

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E**  
**BIOLOGIA MOLECULAR**



**ESTUDOS CITOGENÉTICOS COMPARATIVOS ENTRE**  
**ESPÉCIES DE SCAURA (HYMENOPTERA, APIDAE,**  
**MELIPONINI)**

**ALAYNE MAGALHAES TRINDADE DOMINGUES**

**ILHÉUS – BAHIA – BRASIL**

**AGOSTO DE 2005**

**ALAYNE MAGALHÃES TRINDADE DOMINGUES**

**ESTUDOS CITOGENÉTICOS COMPARATIVOS ENTRE ESPÉCIES DE *SCAURA*  
(HYMENOPTERA, APIDAE, MELIPONINI)**

Dissertação apresentada à  
Universidade Estadual de Santa Cruz,  
como parte das exigências para  
obtenção do título de Mestre em  
Genética e Biologia Molecular.

**ALAYNE MAGALHÃES TRINDADE DOMINGUES**

**ILHÉUS – BAHIA – BRASIL**

**AGOSTO DE 2005**

ALAYNE MAGALHÃES TRINDADE DOMINGUES

ESTUDOS CITOGENÉTICOS COMPARATIVOS ENTRE ESPÉCIES DE *SCAURA*  
(HYMENOPTERA, APIDAE, MELIPONINI)

Dissertação apresentada à  
Universidade Estadual de Santa Cruz,  
como parte das exigências para obtenção  
do título de Mestre em Genética e Biologia  
Molecular.

APROVADA: 02 de agosto de 2005

Profa. Dra. Ana Maria Waldschmidt  
(UESB)

Profa. Dra. Janisete Gomes da Silva-Miller  
(UESC)

Prof. Dr. Marco Antônio Costa  
(UESC – Orientador)

Dedico este trabalho à minha família, por todo amor e pelo incentivo incondicional, em especial ao meu 'pai' Walmique (in memória), um exemplo de homem a ser seguido.

## AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos a todos que contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

À Universidade Estadual de Santa Cruz, pela realização deste curso.

Ao curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marco Antonio Costa, pelo incentivo, pelo apoio durante o desenvolvimento da pesquisa, pela amizade e acima de tudo pela confiança.

A Profa. Dra. Mônica Rosa Bertão, pelos ensinamentos transmitidos, pelo incentivo, pela amizade, e pelo exemplo de profissional a ser seguida.

Ao professor Dr. Ronan Xavier pelas sugestões e correções do trabalho final.

Ao professor Paulo Terra pelas valiosas sugestões.

Ao Dr. Paulo Nogueira Neto por permitir a coleta de amostras de *S. longula* em seu Meliponário na Fazenda Aretuzina, em São Paulo.

Ao Sidnei Mateus e ao professor Dr. Ronaldo Zucchi pelo acesso ao laboratório e auxílio com a coleta de *S. latitarsis*.

A todos os professores do curso de Pós-Graduação, que me apoiaram e ajudaram na minha formação profissional.

Aos meus professores de Graduação, Ana Maria, Juvenal, Ana Angélica, Paulo Carneiro, entre outros, que sempre incentivaram e confiaram em minha capacidade.

Às minhas colegas e amigas do laboratório, Rita e Vanderly, pela amizade, pelo apoio e pelos momentos de aprendizagem.

Aos amigos, Thiago e Rafael, pelo auxílio na realização desse trabalho, pelas risadas, pela confiança e pelo apoio constante.

À Claudine, pela convivência e pela amizade.

À minha amiga Cristina, pela convivência, pela confiança e claro pelos momentos alegres que compartilhamos.

Ao Charles, pela amizade e pelos momentos de risada.

Aos amigos Juca, Thiago Moraes, Renato e Luciano, pela amizade e pelo carinho.

Aos colegas de mestrado, pela amizade.

À Andréa, secretária do Curso de Pós-graduação, pelo apoio constante.

À Tânia e Suzana, pela amizade e por serem pessoas muito prestativas.

Aos meus pais (Pedro e Eula), pelo amor e por me ensinarem que a vida é cheia de obstáculos, que devem ser encarados com seriedade e segurança.

Às minhas queridas irmãs, Rosália e Yone, pelo amor, pelo incentivo e por acreditarem que eu iria chegar até aqui.

À minha 'mãe' (Vivina), por todo amor e carinho.

Ao meu 'pai' Walmique (in memória), pelo amor, pelo carinho, pela força e, acima de tudo, por ser uma pessoa com características insuperáveis.

Minha eterna gratidão a todos que me incentivaram, apoiaram e confiaram na minha capacidade em realizar este trabalho.

## INDICE

EXTRATO .....	vii
ABSTRACT .....	ix
LISTA DE FIGURAS .....	xi
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1 Considerações gerais sobre a tribo Meliponini .....	3
2.2 Importância ecológica e econômica das abelhas sem ferrão .....	4
2.3 Considerações sobre o gênero <i>Scaura</i> (Schwarz) .....	5
2.4 Considerações sobre a citogenética .....	7
2.4.1 Estudos citogenéticos na tribo Meliponini .....	7
2.4.2 Heterocromatina .....	8
2.4.3 Evolução cariotípica .....	9
2.5 Técnicas de bandamento .....	12
2.5.1 Banda C .....	13
2.5.2 Fluorocromos .....	14
2.5.2.1 DAPI “4'-6- diamidino – 2 – phenylindole” .....	14
2.5.2.2 Cromomicina A <sub>3</sub> (CMA <sub>3</sub> ) .....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	16
3.1 Material biológico .....	16
3.2 Preparação citológica .....	18
3.3 Técnica de coloração convencional .....	19
3.4 Técnica de bandamento .....	19
3.4.1 Banda-C .....	19
3.4.2 Coloração com CMA <sub>3</sub> .....	20

3. 4.3 Coloração com DAPI (4' – 6" – diamidino – 2 – phenilindole) .....	20
3.5 Análise dos cromossomos mitóticos .....	21
3.5.1 Análise das metáfases tratadas com técnicas da citogenética clássica ....	21
3.5.2 Análise das metáfases tratadas com fluorocromos .....	21
3.6 Representação esquemática do material.....	22
4. RESULTADOS .....	24
4.1 Características gerais dos cariótipos .....	24
4.2 Padrão de distribuição da heterocromatina .....	25
4.3 Caracterização cromossômica em <i>Scaura</i> por meio da coloração com os fluorocromos CMA <sub>3</sub> e DAPI .....	35
5. DISCUSSÃO .....	39
5.1 Número cromossômico e conteúdo heterocromático.....	39
5.2 Heteromorfismo cromossômico em <i>S. longula</i> .....	42
5.3 Caracterização da heterocromatina .....	43
5.4. Evolução cariotípica.....	45
6. CONCLUSÕES .....	50
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	51

## EXTRATO

DOMINGUES, Alayne Magalhães Trindade, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, agosto de 2005. **Estudos Citogenéticos Comparativos entre espécies de *Scaura* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)**. Orientador: Marco Antônio Costa. Co-orientadora: Mônica Rosa Bertão. Colaborador: Ronan Xavier Corrêa.

O gênero *Scaura* (Scharwz) inclui abelhas sem ferrão de tamanho pequeno e coloração escura, apresentando variação no hábito de nidificação, podendo nidificar em cavidades diversas como ocos de árvores, ou mesmo em termiteiros ativos. Atualmente, quatro espécies são reconhecidas: *S. latitarsis* (Friese), *S. atlântica* (Melo), *S. longula* (Lepeletier) e *S. tenuis* (Ducke). No presente trabalho objetivou-se desenvolver a análise comparativa dos cariótipos para identificar os principais rearranjos cromossômicos ocorridos ao longo da evolução dessas espécies e caracterizar, em nível cromossômico, o grau de divergência encontrado, bem como inferir sobre suas relações. Amostras de *S. latitarsis*, *S. atlantica* e *S. longula* foram coletadas diretamente dos ninhos oriundos de diferentes regiões do país, de acordo com a distribuição do gênero. A análise dos cariótipos, por meio das diferentes técnicas, permitiu determinar que estes apresentam número cromossômico  $2n=34$  nas fêmeas e  $n=17$  nos machos. A fórmula cariotípica variou entre as espécies, sendo o cariótipo de *S. longula* constituído de 6 cromossomos acrocêntricos e 28 pseudoacrocêntricos; *S. atlantica* 8 acrocêntricos e 26 pseudoacrocêntricos; e *S. latitarsis* 4 acrocêntricos, 28 pseudoacrocêntricos e 2 metacêntricos. Por meio do bandamento C foi possível verificar que a heterocromatina está distribuída, preferencialmente, em um dos braços cromossômicos e na região centromérica. S.

*longula* apresentou um heteromorfismo num dos pares cromossômicos, caracterizado pela presença de um longo braço heterocromático em um deles, fortemente marcado por CMA<sub>3</sub>. Para essa espécie, a coloração DAPI revelou delicadas marcações nas regiões heterocromáticas do restante do cariótipo. Os cromossomos de *S. atlantica* coraram uniformemente com o DAPI, entretanto, as regiões pericentroméricas heterocromáticas foram mais fortemente marcadas. Essa espécie apresentou marcações CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> terminais em dois pares de cromossomos homólogos, coincidindo com regiões DAPI<sup>-</sup>. Em *S. latitarsis*, o DAPI ressaltou pequenas regiões brilhantes em um dos braços cromossômicos e na região pericentromérica, enquanto CMA<sub>3</sub> marcou dois pares cromossômicos distintos. A análise comparativa das três espécies, mostrou que, embora o número cromossômico seja conservado no gênero, existem diferenças morfológicas marcantes entre seus cariótipos, com padrão qualitativo e quantitativo de distribuição da heterocromatina característico de cada uma. Observou-se que a reorganização do cariótipo envolve freqüentemente alterações de tamanho nas regiões heterocromáticas CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>, citadas na literatura como sendo correlacionadas com a localização de NOR. Trabalhos fazendo uso de técnicas citogenéticas moleculares nessas espécies estão sendo conduzidos e permitirão enriquecer os conhecimentos acerca destas diferenças e da complexa citotaxonomia do grupo.

**Palavra-chave:** Abelha sem ferrão, heterocromatina, fluorocromos, heteromorfismo.

## ABSTRACT

DOMINGUES, Alayne Magalhães Trindade, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, August, 2005. **Comparative Cytogenetic studies among species of *Scaura* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)**. Advisor: Dr. Marco Antonio Costa. Advisor Committee Members: Dra Mônica Rosa Bertão and Ronan Xavier Corrêa.

The genus *Scaura* (Scharwz) contains species of stingless bees of small size and dark coloration. The group presents variation in the nesting behavior with nest locations including several types of cavities as hollow of trees or within active termite nests. Currently, four species are recognized in the genus: *S. latitarsis* (Friese), *S. atlantica* (Melo), *S. longula* (Lepelitier) e *S. tenuis* (Ducke). The present work had as objective comparatively analyze the karyotypes of *Scaura*, genus using different techniques such as the conventional staining with Giemsa, base-specific fluorochromes and C-band patterns. Samples of *S. latitarsis*, *S. atlantica* and *S. longula* were collected from nests in different locations in the Southeastern, Northeast and MidWest regions of Brazil. Analysis of the karyotypes, using the three different techniques, allowed to determine the chromosome numbers  $2n=34$  in females and  $n=17$  in males. The karyotypic formula varied among the three species. *S. longula* karyotype comprises 4 acrocentric and 30 pseudoacrocentric chromosomes; *S. atlantica* presented 8 acrocentric and 26 pseudoacrocentric chromosomes, and *S. latitarsis* 4 acrocentric, 28 pseudoacrocentric and 2 metacentrics chromosomes. C-banding showed that the heterochromatin is distributed, in one of the chromosome arms and in the centromeric regions. *S.*

*longula* presented heteromorphism in one of the chromosome pairs, characterized by the presence of a long heterochromatic arm in one of them. The GC-specific fluorochrome (CMA<sub>3</sub>) staining showed that this long heterochromatic arm is strongly marked. DAPI staining marked slightly the heterochromatin. The chromosomes of *S. atlantica* stained uniformly with the DAPI, however the pericentromeric heterochromatin was more strongly stained. This species presented terminal CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> labelings in two pairs of homologous chromosomes, coinciding with DAPI<sup>-</sup> regions. In *S. latitarsis*, the DAPI evidenced small shining regions in one of the chromosome arms and the pericentromeric region, while CMA<sub>3</sub> marked two distinct chromosome pairs. The comparative analysis of the three species showed that, although the chromosome number is conserved, there are remarkable morphological differences among the karyotypes with each species presenting a typical qualitative and quantitative standard of distribution of the heterochromatin. We noted that karyotype reorganization involved alterations of size in the CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> heterochromatin. Literature data frequently correlate such heterochromatin with location of NOR. Further studies using more accurate molecular cytogenetics techniques on these species are being carried out and will certainly be enlightening and will contribute to a better understanding of the mechanisms involved in the karyotype evolution of the genus.

**key words:** Stingless bee, heterochromatin, fluorochromes, heteromorphism.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa dos locais de coleta das espécies .....	17
Figura 2 - Representação esquemática e nomenclatura dos cromossomos de acordo com a proposta de Imai (1991). .....	23
Figura 3 - Cariótipo de fêmea de <i>S. longula</i> (2n=34) obtido a partir de metáfases submetidas à coloração convencional com Giemsa. ....	27
Figura 4 - Cariótipos de <i>S. atlantica</i> obtidos a partir de metáfase submetida à coloração convencional com Giemsa.....	28
Figura 5 - Cariótipo de macho <i>S. latitarsis</i> (n=17) obtido a partir de metáfase submetida à coloração convencional com Giemsa. ....	29
Figura 6 - Metáfase mitótica de <i>S. longula</i> apresentando o padrão de banda C.....	30
Figura 7 - Padrão de banda C em metáfase mitótica de <i>S. atlantica</i> .....	31
Figura 8 - Padrão de banda C em metáfase mitótica de <i>S. latitarsis</i> .....	32
Figura 9 - Esquema representativo dos cromossomos obtido por meio da banda C.	33
Figura 10 - Metáfases mitóticas <i>S. longula</i> submetidas ao tratamento com fluorocromos. ....	36
Figura 11 - Metáfases mitóticas de <i>S. atlantica</i> submetidas ao tratamento com fluorocromos. ....	37
Figura 12 - Metáfases mitóticas de <i>S. latitarsis</i> submetidas ao tratamento com fluorocromos. ....	38
Figura 13 - Esquema representando o aparecimento de bandas intersticiais e terminais.....	41
Figura 14 - Esquema da formação de cromossomo metacêntrico a partir de fusão .	49
Figura 15 - Formação de cromossomo metacêntrico por inversão pericentromérica	49

## 1. INTRODUÇÃO

Os cromossomos representam a estrutura física do material genético e as alterações que ocorrem ao longo do tempo, tornam elementos essenciais nos estudos de evolução dos organismos. Assim, a citogenética representa uma ferramenta valiosa na análise detalhada das características estruturais e dinâmicas dos cromossomos.

Os meliponíneos, conhecidos como abelhas sem ferrão, começaram a ser estudados citogeneticamente há cerca de meio século, porém os primeiros trabalhos abordavam apenas a determinação do número de cromossomos das espécies. Deste então, esses organismos tornaram-se importantes objetos de diversos estudos mais elaborados.

Com o avanço das pesquisas, novas técnicas de citogenética foram introduzidas neste estudo, principalmente no que se refere a citogenética molecular, permitindo um detalhamento maior sobre a constituição e morfologia cromossômica desses organismos. Apesar desses avanços, ainda há poucas espécies de meliponíneos estudados citogeneticamente, das quais apenas se conhece o número cromossômico e a distribuição da heterocromatina.

O gênero *Scaura* despertou um grande interesse por possuir uma taxonomia problemática e, embora seja estudado sob diversos aspectos, são raros os dados citogenéticos para esse grupo. Este gênero é constituído por espécies de abelhas de tamanho pequeno que não apresentam agressividade na defesa do ninho. Ele apresenta algumas espécies com ampla distribuição geográfica e outras com ocorrência restrita. Atualmente são reconhecidas quatro espécies: *S. latitarsis*, *S. longula*, *S. tenuis* e *S. atlantica*.

Considerando a grande diversidade e importância das abelhas sem ferrão no ecossistema neotropical, a realização de estudos citogenéticos nesse gênero poderá contribuir para o entendimento dos mecanismos envolvidos na evolução cariotípica e na sua complexa citotaxonomia.

O presente trabalho objetivou obter informações citogenéticas detalhadas sobre as espécies do gênero *Scaura* por meio de métodos tradicionais de análise e observação de cromossomos, bem como da identificação dos padrões de banda C da constituição molecular da heterocromatina fazendo uso dos fluorocromos base-específicos. Com as informações obtidas pretendeu-se:

- desenvolver uma análise comparativa dos cariótipos das espécies estudadas para caracterizar, em nível cromossômico, o grau de divergência encontrado dentro do gênero;
- identificar os principais rearranjos cromossômicos ocorridos ao longo da evolução do cariótipo dessas espécies, e correlacioná-los com a diversidade encontrada no grupo;
- inferir as relações entre as espécies com base nas similaridades e diferenças cariotípicas encontradas, bem como sobre a evolução do cariótipo neste grupo.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Considerações gerais sobre a tribo Meliponini

A tribo Meliponini pertence à ordem Hymenoptera, um grupo extremamente diversificado, formado por formigas, vespas e abelhas. A ordem Hymenoptera tem sido bastante estudada devido à sua importância econômica, além de apresentar características notáveis do ponto de vista biológico, como a ampla diversidade de padrões de vida e evolução de formas sociais (CROZIER, 1977). Sob o ponto de vista genético, esse grupo representa um interessante objeto de estudo visto que, nestes organismos, a determinação do sexo é por um mecanismo de haplodiploidia em que os machos são originados de ovos não fertilizados por um processo conhecido como partenogênese arrenótoca e as fêmeas, diplóides, são originadas de ovos fertilizados (CROZIER, 1977; GOTTLIEB et al., 2002; KERR, 1952; WILSON, 1976).

A tribo Meliponini pertence à família Apidae, subfamília Apinae. Dentro desta subfamília, as tribos de abelhas corbiculadas (apresentam corbícula – estrutura côncava na face externa da tíbia da perna posterior das operárias ou fêmeas coletoras, usadas para transportar pólen) constituem um grupo monofilético. As abelhas corbiculadas são agrupadas em quatro tribos: Euglossini (com 175 espécies), Bombini (representada pelo gênero *Bombus*, com 250 espécies), Apini (com 11 espécies) e Meliponini (abelhas-sem-ferrão, com algumas centenas de espécies) (MICHENER, 2000; ROIG-ALSINA; MICHENER, 1993).

Os Meliponini ocorrem nos trópicos de todo o mundo, mas a maioria das espécies está restrita à região Neotropical. As espécies estão organizadas em 56

gêneros, com base em dados morfológicos, de acordo com Camargo e Pedro, (1992). Costa et al. (2003) basearam-se em dados genéticos de seqüências mitocondriais e propuseram novas relações entre os gêneros de Meliponini, porém consideraram o mesmo número de gêneros proposto por Camargo e Pedro (1992).

A tribo Meliponini compreende formas altamente sociais que vivem em colônias permanentes, freqüentemente compostas por milhares de indivíduos (MICHENER, 2000; TEIXEIRA et al., 2003; WILSON, 1976).

As abelhas constroem seus ninhos em locais de tamanho variável, utilizando barro, cera e resina. Podem se alojar em ocos de árvores vivas ou secas, em cipós, em raízes secas, em mourões de cercas, em tijolos, em frestas de paredes, em ninhos abandonados de formigas, ou mesmo, em termiteiros ativos, entre outros locais. A conformação da entrada do ninho varia enormemente de espécie para espécie, desde “boca de sapo”, feita de barro, até canudos de cêra que são fechados à noite. (ALONSO, 1998; KERR et al., 1996; KERR et al., 2001; WILSON, 1976).

## **2.2 Importância ecológica e econômica das abelhas sem ferrão**

As abelhas são parte integrante do ecossistema e da biodiversidade mundial. Além disso, apresentam grande importância econômica e social, por produzirem mel de boa qualidade, serem de fácil manejo, servirem como instrumento educacional para crianças e principalmente, por apresentarem grande importância como polinizadores (ALONSO, 1998; KERR et al., 1996; KERR et al., 2001).

Segundo KERR et al. (2001), um terço da produção agrícola mundial depende da visita de animais às flores, sendo as abelhas responsáveis por 38% da polinização das plantas floríferas. Cabe ressaltar que, dependendo da floresta, 30% a 80% são polinizadas por uma ou mais espécies de meliponíneos.

Está claro que essas abelhas promovem benefícios econômicos, por seus serviços como polinizadores de cultivares, permitindo a produção de sementes por diversas plantas, muitas das quais extremamente úteis para o homem. Isso deve-se

às características de vida social das abelhas, tais como a constância floral à adaptabilidade, o recrutamento e a inofensibilidade, que as tornam bons polinizadores (HEARD, 1999; WHITE et al., 2001).

Os meliponíneos brasileiros estão sendo dizimados com velocidade mais rápida que a destruição das florestas, principalmente pela ação predatória humana, através do desmatamento, das grandes queimadas, da falta de conhecimento sobre a criação racional dessas abelhas, do uso de inseticidas nas proximidades de culturas, entre outros fatores (KERR et al., 2001).

É fundamental que as políticas de preservação das espécies incluam estratégias de manutenção da diversidade genética uma vez que é necessária para qualquer espécie para manter o potencial reprodutivo, a resistência a doenças e a habilidade para se adaptar a mudanças (PRIMACK; RODRIGUES, 2001; SOLE-CAVA, 2001). Cabe salientar que estudos genéticos podem ser úteis na sugestão de políticas de preservação nos seus estágios iniciais e mais simples, como na determinação de estruturas populacionais e na análise filogeográfica (SOLE-CAVA, 2001).

### **2.3 Considerações sobre o gênero *Scaura* (Schwarz)**

O gênero *Scaura* (Schwarz) inclui abelhas sem ferrão de tamanho pequeno e coloração escura (MELO; COSTA, 2004). De acordo com Silveira et al. (2002), o gênero incluía três espécies: *S. latitarsis* (Friese), *S. longula* (Lepelletier) e *S. tenuis* (Ducke). Entretanto, uma nova espécie foi descrita recentemente no gênero como *S. atlantica* (MELO; COSTA, 2004).

*S. latitarsis* foi originalmente descrita com ocorrência nos Estados do Amazonas, Amapá, Espírito Santo, Minas Gerais, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e São Paulo (SILVEIRA et al., 2002). Todavia, de acordo com Melo e Costa (2004), o nome *S. latitarsis* deve ser usado de maneira restrita, somente para as formas que ocorrem na bacia do rio Paraná, no Brasil. *S. longula*, conhecida popularmente como 'jataí-preta', é uma abelha pouco freqüente, presente no cerrado

(NOGUEIRA-NETO, 2003), distribuída pelos Estados do Amazonas, Amapá, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso, Pará e São Paulo. (SILVEIRA et al., 2002). *Scaura tenuis*, por sua vez, está distribuída nos Estados do Amazonas, Mato Grosso e Pará (SILVEIRA et al., 2002). *Scaura atlantica* tem distribuição restrita à floresta Atlântica do Sul da Bahia e Norte do Espírito Santo, incluindo a bacia do Rio Jequitinhonha no Estado de Minas Gerais (MELO; COSTA 2004).

Essas espécies apresentam variação nos hábitos de nidificação, podendo ser em cavidades diversas (*S. tenuis*), em ocos de madeira (*S. longula*) ou mesmo no interior de termiteiros ativos (*S. latitarsis* e *S. atlantica*) (MATEUS et al., 1999; MELO; COSTA, 2004; NOGUEIRA-NETO, 2003).

Diferenças marcantes são observadas quanto à arquitetura dos favos de cria. *S. latitarsis* e *S. atlantica* apresentam células verticais, organizadas na forma compacto-horizontal. *S. tenuis* forma um aglomerado de células isoladas do tipo cacho. *S. longula*, apresenta favos de cria isolados, mas agrupados verticalmente como uma cortina, sendo este um caso raro entre os meliponíneos neotropicais (KERR et al., 1996; MATEUS et al., 1999). Estrutura semelhante é observada em outra espécie de abelha sem ferrão ocorrente na África, *Dactylurina staudingeri*. Nesse caso, as células de cria são organizadas em favos duplos, os quais começam a ser construídos de cima para baixo, em contraposição, *S. longula*, apresenta favos simples, iniciados de baixo e expande-se para cima (NOGUEIRA-NETO, 2003).

O gênero *Scaura* possui uma taxonomia problemática e tem sido estudado sob diversos aspectos de sua biologia. Dados genéticos sobre este grupo ainda são raros, conhecendo-se apenas algumas características cariotípicas de *Scaura latitarsis* (COSTA, 2003; ROCHA et al., 2003b). Rocha et al. (2003b) encontraram o número diplóide de 34 cromossomos, sendo 14 acrocêntricos e 20 pseudoacrocêntricos. Costa (2003), por sua vez, encontrou dificuldades em determinar a morfologia cromossômica, relatando apenas o número de cromossomos ( $2n=34$ ) e duas marcações encontradas com fluorocromo CMA<sub>3</sub>.

## 2.4 Considerações sobre a citogenética

A citogenética compreende todo ou qualquer estudo relativo ao cromossomo, isolado ou em conjunto, condensado ou distendido, incluindo as observações sobre sua morfologia, organização, função e replicação, bem como variação e evolução (GUERRA, 1988).

Em insetos, os primeiros cromossomos a serem analisados foram os de díptera, *Drosophila melanogaster*. Desde então, os insetos tornaram-se um importante objeto de estudo para a citogenética. Isso deve-se em parte à adequação para observação citológica, ao baixo custo associado com a disponibilidade de organismos, além da ampla variedade de grupos (AULT, 1996).

### 2.4.1 Estudos citogenéticos na tribo Meliponini

Kerr (1948) iniciou os estudos citogenéticos com a Tribo Meliponini, determinando os números cromossômicos  $n=9$  e  $2n=18$  cromossomos para duas espécies do gênero *Melipona*. Estes dados foram ampliados por diversos estudos posteriores e, atualmente existem 28 gêneros e 65 espécies estudadas citogeneticamente, com uma variação numérica de  $n=8$  a  $n=18$  cromossomos, sendo  $n=17$  o número predominante (ROCHA, 2002).

Os primeiros trabalhos com meliponíneos baseavam-se no esmagamento das gônadas fixadas em ácido acético a 45% e consistiam basicamente na determinação do número de cromossomos das espécies em estudo (KERR, 1948; 1952; KERR; SILVEIRA, 1972). Imai et al. (1988) propuseram uma nova metodologia para as preparações citológicas em formigas, por meio da dissecação do gânglio cerebral tratado com solução de colchicina-hipotônica e fixado em lâmina com soluções de diferentes concentrações de ácido acético/ etanol. Essa nova técnica permitiu fazer preparações cromossômicas de alta qualidade. Sendo assim, essa metodologia foi expandida para os demais organismos da ordem Hymenoptera, como nos estudos

com vespas (HOSHIBA et al., 1989; HOSHIBA; IMAI, 1993; SCHER; POMPOLO, 2003; SILVA-JUNIOR et al., 2000) e abelhas (BRITO et al., 1997; BRITO et al., 1997; BRITO-RIBON et al., 1999; BRITO et al., 2003; CAIXEIRO; POMPOLO, 1999; COSTA et al., 1992; COSTA et al., 2004; DOMINGUES et al., 2005; GOMES et al., 1998; HOSHIBA; IMAI, 1993; MAMPUMBU, 2002; MOREIRA e POMPOLO, 1997; POMPOLO, 1994; POMPOLO; CAMPOS, 1995; ROCHA; POMPOLO, 1998; ROCHA, 2000; ROCHA et al., 2002; ROCHA et al., 2003a; ROCHA et al., 2003b), que juntamente com outras técnicas citogenéticas vêm contribuindo para o conhecimento da natureza e localização da heterocromatina.

#### **2.4.2 Heterocromatina**

Heitz (1928) acompanhou todo o ciclo celular e demonstrou que alguns segmentos cromossômicos não se descondensavam na interfase, sendo essas regiões chamadas de heterocromatina (GUERRA, 1988).

Várias propriedades são atribuídas à heterocromatina que, de modo geral, corresponde a um segmento do cromossomo que é geneticamente inativo, visto que está constantemente condensado, além disso, é composto por DNA altamente repetitivo, denominado de DNA satélite, e que se replica tardiamente na fase S (GUERRA, 1988; PIECZARKA; MATTEVI, 1998).

A distribuição da heterocromatina no cariótipo não acontece ao acaso, sendo que os segmentos heterocromáticos tendem a localizar-se na região pericentromérica dos cromossomos, nos telômeros ou nas proximidades dos organizadores nucleolares (PIECZARKA; MATTEVI, 1998). Segundo um levantamento feito por Imai (1991), a heterocromatina distribui-se segundo dois padrões gerais: no tipo I, que inclui entre outros, por exemplo, os mamíferos, peixes e formigas, a heterocromatina encontra-se preferencialmente na região pericentromérica dos cromossomos, enquanto o tipo II, que ocorre nos anfíbios, gafanhotos e plantas, a heterocromatina predomina na região terminal ou intersticial.

Rocha e Pompolo (1998), analisando o cariótipo de oito espécies de abelhas do gênero *Melipona*, observaram uma ampla variação no conteúdo de heterocromatina e baseando-se nisso, separaram as espécies analisadas em dois grupos, sendo o grupo I constituído de espécies com cariótipo com um baixo conteúdo heterocromático e o grupo II espécies com alto conteúdo heterocromático.

Um dos fatores que geram mais discussão em relação à heterocromatina é sua possível função no genoma, uma vez que está presente na maioria dos cariótipos, e sendo assim, muitos autores acreditam que deva desempenhar algum papel importante (PIECZARKA; MATTEVI, 1998). Como destacado por Pieczrka e Mattevi (1998), a heterocromatina pode estar relacionada com o reconhecimento de cromossomos homólogos durante o pareamento meiótico, ser um local propício a quebras cromossômicas sem causar danos genéticos ao indivíduo, proteger as porções eucromáticas do genoma do ataque de substâncias mutagênicas, ou de alguma forma estar envolvida na atividade centromérica e, na ausência de qualquer função convincente, essa heterocromatina seria um segmento de DNA lixo que estaria presente no genoma exclusivamente para utilizar a maquinaria celular para replicar-se. Foi sugerido também que a heterocromatina estaria envolvida na recuperação da estabilidade telomérica, após fissões cêntricas além de estar diretamente ligada à evolução cromossômica (IMAI, 1991, IMAI et al., 1986, IMAI et al., 1988, IMAI et al., 1994 e IMAI et al., 2001).

#### **2.4.3 Evolução cariotípica**

O cariótipo não é uma estrutura rigidamente estável, podendo ocorrer variações inter e intra específica devido a alterações no número e tamanho dos cromossomos, na posição do centrômero, na quantidade de DNA, na quantidade de heterocromatina, ou mesmo, variações no número e posição de suas bandas C e G (GUERRA, 1988).

O uso das técnicas citogenéticas tem evidenciado que essas variações cromossômicas são fatores significantes que contribuem para a evolução cariotípica das espécies (IMAI et al., 1986).

Kerr (1952) e Kerr e Silveira (1972) propuseram  $n=8$  como o número básico de cromossomos em Apis e meliponíneos e sugeriram que mudanças ocorridas no cariótipo poderiam ser interpretadas como poliploidia, seguida de rearranjos do tipo Robertsoniano. Em plantas, é bem conhecido que a poliploidia tem desempenhado um importante papel na evolução cariotípica, entretanto em animais, a poliploidia parece restrita às formas partenogenéticas, como também a poucos grupos de espécies hermafroditas (IMAI, 1969; MABLE, 2004; OTTO; WHITTON, 2000).

Analisando 40 espécies de formigas endêmicas do Japão, Imai (1969) encontrou o número cromossômico haplóide variando de  $n=9$  a  $n=27$  e assim classificou as espécies em quatro grupos. Para explicar as alterações no cariótipo, reorganizou cinco tendências possíveis: (1) poliploidia; (2) dissociação cêntrica; (3) inversão pericêntrica; (4) deficiência, e (5) eliminação. Dentre essas tendências, a poliploidia e a dissociação foram as dominantes, mas o autor assumiu que a poliploidia deveria ser a causa principal das alterações no número cromossômico e a dissociação cêntrica seria uma alteração secundária, em menor grau que ocorreu somente em poucos grupos.

Entretanto, Pompolo e Campos (1995), analisando duas espécies de *Leurotrigona*, contradizem a hipótese de poliploidia, visto que não explica a presença da heterocromatina ou a variação na morfologia cromossômica do cariótipo. Como explicação alternativa, admitem que a hipótese de fissão cêntrica melhor explica as alterações encontradas nestas duas espécies, uma vez que tal hipótese não requer largos rearranjos cromossômicos, além de explicar a acumulação de heterocromatina observada em uma das espécies analisadas.

Imai et al. (1977), analisando o cariótipo de formigas australianas, sugerem três hipóteses para explicar a evolução cariotípica. Na hipótese I (Hipótese de Fusão), as espécies ancestrais tinham um cariótipo com elevado número cromossômico (em torno de 40 pares de acrocêntricos) e a evolução prosseguiu com uma predominância de fusões levando a uma redução do número de cromossomos. Na hipótese II (Hipótese de Fissão), o cariótipo ancestral de formiga tinha  $n=3$  e que

o número aumentou sobretudo através do conjunto de ações de fissões cêntricas seguida de inversões pericêntricas para converter acrocêntricos em outros tipos de cromossomos. Na hipótese III (Hipótese Modal), o cariótipo ancestral apresentava o número modal. Essa última hipótese difere das hipóteses de fusão e fissão no sentido em que mudanças cariotípicas podem seguir em direção ao aumento ou à diminuição do número cromossômico, assim divergindo em ambas as direções a partir de um número ancestral. Ainda segundo essa terceira hipótese, a fissão é mais freqüente na evolução de formigas que a fusão (IMAI et al., 1977).

Foi sugerido por Imai et al. (1977) que o cariótipo primordial de insetos tinha baixo número cromossômico e que a rapidez da evolução cariotípica diferia de grupo para grupo, bem como, possivelmente, a tendência da direção esperada. Sendo assim, isso fornece suporte adicional para as hipóteses de fissão e modal, não dando suporte para a hipótese de fusão. A Hipótese Modal também se enquadra com os dados obtidos para formigas australianas, porém é similar à hipótese de fissão e é operacionalmente difícil distinguir uma da outra (IMAI et al., 1977).

As hipóteses de fissão e fusão produzem cenários opostos para a evolução cariotípica, gerando controvérsia entre os citogeneticistas. Há muito que a hipótese de fusão era considerada o dogma da citogenética animal, entretanto existem dados que suportam o evento de fissão. Ao comparar os ciclos de fusão com os ciclos de fissão, as evidências indicam que fissão é um modelo razoável para evolução cariotípica de mamíferos, contudo foi enfatizado que fusões também podem ocorrer (IMAI, 1978; IMAI et al., 1980). Sendo assim, os estudos sugerem que a fissão e fusão são fenômenos significativos na evolução cariotípica (IMAI, 1978).

Contudo, uma tentativa foi feita para ajustar as controvérsias da fusão-fissão, quando Imai et al., (1986) propuseram a Hipótese de Interação Mínima. Essa hipótese implica que o cariótipo tende a evoluir no sentido de minimizar riscos genéticos resultantes de translocações deletérias. Há uma tendência geral em eucariotos para um aumento de DNA nuclear e, portanto, do tamanho do genoma, com a obtenção de alto grau de organização. Isso sugere que o aumento do volume nuclear pode ter desempenhado um papel importante na redução de riscos genéticos em muitos eucariotos (IMAI et al., 1986).

De acordo com a Hipótese de Interação Mínima, a evolução cariotípica é determinada pela razão entre o tamanho do genoma e o volume nuclear de oócito ou espermatoócito no paquíteno. Para explicar a evolução do cariótipo de Hymenopteras, essa hipótese propõe um ciclo de alterações cromossômicas, em que fissões cêntricas são rearranjos adaptativos que aumentam o número de cromossomos, reduzindo seus tamanhos e, conseqüentemente, diminuindo as interações entre eles. Todavia, esse evento gera instabilidade na região quebrada que corresponde à região telomérica. Como resultado dessa instabilidade, ocorre crescimento em tandem da heterocromatina. Porém, essa heterocromatina forma associações não-específicas, aumentando novamente os riscos de interações cromossômicas. Fusões e inversões pericêntricas funcionariam como mecanismos para eliminar essa heterocromatina, estabilizando o cariótipo. Contudo, a limitação em relação à fusão seria uma redução *de novo* do número cromossômico, dando reinício ao ciclo (IMAI, 1991; IMAI, 1993; IMAI et al., 1994; IMAI et al., 2001).

## 2.5 Técnicas de bandamento

Nos últimos anos, com o desenvolvimento das técnicas de bandamento cromossômico, foi proporcionado um progresso considerável, tanto na citogenética humana, como na citogenética das demais espécies (DRETS, 2002).

Atualmente é possível determinar não apenas o número e a morfologia dos cromossomos como também o pareamento adequado entre homólogos. Por meio das técnicas citogenéticas é possível realizar uma análise detalhada de cada par, identificando possíveis rearranjos estruturais, como também definir a localização da heterocromatina no cariótipo (PIECZARKA; MATTEVI, 1998). Os bandamentos com fluorocromos base-específicos, bandamentos com enzima de restrição e a hibridação *in situ* foram técnicas desenvolvidas e aprimoradas na segunda metade dos anos 80 e início dos anos 90, que proporcionaram informações diretas relacionadas à composição de bases do DNA. Essas técnicas constituem a citogenética molecular e, se somadas aos bandamentos tradicionais, formam um

instrumento poderoso na análise do genoma e, principalmente, para identificar possíveis alterações no cariótipo ou mesmo permitir a comparação entre espécies diferentes (GUERRA, 1988; PIECZARKA; MATTEVI, 1998).

### **2.5.1 Banda C**

A técnica de bandamento C produz uma coloração seletiva da heterocromatina constitutiva e, por ser de fácil realização, é muito utilizada para determinar a localização da heterocromatina ao longo do cariótipo (SUMNER, 1972; VERMA; BABU, 1995).

Bandas-C estão presentes nas regiões centroméricas dos cromossomos de espécies analisadas e representam heterocromatina constitutiva, a qual é altamente condensada, constituindo DNA altamente repetitivo (FERNANDEZ, et al., 2002).

O método original implicava na incubação do material em solução ácida (HCl), seguida de uma solução alcalina (NaOH), e depois o material era incubado em uma solução salina aquecida (2xSSC). Posteriormente, esse protocolo foi revisto e melhorado, substituindo o hidróxido de sódio por hidróxido de bário. Ambos os processos produzem padrões de bandas-C similares, no entanto, o último método apresenta a vantagem de ser mais fácil de controlar o processo de desnaturação (PIECZARKA; MATTEVI, 1998).

As bandas C surgem em função da extração do DNA contido nas regiões eucromáticas, por depurinação do DNA durante os tratamentos com ácido clorídrico e com hidróxido de bário. A utilização de uma solução salina de 2XSSC permite que haja uma precipitação e retirada deste DNA que foi fragmentado. As regiões de heterocromatina apresentam um grau de condensação maior, sendo pouco afetadas pelo tratamento ao comparar com as regiões de eucromatina (SUMNER, 1990).

Contudo, embora a técnica de bandamento C seja extremamente útil devido à sua facilidade de produção e clareza de resultados, ela não fornece informações a respeito da natureza da heterocromatina, sendo interessante o uso de outras

técnicas de análise, como as que empregam substâncias com afinidades base-específica (PIECZARKA; MATTEVI, 1998).

## **2.5.2 Fluorocromos base específicos**

Os fluorocromos são substâncias químicas com capacidade de interagir com a luz e emitir fluorescência. A fluorescência é a luminescência de uma substância excitada por radiação. Quando radiação alta atinge uma substância, essa absorve e, ou, converte uma pequena porção da energia, sendo a maior parte emitida novamente (PIECZARKA; MATTEVI, 1998).

Existe uma ampla variedade de fluorocromos usados para corar cromossomos e produzir padrão de fluorescência característico. Eles podem ser de um modo geral categorizados em dois tipos diferentes, de acordo com sua afinidade por pares de base AT ou GC (SCHWEIZER, 1981).

### **2.5.2.1 DAPI “4'-6- diamidino – 2 – phenylindole”**

O DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole) foi muito utilizado em análises do cariótipo humano, em que foi utilizada luz fluorescente, assim como a distamicina A (DA), um antibiótico oligopeptídeo, antes corado com o corante primário DAPI, eles exibem um padrão interessante em certas regiões heterocromáticas que são fluorescentes, brilhantes além do resto do complemento (SCHWEIZER, 1981; SUMNER, 1990).

### **2.5.2.2 Cromomicina A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>)**

A CMA<sub>3</sub> é um antibiótico que tem uma afinidade pelos pares de base GC (SCHWEIZER, 1981). Cromossomos corados com CMA<sub>3</sub> proporcionam bandas reversas fluorescentes (bandas R). Essas bandas podem ser significativamente realçadas por contracorantes com um DNA ligante AT específica (SUMNER, 1990).

Os cromossomos podem ser corados triplamente por CMA<sub>3</sub>, DA (distamicina A) e DAPI, o que permite a observação de dois padrões fluorescentes sucessivos, realçando bandas R pela cromomicina A<sub>3</sub> e bandas DA/DAPI, da mesma célula (VERMA; BABU, 1995).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material biológico

A coleta das amostras foi realizada diretamente dos ninhos, extraíndo-se os favos e alguns indivíduos adultos. Neste estudo foram analisadas três espécies de *Scaura* coletadas nas regiões Sudeste, Nordeste e Centro-Oeste, sendo analisado uma colônia de cada espécie. *S. atlantica* foi coletada em ninhos associados com termiteiros ativos na Mata Atlântica do Sul da Bahia, campus da UESC- Ilhéus (S 14°78'89"; W 39°04'94"). *S. latitarsis* foi coletada no Campus da USP em Ribeirão Preto - SP (S 21°09'504"; W 47° 51'906"). *S. longula* foi proveniente de Luziania – GO (S 16°15'09"; W 47°57'01") (Figura 1). Foi analisado um mínimo de 30 indivíduos de cada espécie.

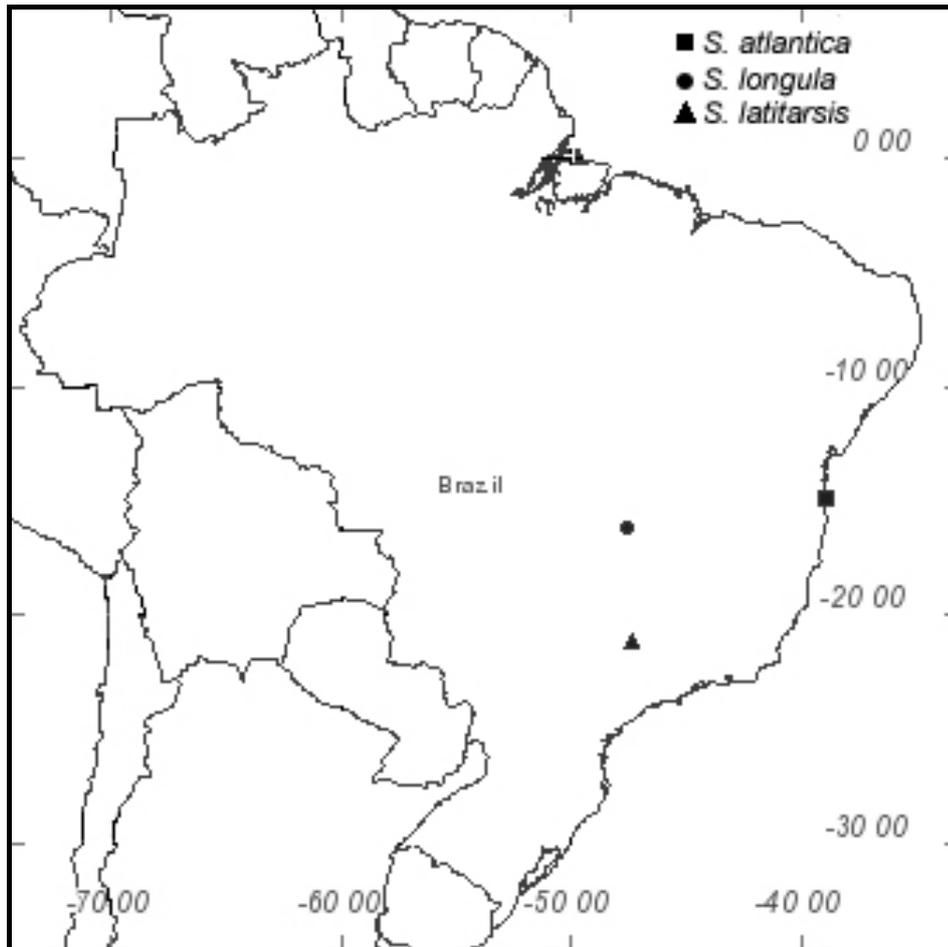


Figura 1 – Mapa dos locais de coleta das espécies. Obtido do CRIA - Centro de Referência em Informação Ambiental do speciesMapper.

### 3.2 Preparação citológica

A análise citogenética foi realizada a partir do gânglio cerebral de larvas pós-defecantes utilizando-se a técnica descrita por IMAI et al. (1988) para a preparação das lâminas.

Sob um esteromicroscópio, os gânglios cerebrais foram dissecados com auxílio de estiletes sobre lâmina em solução de colchicina-hipotônica 0,005% (0,5 ml de solução de colchicina 0,1% e 9,5 ml de solução de citrato de sódio a 1%). Em seguida, os gânglios foram transferidos para um recipiente contendo a mesma solução de colchicina, onde permaneceram por uma hora e meia.

Após esse tempo, com auxílio de uma pipeta Pasteur, cada gânglio individualmente foi transferido para lâminas previamente limpas. Cada lâmina foi inclinada em um ângulo de 10° a 20° para drenar o máximo possível de solução colchicina-hipotônica e, nessa mesma posição, foram pingadas algumas gotas de fixador I (3 partes de ácido acético: 3 partes de etanol absoluto: 4 partes de água) sobre o material, com o intuito de lavar toda a superfície da lâmina, em seguida posicionou-se a lâmina a 90° para retirar todo o excesso do fixador I.

Após drenagem do fixador I, colocou-se a mesma lâmina sob o esteromicroscópio, sendo aplicadas duas gotas de fixador I diretamente sobre o material. A seguir, o gânglio foi dissociado com auxílio de estiletes para separar as células e espalhar o material pela lâmina.

Antes de ocorrer retração do tecido, foram adicionadas sobre o material duas gotas de fixador II (1 parte de ácido acético: 1 parte de etanol absoluto) e, com papel-filtro, removeu-se o excesso de fixador I que foi empurrado para as bordas da lâmina pelo fixador II.

Assim que o fixador II ocupou toda a superfície da lâmina e evaporou parcialmente, foram adicionadas duas gotas de fixador III (100% de ácido acético) e, com papel-filtro, retirou-se o que restou de fixador II que migrou para as bordas das lâminas. Após essa fase, a lâmina foi deixada ao ar para secar completamente e, posteriormente, guardada no freezer para proteger contra poeira e impedir seu envelhecimento.

### **3.3 Técnica de coloração convencional**

Após 24 horas, as lâminas preparadas da forma descrita no item 3.2 foram submetidas à coloração com solução de Giemsa em tampão Sörense (pH 6,8) na proporção 1:30 por cerca de 25 minutos à temperatura ambiente. Logo após, as lâminas foram lavadas em água corrente e secas ao ar.

### **3.4 Técnica de bandamento**

#### **3.4.1 Banda-C**

O procedimento usado para obtenção de banda-C foi o de Sumner (1972), com modificações de acordo com Pompolo e Takahashi (1990) e adaptadas para as espécies do presente trabalho.

Após três dias de preparação, as lâminas foram submetidas aos seguintes tratamentos:

1. hidrólise em HCl 0,2 N, à temperatura ambiente, por 4 minutos;
2. lavagem em água destilada, por aproximadamente 1 minuto;
3. incubação em Ba(OH)<sub>2</sub> 5 % a 60 °C, por 8 minutos;
4. lavagem em HCl 0,2 N, por 30 segundos;
5. lavagem em água destilada, por 1 minuto;
6. incubação em solução salina - 2 X SSC (solução salina de citrato de sódio e cloreto de sódio), pH 7,0 a 60 °C, por 9 minutos;
7. lavagem em água destilada, por 1 minuto;
8. coloração com solução Giemsa em tampão Sörense (pH 6,8; 0,01 M) 8 % por 25 minutos, à temperatura ambiente;
9. lavagem em água corrente;

### **3.4.2 Coloração com CMA<sub>3</sub>**

Esta técnica foi realizada segundo protocolo proposto por Schweizer (1976). Colocou-se uma gota de CMA<sub>3</sub> (0,5mg/ml) em cima das células e cobriu-se com uma lamínula. Guardou-se a lâmina em caixa escura por 1 hora. Retirou-se a lamínula e o excesso de corante com um jato de água destilada e depois secou-se a lâmina rapidamente com uma bomba de ar. Em seguida, colocou-se uma gota de meio de montagem (glicerol/McIlvaine/MgCl<sub>2</sub>), cobriu-se com uma lamínula e retirou-se o excesso de meio, com auxílio de folhas de papel filtro. Por fim, guardou-se a lâmina em caixa escura por pelo menos três dias antes de ser analisada ao microscópio.

### **3. 4.3 Coloração com DAPI (4' – 6" – diamidino – 2 – phenilindole)**

Esta técnica baseou-se no protocolo proposto por Schweizer (1976). Colocou-se uma gota de DAPI (2µg/ml) em cima das células e cobriu-se com uma lamínula. Guardou-se em caixa escura por 30 minutos. Em seguida, retirou-se a lamínula e o excesso de corante com um jato de água destilada e secou-se rapidamente a lâmina com o auxílio de uma bomba de ar. Ao final, a lâmina foi montada com meio de montagem glicerol/McIlvaine (contendo MgCl<sub>2</sub>), cobrindo-se com uma lamínula e comprimindo-a ligeiramente entre duas folhas de papel de filtro para tirar o excesso de meio. A lâmina foi guardada em caixa escura por pelo menos três dias antes de ser analisada ao microscópio.

### **3.5 Análise dos cromossomos mitóticos**

#### **3.5.1 Análise das metáfases tratadas com técnicas da citogenética clássica**

As lâminas foram analisadas em microscópio óptico Olympus BX-60, utilizando-se objetiva de imersão para contagem e análise detalhada dos cromossomos. Em média, foram observadas dez metáfases por lâminas. As melhores metáfases foram fotografadas em Fotomicroscópio Olympus BX60 sob objetiva de 100 X, utilizando-se os filmes Technical Pan ISO 100 ou TMAX Professional 100 KODAK. Os negativos foram revelados com revelador D-76 e a fixação feita com fixador KODAK. A ampliação e cópia dos negativos foram feitas em papel KODABROMIDE F-3, usando revelador DEKTOL e fixador KODAK. Algumas metáfases foram selecionadas e suas imagens capturadas com o sistema de análise de imagens usando o programa IM50.

#### **3.5.2 Análise das metáfases tratadas com fluorocromos**

As lâminas foram previamente analisadas em microscópio Olympus BX-60, usando o sistema de contraste de fase. As melhores metáfases foram fotografadas ao microscópio Leica DMRA2, acoplado com epifluorescência, utilizando o filme FULGI-COLOR, ISO 400. Para observar a coloração DAPI foi usado filtro de 340 a 380 nm (filtro A). Para o CMA<sub>3</sub> usou-se filtro de 390 a 490 nm (filtro D).

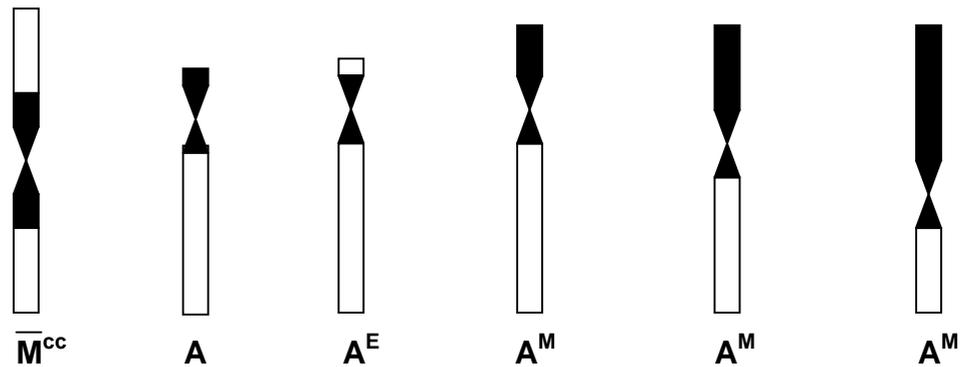
A revelação e ampliação dos negativos foram feitas em lojas fotográficas.

Algumas metáfases observadas foram selecionadas e suas imagens capturadas com o sistema de análise de imagens utilizando o programa IM50.

### **3.6 Representação esquemática do material**

Os cromossomos das espécies estudadas foram classificados seguindo a nomenclatura proposta por Imai (1991), baseada no padrão de banda C observado. Os cariótipos foram montados de acordo com a ordem decrescente do tamanho dos braços eucromáticos (figura 2), os quais foram numerados de 1 a 17.

Os resultados obtidos da coloração com fluorocromos foram apresentados na forma de fotografias.



Heterocromatina ■  
 Eucromatina □  
 Centrômero ⚡

$M^{CC}$ : Cromossomo Metacêntrico apresentando a heterocromatina localizada na região pericentromérica;

A: Cromossomo Acrocêntricos, com braço curto heterocromático e braço longo eucromático;

$A^E$ : Cromossomo Acrocêntrico com braço curto eucromático;

$A^M$ : Cromossomos Pseudoacrocêntricos, com um dos braços totalmente heterocromático e o outro eucromático.

Figura 2 - Representação esquemática e nomenclatura dos cromossomos de acordo com a proposta de Imai (1991).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Características gerais dos cariótipos

A análise das metáfases mitóticas de pelo menos 30 indivíduos por espécie possibilitou demonstrar que todas as espécies apresentam o mesmo número cromossômico, com  $2n=34$  nas operárias, foi registrado também a presença de machos com  $n=17$  cromossomos, em *S. atlantica* e *S. latitarsis*.

O cariótipo diplóide de *S. longula* apresentou 3 pares de cromossomos acrocêntricos e 14 pares pseudoacrocêntricos (Figura 3). O cariótipo de *S. atlantica* consistiu de 4 pares cromossômicos acrocêntricos e 13 pares pseudoacrocêntricos (Figura 4). *S. latitarsis*, por sua vez, apresentou 2 pares cromossômicos acrocêntricos, 14 pares pseudoacrocêntricos e 1 par metacêntrico (Figura 5).

Comparando o cariótipo das três espécies, verificou-se que existem diferenças morfológicas nos cromossomos, caracterizadas principalmente por diferenças na quantidade e distribuição da heterocromatina ao longo dos cromossomos, indicando que cada espécie apresenta um cariótipo característico (Figuras 6, 7, 8 e 9).

## 4.2 Padrão de distribuição da heterocromatina

Os resultados obtidos com a técnica de banda C em *S. longula* mostraram que a heterocromatina está distribuída em um dos braços na maioria dos cromossomos do complemento. O par cromossômico 3 apresentou-se eucromático, entretanto, um pequeno bloco heterocromático na região próxima ao centrômero do braço longo foi evidenciado. Os cromossomos dos pares 12 a 15 apresentaram heterocromatina ao longo de todo o comprimento de um dos braços e, também, um segundo bloco de heterocromatina foi observado na região próxima ao centrômero no braço longo. O 16° par cromossômico apresentou heterocromatina em um dos braços cromossômicos, como também, na região próxima ao centrômero no braço eucromático e na região terminal do mesmo braço. O último par cromossômico apresentou um dos braços heterocromático, observando-se apenas uma pequena banda C na região intersticial do braço longo. O que despertou a atenção no cariótipo dessa espécie foi a diferença de tamanho entre os cromossomos do 6° par, caracterizando heteromorfismo nesta espécie, um fato que não foi observado nas outras duas espécies (Figuras 3, 6 e 9A).

*S. atlantica* revelou bandas heterocromáticas em todos os cromossomos, freqüentemente ao longo de todo o comprimento de um dos braços. Os cromossomos dos pares 3 e 7 ao 15 apresentaram bandas secundárias na região próxima ao centrômero do braço longo dos cromossomos. Heterocromatina também foi evidenciada na região intersticial dos pares 4, 11, 12 e 13. Os pares 14, 15, 16 e 17 também apresentaram a região distal do braço longo heterocromática (Figuras 4, 7 e 9B).

A análise das metáfases mitóticas de *S. latitarsis* mostrou a presença de heterocromatina em todos os cromossomos, principalmente em um dos braços, exceto no 1° par que apresenta morfologia metacêntrica com banda C pericentromérica. Os pares 9 a 16 apresentaram uma banda secundária na região próxima ao centrômero do braço longo. O 17° par também apresentou uma banda secundária na região terminal do braço longo. O 14° par, além das outras duas bandas, apresentou um terceiro bloco heterocromático na região intersticial. Os

pares 15 e 16 também apresentaram uma terceira banda, porém na região terminal do braço longo (Figuras 5, 8 e 9C).

Na tabela 1 encontra-se a síntese dos números e tipos cromossômicos encontrados nas três espécies de *Scaura* baseada na nomenclatura de Imai (1991).

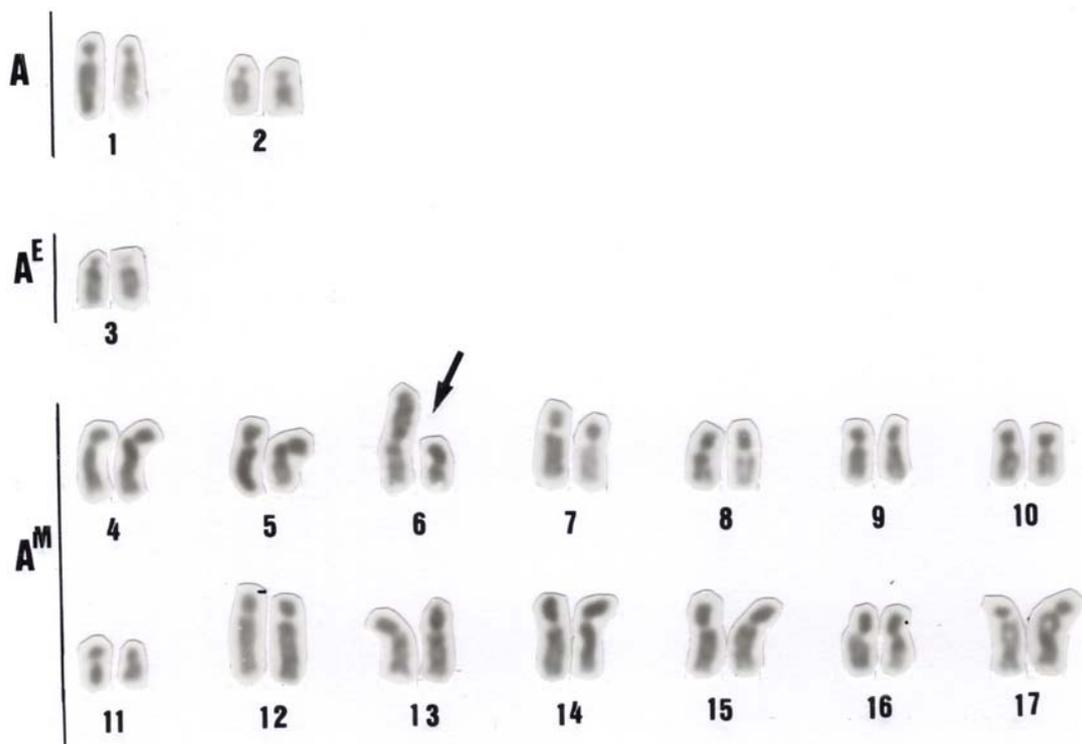


Figura 3 - Cariótipo de fêmea de *S. longula* ( $2n=34$ ) obtido a partir de metáfases submetidas à coloração convencional com Giemsa. A seta indica par heteromórfico. (A) cromossomos acrocêntricos; (A<sup>E</sup>) acrocêntrico com braço curto eucromático; (A<sup>M</sup>) pseudoacrocêntrico. Barra = 3  $\mu$ m.

A



B



Figura 4 - Cariótipos de *S. atlantica* obtidos a partir de metáfase submetida à coloração convencional com Giemsa. A) Cariótipo de fêmea (2n=34). B) Cariótipo de macho (2n=17). (A) cromossomos acrocêntricos; (A<sup>M</sup>) pseudoacrocêntricos. Barra = 3  $\mu$ m.

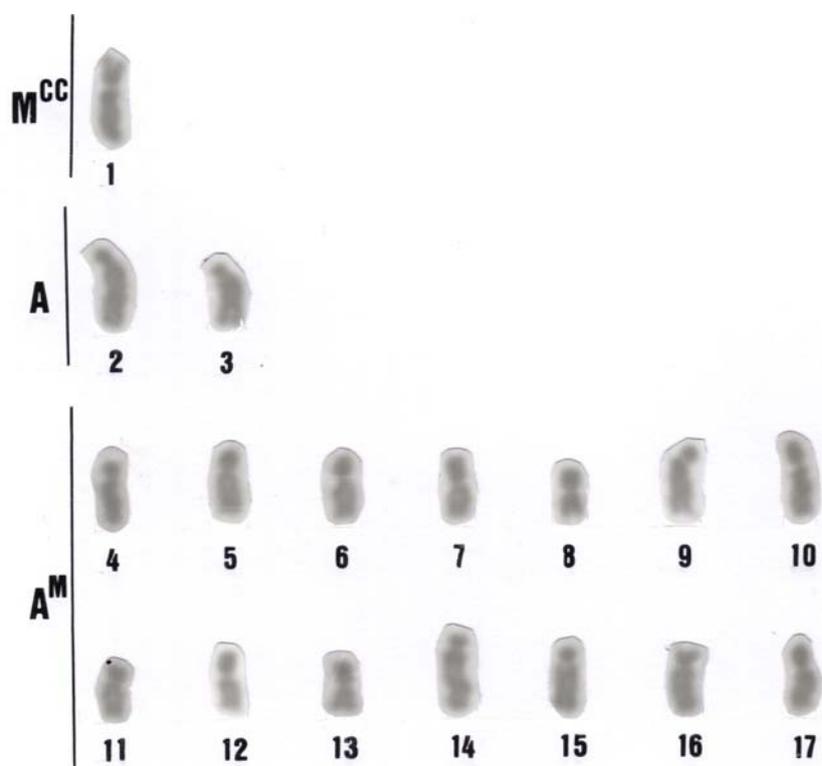


Figura 5 - Cariótipo de macho de *S. latitarsis* (n=17) obtido a partir de metáfase submetida à coloração convencional com Giemsa. ( $M^{CC}$ ) cromossomo metacêntrico com heterocromatina pericentromérica; (A) acrocêntricos; ( $A^M$ ) pseudoacrocêntricos. Barra = 3  $\mu$ m.

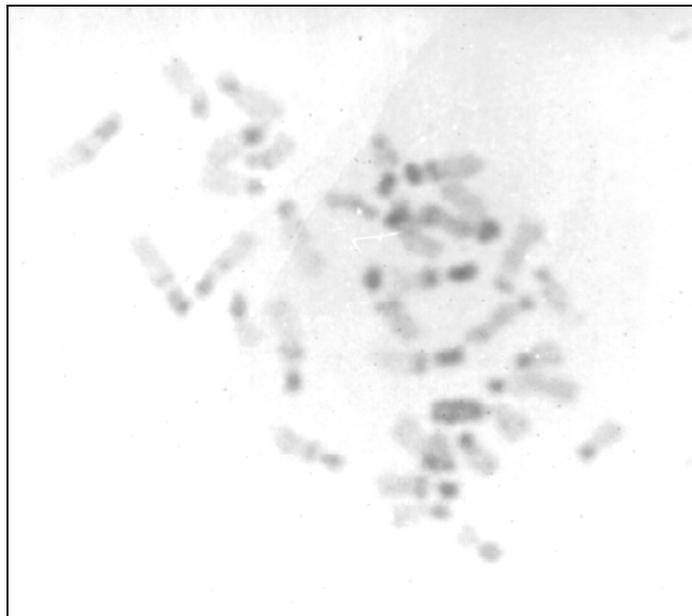


Figura 6 - Metáfase mitótica de *S. longula* apresentando o padrão de banda C. Barra = 3  $\mu$ m.

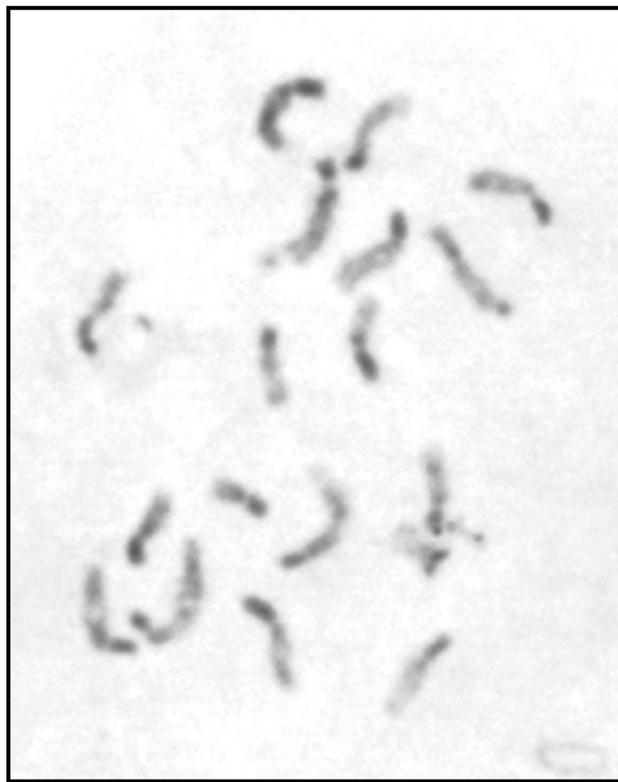


Figura 7 – Padrão de banda C em metáfase mitótica de *S. atlantica*. Barra = 3  $\mu\text{m}$ .

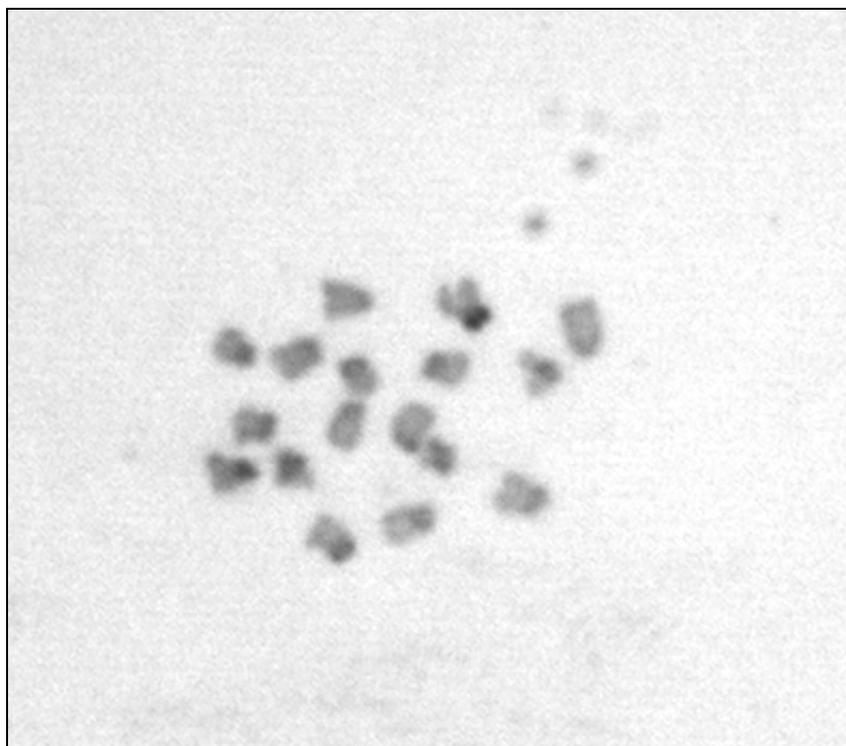


Figura 8 - Padrão de banda C em metáfase mitótica de *S. latitarsis*.  
Barra = 3  $\mu\text{m}$ .

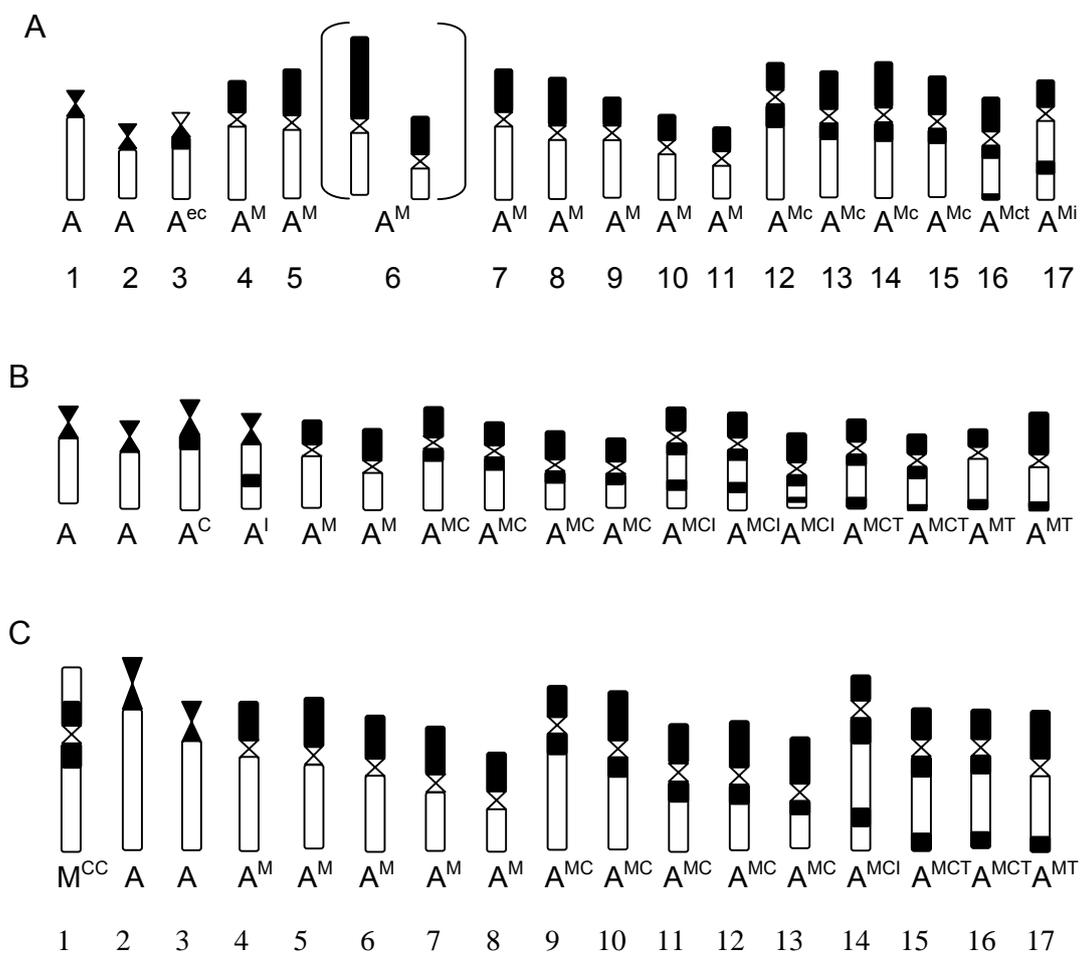


Figura 9 - Esquema representativo dos cromossomos obtido por meio da banda C. A) *S. longula*. Em destaque os cromossomos do par heteromórfico. B) *S. atlantica*. C) *S. latitarsis*.

Tabela 1 – Número e tipos cromossômicos encontrados nas três espécies de *Scaura*, baseiam na nomenclatura proposta por Imai (1991). Na fórmula cariotípica os diferentes tipos de A<sup>M</sup> foram agrupados para facilitar comparação com dados de literatura

Espécie	Tipos Cromossômicos										N (2n)	Fórmula cariotípica	
	A	A <sup>c</sup>	A <sup>i</sup>	A <sup>ec</sup>	A <sup>M</sup>	A <sup>Mc</sup>	A <sup>Mci</sup>	A <sup>Mct</sup>	A <sup>Mt</sup>	A <sup>Mi</sup>			M <sup>cc</sup>
<i>S. longula</i>	2			1	8	4		1		1		17(34)	3A+14A <sup>M</sup>
<i>S. atlantica</i>	2	1	1		2	4	3	2	2			17(34)	4A+13A <sup>M</sup>
<i>S. latitarsis</i>	2				5	5	1	2	1		1	17(34)	1M+2A+14A <sup>M</sup>

A: acrocêntrico, A<sup>c</sup> acrocêntrico com heterocromatina centromérica, A<sup>i</sup> acrocêntrico com heterocromatina intersticial, A<sup>ec</sup> acrocêntrico eucromático com heterocromatina centromérica, A<sup>M</sup> pseudoacrocêntrico, A<sup>Mc</sup> pseudoacrocêntrico com heterocromatina centromérica e intersticial, A<sup>Mci</sup> pseudoacrocêntrico com heterocromatina centromérica e terminal, A<sup>Mct</sup> pseudoacrocêntrico com heterocromatina centromérica e terminal, A<sup>Mt</sup> pseudoacrocêntrico com heterocromatina terminal, A<sup>Mi</sup> pseudoacrocêntrico com heterocromatina intersticial, M<sup>cc</sup> metacêntrico com heterocromatina pericentromérica.

### 4.3 Caracterização cromossômica em *Scaura* por meio da coloração com os fluorocromos CMA<sub>3</sub> e DAPI

A coloração com fluorocromos base-específicos mostrou que o cariótipo de *S. longula* apresenta várias marcações com CMA<sub>3</sub> (Figura 10 A), entretanto, um cromossomo mostrou-se mais fortemente marcado, correspondendo ao cromossomo maior do par heteromórfico, o qual apresenta um braço longo totalmente heterocromático, através da banda C (Figuras 3, 6 e 9 A). Ao observar os núcleos interfásicos, notou-se que existem dois pontos brilhantes, um ponto maior e mais fortemente marcado e outro menor (Figura 10 A). A coloração DAPI corou uniformemente os cromossomos, revelando delicadas marcações em um dos braços cromossômicos, coincidindo com regiões de heterocromatina obtida através da técnica de banda C. O cromossomo fortemente marcado pela CMA<sub>3</sub> apresentou a mesma região com marcação DAPI<sup>-</sup> (Figura 10 B).

*S. atlantica* revelou dois cromossomos pseudoacrocêntricos, do complemento haplóide, com Banda CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>, que se localizaram na região terminal do braço curto heterocromático (Figura 11 A). Quanto à coloração com o fluorocromo DAPI, observou-se que os cromossomos são uniformemente corados, com pequenas marcações mais brilhantes, principalmente na região pericentromérica. Algumas dessas regiões, coincidem com regiões de banda C. Cabe ressaltar que um dos cromossomos do complemento haplóide mostrou-se DAPI<sup>-</sup>, podendo corresponder à região de constrição secundária, o que leva à formação de satélite (Figura 11 B).

Os resultados de CMA<sub>3</sub> para *S. latitarsis* corroboram os dados descritos por Costa (2003), apresentando marcações CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> em dois pares cromossômicos, sendo uma no braço curto de um dos cromossomos e a outra na região do braço longo de outro cromossomo (Figura 12 A). A coloração com o fluorocromo DAPI revelou os cromossomos uniformemente corados, com pequenas regiões brilhantes em um dos braços cromossômicos e na região pericentromérica. Também foi observado que a região terminal de um dos cromossomos mostrou-se DAPI<sup>-</sup>, o que pode corresponder a uma região de constrição secundária (Figura 12 B).

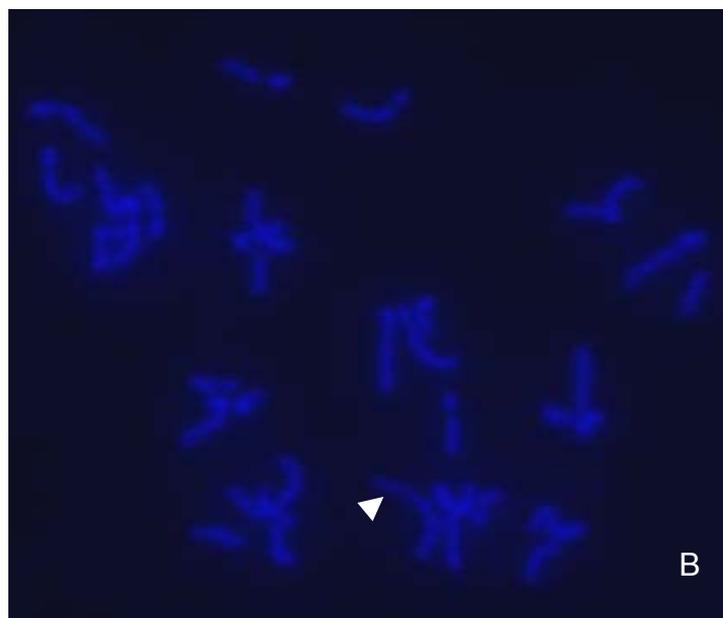
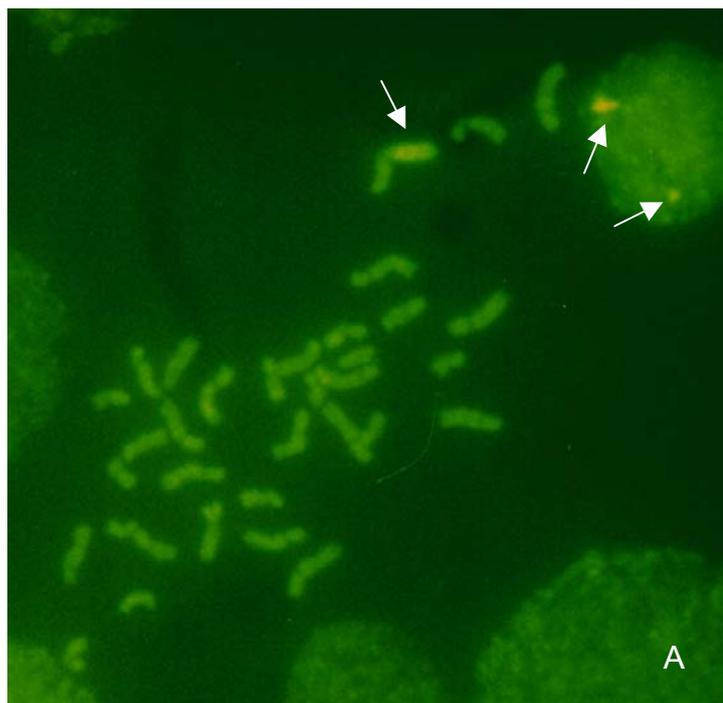


Figura 10 - Metáfases mitóticas e núcleo interfásico de *S. longula* submetidas ao tratamento com fluorocromos. A) CMA<sub>3</sub>; B) DAPI. As setas indicam regiões de CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>, e a cabeça-de-seta indica região DAPI<sup>-</sup>. Barra = 3 μm.

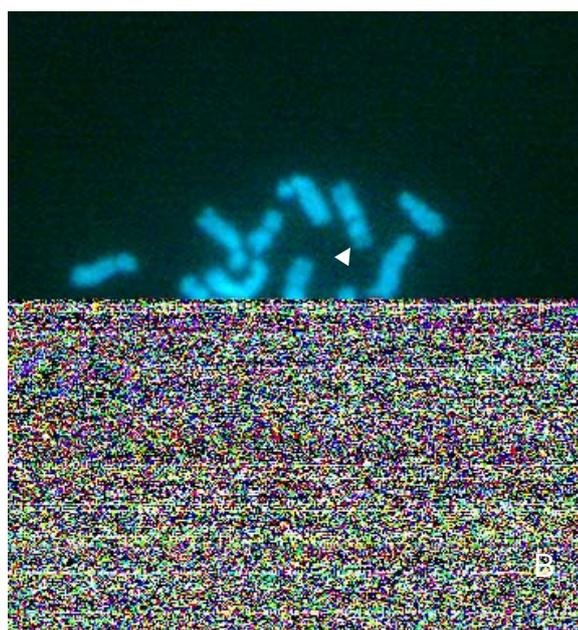
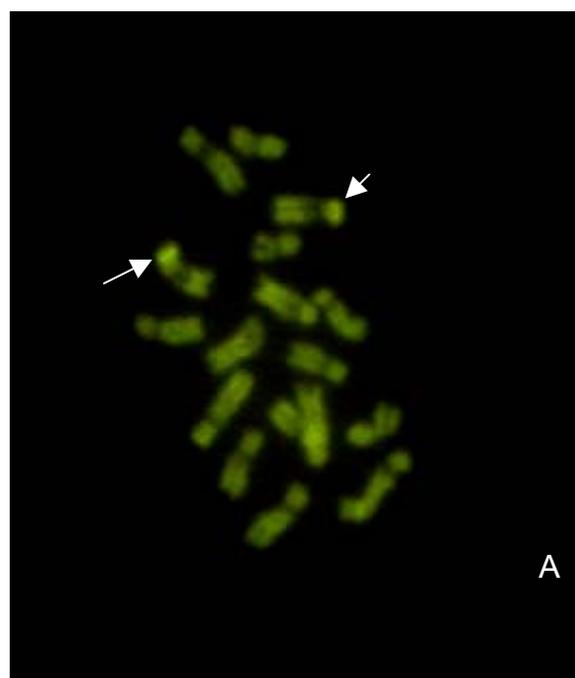


Figura 11 - Metáfases mitóticas de machos de *S. atlantica* submetidas ao tratamento com fluorocromos. A) CMA<sub>3</sub>; B) DAPI. As setas indicam regiões de CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>, e a cabeça-de-seta indica região DAPI<sup>-</sup>. Barra = 3 μm.

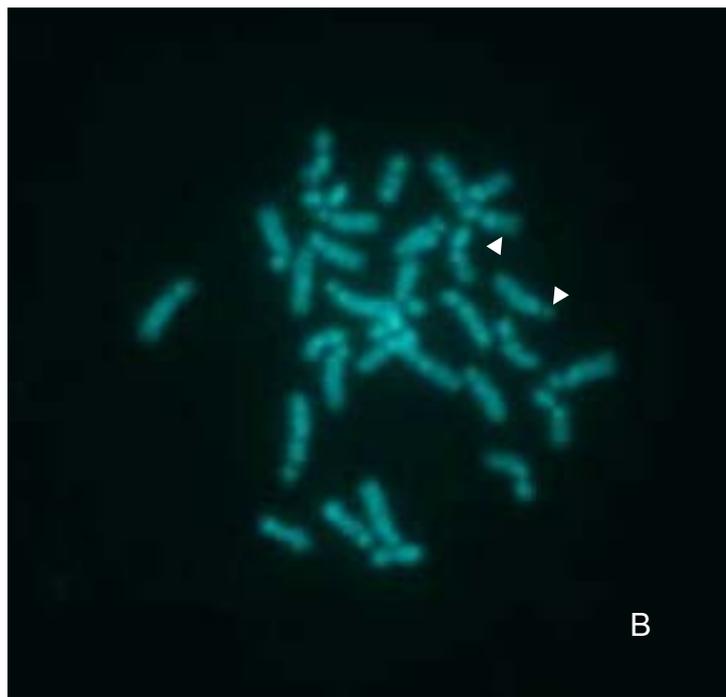
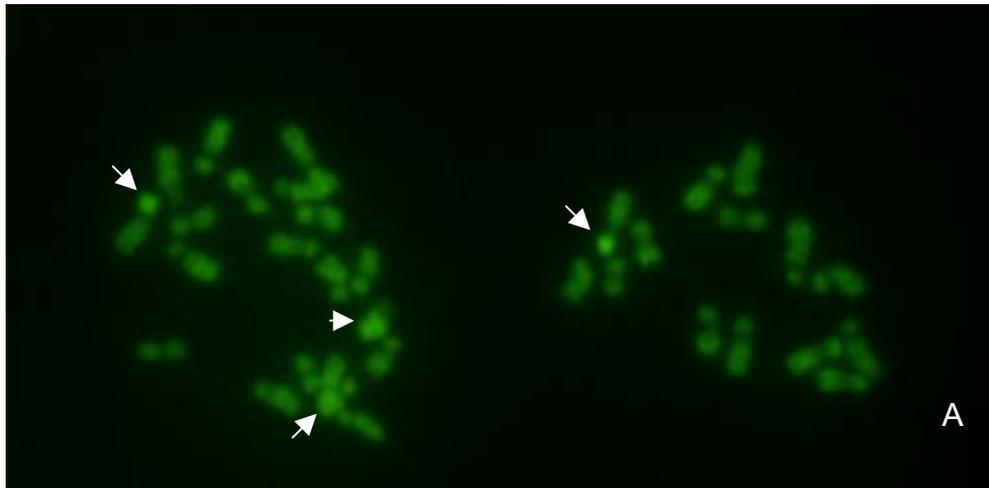


Figura 12 - Metáfases mitóticas de *S. latitarsis* submetidas ao tratamento com fluorocromos. A) CMA<sub>3</sub>. B) DAPI. As setas indicam as regiões CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>, e a cabeça-de-seta indica região DAPI<sup>-</sup>. Barra = 3 μm.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Número cromossômico e conteúdo heterocromático

O gênero *Scaura* é um grupo pouco estudado sob o ponto de vista genético, constando na literatura somente trabalhos citogenéticos anteriores com *S. latitarsis* (ROCHA et al., 2003b). Entretanto, esta espécie, antes considerada com ampla distribuição geográfica, passou por recente redefinição taxonômica (MELO; COSTA, 2004), que limitou o uso do nome *S. latitarsis* somente para as formas ocorrentes na região da Bacia do Rio Paraná. Sendo assim, o presente trabalho permitiu reavaliar os dados determinados para essa espécie, refinar as análises em nível citogenético molecular e analisá-las comparativamente com outras espécies pertencentes ao mesmo gênero.

O número diplóide de 34 cromossomos, encontrado para *S. longula*, *S. atlantica* e *S. latitarsis*, é comum na maioria dos meliponíneos já estudados como em *Trigona* (ROCHA et al., 2003b; TARELHO, 1973), *Tetragona* (HOSHIBA e IMAI, 1993; ROCHA et al. 2003b; TARELHO, 1973), *Schwarziana* (ROCHA et al., 2003b), *Scaptotrigona* (HOSHIBA e IMAI, 1993; ROCHA et al., 2003b; TARELHO, 1973), *Plebeia* (CAIXEIRO e POMPOLO, 1999; HOSHIBA e IMAI, 1993), *Partamona* (BRITO et al., 1997; BRITO et al., 1998; BRITO et al., 2003; BRITO-RIBON et al., 1999; COSTA et al., 1992; TARELHO, 1973), *Paratrigona* (ROCHA et al., 2003b), *Oxytrigona* (KERR, 1969, 1972), *Nanotrigona* (KERR, 1969; ROCHA et al., 2003b; TARELHO, 1973), *Mourela* (ROCHA et al., 2003b), *Meliplebeia* (KERR, 1972), *Geotrigona* (TARELHO, 1973), *Friesella* (MAMPUMBU, 2002) e *Dactylurina* (KERR, 1969). Como observado por Pompolo (1992, 1994), a evolução cariotípica em

abelhas parece seguir o ciclo proposto por Imai et al. (1988), Imai e Taylor (1989), Imai (1991) e Imai et al. (1994). Assim essa constância numérica representa o resultado final de fissões cêntricas que ocorreram em cariótipos com baixo número cromossômico, seguindo pressupostos da Hipótese da Interação Mínima. Cabe ressaltar que algumas espécies diferem desse número o que é justificado pela presença de cromossomos supranumerários (BRITO et al., 1997; BRITO, 1998; COSTA et al., 1992), ou mesmo fusão cêntrica (DOMINGUES et al., 2005).

Embora o número cromossômico tenha sido conservado, as variações morfológicas nos cariótipos foram evidentes. Conforme descrito nas fórmulas cariotípicas (Tabela 1), cada espécie analisada no presente estudo apresentou um padrão característico de distribuição de heterocromatina, que possibilitou identificar cada uma através do seu próprio padrão de bandamento C (Figura 9).

Nas três espécies, foram observados segmentos heterocromáticos nas regiões intersticiais e terminais de alguns cromossomos. A presença dos segmentos intersticiais pode ser explicada como sendo produto final da inserção de heterocromatina, como foi sugerido por Imai (1991). Esse autor argumenta que essa heterocromatina intersticial é mais comum em gafanhotos, anfíbios e plantas (classificados como eucariotos Tipo II). E Embora tenha sido observada nas abelhas deste estudo, representou uma pequena porção da heterocromatina total. A heterocromatina terminal foi predominante, de forma semelhante ao que já foi descrito em outros grupos de Hymenoptera. A maior parte desta heterocromatina está localizada nos braços heterocromáticos de cromossomos pseudoacrocêntricos. A argumentação de Imai (1988) para a origem destes cromossomos é pela adição em “tandem” de heterocromatina terminal, como forma de restabelecer a estabilidade telomérica após fissões cêntricas (ver item 2.4.3 e figura 13). Existem poucas evidências de fissões cêntricas no grupo em estudo, dada a estabilidade numérica nos cariótipos encontrada neste trabalho. Entretanto, a hipótese de Imai pode ser válida para explicar a origem destes pseudoacrocêntricos por adição em “tandem” de heterocromatina a partir de eventos de fissão mais antigos relacionados à ancestralidade do grupo.

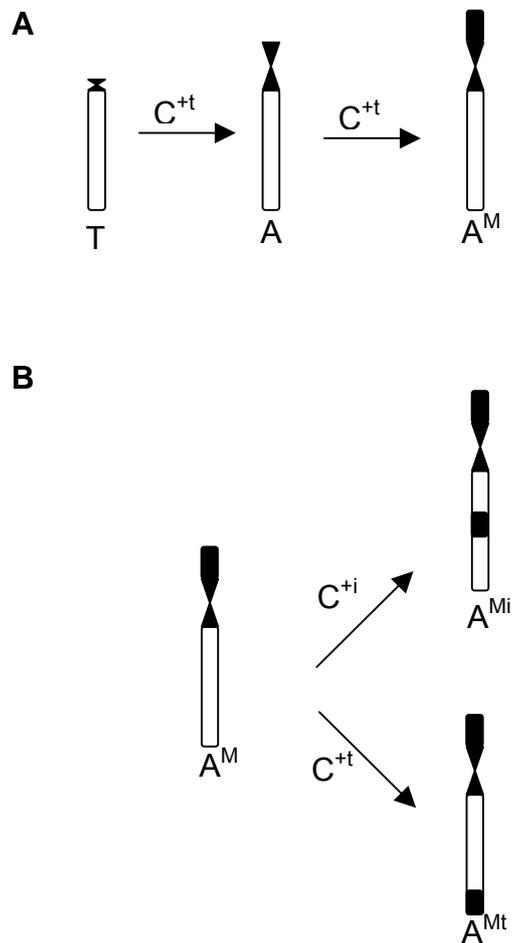


Figura 13 - Esquema representando o aparecimento de bandas intersticiais e terminais, segundo Imai (1991). A) Crescimento em tandem de heterocromatina, mostrando a origem de cromossomos pseudoacrocêntricos; B) Cromossomo pseudoacrocêntrico com inserção de heterocromatina na região terminal ( $C^{+t}$ ) e intersticial ( $C^{+i}$ ).

Nos cromossomos de *S. longula*, a heterocromatina está localizada ao longo de um dos braços ou na região pericentromérica. As duas outras espécies apresentaram bandas C distribuídas ao longo dos cromossomos do complemento (Figuras 6,7,8 e 9), caracterizando grupos cariotípicos distintos.

## 5.2 Heteromorfismo cromossômico em *S. longula*

Um heteromorfismo cromossômico foi encontrado exclusivamente no cariótipo de *S. longula*. Esse heteromorfismo é caracterizado pela diferença do tamanho do braço heterocromático de um dos cromossomos do par 6 em relação ao seu homólogo (Figura 3). A ocorrência de heteromorfismos de tamanho do braço heterocromático foi observado em outros organismos como bovinos (FERNANDEZ-GARCIA et al., 1997) e rato (WANG et al., 2003). Dentre os Hymenoptera, foi observado em vespas *Trypoxylon (Trypargilum) nitudum* (SCHER, POMPOLO, 2003) e em abelhas como *Friesella schrottkyi* (MAMPUMBU, 2002) e *Partamona helleri* (BRITO et al., 1997; BRITO, 1998).

Existem três mecanismos citológicos possíveis que explicariam a presença desse heteromorfismo no cariótipo de *S. longula*. Primeiro, a deleção de uma fração do braço heterocromático do cromossomo menor do par heteromórfico que, de acordo com Guerra (1988), é a perda de um pedaço qualquer do cromossomo, podendo ser terminal (mais rara) ou intersticial, originadas por quebra e eliminação cromossômica.

O segundo mecanismo que possivelmente induziria a esse heteromorfismo é a translocação de um segmento de um cromossomo para outro não-homólogo. Esse tipo de rearranjo foi observado em *Trypoxylon (Trypargilum) nitudum* por Scher e Pompolo (2003) e discutido como um mecanismo adotado pela célula para eliminar heterocromatina. Em nossas análises, não foi identificado o cromossomo do complemento, para o qual o segmento poderia ter sido translocado, sendo assim esse segundo mecanismo supostamente pode ser descartado para explicar a origem

do polimorfismo cromossômico. Essa observação também foi feita por Fernandez-Garcia et al. (1997), ao estudarem um novo polimorfismo cromossômico em bovinos.

O terceiro mecanismo é a duplicação do bloco heterocromático na região centromérica como foi observado em bovinos por Fernandez-Garcia et al (1997) e em ratos por Wang et al. (2003). Tanto a deleção quanto a duplicação podem ser identificadas citologicamente através de alterações na análise de marcadores cromossômicos, bem como pela medição da extensão do cromossomo mitótico. Ambos os mecanismos podem se originar do pareamento meiótico incorreto ou pela distribuição desigual da cromatina (GUERRA, 1988). Nossos dados mostram que tal polimorfismo está diretamente relacionado com a heterocromatina, consistentes com as suposições feitas por Guerra (1988), ao afirmar que polimorfismos gerados por duplicação/deleção ocorrem mais freqüentemente em segmentos não-codificantes, como a heterocromatina.

Vale ressaltar que o heteromorfismo foi observado em todos os indivíduos analisados nesta colônia, entretanto, seria interessante analisar indivíduos na colônia que fossem haplóides para confirmar qual dos cromossomos do par heteromórfico aparece em maior freqüência ou mesmo se indivíduos haplóides, portando o cromossomo menor, são igualmente viáveis. Como não foi encontrado indivíduo haplóide durante essas análises, novas amostras necessitam ser coletadas em outras épocas do ano, levando-se em consideração a existência de uma diferença sazonal na produção de zangões nas colônias de meliponíneos.

### **5.3 Caracterização da heterocromatina**

A coloração por fluorocromos base-específicos permitiu caracterizar a composição molecular da heterocromatina nas espécies estudadas. Fazendo uma análise comparativa dos resultados obtidos com o bandamento C e o fluorocromo DAPI, notou-se que algumas regiões que aparecem com a fluorescência mais intensa coincidiram com regiões heterocromáticas nas três espécies de *Scaura*. Considerando a afinidade do DAPI por regiões cromossômicas ricas em pares de

base AT (VERMA; BABU, 1995), pode-se inferir que as regiões heterocromáticas coradas positivamente pelo DAPI são ricas em AT quando comparadas ao restante do genoma.

O DAPI revelou outras regiões cromossômicas fracamente coradas. Estas marcações fracas ocorreram em regiões cromossômicas terminais em todas as espécies. Em *S. longula* este tipo de marcação deu-se ao longo do braço maior heterocromático de um dos cromossomos do par heteromórfico (par 6, Figura 10B). A coloração CMA<sub>3</sub>, que especificamente cora regiões cromossômicas de DNA rico em GC (VERMA; BABU, 1995), resultou em bandas CMA<sub>3</sub> positivas neste braço longo heterocromático, mostrando congruência nos resultados obtidos com os dois fluorocromos (Figura 10 A e B). Esse resultado com *S. longula* também demonstra a existência de uma heterogeneidade heterocromática com relação à composição nucleotídica, visto que a maioria da heterocromatina é rica em AT, porém o par heteromórfico revelou heterocromatina rica em pares de base GC. Esse caráter heterogêneo da heterocromatina também foi observado em outros gêneros de Meliponini, como *Melipona* (ROCHA et al., 2002) e duas espécies de *Partamona* (BRITO, 1998).

Com este resultado, foi possível comparar as espécies com base em diferenças quantitativas e qualitativas na heterocromatina uma vez que, caracterizando-a molecularmente, foi possível estabelecer com maior segurança homologia destas regiões e acompanhar sua reorganização no genoma neste grupo.

As metáfases mitóticas de *S. atlântica*, submetidas à coloração com CMA<sub>3</sub>, realçaram duas bandas mais fortemente brilhantes na porção terminal de dois cromossomos não-homólogos, que correspondeu às regiões de DAPI<sup>-</sup>, heterocromáticas (Figuras 11 A e B).

De forma semelhante, o complemento cromossômico diplóide de *S. latitarsis* revelou dois pares cromossômicos com marcações CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>. Em um dos pares, a banda R localizou-se na região terminal do braço curto, correspondendo à porção DAPI<sup>-</sup> heterocromática. No outro par, o braço longo que se mostrou CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>, não corresponde à região heterocromática (Figuras 12 A e B). Os dados com CMA<sub>3</sub> coincidem com as observações feitas por Costa (2003) para essa espécie, porém este autor não realizou a coloração com DAPI.

A correlação entre regiões CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> e banda NOR tem sido descrita na literatura, sendo bastante comum entre os animais. Em abelhas, essa correlação foi registrada em *Melipona* (ROCHA 2002; ROCHA et al. 2002), em *Friesella schrottkyi* (MAMPUMBU, 2002) e em duas espécies de *Partamona* (BRITO, 1998). No entanto, como foi observado por Brito (1998), tal indicação não é precisa, visto que o número de marcações CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> pode ser maior em relação à coloração com nitrato de prata. Isso se deve ao fato que o CMA<sub>3</sub> liga-se preferencialmente a regiões do DNA ricas em GC, correspondendo a regiões de NOR ativas ou não, e o nitrato de prata, por sua vez, impregna-se apenas em NOR ativas. Em relação às espécies de *Scaura* em que as marcações foram fortes, relativamente pontuais e heterocromáticas, acreditamos que essas regiões CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> são possíveis sítios citológicos de localização de NOR.

É interessante salientar que esse tipo de informação pode ajudar a elucidar a evolução deste tipo de cromatina dentro do gênero *Scaura*. Embora seja uma técnica relativamente fácil de ser realizada, a coloração com nitrato de prata ainda não foi adaptada com sucesso para uma visualização de NOR em cromossomos de Meliponini, sendo registrado apenas em *Melipona* (ROCHA et al., 2002), e *Friesella schrottkyi* (MAMPUMBU, 2002). Novas perspectivas nesta área vêm de ensaios recentemente realizados com hibridação *in situ* de sondas de DNA ribossomal, que têm apontado a localização de genes ribossomais nas regiões heterocromáticas coincidentes com bandas CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> em abelhas (Costa inf. pessoal).

#### **5.4. Evolução cariotípica**

Nossos dados mostraram que, embora o número cromossômico seja conservado no gênero *Scaura*, existem variações nas fórmulas cariotípicas das três espécies estudadas.

Segundo Guerra (1988), é muito difícil reconhecer se uma determinada alteração está relacionada à diferenciação interespecífica ou se é apenas uma diferença que se estabeleceu paralela ou posteriormente à completa separação das

espécies, mas as variações cromossômicas são sempre significativas para o rumo evolutivo das espécies.

Sabe-se que as hipóteses da evolução cariotípica enfocam principalmente as alterações no número de cromossomos, entretanto, as variações cromossômicas podem ser tanto numéricas quanto estruturais.

As variações numéricas mais fáceis de serem observadas, pois altera o número cromossômico das espécies. As estruturais são reconhecidas quando afetam a morfologia cromossômica ou mudam a posição de certos marcadores cromossômicos, como os centrômeros e diversos tipos de bandas (GUERRA, 1988).

Em formigas, de acordo com Imai et al. (1977), os rearranjos cromossômicos que contribuem para mudanças cariotípicas são: inversão cêntrica, mudanças saltatórias de heterocromatina, translocações recíprocas simples, translocações complexas, cromossomos supranumerários, deleção cromossômica e rearranjos Robertsonianos (fissão, fusão), sendo que os quatro primeiros conduzem a variações no comprimento dos braços cromossômicos, enquanto os demais proporcionam mudanças no número cromossômico. Eles completam afirmando que dentro os rearranjos que alteram o braço cromossômico, a inversão e o crescimento de heterocromatina são os mais importantes na evolução do cariótipo de formigas.

Essas informações estão de acordo com os resultados observados nos cariótipos das espécies de *Scaura*, os quais diferem tanto no número de cromossomos acrocêntricos e pseudoacrocêntricos, quanto na distribuição variável de heterocromatina ao longo do complemento cromossômico.

O cariótipo de *S. latitarsis* apresentou um par cromossômico de morfologia metacêntrica, o que não foi observado nas outras duas espécies analisadas. A origem deste pode ter envolvido fusão cêntrica entre dois cromossomos acrocêntricos ou pseudoacrocêntricos (Figura 14). Como foi relatado por Hoshiba e Imai (1993), esse mecanismo tem como consequência à redução do número de cromossomos. Sendo assim, talvez não seja o mais adequado para explicar a presença do par metacêntrico encontrado no cariótipo de *S. latitarsis*, uma vez que não foi observada alteração numérica dentro do gênero *Scaura*. Um mecanismo alternativo seria a inversão pericentromérica de um cromossomo pseudoacrocêntrico ( $A^M$ ) seguido de eliminação de heterocromatina ( $A^{Mc} \rightarrow M^{cct} \rightarrow M^{cc}$ ). Tal explicação

tem suporte nas observações feitas em outras espécies de abelhas e vespas por Hoshiba e Imai (1993) (Figura 15).

Cabe ressaltar que a fórmula cariotípica estabelecida neste trabalho para *S. latitarsis* não coincide com os dados observados por Rocha et al. (2003b), em que foi registrada a fórmula cariotípica de  $2K= 14 A + 20 A^M$ , não relatando a presença de cromossomos metacêntricos. Isso pode ser explicado pela baixa resolução da técnica de bandamento C utilizada naquele trabalho, que não permitiu visualização das bandas ao longo dos cromossomos, dificultando a determinação morfológica dos mesmos. Alternativamente, *S. latitarsis* pode apresentar uma variação intraespecífica, o que poderia ser elucidado por meio de um estudo mais amplo, abrangendo mais amostras dentro da área de ocorrência da espécie. Neste caso, não deve ser descartada a possibilidade de serem encontrados números cromossômicos diferentes que venham a corroborar a origem do cromossomo metacêntrico por fusão. Caso semelhante foi detectado recentemente na espécie *Trigona fulviventris* (DOMINGUES et al., 2005).

Os resultados obtidos com as diferentes técnicas citogenéticas indicam que *S. latitarsis* e *S. atlantica* apresentam grande similaridade cariotípica entre si, em comparação com *S. longula*. É interessante notar que *S. longula* divergiu das demais espécies pela presença marcante de um heteromorfismo cromossômico, bem como por conter um grande bloco de heterocromatina rica em pares de base GC. Esse tipo de heterocromatina nas outras duas espécies ocorreu na forma de pequenas marcações em dois pares cromossômicos distintos.

Vale ressaltar que apesar de *S. latitarsis* e *S. atlantica* apresentarem uma diferenciação no tamanho e localização de marcações  $CMA_3^+$  o número de bandas por genoma haplóide foi o mesmo em ambas. Considerando a maior proximidade entre estas duas espécies, evidenciada por dados citogenéticos, morfológicos e comportamentais, provavelmente a reorganização do genoma deve ter ocorrido após a divergência destas espécies em relação a *S. longula*.

Esses resultados permitiram fazer inferências sobre os eventos envolvidos na diferenciação cariotípica nas espécies de *Scaura*. O uso de dados adicionais com outras espécies, baseando-se na citogenética tradicional e molecular, bem como nos

dados filogenéticos, será de grande importância na compreensão mais detalhada dos eventos ocorridos na evolução cromossômica dentro do gênero.

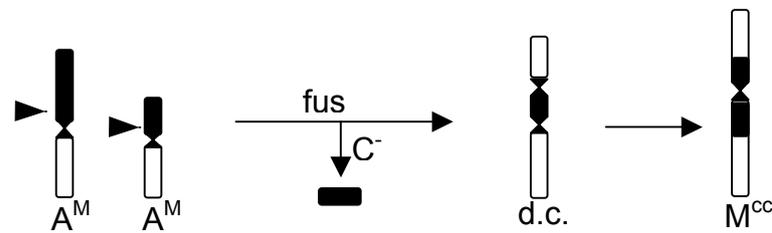


Figura 14 - Esquema da formação de cromossomo metacêntrico a partir da fusão entre dois cromossomos pseudoacrocêntricos ( $A^M$ ), levando a eliminação bloco heterocromático ( $C^-$ ), o resultado é um cromossomo dicêntrico e por fim tem-se um metacêntrico com heterocromatina na região pericentromérica ( $M^{cc}$ ), segundo Imai (1991).

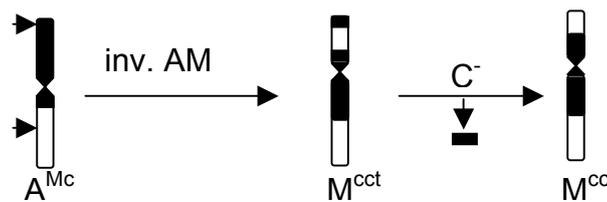


Figura 15 - Formação de cromossomo metacêntrico com heterocromatina na região pericentromérica ( $M^{cc}$ ), a partir de inversão pericentromérica (inv. AM) seguida de eliminação de heterocromatina ( $C^-$ ). Esquema modificado de Imai (1991).

## 6. CONCLUSÕES

As técnicas aplicadas neste trabalho constituíram num valioso instrumento para o estudo das alterações cromossômicas que ocorreram no cariótipo de cada espécie dentro do gênero *Scaura*, servindo de base para outros estudos evolutivos.

A citogenética realizada nas três espécies de *Scaura* permitiu concluir que embora o número cromossômico seja constante no gênero de  $2n=34$  (fêmeas) e  $n=17$  (machos), as espécies apresentam morfologias cromossômicas diferentes, o que equivale dizer que ao longo do tempo evolutivo os segmentos do genoma se reorganizaram consideravelmente.

A análise dos cromossomos de *S. latitarsis* e *S. atlantica*, por meio das diferentes técnicas, permitiu observar que estas apresentam cariótipos bastante semelhantes, o que era esperado, visto que estas são espécies mais próximas.

As variações na morfologia dos cromossomos das espécies de *Scaura* são conseqüências de variações estruturais que também desempenham um papel fundamental na evolução das espécies. Como a maioria das hipóteses de evolução cromossômica envolve alterações numéricas, os dados obtidos podem ser melhor encaixados na hipótese de interação mínima, uma vez que esta explica determinadas alterações estruturais observadas nos cariótipos de *Scaura*.

Trabalhos com essas espécies e outras relacionadas, fazendo uso de técnicas citogenéticas tradicionais e moleculares, deverão ser conduzidos de forma a enriquecer os conhecimentos acerca destas diferenças e assim auxiliar na compreensão da complexa evolução cariotípica e citotaxonomia do grupo.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALONSO, W.J. As abelhas sem ferrão: Centenas de espécies para polinização, produção de mel, lazer e educação. **A Lavoura**. Rio de Janeiro, RJ, ano 101, n. 626, p. 30-33, set. 1998.

AULT, J.G. Contributions of insect systems to the chromosome theory of inheritance and to our understanding of chromosome behavior on the spindle. **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, v.25, n. 1, p 93-114(22), jan. 1996.

BRITO, R.M. **Caracterização citogenética de duas espécies do gênero *Partamona* Schwarz, 1939 (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae)**. 1998. 97 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1998.

BRITO, R.M.; CAIXEIRO, A.P.A.; POMPOLO, S.G.; AZEVEDO, G.G. 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**. São Paulo, v. 26, n. 1, p. 53-57, jan. 2003.

BRITO, R.M.; COSTA, M.A.; POMPOLO, S.G. Characterization and distribution of supernumerary chromosomes in 23 colonies of *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Brazilian Journal of Genetics**. Ribeirão Preto, SP, v. 20, n. 2, p. 185-188, jun. 1997.

BRITO-RIBON, R.M.; MIYAZAWA C.S.; POMPOLO S.G. First karyotype characterization of four species of *Partamona* (Friese, 1980) (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) in Mato Grosso State, Brasil. **Cytobios**. Inglaterra, v. 100, p. 19-26, 1999.

CAIXEIRO, A.P.A.; POMPOLO, S.G. Caracterização citogenética da heterocromatina constitutiva e sua implicação na evolução do cariótipo do gênero *Plebeia* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). **Genetics and Molecular Biology**. Ribeirão Preto, SP, v. 22 (Suplement 3), p. 31-32, 1999.

COSTA, K.F. **Análise cariotípica de onze espécies da tribo Meliponini (Hymenoptera, Apidae, Apinae) de áreas de cerrado da Chapada dos Guimarães, Cuiabá, e do Pantanal Matogrossense de Poconé-MT**. 2003. 91f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação da Biodiversidade) – Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2003.

COSTA, K.F.; BRITO, R.M.; MIYAZAWA, C.S. Karyotypic description of four species of *Trigona* (Jurine, 1807) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) from the State of Mato Grosso, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**. São Paulo, v. 27, n. 2, p. 187-190, 2004.

COSTA, M.A.; LAMA, M.A.D.; MELO, G.A.R.; SHEPPARD, W.S. Molecular phylogeny of the stingless bees (Apidae, Apinae, Meliponini) inferred from mitochondrial 16S rDNA sequences. **Apidologie**. U.S.A., v. 34, p. 73-84, 2003.

COSTA, M.A.; POMPOLO, S.G.; CAMPOS, L.A.O. Supranumerary Chromosomes in *Partamona cupira* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Brasilian Journal of Genetics**. Ribeirão Preto, SP, v. 15, n. 4, p. 801 – 806, 1992.

CROZIER, R. H. Evolutionary genetics of the Hymenoptera. **Annual Review of Entomology**. Australia, v. 22, p. 263-288, jan. 1977.

DRETS, M. E. Una saga citogenética: El descubrimiento de los métodos de bandeo cromosómico. Significado y proyección bio-médica. **Revista Médica del Uruguay**. Uruguay, v.18, n. 2, p. 107-121, set. 2002.

DOMINGUES, A.M.T; WALDSCHMIDT, A.M.; ANDRADE, S.E.; ANDRADE-SOUZA, V.; ALVES, R.M.O.; SILVA-JUNIOR, J.C.; COSTA, M.A. Karyotype characterization of *Trigona fulviventris* Guérin, 1835 (Hymenoptera, Meliponini) by C banding and fluorochrome staining: Report of a new chromosome number in the genus. **Genetics and Molecular Biology**. São Paulo, v. 28, n. 3, p. 390-393, set. 2005.

FERNÁNDEZ, R.; BARRAGÁN, M.J.L.; BULLEJOS, M.; MARCHAL, J.A.; DÍAZ DE LA GUARDIA, R.; SÁNCHEZ, A. New C-band protocol by heat denaturation in the presence of formamide. **Hereditas**. Catalunya, v. 137, p. 145-148, nov. 2002.

FERNANDEZ-GARCÍA, J.L.; MARTINEZ-TRANCÓN, M.; RABASCO, A. A new chromosomal polymorphism by duplication of a heterochromatic region in cattle. **Genetical Research**. Cambridge, v. 69, n. 3, p. 237-238, jun. 1997.

GOMES, F.L.; BRITO, R.M.; POMPOLO, S.G.; OLIVEIRA, L.A.O.; PERUQUETTI, C. Karyotype and C and G-banding patterns of *Eufriesea violacea* (Hymenoptera, Apidae, Euglossinae). **Hereditas**. Catalunya, v. 128, n. 1, p. 73-76, 1998.

GOTTLIEB, Y.; ZOCHORI-FEIN, E.; WERREN, J.H.; KARR, T.L. Diploidy restoration in *Wolbachia* – infected *Muscidifurax uniraptor* (Hymenoptera: Pteromalidae). **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 81, p. 166-174, set. 2002.

GUERRA, M. **Introdução a Citogenética Geral**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1988. 142 p.

HEARD, T.A. The role of stingless bees in crop pollination. **Annual Review of Entomology**. Australia, v. 44, p. 183-206, jan. 1999.

HEITZ, E. Das Heterochromatin der Moose. **Jahrbücher für Wissenschaftliche Botanik**. New York, v. 69, p. 762-818, 1928.

HOSHIBA, H.; IMAI, H. T. Chromosome evolution of bees and wasps (Hymenoptera, Apocrita) on the basis of C-banding pattern analyses. **Japanese Journal Entomology**. Japan, v.61, n. 3, p. 465-492, 1993.

HOSHIBA, H.; MATSUURA, M.; IMAI, H.T. Karyotype evolution in the social wasps (Hymenoptera, Vespidae). **Japanese Journal Genetics**. Japan, v. 64, p. 209-222, 1989.

IMAI, H.T. Karyological Studies of Japanese Ants: I. Chromosome Evolution and Species Differentiation in Ants. **Sci. Rep. T. K. D., Sect. B**. Tokyo, v. 14, n. 206, p. 27-46, 1969.

IMAI, H.T. On the Origin of Telocentric Chromosomes in Mammals. **Journal of Theoretical Biology**. Japan, v. 71, p. 619-637, 1978.

IMAI, H.T. Centric Fission in Man and Other Mammals. In: Daniel, A. (ed.) **The Cytogenetics of Mammalian Autosomal Rearrangements**. New York: Alan R. Liss Inc., 1988. p. 551-582.

IMAI, H.T. Mutability of constitutive heterochromatin (C-bands) during eukaryotic chromosomal evolution and their cytological meaning. **Japanese Journal Genetics**. Japan, v. 66, p. 635-661, 1991.

IMAI, H.T. A theoretical approach to chromosome banding pattern analysis. **Japanese Journal Genetics**. Japan, v. 68, p. 97-118, 1993.

IMAI, H.T. Taylor R.L.W.; Crosland M.W.J.; Crozier R.H. Modes of spontaneous chromosomal mutation and karyotypes evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis. **Japanese Journal Genetics**. Japan, v. 63, p.159-185, 1988.

IMAI, H.T.; CROZIER, R.H.; TAYLOR, R.W. Karyotype Evolution in Australian Ants. **Chromosoma**, Berlin, v. 59, p. 341-393, 1977.

IMAI, H.T.; CROZIER, R.H. Quantitative analysis of directionality in mammalian karyotype evolution. **The American Naturalist**. Chicago, v. 116, n. 4, p. 537-569, 1980.

IMAI, H.T.; MARUYAMA, T.; GOJOBORI, T.; INOYE, Y.; CROZIER, R.H. Theoretical bases for karyotype evolution. 1. The minimum hypothesis. **The American Naturalist**. Chicago, v. 128, n. 6, p. 900-920, 1986.

IMAI, H.T.; SATTA, Y.; TAKARATA, N. Integrative Study on Chromosome Evolution of Mammals, Ants and Wasps Based on the Minimum Interaction Theory. **Journal of Theoretical Biology**. Japan, v. 210, p. 475-497, 2001.

IMAI, H.T., TAYLOR, R.W. Chromosomal polymorphisms involving telomere fusion, centromeric inactivation and centromere shift in the ant *Myrmecia (pilosula)* n=1. **Chromosoma**, Berlin, v.6, p.456-460, 1989.

IMAI, H.T.; TAYLOR, R.W.; CROZIER, R.H. Experimental base for the minimum interaction theory: I. Chromosome evolution in ants of the *Myrmecia pilosula* species complex (Hymenoptera: Formicidae: Myrmeciinae). **Japanese Journal Genetics**. Japan, v. 69, p. 137-182, 1994.

KERR, W.E. Estudos sobre o gênero *Melipona*. **Anais da Escola Superior Agrícola**. "Luiz de Queiroz". v. 5, p. 182-276, 1948.

KERR, W.E. A variação do número de cromossomos na evolução dos Hymenoptera. **Scientia Genetica**. v. 4, n. 3, p. 182 – 219, abr. 1952.

KERR, W.E. Some aspects of the evolution of the social bees (Apidae). **Evolutionary Biology**. v. 3, p.119-175, 1969.

KERR, W.E. Numbers of chromosomes in some species of bees. **Journal of the Kansas Entomology Society**. New York, v.45, p. 111-122, 1972.

KERR, W.E.; CARVALHO, G.; NASCIMENTO, V. **Abelha Uruçu – Biologia, manejo e conservação**. Belo Horizonte: Fundação Acangaú, 1996. 144 p. (Coleção Manejo da Vida Silvestre,2).

KERR, W.E.; CARVALHO, G.A.; SILVA, A.C.; ASSIS, M.D.G.P. Aspectos pouco mencionados da diversidade amazônica: Biodiversidade, pesquisa e desenvolvimento na Amazônia. **Parcerias Estratégicas**, n. 12, p. 20-41, set. 2001.

KERR, W.E.; SILVEIRA, Z.V. Karyotypic evolution of bees and corresponding taxonomic implications. **Evolution**, v. 26, p. 197-202, 1972.

MABLE, B.K. Why polyploidy is rarer in animals than in plants': myths and mechanisms. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 82, p. 453-466, 2004.

MAMPUMBU, A.R. **Análise Citogenética da heterocromatina e da NOR em populações de abelhas sem ferrão *Friesella schrottkyi* (Friese, 1900) (Hymenoptera: Meliponini)**. 2002. 56 f. Dissertação (Mestrado em Genéticas e Melhoramento) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

MATEUS,S.; NOGUEIRA-NETO, P.; ZUCCHI, R. Diversidade etológica do processo de postura das células de cria em espécies do gênero *Scaura* (Apidae, Meliponinae). In: XVII Encontro Anual de Etologia, 17, 1999, São Paulo. **Anais de Etologia**. São Paulo: SBEt, 1999. p. 91.

MELO, G.; COSTA, M.A. A new stingless bee species of the genus *Scaura* (Hymenoptera, Apidae) from the Brazilian Atlantic forest, with notes on *S. Latitarsis* (Friese). **Zootaxa**, v. 544, p. 1-10, 2004.

MICHENER, C.D. **The bees of the world**. London: The Johns Hopkins University Press, 2000.

MOREIRA, C.M.L.C., POMPOLO, S.G. Caracterização cariotípica de espécies do gênero *Frieseomelitta* IHERING, 1912 (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Revista Brasileira de Genética**. Goiânia, GO, v. 20, n. 3, p. 62-62,1997.

NOGUEIRA-NETO, P. Endocruzamentos em colônias de *Scaura longula* Lepeletier (Hymenoptera, Apidae). In: MELO, GAR; ALVES-DOS-SANTOS. **Apoidea Neotropica: homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure**. Criciúma: UNEC, 2003. p. 189-190p.

OTTO, S.P.; WHITTON, J. Polyploid incidence and evolution. **Annual Review Genetics**. Raleigh, v. 34, p. 401-437, 2000.

PIECZARKA, J.C.; MATTEVI, M. Heterocromatina Constitutiva. In: DUARTE, FAM. **Série Monografias**, n. 7. Ribeirão Preto: SBG, 1998. p. 185-225.

POMPOLO, S.G. Estudos citogenéticos em Meliponinae. **Naturalia**, (edição especial), p. 62-66, 1992.

POMPOLO, S.G. Análise dos cariótipos de 19 gêneros de abelhas da subfamília Meliponinae. **Anais do 1º Encontro sobre Abelhas**. Ribeirão Preto, SP, v. 1, p. 143-146, 1994.

POMPOLO, S.G.; CAMPOS, L.A.O. Karyotypes of two species of stingless bees, *Leurotrigona muelleri* and *Leurotrigona pusilla* (Hymenoptera, Meliponinae). **Revista Brasileira de Genética**. , v. 18, n. 2, p. 181-184, 1995.

POMPOLO, S.G.; TAKAHASHI, C.S. Chromosome numbers and C-banding in two wasp species of the genus *Polistes* (Hymenoptera, Polistinae, Polistini). **Insectes Society**, n. 37, p. 251-257, 1990.

PRIMACK, R.B.; RODRIGUES, E. **Biologia da Conservação**. Londrina: E. Rodrigues, 2001. 328 p.

ROCHA, M.P. **Análise cariótica de dez espécies de abelhas do gênero *Melipona* Illiger, 1806 (Hymenoptera, Apidae), baseada em padrões de heterocromatina**. 2000. 52 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2000.

ROCHA, M.P. **Análises citogenéticas em abelhas do gênero *Melipona* (Hymenoptera, Meliponinae)**. 2002. 86 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural na área de Biologia Celular) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

ROCHA, M.P.; CRUZ, M.P.; WALDSCHMIDT, A.M.; SILVA-JUNIOR, J.C.; POMPOLO, S.G. Longitudinal differentiation in *Melipona mandacaia* (Hymenoptera, Meliponini) chromosomes. **Hereditas**. Catalunya, v. 138, p. 133-137, 2003a.

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

ROCHA, M.P.; POMPOLO, S.G.; CAMPOS, L.A.O. Citogenética da tribo Meliponini (Hymenoptera, Apidae). In: MELO, G. A. R.; ALVES-DOS-SANTOS, I. (Editores). **Apoidea Neotropical : homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure**. Criciúma: UNESC, 2003b, p. 311-320.

ROCHA, M.P.; POMPOLO, S.G.; DERGAM, J.A.; FERNANDES, A.; CAMPOS, L.A.O. DNA characterization and karyotypic evolution in the bee genus *Melipona* (Hymenoptera, Meliponini). **Hereditas**. Catalunya, v. 136, p. 19-37, 2002.

ROIG-ALSINA, A.; MICHENER, C.D. **Studies of the phylogeny and classification of long-tougued bee (Hymenoptera: Apoidea)**. Univ. Kansas Sci. Bul., n. 55, p.123-173, 1993.

SCHER, R.; POMPOLO, S.G. Evolutionary dynamics of the karyotype of the wasp *Trypoxylon (Trypargilum) nitidum* (Hymenoptera, Sphecidae) from the Rio Doce State Park, Minas Gerais, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 307-311, 2003.

SCHWEIZER, D. Reverse fluorescent chromosome banding with cromomycin and DAPI. **Chromosoma**. Berlin, v. 58, p. 307-324, 1976.

SCHWEIZER, D. Counterstain-Enhanced chromosome banding. **Human Genetics**, v. 57, p. 1-14, 1981.

SILVA-JUNIOR, J.C.; POMPOLO, S.G.; CAMPOS, L.A.O.; CRUZ, I. The kayotype of the parasitoid *Chelonus insularis* Cresson (Hymnoptera, Braconidae, Cheloninae). **Revista Brasileira de Biologia**. São Carlos, v. 60, n. 2, p. 337-339, 2000.

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

SOLÉ-CAVA, A.M. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: MATIOLI, SR (ed.). **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Editora Holos, 2001. p. 172-192.

SUMNER, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**. n. 75, p. 304-306, 1972.

SUMNER, A.T. **Chromosome banding**, London: Unwin Hyman, 1990, p. 434.

TARELHO, Z.V.S. **Contribuição ao estudo citogenético dos Apoidea**. Ribeirão Preto: USP, 1973. 112 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1973.

TEIXEIRA, A.C.P.; MARINI, M.M.; NICOLI, J.R.; ANTONINI, Y.; MARTINS, R.P.; LACHANCE, M. A.; ROSA, C. A. *Starmecella meliponinorum* sp. nov., a novel ascomycetous yeast species associated with stingless bees. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. n. 53, p. 339-343, 2003.

VERMA, R.S.; BABU, A. **Human Chromosomes: Banding Techniques**. 2<sup>o</sup> Edition. Mc Graw – Hill: International Edition, 1995, p. 72-128.

WANG, J.X.; ZHAO, X.F.; KOH, H.S.; GENG, Y.; QI, H.Y. Chromosomal polymorphisms due to heterochromatin growth and pericentric inversion in white-bellied rat, *Niviventer confucianus*, from China. **Hereditas**. Catalunya, v. 138, p. 59-64, 2003.

WHITE, D.; CRIBB, B.W.; HEARD, T.A. Flower constancy of the stingless bee *Trigona carbonaria* Smith (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). **Australian Journal of Entomology**. Austrália, v. 40, p 6-64, 2001.

WILSON, E.O. **The insect societies**. USA: The Belknap Press of Harvard University Press Cambridge, 1976. 548 p.