerais State, Brazil. *PloS one* 7:e42278.
- Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res* 83:438-442.
- Sumner AT (2003) *Chromosomes Organization and Function*. Blackwell Publishing North Berwick, 287 p.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A and Kumar S (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30:2725-2729.
- Tavares MG, Lopes DM and Campos LAO (2017) An overview of cytogenetics of the tribe Meliponini (Hymenoptera: Apidae). *Genetic* 145:1-18.
- Tomita M, Shimizu N and Brutlag DL (1996) Introns and Reading frames: correlation between splicing sites and their codon positions. *Mol Biol Evol* 13:1219-1223.
- Travenzoli *et al.*, 2018
- Travenzoli NM, Silva PC, Santos U, Zanuncio JC, Oliveira C and Dergam JA (2015) Cytogenetic and molecular data demonstrate that the Bryconinae (Ostariophysi, Bryconidae) species from Southeastern Brazil form a phylogenetic and phylogeographic unit. *PloS one* 10:e0137843.
- Trojer P and Reinberg D (2007) Facultative heterochromatin: is there a distinctive
- Vaidya G, Lohman DJ and Meier R (2011) Sequence Matrix: concatenation software for the fast assembly of multigene datasets with character set and codon information. *Cladistics* 27:171-180.
- Vicari MR, Nogaroto V, Noleto RB, Cestari MM, Cioffi MB, Almeida MC ... & Artoni RF (2010) Satellite DNA and chromosomes in Neotropical fishes: methods, applications and perspectives. *J Fish Biol* 76:1094-1116.

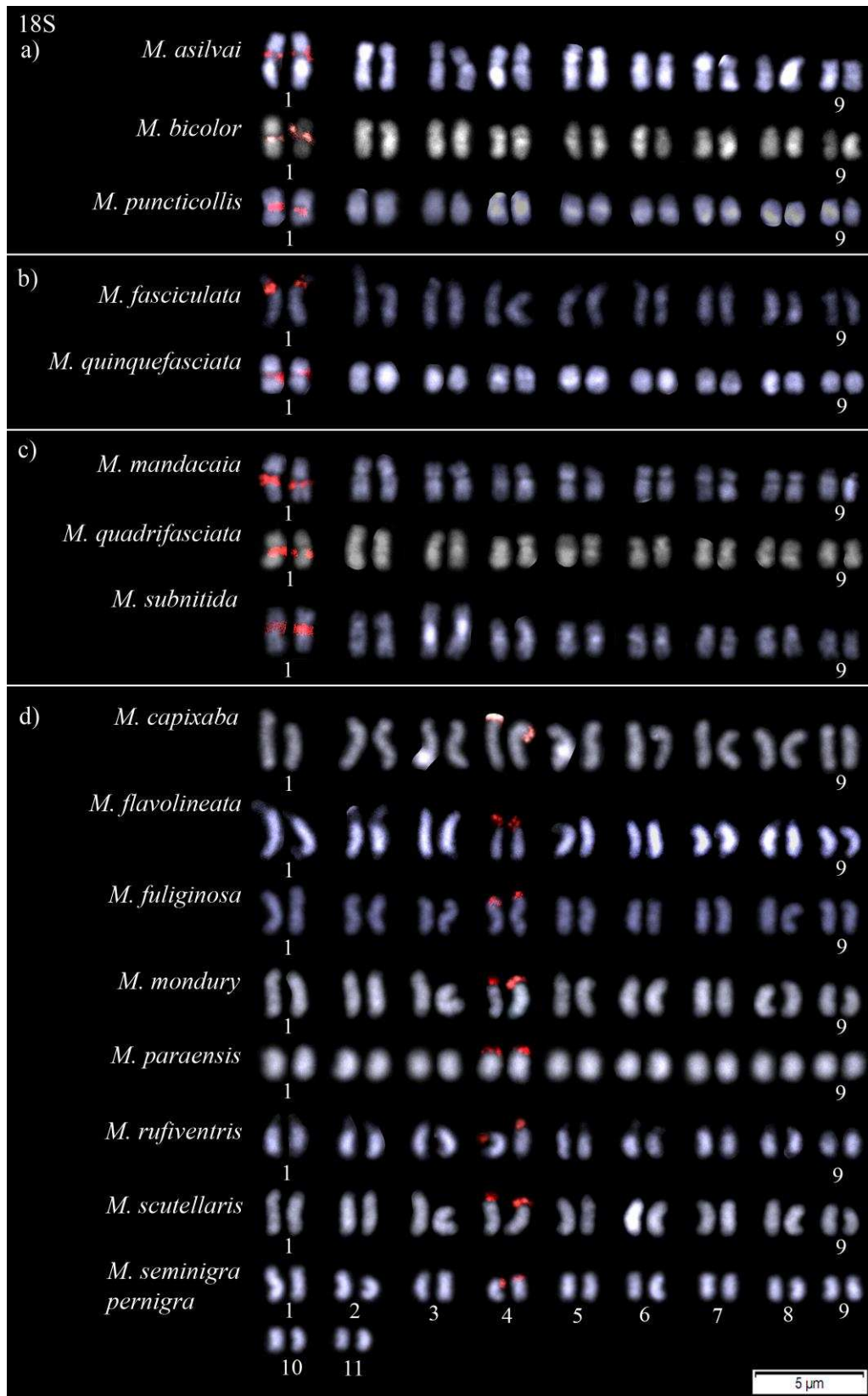
- Yamada K, Kamimura E, Kondo M, Tsuchiya K, Nishida-Umehara C and Matsuda Y. (2006) New families of site-specific repetitive DNA sequences that comprise constitutive heterochromatin of the Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*, Cricetinae, Rodentia). *Chromosoma* 115:36-49.
- Yano CF, Poltronieri J, Bertollo LAC, Artoni RF, Liehr T and de Bello Cioffi M (2014) Chromosomal mapping of repetitive DNAs in *Tripurtheus trifurcatus* (Characidae, Characiformes): insights into the differentiation of the Z and W chromosomes. *PloS one* 9:e90946.

## Figuras

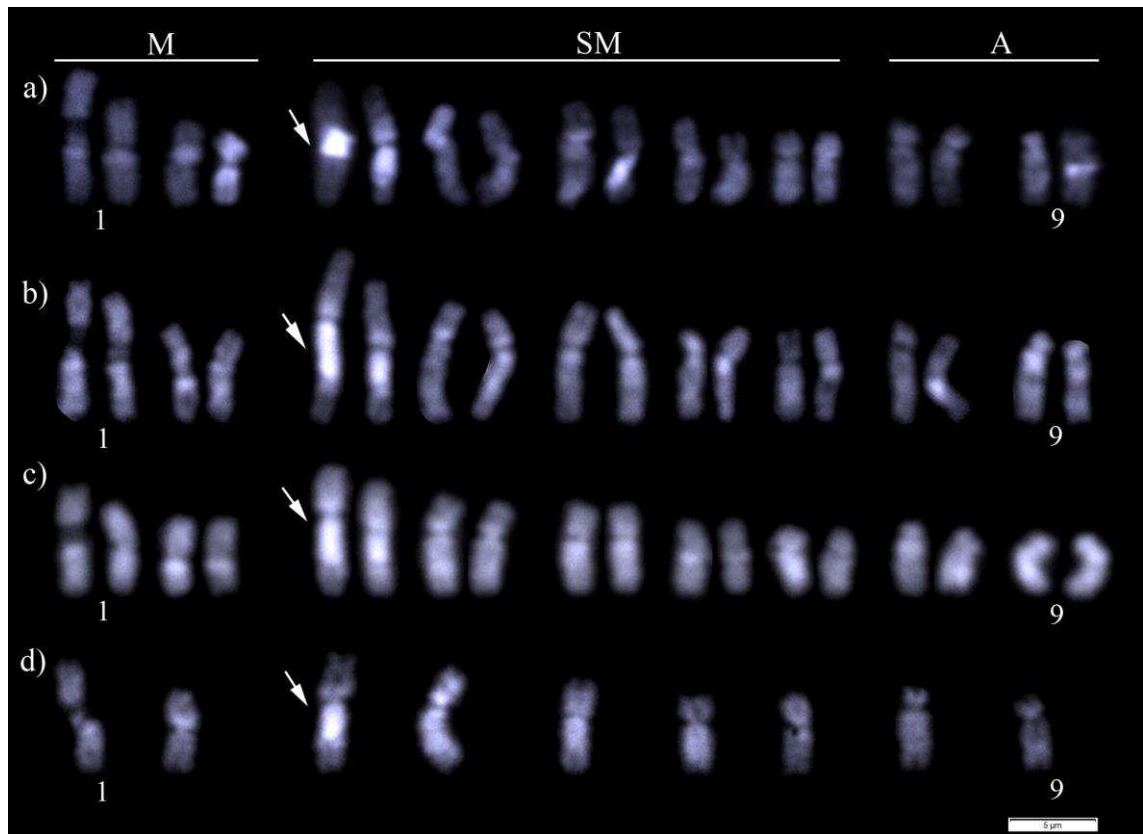


**Figura 1.** Árvore consenso da análise bayesiana com base em seqüências parciais dos genes Arg-K, EF1- $\alpha$ , Opsin, 16S e 28S concatenados nas espécies de *Melipona*, incluindo a datação molecular e a inferência da quantidade de heterocromatina ancestral. Os círculos nos ramos terminais representam as diferenças na quantidade de heterocromatina (em branco, baixo conteúdo e em preto, alto conteúdo) e nos nós ancestrais indicam as probabilidades dos estados ancestrais. Os ramos coloridos representam os subgêneros: *Eomelipona* (vermelho), *Melipona* (azul), *Melikerria* (verde) e *Michmelia* (roxo).



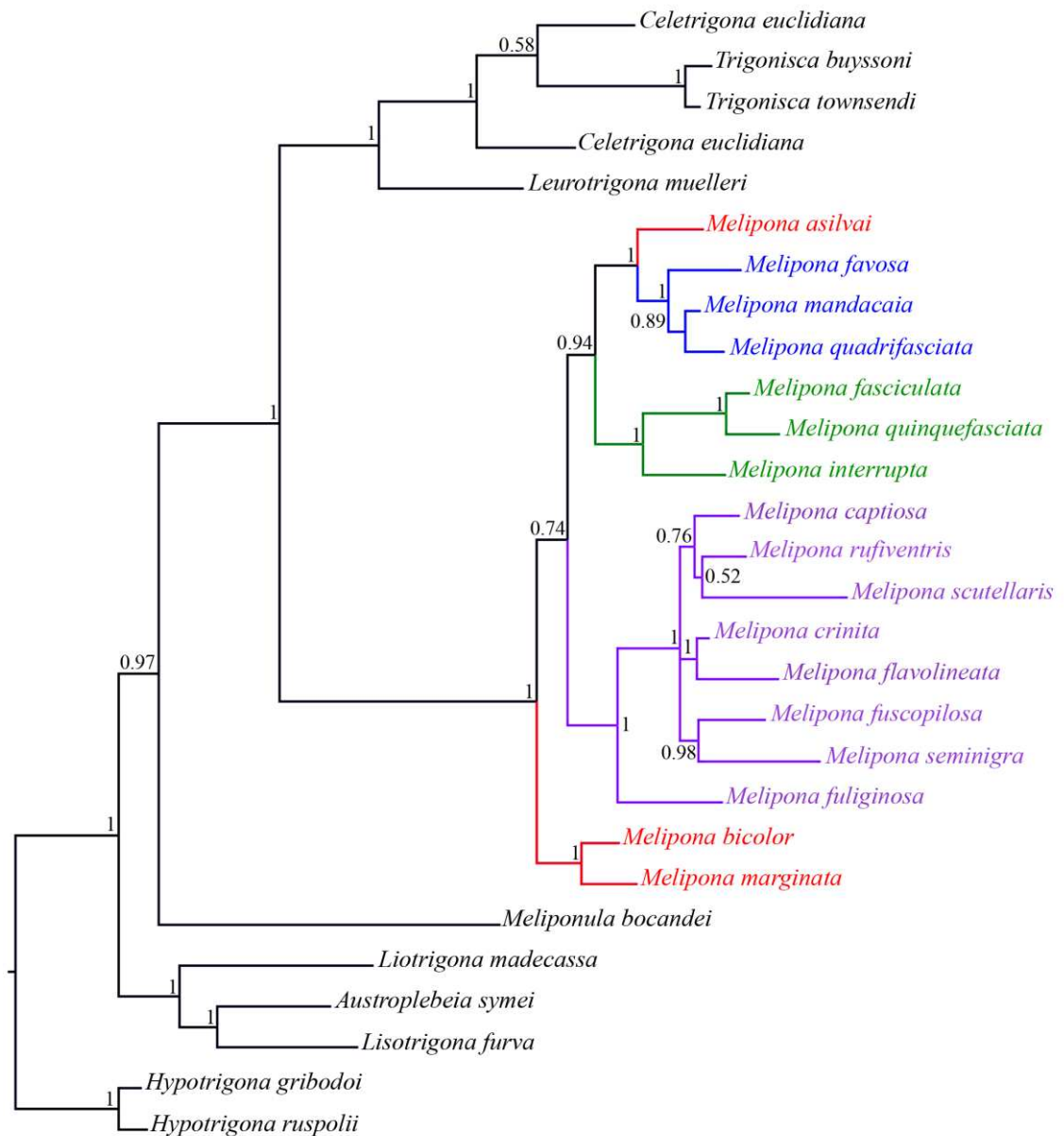


**Figura 2.** Padrões obtidos com o FISH com a sonda de DNA 18S ribossomal em espécies *Melipona* pertencentes aos subgêneros: (a) *Eomelipona*, (b) *Melikerria*, (c) *Melipona stricto sensu* e (d) *Michmelia*. Em azul, cromossomos corados com DAPI e em vermelho, a marcação da sonda.

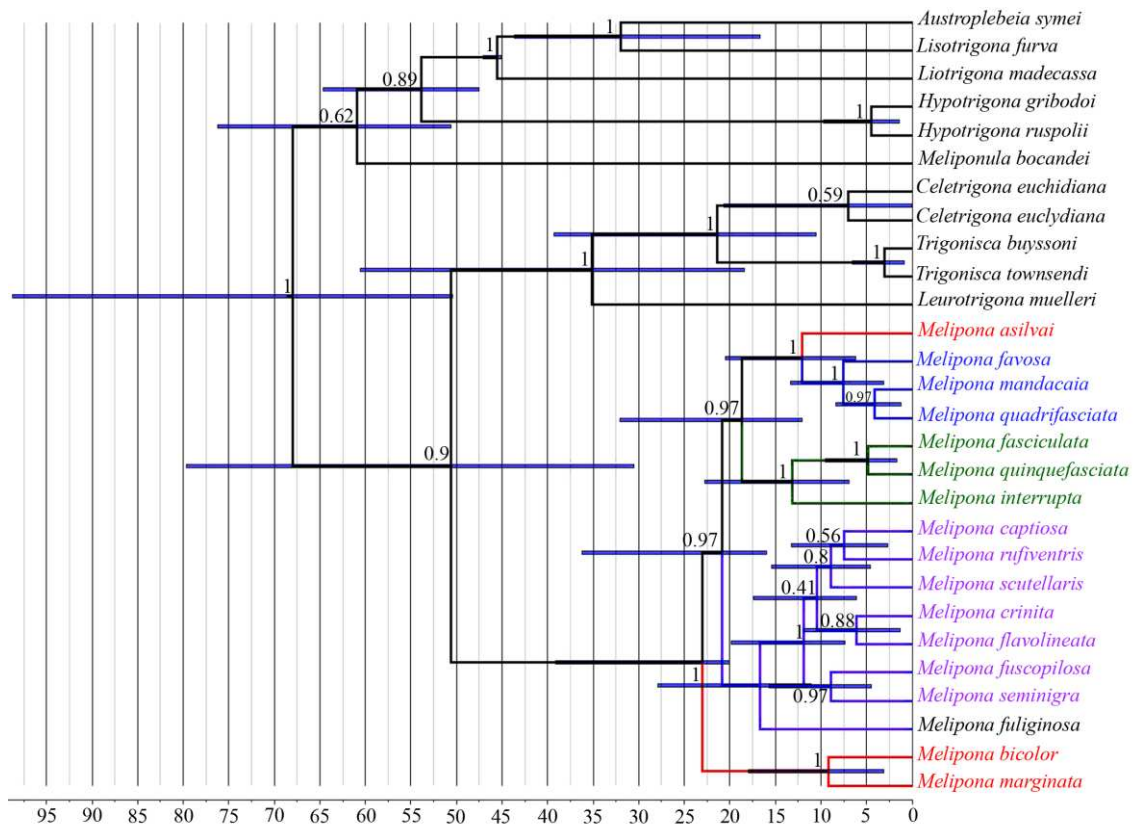


**Figura 3.** Cariótipo de *Melipona subnitida*: (a, b, c) fêmea e (d) macho. As letras representam cromossomos: (m) metacêntrico, (sm) submetacêntrico e (a) acrocêntrico. As setas estão indicando o bloco heterocromático. Em azul a coloração com DAPI.

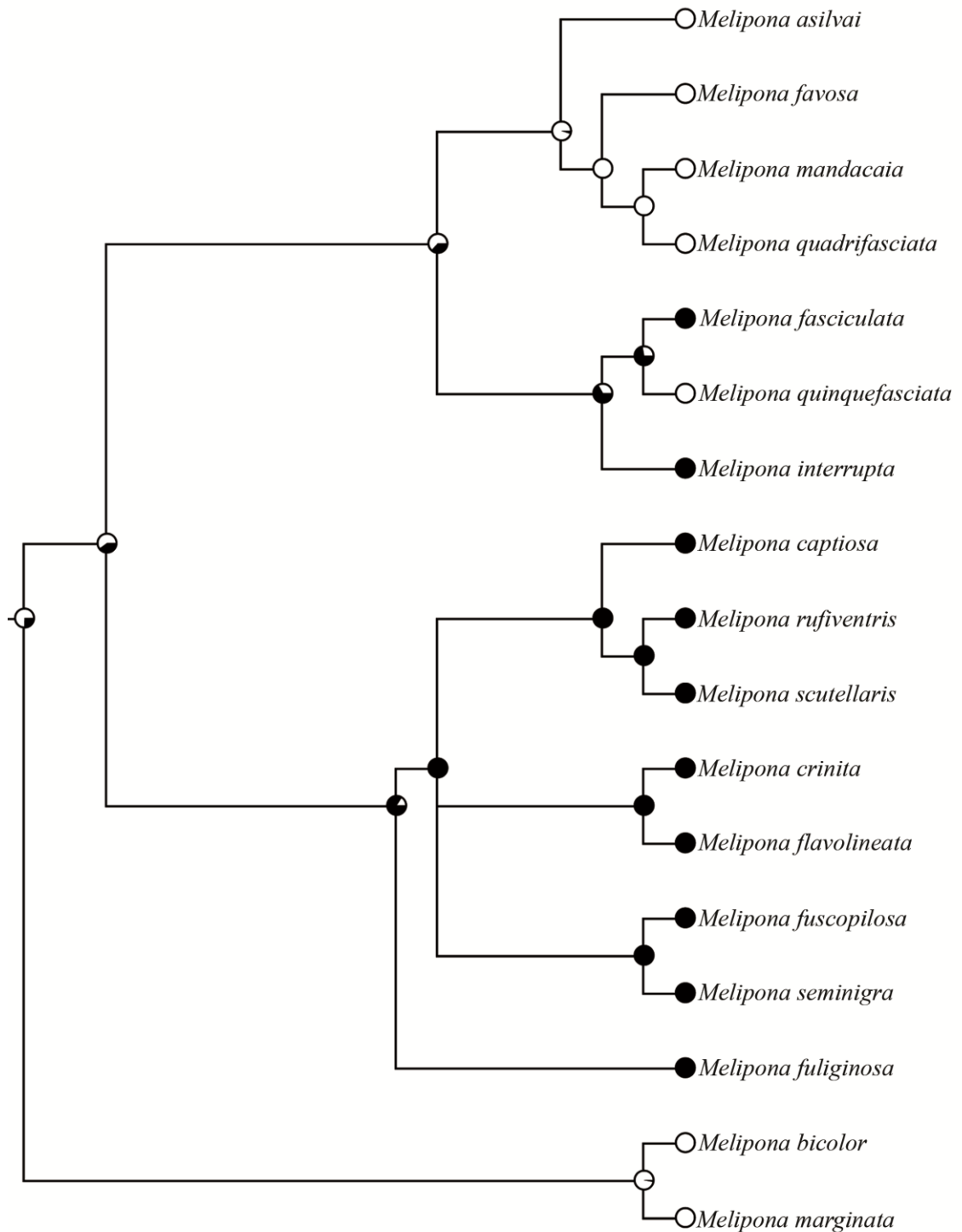
## Material Suplementar



**Figura S1.** Árvore consenso da análise bayesiana com base em seqüências parciais dos genes Arg-K, EF1- $\alpha$ , Opsin, 16S e 28S em espécies de *Melipona*. Os ramos coloridos representam os subgêneros: *Eomelipona* (vermelho), *Melipona* (azul), *Melikerria* (verde) e *Michmelia* (roxo). O grupo externo foi representado pelas espécies *Austroplebeia symei*, *Celetrigona euclidiana*, *Hypotrigona gribodoi*, *Hypotrigona ruspolii*, *Leurotrigona muelleri*, *Liotrigona madecassa*, *Lisotrigona furva*, *Meliponula bocandei*, *Trigonisca buyssoni* e *Trigonisca townsendi*.



**Figura S2.** Árvore consenso da análise bayesiana com base em sequências parciais dos genes Arg-K, EF1- $\alpha$ , Opsin, 16S e 28S em espécies de *Melipona* incluindo o tempo de divergência estimado pelo programa Beast. Os ramos coloridos representam os subgêneros: *Eomelipona* (vermelho), *Melipona* (azul), *Melikerria* (verde) e *Michmelia* (roxo). O grupo externo foi representado pelas espécies *Austroplebeia symei*, *Celetrigona euclidiana*, *Hypotrigona gribodoi*, *Hypotrigona ruspolii*, *Leurotrigona muelleri*, *Liotrigona madecassa*, *Lisotrigona furva*, *Meliponula bocandei*, *Trigonisca buyssoni* e *Trigonisca townsendi*.



**Figura S3.** Reconstrução do estado ancestral de acordo com a quantidade de heterocromatina. Os círculos nos ramos terminais representam as diferenças na quantidade de heterocromatina (em branco: baixo conteúdo e em preto: alto conteúdo) e nos nós ancestrais indicam as probabilidades dos estados ancestrais.

**Tabela 1.** Espécies de *Melipona* incluindo as do presente estudo, número de ploide, padrões de bandamento-C (baixo ou alto conteúdo de heterocromatina) e locais de coleta. As foram separadas em subgêneros baseado segundo Camargo & Pedro, 2013

Subgênero	Espécies	2n	Bandeamento-C	Localização	Referências bibliográficas
<i>Eomelipona</i>	<i>M. asilvai</i> Moure, 1971	18	Low	Pedra de Maria da Cruz – MG	Rocha and Pompolo, 1998
	<i>M. bicolor</i> Lepeletier, 1836	18	Low	Viçosa (MG)	Rocha and Pompolo, 1998
	<i>M. marginata</i> Lepeletier, 1836	18	Low	Caeté (MG)	Rocha and Pompolo, 1998; Rocha <i>et al.</i> , 2007
<i>Melikerria</i>	<i>M. fasciculata</i> Smith, 1854**	18	High	São Luiz (MA), Urbano Santos (MA)	Rocha <i>et al.</i> , 2002; Lopes <i>et al.</i> , 2011
	<i>M. interrupta</i> Latreille, 1811	18	High	Manaus (AM)	Travenzoli <i>et al.</i> , 2018a
	<i>M. quinquefasciata</i> Lepeletier, 1836	18***	Low	Brasília (DF), Luiziana (GO)	Rocha <i>et al.</i> , 2002
<i>Melipona</i>	<i>M. favosa</i> Fabricius, 1798	18	Low	Suriname (referred as Surinum)	Hoshiba, 1988
	<i>M. mandacaia</i> Smith, 1863	18	Low	Irecê (BA)	Rocha <i>et al.</i> , 2003
	<i>M. quadrifasciata</i> Lepeletier, 1836	18	Low	Viçosa (MG)	Rocha & Pompolo, 1998
<i>Michmelia</i>	<i>M. captiosa</i> Moure, 1962	18	High	Rio Branco (AC)	Rocha & Pompolo, 1998
	<i>M. crinita</i> Moure & Kerr, 1950	18	High	Rio Branco (AC)	Rocha <i>et al.</i> , 2002
	<i>M. flavolineata</i> Friese, 1900	18	High	Urbano Santos (MA)	Lopes <i>et al.</i> , 2011
	<i>M. fuliginosa</i> Lepeletier, 1836	18	High	Urbano Santos (MA)	Lopes <i>et al.</i> , 2011
	<i>M. fuscopilosa</i> Moure & Kerr, 1950	18	High	Rio Branco (AC)	Rocha & Pompolo, 1998; Rocha <i>et al.</i> , 2002

**Continuação**

<b>Subgênero</b>	<b>Espécies</b>	<b>2n</b>	<b>Bandeamento- C</b>	<b>Localização</b>	<b>Referências bibliográficas</b>
	<i>M. rufiventris</i> Lepeletier, 1836	18***	High	Guimarães (MG)	Lopes <i>et al.</i> , 2008
	<i>M. scutellaris</i> Latreille, 1811	18	High	Lençóis (BA)	Rocha & Pompolo, 1998; Rocha <i>et al.</i> , 2002
	<i>M. seminigra merrillae</i> Cockerell, 1919	22	High	Altamira (PA)	Cunha <i>et al.</i> , 2018

## Material Suplementar

**Tabela S1.** Espécies de abelhas e o grupo externo analisado, local de coleta, número de acesso dos genes no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e as referências bibliográficas

Espécies	Voucher	Local de coleta	16S	ArgK	EF1- $\alpha$	Opsin	28S	Referências bibliográfica
<b>Grupo interno</b>								
<i>Melipona asilvai</i>	MP82	Brazil	EU162991	EU163076	EU163244	–	–	Ramírez et al., 2010
<i>Melipona bicolor</i>	456	Brazil, Minas Gerais	FJ041919	FJ042195	FJ042296	FJ042398	FJ042020	Rasmussen & Cameron, 2010
<i>Melipona captiosa</i>	MP43	French Guiana	EU162976	EU163061	EU163229	–	–	Ramírez et al., 2010
<i>Melipona crinita</i>	586	Peru, Madre de Díos	FJ041942	FJ042219	FJ042320	FJ042422	FJ042044	Rasmussen & Cameron, 2010
<i>Melipona fasciculata</i>	120	Brazil, São Paulo	FJ041946	FJ042223	FJ042324	FJ042426	FJ042048	Rasmussen & Cameron, 2010
<i>Melipona favosa</i>	MP19	French Guiana	EU162961	EU163046	EU163214	–	–	Ramírez et al., 2010
<i>Melipona flavolineata</i>	MP49	Brazil	EU162981	EU163066	EU163234	–	–	Ramírez et al., 2010
<i>Melipona fuliginosa</i>	MP42	French Guiana	EU162975	EU163060	EU163228	–	–	Ramírez et al., 2010
<i>Melipona fuscopilosa</i>	MP35	Brazil	EU162970	EU163055	EU163223	–	–	Ramírez et al., 2010
<i>Melipona interrupta</i>	MP20	Brazil	EU162962	EU163047	EU163215	–	–	Ramírez et al., 2010
<i>Melipona mandacaia</i>	MP81	Brazil	EU162990	EU163075	EU163243	–	–	Ramírez et al., 2010
<i>Melipona marginata</i>	461	Brazil, São Paulo	FJ041920	FJ042196	FJ042297	FJ042399	FJ042021	Rasmussen & Cameron, 2010
<i>Melipona quadrifasciata</i>	MP23	Brazil	EU162965	EU163050	EU163218	–	–	Ramírez et al., 2010
<i>M. quinquefasciata</i>	MP80	Brazil	EU162989	EU163074	EU163242	–	–	Ramírez et al., 2010
<i>Melipona rufiventris</i>	MP77	Brazil	EU162985	EU163070	EU163238	–	–	Ramírez et al., 2010
<i>Melipona scutellaris</i>	121	Brazil, Minas Gerais	FJ041939	FJ042216	FJ042317	FJ042419	FJ042041	Rasmussen & Cameron, 2010
<i>Melipona seminigra merrillae</i>	122	Brazil, Amazonas	FJ041940	FJ042217	FJ042318	FJ042420	FJ042042	Rasmussen & Cameron, 2010



**Continuação**

<b>Espécies</b>	<b>Voucher</b>	<b>Local de coleta</b>	<b>16S</b>	<b>ArgK</b>	<b>EF1-<math>\alpha</math></b>	<b>Opsin</b>	<b>28S</b>	<b>Referências Bibliográficas</b>
<b>Grupo externo</b>								
<i>Austroplebeia symei</i>	223	Australia, QLD	DQ790445	-	DQ813105	DQ813183	FJ042170	Rasmussen & Cameron, 2010
<i>Celetrigona euclidiana</i>	062	Peru, San Martín	FJ041912	FJ042188	FJ042289	FJ042391	FJ042012	Rasmussen & Cameron, 2010
<i>Hypotrigona gribodoi</i>	405	Uganda, Bwindi	DQ790440	DQ813043	DQ813121	DQ813199	FJ042165	Rasmussen & Cameron, 2010
<i>Hypotrigona ruspolii</i>	425	Cameroon, Yaounde	DQ790441	DQ813044	DQ813122	DQ813200	FJ042166	Rasmussen & Cameron, 2010
<i>Leurotrigona muelleri</i>	466	Brazil, São Paulo	FJ041933	FJ042209	FJ042310	FJ042412	FJ042034	Rasmussen & Cameron, 2010
<i>Liotrigona madecassa</i>	404	Madagascar, Mahajanga	DQ790443	DQ813049	DQ813127	DQ813205	FJ042168	Rasmussen & Cameron, 2010
<i>Lisotrigona furva</i>	420	Thailand, Pathumthani	DQ790444	-	DQ813128	DQ813206	FJ042169	Rasmussen & Cameron, 2010
<i>Meliponula bocandei</i>	406	Uganda, Bwindi	DQ790452	DQ813052	DQ813131	DQ813209	FJ042177	Rasmussen & Cameron, 2010
<i>Trigonisca buyssoni</i>	150	Costa Rica, Guanacaste	FJ041998	FJ042276	FJ042377	FJ042478	FJ042103	Rasmussen & Cameron, 2010
<i>Trigonisca townsendi</i>	383	Peru, Tumbes	DQ790456	DQ813068	DQ813147	DQ813225	FJ042105	Rasmussen & Cameron, 2010

**Tabela S2.** Probabilidades (em porcentagem) da quantidade de heterocromatina observada na reconstrução do ancestral comum no clado entre as espécies de *Melipona*

<b>Clado</b>	<b>Probabilidades (%)</b>	
	<b>Baixo</b>	<b>Alto</b>
A	75	25
B	60	40
C	16	84
D	63	37
E	33	67
F	92	8

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Baseado nas informações citogenéticas e de evolução cromossômica sob uma abordagem filogenética em Meliponini, sugerimos que o  $n=18$  é o número cromossômico ancestral e que se manteve ao longo da evolução em diferentes espécies, reduzindo para  $n=17$  no ancestral comum dos Meliponini neotropical por eventos de fusão cromossômica. E o baixo número de cromossomos ( $n=9$ ) em *Melipona* é uma apomorfia do grupo.
- A espécie *Austroplebeia australis* possui uma constituição da cromatina, baseada na riqueza de bases AT e CG, mais semelhante a ao observado em espécies solitárias e que grande quantidade de heterocromatina semelhante ao observado em algumas espécies de *Melipona*, da linhagem Neotropical. O que demonstra que a heterocromatina parece ser uma característica importante para evolução cromossômica da tribo. Possivelmente, passe por processos de crescimento independentes em cada gênero.
- As análises de citogenética clássica e molecular de *Melipona (Melikerria) interrupta* confirmam que, baseados nos padrões heterocromáticos, *M. (Melikerria) interrupta* é classificada como pertencente ao Grupo II, o que sugere o aumento da quantidade de heterocromatina no subgênero *Melikerria*. A espécie *M. quinquefasciata* parece estar evoluindo independentemente no grupo e que as diferenças nas regiões de marcações do CMA<sub>3</sub> e do sítio de 18S apenas nas espécies de alto conteúdo de heterocromatina de *Melikerria* é uma característica importante a ser melhor investigada.
- Com base nas informações de citogenéticas clássicas e moleculares em *Melipona* concluímos que os padrões heterocromáticos, fluorocromos base-específico e de DNA repetitivo quando correlacionados são marcadores cromossômicos que permitem caracterizar e separar as espécies de cada subgênero. O DNA repetitivo nas regiões eucromática é semelhante entre as espécies dos subgêneros, diferentemente da heterocromatina. E as diferenças nos sítios de CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> e rDNA 18S indicam as regiões heterocromáticas estejam evoluindo de maneira independente entre as espécies.

- Concluimos que o ancestral comum de *Melipona* possui baixo conteúdo de heterocromatina, esta que cresceu no ancestral comum de *Michmelia* e independentemente em *Melikerria*. E as diferenças nos padrões de marcação e da posição dos sítios de rDNA 18S, nas espécies de alto teor pertencentes a distintos subgêneros em três posições diferentes confirmam que a heterocromatina surgiu em momentos independentes entre as espécies.