

ANDERSON FERNANDES DE MIRANDA

BANDEAMENTO CROMOSSÔMICO COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO E  
FLUOROCROMOS NO GÊNERO *MELIPONA* (HYMENOPTERA: APIDAE)

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2004

ANDERSON FERNANDES DE MIRANDA

BANDEAMENTO CROMOSSÔMICO COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO E  
FLUOROCROMOS NO GÊNERO *MELIPONA* (HYMENOPTERA: APIDAE)

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


APROVADA: 30 de julho de 2004.

---

Prof. Carlos Roberto de Carvalho

---

Prof<sup>a</sup> Tânia Maria Fernandes-Salomão



---

Prof<sup>a</sup> Marla Piumbini Rocha  
(Conselheira)

---

Prof. Jorge Abdala Dergam dos Santos  
(Conselheiro)

---

Prof<sup>a</sup> Silvia das Graças Pompolo  
(Orientadora)

Na terra onde nasci cresce um arbusto chamado pilriteiro. Dá umas frutinhas muito mambembes que não servem para nada. O povo, na sua sabedoria, logo improvisou uma quadrinha mista de ternura e ironia filosofando sobre o pilriteiro:

- Pilriteiro que dás pilritos,  
por que não dás coisa boa?
- Cada um dá o que pode  
conforme a sua pessoa...

(Raul Pereira)

Dedico este *pilrito* à  
minha mãe Leninha por todos  
os momentos difíceis pelos  
quais passou sem deixar a  
peteca cair.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus (que é O CARA!!!) por todos os perrengues que não me deixou passar só. E à minha mãe (se Ele é O CARA, ela com certeza é A MULHER), pela dedicação, paciência e amor incondicional.

Ao meu pai Geraldo Miranda, pelo exemplo de honestidade; à Cíntia, pelo insuportável protecionismo (...quando a gente ama, é claro que a gente cuida...); e à caçula Bethânia, desorientada, mas de uma vitalidade e alegria contagiantes, por tudo.

À minha orientadora professora Sílvia, por tudo que fez por mim, sendo responsável direta por todo o sucesso que eu alcançar algum dia.

Agradeço profundamente à Marla Rocha e ao Gustavo Schiedeck, por tudo que fizeram por mim; fazer o bem sem olhar a quem é uma atitude rara hoje em dia.

À Viviane Aline, não existem palavras para descrever o que ela representou e representa pra mim, uma *anjinha*, pela guarda.

Ao meu amigo professor Jorge Dergam, pelo exemplo como pesquisador e pelos bons papos; uns ensinam, outros inspiram.

Ao mentor e amigo professor Pedro Crescêncio, por todos os ensinamentos (incluindo as piadas!) e pelo exemplo de simplicidade; os bons não precisam de *outdoors*.

Ao professor Marco Aurélio, por todos os galhos que quebrou desde os tempos de graduação.

Agora um agradecimento especial ao pessoal do BV (onde o bem o mal se misturam), tanto o lado “A” (Itos, Bob, Vagão, Jonatas, Koku) quanto o lado “B” (Tchoque, Manabu, Meloso, Monstrão e por aí vai...), pelo aprendizado que universidade nenhuma ensina.

Ao meu parceiro Manga (Marcelo Perillo), mesmo com a distância e algumas divergências, por ainda ser um dos meus poucos amigos.

À dupla dinâmica Tibadas (Luciano Bambino) e EXPERTO (Dênis F. Miranda), por todas as confusões em que nos metemos e das quais saímos juntos. Ainda bem que O CARA joga no nosso time!

Aos meus amigos Tcheca (Wagner Vilella), Rato (Rodrigo) e Mocotó (Fábio Jr.), por mesmo a falta de contato não ter apagado a história que criamos juntos.

À família Ganso: Filipe, Siara e Prodígio (Mateus) – Sou fã de vocês, pela cumplicidade.

Aos meus amigos do vôlei Pablo, Héber, Vilson e Fernando Lúcio, pela saudade dos nossos “babas”.

À new generation: Cabana do pai Tomás (Filipe Ayuppi), Cueca (sem registro de batismo) e Formigão (também sem registro de batismo), molecada saudável e divertida, pelo companheirismo.

Aos meus companheiros de labuta do Laboratório de Citogenética de Insetos: Elaine Caliman (o carisma personificado) e Hilton Aguiar (meu fiel escudeiro), pelos bons momentos que passamos juntos.

À família do Pré-Vestibular Soma: Leandro, Zé André, Mírian e Bruno, em especial ao Magrelo (Gustavo Martins) e ao Wellington Clarindo, pelo exemplo de ética e profissionalismo.

Aos órgãos financiadores de pesquisa: CAPES, FAPEMIG e CNPq, sem os quais minha pesquisa não poderia ser desenvolvida, pelo apoio financeiro.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de cursar a pós-graduação.

## ÍNDICE

	Página
RESUMO .....	vi
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Citogenética .....	1
1.1.1. Fluorocromos .....	1
1.1.2. Enzimas de restrição.....	3
1.2. Subtribo Meliponina .....	7
2. OBJETIVOS.....	13
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	14
BANDEAMENTO CROMOSSÔMICO COM ENZIMAS DE RESTRICÇÃO E FLUOROCROMOS NO GÊNERO <i>MELIPONA</i> (HYMENOPTERA: APIDAE).....	19
RESUMO .....	19
INTRODUÇÃO.....	20
MATERIAL E MÉTODOS .....	22
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	25
CONCLUSÕES.....	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
ANEXOS .....	40
ANEXO 1 – MATRIZES DOS CARACTERES .....	41

## RESUMO

MIRANDA, Anderson Fernandes de, M. S., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2004. **Bandeamento cromossômico com enzimas de restrição e fluorocromos no gênero *Melipona* (Hymenoptera: apidae)**. Orientadora: Silvia das Graças Pompolo. Conselheiros: Maria Piumbini Rocha e Jorge Abdala Dergam dos Santos.

As espécies do gênero *Melipona* são conhecidas como abelhas indígenas sem ferrão. Apresentam grandes relevâncias econômica e ecológica devido à sua importância na polinização e na produção de mel. Até o momento foram estudadas citogeneticamente 16 das 42 espécies descritas do gênero. Na citogenética, a utilização das endonucleases de restrição *in situ* (REs) tem se mostrado muito útil, por produzir informações sobre a constituição da cromatina. O presente trabalho teve como objetivos utilizar duas REs seguidas da coloração com fluorocromos, para obter informações a respeito da composição e organização da cromatina das três espécies do gênero *Melipona* (*M. bicolor*, *M. quadrifasciata* e *M. subnitida*); incrementar o entendimento dos mecanismos de atuação das enzimas de restrição *in situ*; e, com base no padrão de bandeamento, inferir sobre as relações de parentesco entre as espécies estudadas. Os cromossomos metafásicos foram tratados com a combinação das REs *HaeIII* e *DraI*, com os fluorocromos QM e CMA<sub>3</sub>, obtendo, assim, quatro tratamentos para cada espécie. As presenças ou ausências de

bandas foram analisadas e os cladogramas, montados com o auxílio do programa PAUP<sup>®</sup>. Foi reconhecida uma nova modalidade de atuação das REs nos cromossomos das espécies estudadas, que resultou no aumento da fluorescência de algumas regiões dos cromossomos. Os tratamentos com as REs parecem ter amplificado as marcações dos fluorocromos, provavelmente devido à descondensação do DNA, que aumentou a acessibilidade dos fluorocromos. A utilização dos caracteres obtidos com a aplicação das REs produziu um cladograma informativo, no qual se percebe uma grande divergência entre as espécies *M. bicolor* e *M. subnitida*.



## ABSTRACT

MIRANDA, Anderson Fernandes de, M. S., Universidade Federal de Viçosa, July 2004. **Chromosomic band with restriction enzymes and fluorochromes in the *Melipona* (Hymenoptera: apidae)**. Adviser: Silvia das Graças Pompolo. Committee members: Marla Piumbini Rocha and Jorge Abdala Dergam dos Santos.

The bees of genus *Melipona* are known as stingless indigenous bees. They have great economical and ecological relevance due to their importance on pollination and honey production. Until present, 16 out of 42 species of *Melipona* have been cytogenetically studied. In cytogenetics, the use of *in situ* restriction endonucleases (REs) has been very useful for generating information towards a better comprehension of the nature of chromatin. The objective of this work was to apply two REs, followed by fluorochrome dyeing, to characterize chromatin composition and organization in three species (*M. bicolor*, *M. quadrifasciata* and *M. subnitida*); and infer about the degree of similarity among these species. Metaphase chromosomes were treated with the combination of the REs *HaeIII* and *DraI* with fluorochromes QM and CMA<sub>3</sub>, representing four treatments for each species. The presence or absence of bands were recorded as characters and a Neighbor Joining analysis was carried out with PAUP\*. Combination of REs action and fluorochromes resulted in the increase of fluorescence at some regions of the chromosomes, probably because of the

DNA decondensation, which increased the accessibility of the fluorochromes. REs patterns suggest greater divergence between the species *M. bicolor* and *M. subnitida*.

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. Citogenética**

A citogenética pode ser definida como o estudo do conjunto cromossômico normal e anormal e suas propriedades genéticas (GRIFFITHS et al., 1998). É utilizada para estudar a estrutura, a organização e o comportamento dos cromossomos (LACADENA, 1997). Pode ser usada também como uma ferramenta no estudo da evolução das espécies, no entendimento da diversidade genética, na filogenia (SUMNER, 1990) e na taxonomia (MARIANO et al., 1999).

#### **1.1.1. Fluorocromos**

Os fluorocromos são corantes que fluorescem quando excitados por luz de um comprimento de onda específico, sendo a fluorescência a luminescência emitida por essas substâncias nessa situação. Quando a energia atinge uma substância, esta absorve e, ou, converte uma pequena porção de energia. A maior parte da energia, que não é absorvida pela substância, é emitida em um processo conhecido como fluorescimento (*in* PIECZARKA e MATTEVI, 1998).

A microscopia de fluorescência é baseada na capacidade dos fluorocromos de absorver energia em certos comprimentos de onda e emitir energia no comprimento de luz visível. Um microscópio de fluorescência é

composto de uma fonte iluminadora, lentes de aumento e de filtros de luz. A microscopia de fluorescência mais utilizada é a epifluorescência, na qual o material contendo o fluorocromo é iluminado por cima. A fonte de iluminação mais utilizada é a lâmpada de mercúrio de alta pressão, por possuir forte emissão dos comprimentos de ondas necessários para esse tipo de microscopia (PIECZARKA e MATTEVI, 1998).

Filtros de bandas curtas realizam um isolamento da radiação, permitindo que o fluorocromo receba os comprimentos de ondas apropriados para fluorescer. A luz emitida pela excitação do fluorocromo passa pelo espelho dicróico, um tipo de filtro que reflete quase 90% da luz de um comprimento de onda mais curto que um certo valor, enquanto permite a passagem da maior parte da luz com ondas mais longas (luz visível) (PIECZARKA e MATTEVI, 1998).

Os fluorocromos podem ser divididos em duas classes, de acordo com suas afinidades pelas bases AT ou GC. Na primeira classe, podem se citar o 4-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) e a Quinacrina Mostarda (QM), enquanto na segunda classe podem ser encontradas a Cromomicina A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>) e a Mitramicina (VERMA e BABU, 1995; PIECZARKA e MATTEVI, 1998).

Segundo Sumner (1990), Carpersson, em 1968, foi o primeiro pesquisador a utilizar a quinacrina mostarda, introduzindo os fluorocromos na citogenética. Esse bandeamento revolucionou a citogenética, permitindo a identificação dos pares de cromossomos homólogos. Entretanto, logo foi substituído pelo bandeamento G, pois a QM, assim como a maioria dos fluorocromos, proporcionava baixo contraste entre as bandas claras e escuras e rápida perda da fluorescência, mesmo sob rápida excitação de luz. Por esse motivo, as técnicas de bandeamento fluorescente foram subutilizadas por alguns anos.

Mais recentemente foram desenvolvidos métodos para superar tais dificuldades, como a substituição da sacarose por glicerol em meio à montagem da lâmina, fornecendo maior estabilidade à fluorescência. Além disso, foi desenvolvida uma nova técnica, na qual são utilizadas substâncias chamadas de contracorantes, que têm o papel de realçar a marcação do fluorocromo.

De maneira geral, os fluorocromos DAPI, QM e CMA<sub>3</sub> são utilizados em citogenética para produzir informações a respeito da composição de pares de bases de certas regiões dos cromossomos. Araújo et al. (2000), estudando a vespa *Trypoxylon albitarse*, obtiveram um padrão complementar de bandas ao utilizarem os fluorocromos CMA<sub>3</sub> e QM, no qual a CMA<sub>3</sub> evidenciou as regiões de heterocromatina e a QM, a região de eucromatina. Já os cromossomos da abelha *Tetragonisca angustula*, estudada por Menezes (1997), apresentaram as regiões de heterocromatina rica em pares de bases AT (DAPI positivas), com exceção de algumas regiões terminais de alguns cromossomos que se mostraram fortemente marcados pela CMA<sub>3</sub>. Sendo algumas dessas mesmas regiões CMA<sub>3</sub> positivas coincidentes com as regiões de banda NOR positiva. Brito (1998), trabalhando com a abelha *Partamona helleri*, encontrou uma correlação positiva entre as regiões CMA<sub>3</sub> e as marcações de FISH obtidas com sonda para rDNA.

### **1.1.2. Enzimas de restrição**

As Enzimas de Restrição (REs) são proteínas produzidas por algumas bactérias e fungos como meio de defesa. Na presença de DNA exógeno, esses organismos produzem REs, que reconhecem seqüências específicas de 4 a 6 nucleotídeos, causando sua digestão. Esta decorre da hidrólise das ligações fosfodiésteres da dupla hélice do DNA exógeno. As bactérias e fungos protegem-se de suas REs, através da metilação de seu próprio DNA. A metilação ocorre por meio de uma enzima chamada de metiltransferase, que modifica os resíduos de adenina ou citosina, acrescentando a eles um radical metil (CH<sub>3</sub><sup>-</sup>) (TORRE et al., 1993).

Existem três classes de REs, que se diferenciam por sua estrutura, pelos co-fatores requeridos para sua atuação e pela maior ou menor especificidade da seqüência de reconhecimento. As REs classe I cortam o DNA ao acaso, a uma distância igual ou superior a 1.000 pb da seqüência de reconhecimento. Para atuarem, elas requerem como co-fatores Mg<sup>2+</sup> e ATP, que servem para liberar a enzima do DNA. As REs classe II clivam dentro ou imediatamente após a seqüência de reconhecimento. Sua estrutura molecular é composta por duas proteínas idênticas (um dímero), que hidrolisam a ligação fosfodiéster ao

se fixarem dentro ou ao lado da seqüência de reconhecimento e só necessitam de  $Mg^{2+}$  para atuarem (KESSLER, 1987). As REs classe III clivam o DNA de 25 a 27 pb depois da seqüência de reconhecimento. São dependentes de  $Mg^{2+}$  e ATP, e algumas metilam a seqüência de reconhecimento (KESSLER, 1987). As mais específicas em termos de clivagem do DNA são as da classe II, que são também as mais informativas sobre a composição de bases e, portanto, as mais utilizadas na biologia molecular e na citogenética para o estudo dos cromossomos (PIECZARKA et al., 1998).

A utilização das REs *in situ* fazem parte de uma nova geração de técnicas citogenéticas que empregam ferramentas da biologia molecular para fornecerem respostas sobre a composição molecular da cromatina (PIECZARKA et al., 1998). Segundo Torre et al. (1993), o primeiro trabalho propondo uma metodologia para a utilização das REs *in situ* em cromossomos fixados em lâminas foi o realizado por Mezzanotte e colaboradores, em 1983. Nele foi mostrado que certas REs eram capazes de clivar a cromatina fixada, removendo o DNA em diferentes domínios do cromossomo. Essa remoção do DNA de certas regiões pode ser visualizada pela subsequente coloração com giemsa ou com fluorocromo, uma vez que ela promove o surgimento de uma ou mais bandas claras transversais nos cromossomos ou uma simples redução na coloração de regiões ou de cromossomos inteiros (MILLER et al., 1984; VERMA e BABU, 1995).

#### - Mecanismo de atuação

O mecanismo de atuação é um dos pontos fundamentais para o entendimento e para uma interpretação correta dos resultados obtidos mediante a utilização desta técnica. Entre as várias razões para a não-extração de uma fração de DNA serão destacadas a seguir as que encontram maior respaldo na literatura. Porém, é válido destacar que apenas em casos muito especiais elas serão mutuamente exclusivas, podendo estar, na maioria das vezes, atuando em conjunto.

a) O tamanho da molécula da RE: de acordo com Pons et al. (1993), a acessibilidade foi o principal fator que interferiu nos resultados obtidos por duas REs diferentes. Quando em contato com o DNA total, ambas apresentavam um

padrão muito similar de digestão. Todavia, quando foram utilizadas em cromossomos fixados, o padrão de digestão entre elas se mostrou muito desigual, indicando que a principal diferença no mecanismo de atuação delas estava relacionada com as diferentes acessibilidades ao DNA apresentadas por cada uma. Ao que tudo indica, a presença de proteínas não-histônicas em interação com o DNA metafásico poderia ser um empecilho a algumas REs, no sentido de formarem uma barreira física que impediria o acesso das REs ao DNA.

b) Capacidade de reconhecimento da seqüência-alvo: neste ponto destaca-se a utilização de REs isoesquisômeras (diferentes enzimas que reconhecem as mesmas seqüências). Martínéz-Lage et al. (1994), utilizando duas REs diferentes, *MspI* (CC↓GG não metilado) e *HpaII* (CC↓GG metilado), obtiveram resultados muito diferentes quando os cromossomos de um molusco (*Mytilus galloprovincialis* L.) foram tratados com essas enzimas. Esses diferentes resultados foram atribuídos à presença de DNA metilado e não-metilado nas seqüências de reconhecimento das REs. Logo, apenas a presença da seqüência de reconhecimento não garante que o DNA seja clivado. Nesse caso, a proteção do DNA mediante a metilação parece ser um fator preponderante.

c) Associação do DNA a proteínas: estima-se que, se a distância de dois sítios-alvos for menor que 1 Kb, o fragmento será prontamente retirado do cromossomo. Do contrário, ele ficará retido, devido às proteínas que estão em associação ao DNA (LORITE et al., 1999). Logo, se a freqüência dos sítios-alvos for alta, conseqüentemente o tamanho dos fragmentos será pequeno, o que possibilitará sua extração (PONS et al., 1993). Lica e Hamkalo (1985) propuseram que a resistência da cromatina centromérica à digestão por *EcoRI* e *AluI* deve-se, pelo menos em parte, à proteção oferecida pela estrutura altamente condensada do DNA nessa região, pois, quando isolado e purificado (sem proteínas), este DNA resistente era clivado pelas enzimas. Kessler (1987) também relatou que a estrutura terciária do DNA e sua interação com proteínas podem estar envolvidas com a extração diferencial em cromossomos fixados.

Ainda com o intuito de investigar a associação do DNA com as proteínas, Ugarković et al. (1994) utilizaram REs em cromossomos metafásicos e no DNA total de uma espécie de coleóptero (*Tenebrio obscurus*). Em um

primeiro instante, as enzimas promoveram intensa digestão no DNA total, porém não provocaram nenhuma digestão ao longo dos cromossomos metafásicos. Esse resultado levantou a seguinte questão: as REs tiveram ou não acesso ao DNA do cromossomo?

Duas hipóteses podem explicar os resultados: 1) a RE não teve acesso ao DNA devido ao impedimento físico proporcionado, provavelmente, pelas proteínas associadas ao DNA, ou 2) a RE teve acesso ao DNA, clivando-o, porém os fragmentos gerados não foram liberados da matriz cromossômica que envolve o DNA.

Para testar essas hipóteses, os pesquisadores introduziram a utilização da proteinase K (enzima que degrada proteínas em geral) à metodologia de RE *in situ*. Em sua nova metodologia, a proteinase K foi usada de duas maneiras: antes ou depois das REs. Quando a proteinase K foi utilizada depois das REs, não foi verificada a presença de digestões ao longo dos cromossomos, indicando que o DNA não foi clivado pela RE. Porém, quando a proteinase K foi utilizada antes das REs, foi revelada uma intensa digestão nos cromossomos do coleóptero. Isso indicou que a remoção das proteínas resultou numa melhor acessibilidade das REs ao DNA.

#### - Utilização

Duas décadas após seus primeiros ensaios em cromossomos fixados, as REs já foram utilizadas com diversas finalidades. Todavia, uma das vertentes mais promissoras da sua utilização é a apresentada por Garcia et al. (2000). Nesse trabalho, os autores propuseram uma análise filogenética de quatro espécies de roedores de um mesmo gênero, por meio da análise de uma matriz de ausência/presença composta por caracteres citogenéticos. Esses dados foram obtidos com três REs (*AluI*, *HaeIII* e *Sau3A*), que foram comparadas entre os cromossomos homeólogos (cromossomos correspondentes de espécies diferentes) das quatro espécies. Baseado na provável árvore filogenética das espécies analisadas, foi possível propor a história evolutiva (em termos de rearranjos) de um dos cromossomos.

As REs também já foram utilizadas para identificar a presença de heteromorfismos na constituição da heterocromatina não apontados pelas



técnicas convencionais, como a Banda C (VERMA e BABU, 1995), para evidenciar a localização de DNA altamente repetitivo em humanos e, ainda, para distinguir diferentes tipos de heterocromatinas (GOSÁLVEZ et al., 1987; MARTINÉZ-LAGE et al., 1994; ROCHA et al., 2002).

Algumas REs, principalmente as que apresentam sítios de reconhecimento compostos por bases GC, promovem forte digestão em regiões como a NOR. Logo, essas REs estão sendo utilizadas para corroborar os resultados obtidos pelas técnicas de FISH e banda NOR (PADILLA et al., 1993; MARTINÉZ-LAGE et al., 1994; LORITE e PALOMEQUE, 1998; LORITE et al., 1999; FERNANDES et al., 2002).

## **1.2. Subtribo Meliponina**

### *-Origem*

De acordo com Silveira et al. (2002), as abelhas são vespas cujas fêmeas, em vez de capturarem outros artrópodes como alimento, coletam pólen e néctar diretamente nas flores para alimentar suas larvas. Parece ser de consenso que as abelhas se originaram de vespas, uma vez que ambas apresentam várias semelhanças morfológicas e comportamentais, o que, de acordo com os referidos autores, sugere um período relativamente longo de evolução comum antes da divergência entre elas. Também existe consenso na hipótese de que as abelhas constituem um grupo monofilético (todo o grupo se originou de uma única espécie ancestral) e que, dentre as vespas, o grupo mais próximo das abelhas é Crabronidae, constituindo seu grupo-irmão mais provável (SILVEIRA et al., 2002).

Vários cenários evolutivos têm sido apresentados para descrever as possíveis etapas na diferenciação das abelhas a partir das vespas. A idéia mais aceita, de acordo com esses mesmos autores, é a de que as abelhas tenham surgido após a origem das angiospermas, há no máximo 125 milhões de anos, no final da primeira metade do Cretáceo. De acordo com esta hipótese, a primeira grande diversificação das abelhas teria ocorrido concomitantemente com a grande irradiação das plantas floríferas, que se deu aproximadamente entre 130 e 90 milhões de anos. Uma evidência que

corroborar tal hipótese é o mais antigo fóssil de abelha conhecido – *Cretotrigona prisca* –, cuja idade é estimada em cerca de 65 milhões de anos. *C. prisca* é um meliponídeo típico e, como todos os meliponídeos, um dos grupos de abelhas mais derivados. Então, presume-se que grande parte da diversidade morfológica e comportamental exibida pelas abelhas hoje já havia surgido no final do Cretáceo.

#### - *Classificação e características gerais*

A família Apidae contém a subfamília Apinae, na qual se encontram 13 tribos, dentre elas a tribo Apini, com quatro subtribos: Apina, Bombina, Euglossina e Meliponina. A principal característica morfológica das abelhas encontradas na tribo Apini é a presença de corbícula nas fêmeas. A presença de algum nível de organização social também é característica de todas as subtribos (SILVEIRA et al., 2002). A maioria das espécies deste grupo apresenta grande relevância econômica e ecológica devido à sua importância na polinização e na produção de mel (MICHENER, 2000).

A subtribo Meliponina compreende as abelhas normalmente chamadas de abelhas indígenas sem ferrão. Nela são encontradas várias centenas de espécies de abelhas que se distribuem em todas as regiões tropicais do mundo, bem como nas regiões subtropicais de todo o hemisfério sul. Todas as espécies são eussociais (SILVEIRA et al., 2002).

Uma característica importante encontrada não só nessa tribo, mas de modo geral na maioria dos himenópteros, é a partenogênese arrenótoca (origem de machos a partir de ovos não-fertilizados), tendo como consequência a haplodiploidia (machos são haplóides e fêmeas são diplóides) (Dzierzon 1845, *in* CROZIER, 1975).

#### - *Relações filogenéticas*

No que diz respeito à organização filogenética dentro da tribo Apini (subtribos Euglossina, Bombina, Meliponina e Apina), estudos apontam para a Euglossina como o grupo basal, tendo como grupos mais derivados Apina e Meliponina (ROIG-ALSINA e MICHENER, 1993).

Para a subtribo Meliponina, Michener (1990) apresentou um cladograma no qual o gênero *Melipona* é colocado como grupo-irmão de todos os outros meliponídeos. Um resultado equivalente foi encontrado por Pignata e Diniz-Filho (1996), pelo menos para as espécies dos 10 gêneros que eles estudaram. Outra proposta, apresentada por Costa et al. (2003), propõe que o gênero *Melipona* está inserido dentro da subtribo não como um grupo-irmão de todos os outros meliponídeos, mas apenas do gênero *Plebeia*.

#### - Citogenética

Uma revisão a respeito dos estudos citogenéticos na subtribo Meliponina foi realizada por Rocha et al. (2003a). Esse autores relataram que já foram estudadas 74 espécies de 31 gêneros da subtribo Meliponina, e o número cromossômico variou de  $n=8$  a  $n=20$ , tendo um predomínio de  $n=17$ . Os dados citogenéticos mostraram-se em acordo com a divisão dos gêneros proposta por Camargo e Pedro (1992).

No que diz respeito à evolução cariotípica, a teoria mais aceita para explicar os dados citogenéticos encontrados nessa subtribo foi a desenvolvida por Imai et al. (1986, 1988, 1994) para formigas, na qual os cariótipos podem ter evoluído devido à ocorrência de fissões cêntricas (aumento do número cromossômico) e incorporação de heterocromatina nas extremidades fissionadas, para manter a estabilidade telomérica (ROCHA et al., 2003a).

#### - O gênero *Melipona*

Dentre os gêneros compreendidos por esta subtribo, destaca-se o *Melipona*, por apresentar o maior número de espécies estudadas citogeneticamente até o momento. Os primeiros estudos com esse cunho foram realizados por Kerr (1948), que determinou o número cromossômico de  $2n=18$  para fêmeas de *Melipona quadrifasciata* e *Melipona marginata*. Em 1979, Tambasco et al. utilizaram a técnica de Banda G para diferenciar os cromossomos do conjunto haplóide de *Melipona quadrifasciata*. Em 1988, Hoshiba determinou o número cromossômico (machos:  $n=9$  e fêmeas:  $2n=18$ ) para outra espécie do gênero, *Melipona favosa*.

Até o presente já foram cariotipadas 16 das 42 espécies descritas do gênero *Melipona*, o que equivale a 38% (KERR, 1948, 1952, 1969, 1972; HOSHIBA, 1988; TAMBASCO et al., 1979; TARELHO, 1973; ALMEIDA, 1981; ROCHA, 2002; ROCHA e POMPOLO, 1998; ROCHA et al., 2002, 2003ab). Todas as espécies apresentaram  $2n=18$ , exceto *M. quinquefasciata*. Kerr (1972) encontrou  $n=18$  como o número cromossômico, já Pompolo (1992) apresentou  $2n=20$ . Somente em estudo mais recente (ROCHA, 2002) esse impasse foi desvendado pela descoberta da presença de cromossomos B, que podem variar de 0 a 4 cromossomos. Logo, o número de cromossomos dessa espécie pode variar de  $2n=18$  a 22.

De acordo com Rocha e Pompolo (1998) e Rocha et al. (2002), o gênero *Melipona* apresenta uma divisão funcional, baseada na quantidade e localização da heterocromatina, em: grupo I (espécies que apresentam conteúdo de heterocromatina menor que 50%) e grupo II (espécies que apresentam conteúdo de heterocromatina maior que 50%). Dentro do grupo I estão *Melipona quadrifasciata*, *Melipona bicolor*, *Melipona marginata*, *Melipona asilvae* e *Melipona subnitida*. Já no grupo II estão *Melipona scutellaris*, *Melipona capixaba*, *Melipona compressipes*, *Melipona captiosa* e *Melipona seminigra fuscopilosa*.

Rocha et al. (2002), utilizando fluorocromos CMA<sub>3</sub>, DAPI e QM nos cromossomos das espécies do grupo I, possibilitaram a distinção da cromatina em classes, de acordo com a afinidade pelos fluorocromos (AT ou GC específicos), demonstrando uma riqueza até então desconhecida de classes de cromatina dentro do gênero. Em contrapartida, nas espécies do grupo II os fluorocromos demonstraram que a heterocromatina apresenta-se homoganeamente composta por bases AT.

Mediante a utilização das REs *Sma*I, *Hae*III e *Eco*RI *in situ*, foi possível verificar que a heterocromatina de cinco espécies do grupo II (*M. scutellaris*, *M. capixaba*, *M. compressipes*, *M. seminigra fuscopilosa* e *M. rufiventris*) sofreu intenso ataque na região heterocromática de todos os cromossomos, indicando que essa região apresentou seqüências-alvo para as REs. Uma vez que todas as três REs utilizadas apresentavam em sua seqüência de reconhecimento pares de bases GC, foi possível inferir que, apesar de predominantemente rica em pares AT, a heterocromatina das espécies do grupo II também possuía, na

sua constituição, pares de bases GC, demonstrando, assim, sua condição heterogênea (FERNANDES et al., 2000, 2002). Já nas três espécies do grupo I a utilização das REs *in situ* (*Haell* e *Dral*) demonstrou-se que os cariótipos de *M. bicolor* e *M. quadrifasciata* foram muito semelhantes quando comparados com o cariótipo de *M. subnitida*.

A primeira tentativa de organizar o gênero em subgêneros foi realizada por Kerr et al. (1967), quando o gênero foi dividido nos subgêneros *Melipona* e *Michmelia*, incluindo *M. mandacaia* e *M. quadrifasciata*, respectivamente. Em 1992, Moure propôs a criação de dois novos subgêneros e a reorganização das espécies dentro deles, *Melikerria* (contendo *M. quinquefasciata* e *M. compressipes*, entre outras), *Eomelipona* (contendo *M. bicolor*, *M. marginata* e *M. asilvai*, entre outras), *Michmelia* (contendo *M. scutellaris*, *M. rufventris*, *M. seminigra* e *M. quadrifasciata*, entre outras) e *Melipona* (contendo *M. subnitida*, *M. mandacaia* e *M. favosa*, entre outras).

Silveira et al. (2002), seguindo as bases da classificação de Moure (1992), propuseram que *M. quadrifasciata* fosse inserida no mesmo grupo de *M. subnitida* e de *M. mandacaia* (subgênero *Melipona*) por apresentar estreita relação com esta última, tanto na morfologia dos adultos quanto na estrutura dos ninhos.

Mais recentemente, outros tipos de dados foram empregados na subdivisão do gênero. Rocha e Pompolo (1998), utilizando o caráter citogenético conteúdo e localização de heterocromatina, propuseram uma divisão do gênero em dois grupos: grupo I, com baixo conteúdo de heterocromatina; e grupo II, com alto conteúdo. Essa divisão apresenta uma nítida correlação com a subdivisão proposta por Silveira et al. (2002). Dessa maneira, o grupo I, de Rocha e Pompolo (1998), equivale aos subgêneros *Melipona* e *Eomelipona*, de Silveira et al. (2002), enquanto o grupo II seria equivalente aos subgêneros *Melikerria* e *Michmelia*. A única exceção foi *M. quinquefasciata*, que se encontra no subgênero *Melikerria*, embora apresente baixo conteúdo de heterocromatina (grupo I).

Outro trabalho que a princípio teve como objetivo estabelecer as relações filogenéticas entre as espécies do gênero, mas que apresentou resultados que terminaram, entre outras coisas, por reforçar a subdivisão do gênero *Melipona* em quatro subgêneros, foi o realizado por Fernandes-

Salomão et al. (2004). Nele, usaram-se técnicas de biologia molecular para obter caracteres que foram utilizados nas análises filogenéticas. O fragmento de rDNA (ITS-1) de oito espécies do gênero *Melipona* foi seqüenciado e comparado, sendo um cladograma proposto. Além de representar as relações filogenéticas entre as oito espécies, esse estudo corroborou o de Silveira et al. (2002), no que tange à divisão do gênero em quatro subgêneros.

## 2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos:

- Obter informações a respeito da composição e da organização da cromatina de espécies do gênero *Melipona*.
- Incrementar o entendimento dos mecanismos de atuação das enzimas de restrição.
- Realizar inferências a respeito das relações de parentesco entre as espécies estudadas.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, M.G. Estudo sobre o número de cromossomos e contagem de espermatozóides na abelha *Melipona scutellaris* Latreille, 1811. **Ciência e Cultura**, v. 33, p. 539-542, 1981.

ARAÚJO, S.M.S.R.; POMPOLO, S.G.; DERGAM, J.A.S.; CAMPOS, L.A.O. B-chromosomes system of *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* (Hymenoptera, Sphecidae). **Cytobios**, v. 101, p. 7-13, 2000.

BRITO, R.M. **Caracterização citogenética de duas espécies do gênero *Partamona* Schwarz, 1939 (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae)**. Viçosa, MG: UFV/DBG, 1998. 72 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

CAMARGO, J.M.F.; PEDRO, S.R.M. Sistemática de Meliponinae (Hymenoptera, Apidae): sobre a polaridade e significado de alguns caracteres morfológicos. **Naturalia** (Ed. Esp.), p. 45-51, 1992.

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**, v. 34, p. 73-84, 2003.

CROZIER, H.R. Hymenoptera. In: JOHN, B. (Ed.). **Animal cytogenetics**, Berlin, Stuttgart, Gebrüder Borntraeger, 1975.

FERNANDES, A.; ROCHA, M.P.; POMPOLO, S.G. Utilização de enzimas de restrição seguidas de coloração com fluorocromo em cromossomos metafásicos na abelha sem ferrão *Melipona compressipes* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 48., 2000, Ribeirão Preto, SP. **Anais...** Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética, 2000. v. 23, p. 20-21.



FERNANDES, A.; ROCHA, M.P.; POMPOLO, S.G. Citogenética no gênero *Melipona* (Hymenoptera, Meliponini): 1-determinação do índice metafásico; 2-utilização de endonucleases de restrição. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 48., 2002, Ribeirão Preto, SP. **Anais...** Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética, 2002. 194 p.

FERNANDES-SALOMÃO, T.M.F.; ROCHA, R.B.; CAMPOS, L.A.O.; ARAÚJO, E.F. The first internal transcribed spacer (ITS-1) of *Melipona* species (Hymenoptera: Apidae, Meliponini): characterization and phylogenetic analysis. **Insectes Sociaux**, 2004. (no prelo).

GARCIA, L.; PONSÀ, M.; EGOZCUE, J.; GARCIA, M. Comparative chromosomal analysis and phylogeny in four *Ctenomys* species (Rodentia, Octodontidae). **Biological Journal of Linnean Society**, v. 69, p. 103-120, 2000.

GOSÁLVEZ, J.; BELLA, J.L.; LÓPEZ-FERNÁNDEZ, C.; MEZZANOTTE, R. Correlation between constitutive heterochromatin and restriction enzyme resistant chromatin in *Arcyptera tornosi* (Orthoptera). **Heredity**, v. 59, p. 173-180, 1987.

GRIFFITHS, A.J.G.; MILLER, J.H.; SUZUKI, D.T.; LEWONTIN, R.C.; GELBART, W.M. **Introdução à genética**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. 856 p.

HOSHIBA, H. Karyological analysis of a stingless bee, *Melipona favosa* (Apidae, Hymenoptera). **Cytologia**, v. 53, p. 153-156, 1988.

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

IMAI, H.T.; TAYLOR, R.W.; CROSLAND, M.W.J.; CROZIER, R.H. Modes of spontaneous evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis. **Japanese Journal of Genetics**, v. 63, p. 159-185, 1988.

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

KERR, W.E. Estudos sobre o gênero *Melipona*. **Anais da Escola de Agricultura "Luiz Queiroz"**, v. 5, n. 6, p. 181-276, 1948.

KERR, W.E. A variação do número de cromossomas na evolução dos himenópteros. **Scientia Genetica**, v. 3, n. 4, p. 182-199, 1952.

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

KERR, W.E. Numbers of chromosomes in some species of bees. **Journal of the Kansas Entomological Society**, v. 45, p. 11-122, 1972.

KERR, W.E.; PISANI, J.F.; ALLY, D. Aplicação de princípios modernos à sistemática do gênero *Melipona* Illiger, com a divisão em dois subgêneros (Hymenoptera, Apoidea). **Papéis Avulsos de Zoologia**, v. 20, p. 135-145, 1967.

KESSLER, C. ClasiI restriction endonucleases, In: OBE, G.; BASLER, A. (Eds.). **Cytogenetics: basic and applied aspects**. Berlin: Springer-Verlag, 1987. p. 225-280,

LACADENA, J.R. Cytogenetics: yesterday, today and forever. A conceptual and historical view. In: PARKER, J. S.; HENRIQUES-GIL, N.; PUERTAS, M. J. (Eds.). **Chromosome today**. London: Chapman & Hall, 1997. v. 12, p. 3-19.

LICA, L.; HAMKALO, B. Preparation of centromeric heterochromatin by restriction endonuclease digestion of mouse L929 cells. **Chromosoma**, v. 88, p. 42-9, 1985.

LORITE, P.E.; PALOMEQUE, T. Effects of restriction endonucleases on nucleolar organizing regions in the ant *Tapinoma nigerrimum*. **Genome**, v. 41, p. 872-975, 1998.

LORITE, P.; GARCIA, M.F.; CARRILO, J.A.; PALOMEQUE, T. Restriction endonuclease chromosome banding in *Tapinoma nigerrimum* (Hymenoptera, Formicidae). **Hereditas**, v. 131, p. 197-201, 1999.

MARIANO, C.S.F.; POMPOLO, S.G.; DELABIE, J.H.C. Citogenética das espécies gêmeas e simpátricas *Pachycondyla villosa* e *Pachycondyla* sp. *inversa* (Ponerinae). **Naturalia**, v. 24, p. 215-217, 1999.

MARTÍNEZ, A.; GONZÁLEZ-TIZÓN, A.; MÉNDEZ, J. Characterization of different chromatin types in *Mytilus galloprovincialis* L. after C-banding, fluorochrome and restriction endonuclease treatments. **Heredity**, v. 72, p. 242-249, 1994.

MENEZES, M.B.F. **Caracterização citogenética e análise da heterocromatina constitutiva em *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Meliponinae)**. Viçosa, MG: UFV/DBG, 1997. 67 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

MICHENER, C.D. Classification of the Apidae (Hymenoptera). **The University of Kansas Science Bulletin**, v. 54, n. 4, p. 75-164, 1990.

MICHENER, C.D. **The bees of the world**. Baltimore and London: The Johns Hopkins University Press, 2000. 913 p.

MILLER, D.A.; GOSDEN, J.R.; HASTIE, N.D.; EVANS H.J. Mechanism of Endonuclease of Chromosomes. **Experimental Cell Research**, v. 155, p. 294-298, 1984.

MOURE, J.S. *Melikerria* e *Eomelipona*, dois subgêneros novos em *Melipona* Lligiger, 1806 (Hymenoptera, Apidae). Encontro Brasileiro de Abelhas e outros Insetos Sociais. **Naturalia** (Ed. Esp.), v. 62, p. 66, 1992.

PADILLA, J.A.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, J.L.; RABASCO, A.; MARTÍNEZ-TRANCÓN, M.; RODRIGUEZ DE LEDESMA, I.; PÉREZ-REGADERA, J.J. Characterization of the karyotype of the tench (*Tinca tinca* L.) and analysis of its chromosomal heterochromatic regions by C-banding, Ag-staining and restriction endonuclease banding. **Cytogenetic and Cell Genetics**, v. 62, p. 220-223, 1993.

PIECZARKA, J.C.; MATTEVI, M. **Heterocromatina constitutiva**. Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética, 1998. p.197-208, (Série monografias, 7).

PIECZARKA, J.C.; NAGAMACHI, C.Y.; MUNIZ, J.A.P.C.; BARROS, R.M.S. Analysis of constitutive heterochromatin of *Aotus* (Cebidae, Primates) by restriction enzyme and fluorochrome bands. **Chromosome Research**, v. 6, p. 77-83, 1998.

PIGNATA, M.I.B.; DINIZ-FILHO, J.A.F. Phylogenetic autocorrelation and evolutionary constraints in worker body size of some neotropical stingless bees (Hymenoptera: Apidae). **Heredity**, v. 76, p. 222-228, 1996.

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

PONS, J.; PETITPIERRE, E.; JUAN, C. Characterization of the heterochromatin of the darkling beetle *Misolampus goudoti*: cloning of two satellite DNA families and digestion of chromosomes with restriction enzymes. **Hereditas**, v. 119, p. 179-185, 1993.

ROCHA, M.P. **Análises citogenéticas em abelhas do gênero *Melipona* (Hymenoptera, Meliponinae)**. Campinas, SP: UNICAMP, 2002. 84 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural) – Universidade de Campinas, Campinas.

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

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

ROCHA, M.P.; POMPOLO, S.G.; CAMPOS, L.A.O. Citogenética da tribo Meliponini (Hymenoptera, Apidae). In: **Apoidea Neotropica**: homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure. Criciúma, SC: UNESC, 2003a. 320 p.

ROCHA, M.P.; POMPOLO, S.G.; DERGAM, J.A.; FERNANDES, A.; CAMPOS L.A.O. DNA characterization and karyotypic evolution in bees genus *Melipona* (Hymenoptera, Meliponini). **Hereditas**, v. 136, p. 19-27, 2002.

ROIG-ALSINA, A.; MICHENER, C.D. Studies of the phylogeny and classification of long-tongued bees (Hymenoptera: Apoidea). **The University of Kansas Science Bulletin**, v. 55, n. 4, p. 123-162, 1993.

SILVEIRA, F.A.; MELO, G.A.R.; ALMEIDA, E.A.B. **Abelhas brasileiras**: sistemática e identificação. Belo Horizonte: Composição e Arte, 2002. 253 p.

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

TAMBASCO, A.J.; GIANNONI, M.A.; MOREIRA, L.M.A. Analyses of G-bands in chromosomes of the *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepageletier (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Cytologia**, v. 44, p. 21-27, 1979.

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

TORRE, J.; LÓPEZ-FERNÁNDEZ, C.; GOSÁLVEZ, J.; BELLA, J. Restriction endonucleases: powerful tools to induce chromosome markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 21, n. 1, p.13-24, 1993.

UGARKOVIĆ, D.; PLOHL, M.; PETITPIERRE, E.; LUCIJANIĆ-JUSTIĆ, V.; JUAN, C. *Tenebrio obscurus* satellite DNA is resistant to cleavage by restriction endonuclease *in situ*. **Chromosome Research**, v. 2, p. 217-223, 1994.

VERMA, R.S.; BABU, A. **Human chromosomes**. Principles and Techniques. New York: Mc Graw Hill Inc, 1995. 419 p.

## BANDEAMENTO CROMOSSÔMICO COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO E FLUOROCROMOS NO GÊNERO *MELIPONA* (HYMENOPTERA: APIDAE)

Fernandes, A.<sup>1</sup>, Rocha, M.P.<sup>2,\*</sup>, Pompolo, S.G.\* e Dergam, J.A.<sup>3</sup>

### RESUMO

As espécies do gênero *Melipona* são conhecidas como abelhas indígenas sem ferrão e têm grandes relevâncias econômica e ecológica na polinização e na produção de mel. Na citogenética, a utilização das endonucleases de restrição *in situ* (REs) tem se mostrado muito útil, por produzir informações sobre a constituição da cromatina. Os cromossomos metafásicos foram tratados com a combinação das REs *HaeIII* e *DraI*, com os fluorocromos QM e CMA<sub>3</sub>, obtendo, assim, quatro tratamentos para cada espécie. Os tratamentos com as REs parecem ter amplificado as marcações dos fluorocromos, provavelmente devido à descondensação do DNA, que aumentou a acessibilidade dos fluorocromos. O uso dos caracteres obtidos com a aplicação das REs produziu um cladograma informativo, sinalizando uma grande divergência entre as espécies *M. bicolor* e *M. subnitida*.

**Palavras-chave:** Citogenética, *Melipona*, enzimas de restrição, fluorocromos.

---

<sup>1</sup> Universidade Federal de Viçosa, Dep. de Biologia Geral.

<sup>2</sup> Universidade do Estado de Mato Grosso, Dep. de Ciências Biológicas.

<sup>3</sup> Universidade Federal de Viçosa, Dep. de Biologia Animal.

\* Correspondência – Universidade Federal de Viçosa, Dep. de Biologia Geral, Laboratório 319I, Viçosa, Minas Gerais. 36570-000. E-mail: <spompolo@ufv.br>.

## INTRODUÇÃO

A subtribo Meliponina compreende todas as espécies popularmente conhecidas como abelhas indígenas sem ferrão (SILVEIRA et al., 2002). Essas espécies apresentam distribuição neotropical e grande importância econômica e ecológica como produtoras de mel e polinizadoras (MICHENER, 2000).

Do ponto de vista citogenético, o táxon dessa subtribo com o maior número de espécies estudadas é o gênero *Melipona*. Esses estudos abrangem desde características básicas, como o número e a morfologia cromossômicos, até dados de citogenética molecular, como a localização da região organizadora de nucléolo e a distinção de diferentes tipos de heterocromatina (ROCHA, 2002; ROCHA e POMPOLO, 1998; ROCHA et al., 2002, 2003).

Um importante passo para a compreensão da organização desse gênero foi a divisão funcional proposta por Rocha e Pompolo (1998), baseada na quantidade e localização da heterocromatina, em espécies do grupo I (que apresentam baixo conteúdo de heterocromatina) e espécies do grupo II (que apresentam alto conteúdo de heterocromatina). Em estudos complementares foi proposto que o estado de caráter alto conteúdo de heterocromatina seria derivado em relação ao baixo conteúdo (ROCHA et al., 2002), o que veio a nortear as relações filogenéticas entre as espécies dos grupos de alto e baixo conteúdos de heterocromatina.

Estudos citogenéticos objetivando apurar as relações de afinidade entre as espécies do grupo I foram realizados por Fernandes et al. (2002). Para isso,

foi proposta uma metodologia baseada na utilização de Enzimas de Restrição *in situ* (RE), com subsequente coloração com Giemsa. Comparou-se o padrão de digestão de quatro espécies do gênero *Melipona* do grupo I (*M. bicolor*, *M. quadrifasciata*, *M. subnitida* e *M. mandacaia*). Os resultados indicaram uma divisão baseada na similaridade entre os cariótipos do grupo I em dois subgrupos. Em um grupo estariam presentes *M. bicolor* e *M. quadrifasciata*, enquanto no outro, *M. subnitida* e *M. mandacaia*.

As espécies do grupo I agrupadas em cada grupo apresentaram padrões semelhantes de distribuição geográfica. *M. bicolor* foi encontrada no Nordeste e no Sul, *M. quadrifasciata* na Bahia, Paraíba, Pernambuco, Goiás, Mato Grosso, Sudeste e Sul (menos no Paraná), já *M. subnitida* o foi no Maranhão, Ceará, Paraíba e Rio Grande do Norte (SILVEIRA et al., 2002) e *M. mandacaia*, em toda a Região Nordeste (ROCHA et al., 2003). Dessa forma, encontraram-se *M. bicolor* e *M. quadrifasciata* compartilhando boa parte de suas amplas distribuições, enquanto *M. subnitida* e *M. mandacaia*, apesar de também serem simpátricas, apresentaram uma distribuição mais restrita, principalmente *M. subnitida*.

Neste trabalho, os caracteres (presença ou ausência de bandas) relatados por Fernandes et al. (2002) foram reavaliados utilizando o programa PAUP<sup>®</sup>, e foi proposta uma metodologia que combina a técnica de RE *in situ* com a utilização de fluorocromos, com o intuito de produzir novos caracteres. Os resultados poderão ser úteis no fornecimento de novas informações a respeito da composição e organização da cromatina das três espécies do gênero *Melipona*, além de permitirem maior entendimento dos mecanismos de atuação das enzimas de restrição.

## MATERIAL E MÉTODOS

As colônias de *M. quadrifasciata*, *M. bicolor* e *M. subnitida* foram provenientes de Caeté, MG, Cunha, MG, e Santana do Seridó, RN, respectivamente. Analisaram-se cinco indivíduos por espécie e, em média, 10 metáfases por lâmina.

### - Obtenção dos cromossomos metafásicos

Para obtenção dos cromossomos mitóticos metafásicos foram utilizados os gânglios cerebrais de larvas, segundo a metodologia proposta por Imai et al. (1988) e detalhada nos parágrafos subseqüentes.

- Com o auxílio de um estereomicroscópio, o gânglio cerebral da larva foi extraído e colocado em solução hipotônica de colchicina (colchicina a 0,005% em solução de citrato de sódio 1%) por 30 minutos em média, em temperatura ambiente.
- Após esse período, o gânglio cerebral foi transferido para uma lâmina histológica e fixado com algumas gotas do fixador 1 (20% de etanol:20% de ácido acético:60% de água destilada).
- Novamente com o auxílio de um estereomicroscópio, pingaram-se duas gotas do fixador 1 sobre o material, sendo este dissociado com a ajuda de dois estiletes.



- Em seguida, pingaram-se duas gotas do fixador 2 (50% de etanol e 50% de ácido acético) sobre o material, e com papel-filtro removeu-se o fixador 1. O mesmo procedimento foi feito com o fixador 3 (100% de ácido acético).

Após esses procedimentos, as lâminas foram deixadas à temperatura ambiente por um dia, estando prontas para proceder aos tratamentos posteriores.

#### **- Tratamento com as enzimas de restrição**

Após a fixação dos cromossomos, estes foram tratados com as RE *HaeIII* (GG↓CC) *DraI* (AAA↓TTT), das marcas GIBCO® e SIGMA®, respectivamente. As quantidades de 1 µl da RE e 9 µl do tampão foram diluídos em 80 µl de água Milli-Q. Trinta microlitros desta solução foram colocados sobre cada lâmina, que foi coberta com lamínula e incubada durante 12 horas em câmara úmida a 37 °C. Após esse período, a lâmina foi lavada em água corrente em abundância. Para efeito de controle, foram realizados tratamentos apenas com o tampão diluído em água Milli-Q.

#### **- Coloração com fluorocromos**

Após o tratamento com as REs, os cromossomos foram tratados com Cromomicina A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>) ou com Quinacrina Mostarda (QM), ambas da marca SIGMA®. As metodologias estão descritas a seguir:

1) Distamicina/Cromomicina A<sub>3</sub> (DA/CMA<sub>3</sub>), segundo Schweizer (1980).

- Sobre uma lâmina foram colocados cerca de 150 µl da solução de distamicina (0,3 mg/ml) e cobriu-se com uma lamínula por 15 minutos. Após esse período, a lamínula foi retirada em água corrente e a lâmina, mergulhada numa cubeta com tampão McIlvaine durante 15 minutos e, posteriormente, secada ao ar.

- Foram colocados 150 µl da solução de cromomicina A<sub>3</sub> (0,5mg/ml) sobre a lâmina, sendo esta coberta novamente com lamínula por 60 minutos, no escuro.

- A lamínula foi retirada, lavando-se a lâmina em água corrente. A lâmina foi secada ao ar e montada com lamínula em sacarose saturada.

- As lâminas foram guardadas em estufa a 37 °C, por sete dias, e analisadas em microscópio de epifluorescência.

2) Quinacrina Mostarda (QM), segundo Schmid (1988):

- As lâminas foram hidratadas em uma bateria de etanol 100%, 70% e 30% por 30 segundos em cada solução e colocadas em tampão McIlvaine (pH=7,0).

- Após esse primeiro passo, as lâminas foram mergulhadas em solução de quinacrina mostarda (5 mg/100 ml) durante 20 minutos, à temperatura ambiente, e depois lavadas em tampão McIlvaine, durante aproximadamente um minuto. Foram levemente secadas ao ar, montadas com lamínulas em solução de sacarose e, em seguida, analisadas em microscópio de epifluorescência.

#### **- Digitalização das imagens**

As imagens das metáfases foram capturadas por meio de uma câmera CCD (OPTRONICS, modelo DEI-470) conectada a um microscópio Olympus™ BX60, equipado com epifluorescência, utilizando-se o filtro de excitação WB ( $\lambda = 450-480$  nm), com objetiva de imersão com aumento de 100x e processadas em computador IBM com processador *Pentium*® 750 MHz. Os cariogramas foram montados com o auxílio do programa de análise de imagem: Image-Pro® Plus, versão 3.1 (MEDIA CYBERNETICS, 1998).

#### **- Obtenção e análise dos caracteres**

As matrizes binárias de dados foram montadas da seguinte maneira: cada marcação promovida pelas REs foi localizada e comparada com as marcações nos outros cromossomos considerados homeólogos (cromossomos homólogos de espécies diferentes). Se presente, a banda foi representada pelo algarismo 1; se ausente, pelo algarismo 0. Foram montadas três matrizes binárias, sendo a primeira com os caracteres obtidos por Fernandes et al. (2002), na qual foram utilizadas as REs *HaeIII* e *DraI* seguidas da coloração com Giemsa. A segunda foi construída utilizando-se os caracteres obtidos no presente trabalho. A terceira matriz reuniu os dados das duas matrizes anteriores, que foram analisadas pelo sistema de agrupamento de Neighbor-Joining, com o auxílio do programa PAUP® (versão 4.0) (SWOFFORD, 2003).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Tratamento enzimático e o padrão de fluorescência

O tratamento-controle das metáfases apenas com o tampão não produziu marcações ao longo dos cromossomos. Já o tratamento utilizando as REs promoveu digestões ao longo dos cromossomos (Figuras 1 e 2). Com base nas marcações apresentadas nos cromossomos, foi possível produzir dois ideogramas que relacionam as marcações promovidas pelas REs com cada fluorocromo (Figuras 3 e 4).

Foram identificados pelo menos três tipos de cromatina: rica em bases AT ( $AT^+$ ), rica em base GC ( $GC^+$ ) e rica tanto em bases AT quanto em bases GC ( $AT^+GC^+$ ) (Figuras 3 e 4). Esta última banda foi encontrada apenas em *M. subnitida* e somente pela combinação dos fluorocromos (QM e  $CMA_3$ ) com a RE *HaeIII* (Figuras 1e, 3c, 4c).

Esses três tipos de bandas mostraram-se semelhantes aos obtidos por Rocha et al. (2002), utilizando os mesmos fluorocromos ( $CMA_3$  e QM), porém sem o pré-tratamento com as REs. Esses autores também verificaram que a maioria das marcações foi  $AT^+$ . A espécie que apresentou maior nível de correspondência entre as marcações proporcionadas pela utilização do fluorocromo QM, isolado ou em conjunto com as REs, foi *M. subnitida* (58%), seguida pela *M. quadrifasciata* (57%). Em *M. bicolor*, houve a menor das correspondências (28%).

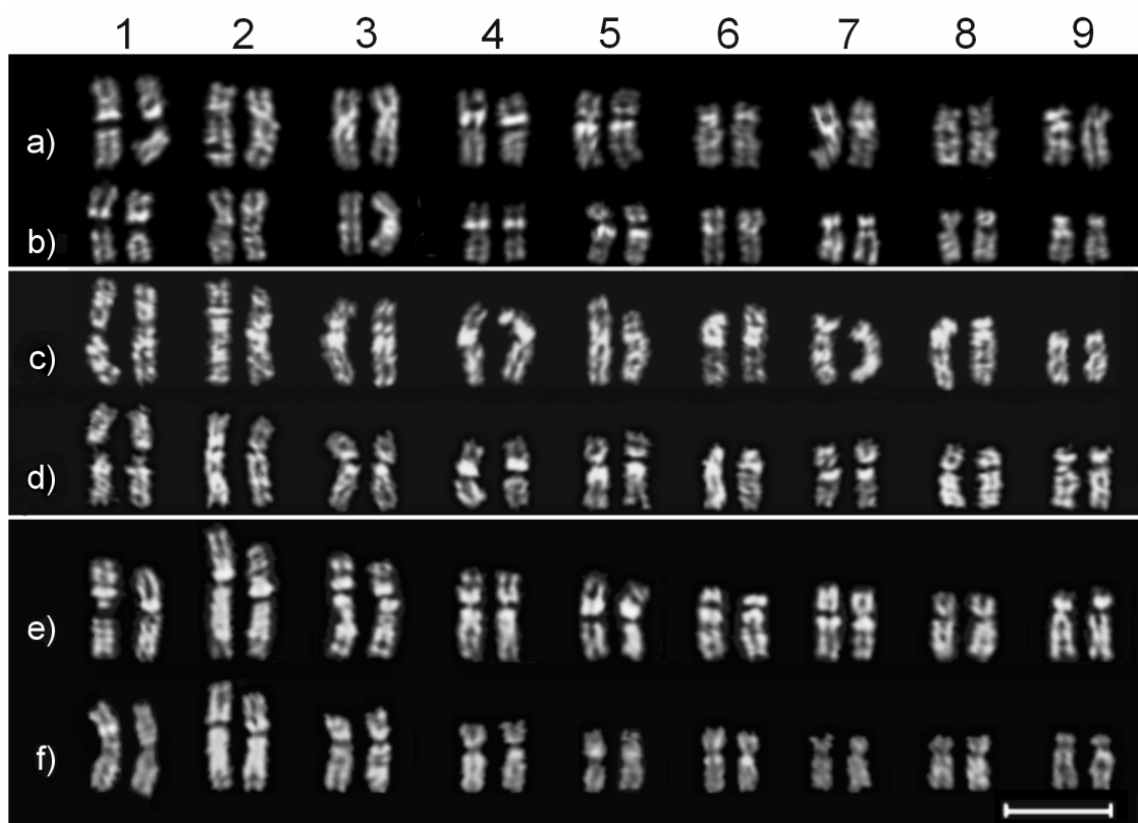


Figura 1 – Cariogramas de três espécies de meliponas submetidas à digestão com REs seguida de coloração com fluorocromo. a) *Haelll/QM*, b) *Dral/QM* em *M. bicolor*; c) *Haelll/QM*, d) *Dral/QM* em *M. quadrifasciata*, e) *Haelll/QM* e f) *Dral/QM* em *M. subnitida*. Barra = 5  $\mu$ m.

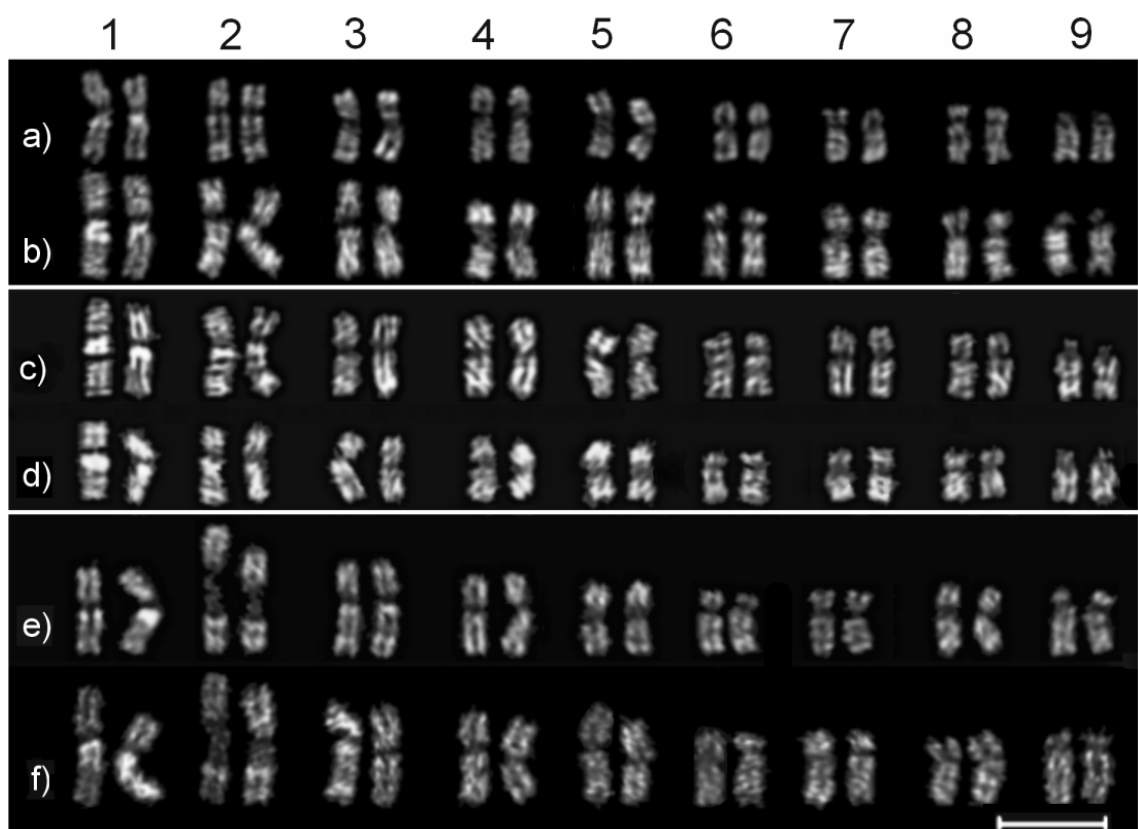


Figura 2 – Cariogramas de três espécies de meliponas submetidas à digestão com REs seguida de coloração com fluorocromo. a) *HaellI/CMA<sub>3</sub>*, b) *Dral/CMA<sub>3</sub>* em *M. bicolor*, c) *HaellI/CMA<sub>3</sub>*, d) *Dral/CMA<sub>3</sub>* em *M. quadrifasciata*, e) *HaellI/CMA<sub>3</sub>* e f) *Dral/CMA<sub>3</sub>* em *M. subnitida*. Barra = 5  $\mu$ m.

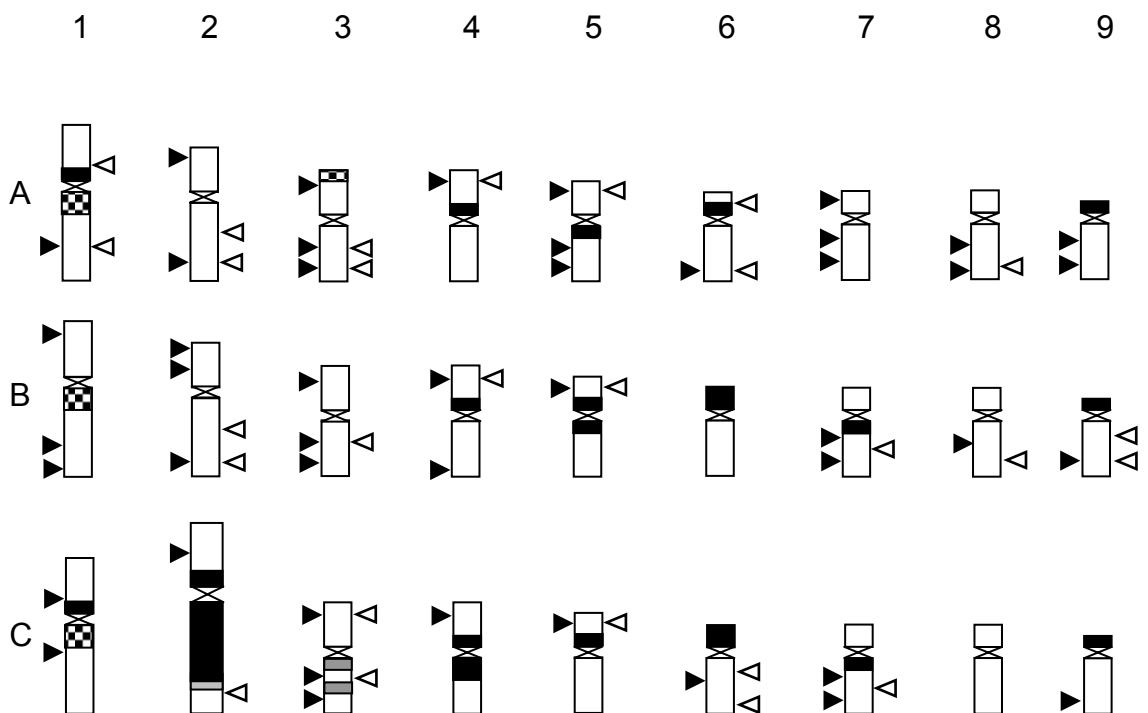


Figura 3 – Ideograma dos cromossomos de (A) *M. bicolor*, (B) *M. quadrifasciata* e (C) *M. subnitida*. Blocos negros = região AT<sup>+</sup>, blocos quadriculados = região CG<sup>+</sup>, blocos cinzas = região AT<sup>+</sup>GC<sup>+</sup>, seta com preenchimento = digestão da ER *HaellI* e seta sem preenchimento = digestão da ER *DraI*.

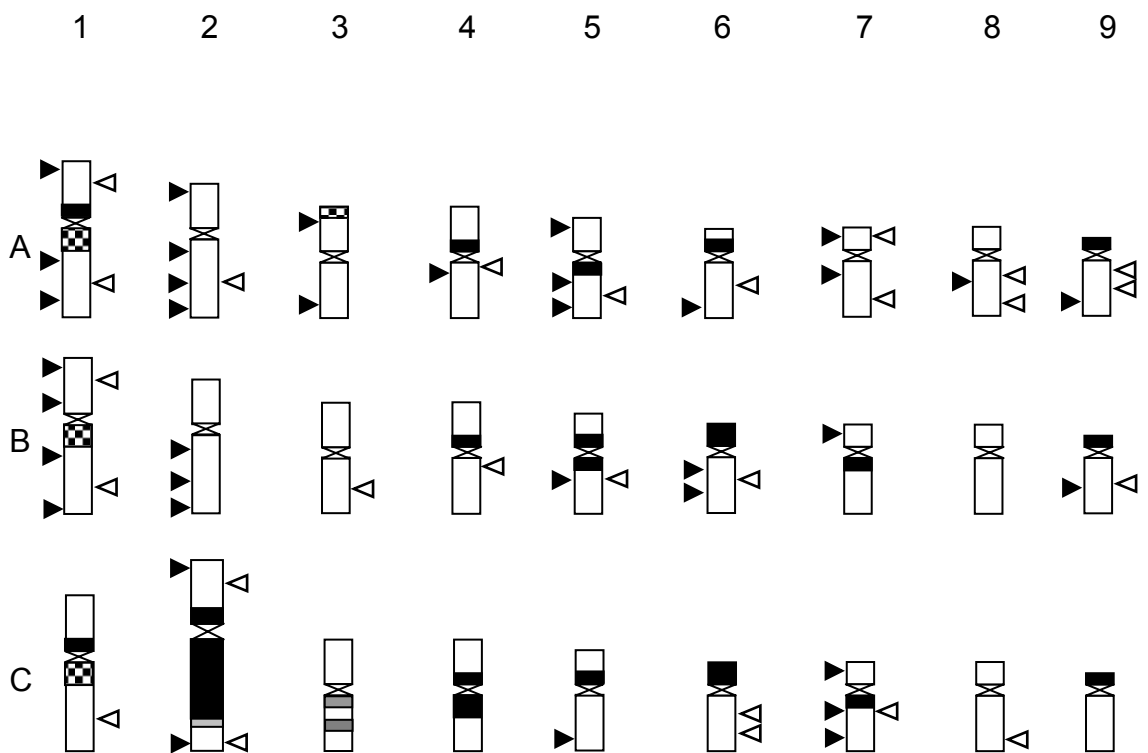


Figura 4 – Ideograma dos cromossomos de (A) *M. bicolor*, (B) *M. quadrifasciata* e (C) *M. subnitida*. Blocos negros = região AT<sup>+</sup>, blocos quadriculados = região CG<sup>+</sup>, blocos cinzas = região AT<sup>+</sup>GC<sup>+</sup>, seta com preenchimento = digestão da ER *HaellI* e seta sem preenchimento = digestão da ER *DraI*.

Já nas bandas GC<sup>+</sup> foi verificada apenas uma banda correspondente, entre os dados do presente trabalho e os apresentados por Rocha et al. (2002), localizada na região pericentromérica do par 1 das três espécies (Figuras 3 e 4). Essa região é particularmente conservada nessas espécies, posto que foi caracterizada como banda NOR positiva nas espécies *M. marginata* e *M. asilvae* (MAFFEI et al., 2001; ROCHA et al., 2002) e FISH positiva na sonda de rDNA em *M. quadrifasciata* e *M. quinquefasciata* (ROCHA, 2002).

O padrão de digestão das REs associadas aos fluorocromos caracterizou-se por promover o aparecimento de várias falhas na fluorescência ao longo de quase todos os cromossomos e por amplificar a fluorescência de algumas regiões, que não se apresentaram como tal quando tratadas apenas com os fluorocromos mostrados por Rocha et al. (2002). Esse resultado parece ser contraditório, uma vez que os fluorocromos se ligam ao DNA e as enzimas atuam, a princípio, justamente retirando o DNA. Todavia, é válido ressaltar outro mecanismo de atuação das REs, que seria o de provocar mudanças na estrutura da cromatina, isto é, a descondensação da cromatina (MEZZANOTE e FERRUCCI, 1984; MILLER et al., 1984).

Essa descondensação poderia disponibilizar um maior número de sítios de ligação do fluorocromo com o DNA. Verma e Babu (1995) ressaltaram alguns aspectos a respeito dos mecanismos de atuação dos fluorocromos, dentre os quais fizeram questão de destacar a importância de proteínas cromossomais e o estado de condensação da cromatina, aspectos que remetem à acessibilidade do fluorocromo ao DNA. Logo, o aumento da fluorescência observado em algumas regiões pode estar relacionado com modificações na estrutura da cromatina provocadas pela atuação das REs, o que poderia vir a aumentar a acessibilidade dos fluorocromos ao DNA.

O tratamento dos cromossomos metafásicos com REs, seguido pela coloração com fluorocromos, não demonstrou a mesma riqueza de tipos de cromatina quando comparado com a coloração com os fluorocromos isoladamente, apresentada por Rocha et al. (2002), mas proporcionou o surgimento de novas bandas, permitindo uma análise mais acurada da constituição de pares de bases da cromatina dessas espécies de abelhas.

A comparação entre as técnicas de bandeamento por Res quando coradas com fluorocromos apresentados no presente trabalho ou com Giemsa



mostrados por Fernandes et al. (2002) revelou os seguintes resultados: numa primeira análise, a posterior coloração com Giemsa produziu um número total de 89 bandas (Tabela 1), enquanto os tratamentos com posterior coloração com fluorocromos produziram um número menor de bandas (73 bandas com QM e 62 bandas com CMA<sub>3</sub>). É interessante ressaltar que em *M. bicolor* e *M. quadrifasciata* o número de bandas entre os diferentes tratamentos não pareceu variar muito, enquanto em *M. subnitida* essa diferença foi muito acentuada. No tratamento com REs seguido com coloração com Giemsa, foram encontradas 48 marcações, enquanto na posterior coloração com QM foram encontrados 19 e em CMA<sub>3</sub>, apenas 13. Resultados semelhantes já haviam sido verificados por Rocha et al. (2003). Aparentemente, a coloração com fluorocromos pode ter mascarado algumas bandas produzidas pelas REs.

Tabela 1 – Quantificação do número de bandas obtidas em cada tratamento para cada espécie. <sup>1</sup>informações retiradas de Fernandes et al. (2002). Abreviações: *M. quadri* = *M. quadrifasciata* e *M. sub* = *M. subnitida*

ESPÉCIES	NÚMERO DE BANDAS POR TRATAMENTO						TOTAL
	<sup>1</sup> HaeIII/ cc	<sup>1</sup> DraI/ cc	HaeIII/ QM	DraI/M Q	HaeIII/ CMA <sub>3</sub>	DraI/ CMA <sub>3</sub>	
<i>M. bicolor</i>	12	9	18	11	18	12	87
<i>M. quadri</i>	10	10	18	9	12	7	75
<i>M. sub</i>	24	24	12	7	6	7	95

O resultado observado no cromossomo 2 de *M. subnitida* merece destaque, uma vez que apresenta um grande bloco de heterocromatina pericentromérica, que é predominantemente AT<sup>+</sup> (DAPI e QM positivos) (ROCHA et al., 2002). Fernandes et al. (2002) inferiram que essa região era protegida por proteínas, posto que a RE *DraI* (seqüência-alvo de reconhecimento AAA↓TTT) não a atacou. Esse mesmo resultado foi verificado no presente trabalho (Figura 1f), porém uma banda *DraI*<sup>+</sup> foi mostrado na extremidade dessa região. Por motivos de resolução, não é possível dizer se a

banda está na região de eucromatina ou de heterocromatina. Mesmo assim, esse resultado abre margem para outras questões que remetem aos mecanismos de atuação das REs. Pela constituição de pares de bases desse bloco, apresentada pelos fluorocromos QM e DAPI, é pouco provável que um bloco de heterocromatina com tal tamanho não apresente sítios com a seqüência-alvo da enzima. Assim, assumindo que num grande bloco de heterocromatina rico em AT existem sítios para a *Dral*, por que não há extração visível nessa região?

Algumas hipóteses podem ser levantadas para explicar tal resultado. Lorite et al. (1999) afirmaram que a quantidade de sítios-alvo influencia a atuação da RE, uma vez que terá reflexo direto no tamanho dos fragmentos de DNA (quanto maior a freqüência, menor o tamanho dos fragmentos) e fragmentos muito grandes não são prontamente removidos (PONS et al., 1993), em razão, provavelmente, das interações moleculares entre o DNA e outros componentes do cromossomo, normalmente as proteínas, que impediriam a retirada do DNA fragmentado de dentro da estrutura do cromossomo (PIECZARKA e MATTEVI, 1998; KESSLER, 1987). Desse modo, o número de pares de bases reconhecidos pela RE *Dral* tem que ser levado em consideração. Ela reconhece uma seqüência de seis pares de bases (AAA↓TTT), o que pode ser crucial para impedir que os fragmentos sejam retirados do cromossomo por serem muito grandes (baixa freqüência de sítios de reconhecimento). Se o tamanho dos fragmentos é realmente o fator que influencia sua extração, a utilização de REs que reconheçam um número menor de pares de bases ou sítios que estejam numa maior freqüência poderia ser empregada para resolver essa questão.

Outra possibilidade pode estar relacionada com o tamanho da molécula da RE. Pons et al. (1993) ressaltaram que a acessibilidade foi o principal fator que interferiu nos resultados obtidos por duas REs diferentes quando utilizadas em DNA total purificado (com um padrão muito similar de digestão) e quando usadas em cromossomos fixados (com um padrão muito diferente de digestão). Esse resultado indicou, provavelmente, que a presença de proteínas não-histônicas em interação com o DNA metafásico poderia ser um empecilho à ação de algumas REs.

Não foi possível concluir quais os fatores que estão atuando mais ativamente na extração diferencial da região heterocromática do cromossomo 2 de *M. subnitida*. As questões centrais são: a enzima está ou não clivando o DNA? Se está, por que ele não está sendo removido?

### **Análise dos caracteres**

Na tentativa de inferir a respeito das relações de parentesco entre as espécies aqui trabalhadas, foram coletados caracteres com base no padrão de digestão proporcionado pelas enzimas. A determinação da polaridade dos caracteres foi dificultada pela falta de um grupo externo adequado e pelo baixo número de espécies analisadas. A saída escolhida foi realizar uma análise fenética, a qual indicaria apenas quais espécies apresentariam maior (ou menor) semelhança média entre si. O resultado da análise fenética é a produção de classes descompromissadas com realidade temporal (AMORIM, 1997), ou seja, sem a inclusão de conceitos evolutivos.

A análise dos caracteres utilizados para obter os dendrogramas baseou-se no mesmo princípio das análises dos caracteres obtidos por RFLP, que também utiliza REs para digerir o DNA total. A digestão da molécula de DNA gera fragmentos, cujo tamanho pode ser analisado pela técnica de eletroforese, e, a partir da presença ou ausência das bandas, a matriz binária é montada (AMORIM, 1997). Do mesmo modo, em se tratando da utilização das REs *in situ*, a presença de bandas nos cromossomos homeólogos pode ser tomada como uma característica em comum (um caráter no mesmo estado).

O primeiro dendrograma (Figura 5a), gerado a partir dos caracteres obtidos do tratamento dos cromossomos com *DraI* e *HaeIII* seguidos da coloração com Giemsa (FERNANDES et al., 2002), indicou que *M. bicolor* apresenta maior semelhança média (cinco caracteres em comum) com *M. quadrifasciata*, enquanto esta última exibe o mesmo número de caracteres de *M. subnitida*. Aparentemente, *M. quadrifasciata* estaria igualmente relacionada com *M. bicolor* e com *M. subnitida*, porém o que chama atenção nesse dendrograma é a relativa divergência entre essas duas últimas espécies. Tal divergência é mais acentuada no segundo e terceiro dendrogramas gerados, respectivamente, pelos caracteres obtidos pela utilização das REs seguidas da

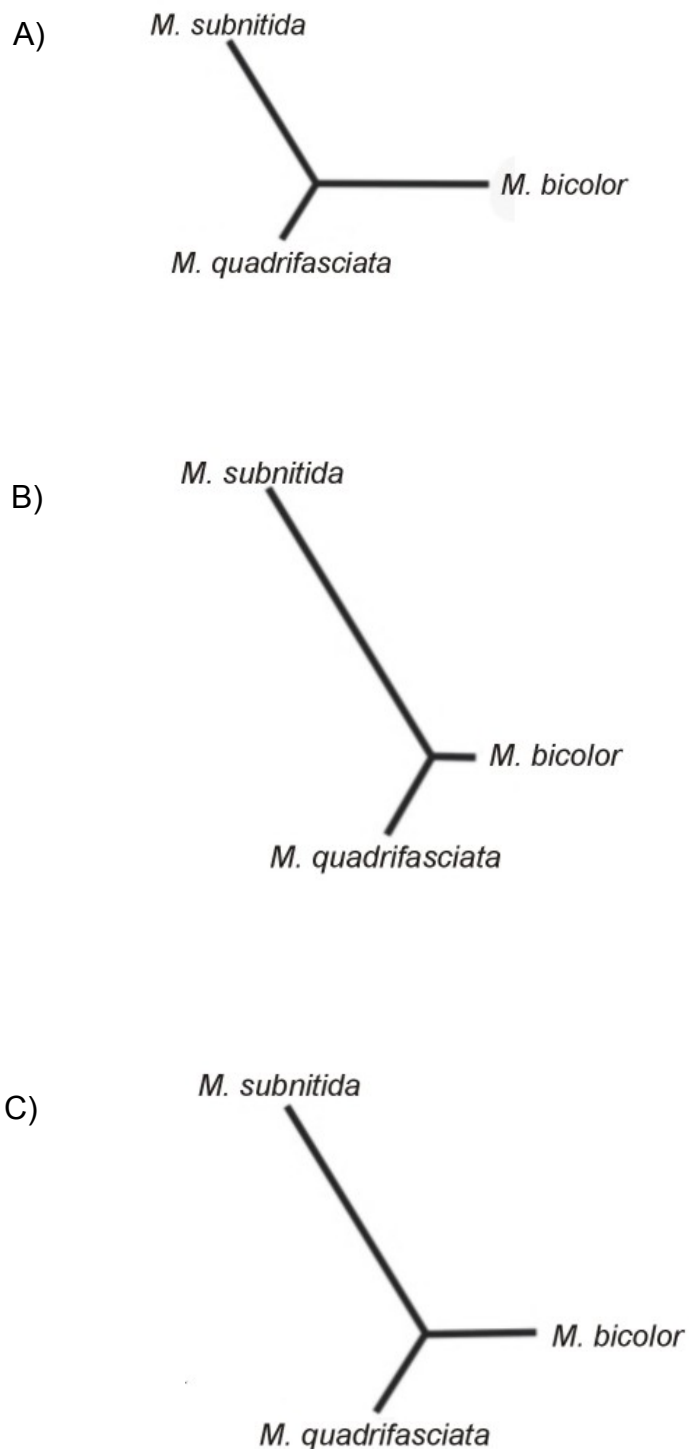


Figura 5 – Dendrograma envolvendo três espécies *M. bicolor*, *M. quadrifasciata* e *M. subnitida*. A) montado a partir dos caracteres obtidos pela digestão com as RE *HaeIII* e *DraI*, corados com Giemsa (FERNANDES et al., 2002); B) montado a partir dos caracteres obtidos pela digestão com as RE *HaeIII* e *DraI*, corados com os fluorocromos  $CMA_3$  e  $QM$ ; e C) montado com os caracteres em conjunto obtidos pela digestão com as RE *HaeIII* e *DraI*, corados com Giemsa (FERNANDES et al., 2002) ou com os fluorocromos  $CMA_3$  e  $QM$ .

coloração com os fluorocromos e pelos caracteres em conjunto (RE tanto seguida da coloração com Giemsa quanto da coloração com fluorocromos), ressaltando-se que no terceiro dendrograma *M. bicolor* e *M. quadrifasciata* apresentam 17 caracteres em comum. Fica claro que *M. subnitida* mostra grande divergência quando comparada com as duas outras espécies, que parecem estar mais relacionadas entre si.

Fernandes-Salomão et al. (2004) propuseram uma filogenia do gênero *Melipona* com base em dados moleculares nucleares (fragmentos de ITS-1). Nessa análise, as espécies *M. bicolor* e *M. quadrifasciata* se apresentaram como grupos-irmãos. Esse trabalho está em sintonia com o apresentado por Silveira et al. (2002), no qual foi proposta uma divisão do gênero em quatro subgêneros, em que *M. bicolor* se encontraria no subgênero *Eomelipona* e *M. quadrifasciata* e *M. subnitida*, no subgênero *Melipona*. Logo, os dados presentes nesse trabalho corroboram parcialmente os encontrados por Silveira et al. (2002), uma vez que indicam que *M. subnitida* compartilha poucas semelhanças com *M. bicolor*.

Segundo Swofford et al. (1996), o fortalecimento de uma hipótese baseada em análise dos caracteres pode se dar pelo incremento de novos caracteres ou pelo aumento do número de espécies estudadas. Um aumento no número de caracteres poderia ser possível utilizando novas enzimas de restrição. No que tange ao aumento das espécies estudadas, duas revelaram especial importância. Uma, a *M. mandacaia*, já apresenta algumas informações obtidas pela utilização de REs em conjunto com fluorocromos e mostra grandes semelhanças citogenéticas e morfológicas com *M. subnitida* (ROCHA et al., 2003; SILVEIRA et al., 2002). A outra seria *M. quinquefasciata*, que apresenta características citogenéticas (presença de cromossomos B com características muito semelhantes às do bloco de heterocromatina pericentromérico do cromossomo 2 de *M. subnitida*) muito especiais (ROCHA, 2002; ROCHA et al., 2002).

## CONCLUSÕES

Trabalhando com três espécies de abelhas do gênero *Melipona* (*M. bicolor*, *M. quadrifasciata* e *M. subnitida*) submetidas ao tratamento com as REs seguidas da coloração com fluorocromos, foi possível concluir que:

- O tratamento dos cromossomos com as REs *HaeIII* e *DraI* seguido da coloração com fluorocromos QM e CMA<sub>3</sub> revelou regiões AT<sup>+</sup>, CG<sup>+</sup> e AT<sup>+</sup>GC<sup>+</sup> semelhantes às apresentadas na literatura, principalmente as bandas AT<sup>+</sup>, que foram as mais encontradas.
- Uma nova modalidade de atuação das REs nos cromossomos das espécies estudadas foi verificada. Os tratamentos com as REs parecem ter amplificado as marcações dos fluorocromos, provavelmente devido à descondensação da cromatina, que aumentou a acessibilidade dos fluorocromos.
- A combinação entre REs/Fluorocromos produziu um menor número de marcações quando comparada com a combinação REs/Giemsa. Isso, provavelmente, foi devido ao mascaramento de algumas bandas pelo brilho dos fluorocromos.
- A utilização dos caracteres obtidos pela utilização das REs (REs/Giemsa e REs/fluorocromos) produziu um cladograma informativo, no qual se percebeu uma grande divergência entre as espécies *M. bicolor* e *M. subnitida*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMORIM, D.S. **Elementos básicos de sistemática filogenética**. Ribeirão Preto, SP: Ed. Holos & Sociedade Brasileira de Entomologia, 1997. 276 p.

FERNANDES, A.; ROCHA, M.P.; POMPOLO, S.G. Citogenética no gênero *Melipona* (Hymenoptera, Meliponini): 1-determinação do índice metafásico; 2-utilização de endonucleases de restrição. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 48., 2002, Ribeirão Preto, SP. **Anais...** Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética, 2002. 194 p.

FERNANDES-SALOMÃO, T.M.F.; ROCHA, R.B.; CAMPOS, L.A.O.; ARAÚJO, E.F. The first internal transcribed spacer (ITS-1) of *Melipona* species (Hymenoptera: Apidae, Meliponini): characterization and phylogenetic analysis. **Insectes Sociaux**, 2004. (no prelo).

IMAI, H.T.; TAYLOR, R.W.; CROSLAND, M.W.J.; CROZIER, R.H. Modes of spontaneous evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis. **Japanese Journal of Genetics**, v. 63, p. 159-185, 1988.

KESSLER, C. ClassII restriction endonucleases. In: OBE, G.; BASLER, A. (Eds.). **Cytogenetics: basic and Applied Aspects**. Germany: Springer-Verlag, 1987. p. 225-280.

LORITE, P.; GARCIA, M.F.; CARRILO, J.A.; PALOMEQUE, T. Restriction endonuclease chromosome banding in *Tapinoma nigerrimum* (Hymenoptera, Formicidae). **Hereditas**, v. 131, p. 197-201, 1999.

MAFFEI, E.M.D.; POMPOLO, S.G.; SILVA-JUNIOR, J.C.; CAIXEIRO, A.P.A.; ROCHA, M.P.; DERGAM, J.A. Silver staining of nucleolar organizer regions (NORs) in some species of Hymenoptera (bees and parasitic wasp) and Coleoptera (lady-beetle). **Cytobios**, v. 104, p. 119-125, 2001.

MEZZANOTE, R.; FERRUCCI, L. Alterations induced in mouse chromosomes by restriction endonucleases. **Genetica**, v. 64, p. 123-128, 1984.

MICHENER, C.D. **The bees of the world**. Baltimore and London: The Johns Hopkins University Press, 2000. 913 p.

MILLER, D.A.; GOSDEN, J.R.; HASTIE, N.D.; EVANS, H.J. Mechanism of Endonuclease of Chromosomes. **Experimental Cell Research**, v. 155, p. 294-298, 1984.

PIECZARKA, J.C.; MATTEVI, M. **Heterocromatina constitutiva**. Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética, 1998. p. 197-208. (Série monografias, 7).

PONS, J.; PETITPIERRE, E.; JUAN, C. Characterization of the heterochromatin of the darkling beetle *Misolampus goudoti*: cloning of two satellite DNA families and digestion of chromosomes with restriction enzymes. **Hereditas**, v. 119, p. 179-185, 1993.

ROCHA, M.P. **Análises citogenéticas em abelhas do gênero *Melipona* (Hymenoptera, Meliponinae)**. Campinas, SP: UNICAMP, 2002. 84 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural) – Universidade de Campinas, Campinas.

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

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

ROCHA, M.P.; POMPOLO, S.G.; DERGAM, J.A.; FERNANDES, A.; CAMPOS, L.A.O. DNA characterization and karyotypic evolution in bees genus *Melipona* (Hymenoptera, Meliponini). **Hereditas**, v. 136, p. 19-27, 2002.

SCHMID, M.; STEINLEIN, C.; FEICHTINGER, W.; ALMEIDA, C.G.; DUELLMAN, W.E. Chromosome banding in amphibia. XIII Sex chromosomes, heterochromatin and meiosis in marsupial frogs (Anura, Hylidae). **Chromosoma**, v. 97, p. 33-42, 1988.

SCHWEIZER, D. Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA-DAPI bands) in human chromosomes. **Cytogenetic and Cell Genetics**, v. 27, p. 190-193, 1980.

SILVEIRA, F.A.; MELO, G.A.R.; ALMEIDA, E.A.B. **Abelhas brasileiras: Sistemática e Identificação**. Belo Horizonte: Composição e Arte, 2002. 253 p.



SWOFFORD, D. L. PAUP\*. **Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods)**. Version 4. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 2003. (<http://paup.csit.fsu.edu>).

SWOFFORD, D.L.; OLSEN, G.J.; WADDELL, P.J.; HILLIS, D.M. *Phylogenetic Inference*, In: HILLIS, D.M.; MORITZ, C.; MABLE, B.K. (Eds.). **Molecular systematics**. [S. I.]: Sinauer Associates, USA, 1996. p. 407-514.

VERMA, R.S.; BABU, A. **Human chromosomes**. Principles and techniques. New York: Mc Graw Hill Inc. 1995. 419 p.

**ANEXOS**

## ANEXO 1

### MATRIZES DOS CARACTERES

Tabela 1 – Matriz binária montada com os caracteres obtidos pela digestão com as RE *HaeIII* e *DraI*, corados com Giemsa (FERNANDES et al., 2002). O algarismo zero indica ausência e o algarismo 1, presença

Caracteres	Espécies		
	<i>M. bicolor</i>	<i>M. quadrifasciata</i>	<i>M. subnitida</i>
1	1	0	1
2	1	1	0
3	1	1	0
4	1	1	0
5	0	1	1
6	1	1	0
7	1	1	0
8	1	0	1
9	0	1	1
10	0	1	1
11	0	1	1
12	0	1	1

Tabela 2 – Matriz binária montada com os caracteres obtidos pela digestão com as RE *HaeIII* e *DraI* corados com os fluorocromos CMA<sub>3</sub> e QM. O algarismo zero indica ausência e o algarismo 1, presença

Caracteres	Espécies		
	<i>M. bicolor</i>	<i>M. quadrifasciata</i>	<i>M. subnitida</i>
1	1	1	0
2	1	1	0
3	0	1	1
4	1	1	0
5	1	1	0
6	1	1	0
7	1	0	1
8	0	1	1
9	1	1	0
10	1	1	0
11	1	1	0
12	1	1	0
13	1	0	1
14	1	1	0
15	1	1	0
16	1	1	0
17	1	1	0
18	1	0	1
19	1	0	1
20	1	1	0

Tabela 3 – Matriz binária montada com os caracteres obtidos pela digestão com as RE *Haelll* e *Dral*, corados com Giemsa (FERNANDES et al., 2002) ou com os fluorocromos CMA<sub>3</sub> e QM. O algarismo zero indica ausência e o algarismo 1, presença

Caracteres	Espécies		
	<i>M. bicolor</i>	<i>M. quadrifasciata</i>	<i>M. subnitida</i>
1	1	0	1
2	1	1	0
3	1	1	0
4	1	1	0
5	0	1	1
6	1	1	0
7	1	0	1
8	0	1	1
9	0	1	1
10	0	1	1
11	0	1	1
12	1	1	0
13	1	1	0
14	0	1	1
15	1	1	0
16	1	1	0
17	1	1	0
18	1	0	1
19	1	1	1
20	0	1	0
21	1	1	0
22	1	1	0
23	1	1	0
24	1	0	1
25	1	1	0
26	1	1	0
27	1	1	0
28	1	0	1
29	1	0	1
30	1	1	0