

MARTINHA MAPINGALA CAPOCO

**Mapeamento de DNA repetitivo na abelha sem ferrão *Tetragonisca fiebrigi*
(Schwarz, 1938) com ênfase nos cromossomos Bs.**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2016

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

T

C245m
2016
Capoco, Martinha Mappingala, 1976-
Mapeamento de DNA repetitivo na abelha sem ferrão
Tetragonisca fiebrigi (Schwarz,1938) com ênfase nos
cromossomos Bs / Martinha Mappingala Capoco. - Viçosa,
MG, 2016.
ix, 34f. : il. ; 29 cm.

Orientador : Tânia Maria Fernandes Salomão.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Abelhas sem ferrão. 2. *Tetragonisca fiebrigi*.
3. Citogenética. 4. Mapeamento cromossômico. 5. Sondas
DNA. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Biologia Geral. Programa de Pós-graduação em Biologia
Celular e Estrutural. II. Título.

CDD 22. ed. 595.799

MARTINHA MAPINGALA CAPOCO

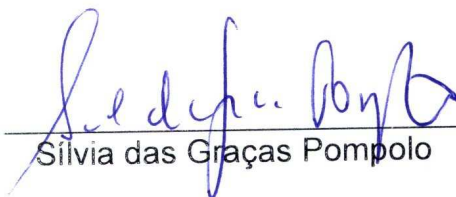
**Mapeamento de DNA repetitivo na abelha sem ferrão *Tetragonisca fiebrigi*
(Schwarz, 1938) com ênfase nos cromossomos Bs.**

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

APROVADA: 25 de janeiro de 2016.



Denilce Meneses Lopes



Sílvia das Graças Pompolo



Tânia Maria Fernandes Salomão
(Orientadora)

”As ideias das pessoas são pedaços da sua felicidade”

William Skakespeare

“A ação nem sempre traz felicidade, mas não há felicidade sem ação”

Benjamim Disraeli

Dedico este trabalho a minha filha, Josefa Loisa Capoco Alface Gabriel ao meu esposo, família e amigos que comigo trilharam essa nova etapa de minha vida

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a DEUS pelo dom da vida e o amor Dele por mim, que me sustenta e me dá forças para recomeçar a cada dia.

Ao meu querido pai, Simão Capoco, (em memória), por me educar, e mostrar a importância de se ter uma formação profissional.

À UFV junto aos órgãos financeiros (Capes, CNPq, Fapemig) pelos recursos financeiros.

Ao programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural pela oportunidade de realizar esse sonho.

Ao meu querido esposo, Pablo Neruda Alface Gabriel por participar em tempo integral da minha vida sem medir esforços.

À família Demba na pessoa do Walter da Glória Pimenta Demba e da sua esposa Azinaide Preciosa Demba, por me mostrarem o caminho de Viçosa.

À professora Denilce Meneses Lopes pela orientação, ensinamentos, incentivo e apoio incondicional em todos os momentos na realização desse trabalho além de paciência e atenção em todos os momentos, sinceramente palavras me faltam...

Aos meus irmãos que mesmo distantes me deram todo apoio e incentivo, Júlio Capoco, Júnior Capoco, Alexandra Capoco, Almeida Capoco, Lucas Capoco, Marcelina Capoco, e meu sobrinho Tarciano Capoco.

À professora Tânia Maria Fernandes Salomão pelos ensinamentos.

Ao professor João Marcos de Araújo.

Ao professor Sergio da Matta.

À professora Silvia das Graças Pompolo.

Ao professor Clovis Andrade.

Ao professor José Eduardo Serrão.

À professora Anésia.

Ao professor Lino.

Ao professor Jorge Dergan, por me receber em seu laboratório com muito carinho.

À secretária Beth pela disponibilidade em tudo que lhe era solicitado.

Enfim, com todos eles pude aprender e acima de tudo agradeço a paciência e o carinho com que sempre me trataram durante esses anos.

Aos meus colegas das diversas disciplinas das quais fui matriculada, Daniel, Filipe, Wendel, Micaela, Luís André, Sabrina, Neila, André o Eduardo Tales e tantos outros agradeço pela amizade e o companheirismo durante toda a caminhada para a realização desse trabalho.

À Jamile por todos os ensinamentos, aos amigos Leonardo, Marilsa e Priscila por todo amor e carinho.

Aos colegas do laboratório Bárbara, Samira, Henrique, Artur, em especial a Renata que iluminava os meus olhos no laboratório sempre disponível e de forma amigável para ajudar.

As meninas do laboratório do professor Jorge Dergan pelo acompanhamento durante o tempo do uso do fotomicroscópio, sempre alegres e disponíveis para ajudar.

Ao Ríudo Paiva, Wagner Sampaio e Natália Travenzoli pelo acompanhamento e ensinamentos na elaboração do meu trabalho sempre presentes e disponíveis.

À amiga Ademária, que esteve sempre prontamente a ajudar em todos os momentos que precisei.

À amiga e anjo da guarda que o Senhor me enviou Camila Novaes que não se cansou em nenhum momento em ajudar e mostrar como eu deveria fazer o trabalho.

Meu profundo agradecimento à todos aqueles que direta ou indiretamente fizeram com que esse dia chegasse, a eles vai a minha gratidão do fundo do meu coração.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1.INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1. Tribo Meliponini	1
1.2. Citogenética em Meliponini	1
1.3. O gênero <i>Tetragonisca</i>	3
1.4. Cromossomos Bs	4
1.5. Citogenética molecular	5
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	7
3. OBJETIVO GERAL	14
3.1. Objetivos específicos	14
4. CAPÍTULO I – Mapeamento de DNA repetitivo na abelha sem ferrão <i>Tetragonisca fiebrigi</i> com ênfase nos cromossomos Bs.....	15
Resumo	15
4.1. Introdução	16
4.2. Material e métodos	17
4.3. Resultados	18
4.4. Discussão.	22
4.5. Conclusões	26
4.6. Referências bibliográficas	27

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Mapeamento de DNA repetitivo (CAA)₁₀ (GA)₁₅ e rDNA 18S de três populações de *Tetragonisca fiebrigi*, à esquerda populações de Tangará da Serra-MT e a direita populações de Palotina- PR, a seta indica a presença do cromossomo B, Barra =5µm) **20**
- Figura 2.** Mapeamento de DNA repetitivo (GA)₁₅ e rDNA18S *T. fiebrigi*, Ribeirão Preto- SP sem o cromossomo B. Barra=5µm..... **21**
- Figura 3.** Mapeamento do DNA ribossomal 18S *T. fiebrigi*, Palotina- PR com 5 cromossomos marcados. A seta indica marcação no cromossomo B. Barra= 5µm..... **21**

RESUMO

CAPOCO, Martinha Mapingala, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Janeiro de 2016. **Mapeamento de DNA repetitivo na abelha sem ferrão *Tetragonisca fiebrigi* (Schwarz, 1938) com ênfase nos cromossomos Bs.** Orientadora: Tânia Maria Fernandes Salomão.

Tetragonisca fiebrigi pertence à tribo Meliponini do qual fazem parte as abelhas sem ferrão. Essa espécie apresenta o cariótipo diploide de $2n=34$ em fêmeas e o número haploide de $n=17$ para machos. Esta espécie possui variações numéricas no seu cariótipo em razão da presença de 1 a 4 cromossomos Bs. O presente estudo buscou mapear o cariótipo de populações de *T. fiebrigi* coletadas em Palotina (PR), Tangará da Serra (MT) e Ribeirão Preto (SP), nas quais foram observados cromossomos Bs. Sondas de DNA repetitivo $(CAA)_{10}$, $(GA)_{15}$ e o rDNA 18S e hibridização *in situ* fluorescente (FISH), foram utilizadas com o intuito de ampliar as informações sobre o cariótipo de *T. fiebrigi* que poderão ser úteis para melhor compreensão dos cromossomos Bs. Nas três populações a sonda $(GA)_{15}$ mostrou sinais positivos nos cromossomos autossômicos, com marcações bem evidentes em todas as regiões dos braços curtos da eucromatina, o cromossomo B, que é heterocromático não apresentou nenhum sinal de hibridização. O mesmo padrão foi observado para a sonda $(CAA)_{10}$. No entanto para essa sonda as marcações foram espalhadas em forma de blocos ao longo de todo o braço eucromático e não sendo identificado nenhum sinal de marcação no cromossomo B. A utilização da sonda de rDNA 18S, resultou em marcações nas regiões terminais da heterocromatina de 5 cromossomos autossômicos, nas metáfases de todas as populações. Na colônia de Palotina (PR) a sonda 18S marcou de forma fraca em um cromossomo B o que indica presença deste gene nesse cromossomo. A composição da cromatina nessa espécie parece ser muito similar, incluindo os cromossomos B. Apesar de possuir uma grande quantidade de heterocromatina na qual é comum a presença de DNA repetitivo, esse padrão tem sido observado em outras espécies de Meliponini em que se observa um acúmulo de microssatélites em regiões de eucromatina.

ABSTRACT

CAPOCO, Martinha Mapingala, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, January 2016. **Repetitive DNA mapping for stingless bee *Tetragonisca fiebrigi* (Schwarz, 1938) with emphasis on the B chromosomes.** Adviser: Tânia Maria Fernandes Salomão.

The *Tetragonisca fiebrigi* specie belongs to Meliponini tribe, which comprises the stingless bees. This specie has the diploid karyotype $2n = 34$ in females and the haploid number of $n = 17$ for males. This species has numerical variations in their karyotype due to the presence 1-4 B chromosomes. This study sought to map the karyotype of populations *T. fiebrigi* collected in Palotina (PR), Tangará da Serra (MT) and Ribeirão Preto (SP), in which it was observed B chromosomes. Repetitive DNA Probes (CAA)₁₀, (GA)₁₅ and the 18S rDNA and fluorescence in situ hybridization (FISH) were used in order to extend the information on the karyotype *T.fiebrigi* that may be useful for better understanding of B chromosomes. In the three populations probe (GA) 15 showed positive signs in autosomal chromosomes with markings clearly evident in all regions of the short arms of euchromatin, the B chromosome, which is heterochromatic not show any hybridization signal. The same pattern was observed for the probe (CAA)₁₀. However, for this probe markings were scattered in the form of blocks throughout the eucromatico arm and a dial tone not being identified on chromosome B. The use of the 18S rDNA probe resulted in markings heterochromatin regions terminals 5 autosomal chromosomes in metaphase of all populations. In Palotina (PR) colony the probe, 18S marked weakly on a B chromosome, which indicates the presence of this gene on that chromosome. The composition of the chromatin in this species appears to be very similar, including the B chromosomes. Despite having a large amount of heterochromatin in which it is common the presence of repetitive DNA, this pattern has been observed in other species of Meliponini where there is an microsatellite accumulation in euchromatin regions.

1.INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Tribo Meliponini

As abelhas são consideradas importantes polinizadoras de angiospermas e contribuem com a manutenção da diversidade dos diferentes ecossistemas (Imperatriz-Fonseca *et al.*, 2006). Sua importância é também valiosa na economia agrícola, pois uma diminuição da polinização poderá levar a grandes perdas na produção agrícola e na qualidade nutricional da alimentação mundial. Além disso, também se destaca a importância das abelhas na produção de mel, própolis, cera e outros (Michener, 2000).

Existem cerca de 20.000 espécies de abelhas que habitam os diferentes ecossistemas. O Brasil apresenta grande diversidade de abelhas, com um número estimado de 3.000 espécies (Pedro e Camargo, 1999). Dentre essas encontram-se as abelhas sem ferrão com mais de 400 espécies descritas.

As abelhas sem ferrão pertencem à tribo Meliponini, conhecidas popularmente como abelhas indígenas, apresentam um ferrão atrofiado e não podem usá-lo para ferocar, são caracterizadas por apresentarem um comportamento eusocial (Michener, 2000) e estão distribuídas nas regiões tropicais do mundo, bem como em muitas regiões subtropicais do hemisfério sul, como América Central e do Sul, África, Índia, Malásia e Austrália (Moure *et al.*, 2007).

As abelhas, mantêm uma relação de simbiose com as plantas pois que elas são diretamente dependentes das flores para obtenção de alimento e outros recursos a fins, enquanto isso as várias plantas dependem exclusivamente da polinização das abelhas para sua reprodução (Michener, 2007).

1.2 Citogenética em Meliponini

A Citogenética é uma ciência que surgiu no início do século XX pela união da Genética e da Citologia e estuda a estrutura cromossômica relacionada com a sua morfologia, organização, função, replicação, evolução e variação (Guerra, 1988). É utilizada em estudos evolutivos e de variabilidade genética (Sumner, 2003) além de auxiliar em estudos de espécies.

Para realizar estudos à nível citogenéticos, é importante o uso de técnicas que assegurem boa caracterização dos cariótipos como as técnicas de coloração e bandeamentos, as quais, não só possibilitam a obtenção do número cromossômico e a detecção de pequenas variações estruturais (Sumner, 2003). Em estudos evolutivos, essas técnicas auxiliam no detalhamento das transformações que ocorreram em grupos de espécies próximas, com cariótipos muito semelhantes (Guerra, 1988). Deste modo a citogenética torna-se uma ferramenta poderosa para análise da variabilidade genética nos himenópteros bem como em outros organismos de maneira geral (Duarte *et al.*, 2009).

Estudos citogenéticos em Hymenoptera vem ocupando destaque, em virtude do aumento de número de espécies analisadas cariotipicamente e da utilização de novas técnicas que evidenciam estruturas importantes para o reconhecimento de homologias cromossômicas, dos mecanismos envolvidos nos rearranjos e nas variações à nível inter e intraespecífico, além das variações interpopulacionais (Rocha *et al.*, 2003).

Em Meliponini os estudos citogenéticos começaram com Kerr (1948) determinando o número cromossômico de algumas espécies do gênero *Melipona*. Depois disso, a citogenética em Meliponini tem se concentrado principalmente na descrição de cariótipos (Pompolo e Campos, 1995), estudo de cromossomo B (Costa *et al.*, 1992, Barth *et al.*, 2011, Tosta *et al.*, 2004) abordagens populacionais e nos últimos anos o uso de técnicas de citogenética molecular (Martins *et al.*, 2009, Tosta *et al.*, 2004, Lopes *et al.*, 2014).

As informações citogenéticas das abelhas pertencentes a tribo Meliponini mostram uma variação de $n=8$ a $n=17$ no número de cromossomos, sendo $n=17$ o número predominante entre os gêneros (Rocha *et al.*, 2003). No entanto, a variação no número de cromossomos ocorre dentro dos gêneros e até mesmo dentro da mesma espécie. Diferenças numéricas foram encontradas nos gêneros *Partamona* (Costa *et al.*, 1992, Tosta *et al.*, 2004, Martins *et al.*, 2009), *Melipona* (Lopes *et al.*, 2008, Rocha *et al.*, 2003) e *Tetragonisca* (Barth *et al.*, 2011) e estavam relacionadas à presença de cromossomos supranumerários. No gênero *Melipona*, além da presença de cromossomos Bs, uma variação no número diploide foi

encontrada para a espécie *Melipona seminigra merrillae*. A variação foi de $2n=22$ para fêmeas e $n=11$ é um resultado diferente do que se tem encontrado para o gênero sem a presença de cromossomos extras (Francini *et al.*, 2011). Isso mostra que na tribo Meliponini, o número cromossômico é uma característica que tem se mostrado pouco variável dentro do gênero, diferente de outros Hymenoptera em que são observadas variações intra e interespecíficas como o observado na espécie de formiga *Camponotus Myrmobrachys* sp (Mariano *et al.*, 2001) em *Trypoxylon albitarse* (Araújo *et al.*, 2000) em vespa *Nasonia Vitripennis* (Werren *et al.*, 1991). Uma outra variação observada em meliponini é a distribuição do conteúdo da heterocromatina, dividindo o gênero em dois grupos, um que apresenta alto conteúdo de heterocromatina e outro que apresenta baixo conteúdo de heterocromatina (Rocha e Pompolo, 1988).

Variações numéricas devido à presença de cromossomos Bs nos Meliponini (Rocha *et al.*, 2003) tem aberto novos campos de estudo. Para análise desses cromossomos vem sendo utilizadas técnicas de citogenética clássicas e citogenética molecular (Tosta *et al.*, 2004, Tosta *et al.*, 2007; Martins *et al.*, 2014). Entretanto, ainda pouco se sabe sobre sua distribuição, composição e origem, o que mostra a necessidade de mais estudos sobre esses cromossomos.

1.3. O gênero *Tetragonisca*

O gênero *Tetragonisca*, pertence a tribo Meliponini, e está representado por quatro espécies descritas na literatura: *T. weyrauchi*, *T. buchwaldi*, *T. angustula* e *T. fiebrigi* (Camargo e Pedro, 2013). A espécie *T. fiebrigi* e *T. angustula* têm sido as mais estudadas, ambas foram consideradas por muito tempo como subespécies (Silveira *et al.*, 2002). Estudos demonstram diferenças morfológicas entre as duas espécies sendo que a *T. angustula*, na sua morfologia, apresenta uma coloração ferruginosa na mesopleura lateral e na área do propodeum, enquanto *Tetragonisca angustula*, apresenta mesopleura preta (Moure *et al.*, 2007). No entanto já são consideradas como espécies, e apresentam isolamento reprodutivo (Oliveira *et al.*, 2004). A *T. fiebrigi* tem uma ampla distribuição podendo ser encontrada no México e em quase toda região

da América do Sul, no Brasil é encontrada nos estados do rio Grande do Sul e Mato Grosso até a fronteira com o Uruguai (Oliveira *et al.*, 2004). São conhecidas popularmente como jataí, apresentam uma coloração amarela dourada e preta, é pouco exigente quanto a sua nidificação, pois constrói seus ninhos em garrafas pets, ocos de arvores, em paredes e muitas vezes em ninhos abandonados por outras espécies.

Barth *et al.*, (2006) analisando colônias de *T. angustula* e *T. fiebrigi* coletadas em Tangará da Serra-MT com técnicas de citogenética bandamento C, coloração com Giemsa convencional e fluorocromo a base de CMA3 e DAPI, respectivamente, encontrou uma variação no número de cariótipo nas colônias *Tetragonisca fiebrigi* que apresentaram, $2n=36$ isso em fêmeas e uma variação de $n=18$ isso em machos, devido a presença de cromossomos extras também conhecidos como cromossomos B's ou supranumerários essas alterações não foram observadas na espécie de *Tetragonisca angustula*, os cromossomos Bs foram heterocromáticos e na coloração com fluorocromo a *T. fiebrigi* apresentou 4 cromossomos com sinais positivos.

1.4. Cromossomos B's

Os cromossomos B's são elementos supranumerários também conhecidos como acessórios são considerados extras ao complemento normal. Geralmente são menores em relação aos cromossomos autossomos e tem seu padrão evolutivo, pois não seguem o padrão de segregação de Mendel (Camacho *et al.*, 2000). Os cromossomos Bs estão presentes em muitas espécies de eucariotos, como em mamíferos (Silva e Yonenaga-Yassuda, 2004), peixes (Moreira-Filho *et al.*, 2004), insetos *Partamona helleri* (Costa *et al.*, 1992), na vespa *Nasonia vitripennis* (Werren, 1991) Orthoptera (Milani *et al.*, 2014), anfíbios (Green, 2004); crustáceos (Coluccia *et al.*, 2004), plantas (Jenkins e Jones, 2004) e helmintos (Spakulova e Casanova, 2004). Muitos autores, consideram que os B's são elementos "egoístas" que têm surgido a partir de cromossomos A autossômicos/sexuais e mantêm-se através das gerações por mecanismos de acumulação (Jones, 2012).

Os supranumerários têm despertado grande interesse na comunidade científica por aparentemente serem dispensáveis e ainda assim persistirem em algumas populações sem serem eliminados (Carvalho *et al.*, 2011).

Normalmente esses cromossomos são relativamente pequenos quando comparados com os cromossomos do grupo A, são compostos de sequência de DNA repetitivo, como DNA ribossomal, sequências centroméricas, teloméricas, bem como elementos móveis (Camacho *et al.*, 2004).

A origem desses cromossomos ainda não é bem esclarecida, mas nos últimos anos o desenvolvimento de técnicas da biologia molecular e da citogenética, tem permitido obtenção de informações adicionais sobre esses cromossomos. Uma possível explicação para a ocorrência do cromossomo B em algumas espécies é que ele pode ter surgido a partir do genoma A envolvendo duplicações e fissões de fragmentos de cromossomos autossômicos ou de cromossomos sexuais (Camacho *et al.*, 2004). Outra teoria sobre a origem do cromossomo B é por hibridização intraespecífica (Tosta *et al.*, 2004, Martins *et al.*, 2015).

1.5. Citogenética molecular

Durante muito tempo a caracterização cromossômica em Meliponini era baseada em parâmetros morfológicos, como tamanho dos braços, posição do centrômero e localização da heterocromatina (Rocha *et al.*, 2003). Estudo citogenéticos fornecem informações sobre a filogenia taxonomia comparações do genoma e rearranjos cromossômicos (Guerra,1988) embora estas ainda apresentem muitas limitações. A maior parte dos dados citogenéticos em Meliponini disponíveis na literatura, referem-se ao número cromossômico distribuição das regiões de heterocromatina por banda C e coloração com fluorocromos para mostrar regiões ricas em GC e AT (Rocha *et al.*, 2003). Devido às limitações das técnicas convencionalmente utilizadas, muitos aspectos em relação à evolução cromossômica dessas abelhas incluindo os relacionados aos cromossomos extras ainda não podem ser elucidados.

Com o avanço das técnicas de biologia molecular associadas à citogenética, surgiu a citogenética molecular que possibilitou a geração de

novas informações, fornecendo meios de inferir a respeito de evolução, composição e rearranjos do cariótipo das espécies. Com o advento da técnica de hibridização *in situ* (FISH), rearranjos e polimorfismos não detectados por meio da citogenética convencional, tornaram-se possíveis (Guerra, 2004).

A técnica de FISH é um método que utiliza recursos da biologia molecular para analisar cromossomos. Ela consiste no mapeamento de um gene por sondas de oligonucleotídeos marcados com fluorescência ou radiação, com sequências de ácidos nucleicos dos cromossomos da espécie em estudo, possibilitando assim verificar presença ou ausência de sequências específicas de DNA nos cromossomos (Phillips e Reed, 1996; Oliveira e Wright, 1998; Henning *et al.*, 2008). Essa técnica permite que sequências alvo de DNA possam ser localizadas, e o genoma inteiro de uma espécie ou sequências de cópia única possam ser analisados, dependendo da complexidade da sonda usada e da combinação de sequências específicas (Guerra, 2004).

Duas características têm contribuído para o uso da FISH com sondas rDNA; a organização dos genes para rRNA em múltiplas repetições o que facilita a detecção do sinal, e a presença de sequências altamente conservadas entre os eucariotos, permitindo que sondas obtidas para uma espécie possam ser utilizadas em outras (Cuadrado e Jouve, 2011). O rDNA apresenta sequências que tem sido muito analisada em quase todos os eucariotas encontram-se organizados por dois grupos, 45S e DNA 5S, onde o maior arranjo é formado por 45S e forma os genes que transcrevem os rRNA 18S, 5.8S e 28S (Martins *et al.*, 2011).

As sondas podem ser obtidas a partir de DNA de sequências únicas, DNA repetitivo, sequências loco-específica obtida por amplificação pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), grandes sequências de DNA genômico clonadas em vetores, bandas cromossômicas, sequências braço específicas e cromossomos inteiros geradas por microdissecção (Beatty *et al.*, 2002). Os microssatélites são normalmente distribuídos ao acaso pelo genoma e possuem um elevado grau de polimorfismo, por isso uso como marcador tem crescido nos últimos anos e ajudando na caracterização de diferentes espécies populações (Martins *et al.*, 2011).

Estudos demonstram que mapeamento de rDNA sequências repetitivas têm revelado informações sobre a organização do genoma em diferentes eucariotos (Cuadrado *et al.*, 2008, Ciofi *et al.*, 2011, Palacios-Gimenez e Cabral-de-Melo, 2015) em estudos evolutivos (Cabral-de-Melo 2011) e na diferenciação entre os cromossomos autossômicos e supranumerários em Orthoptera (Milani *et al.*, 2014). As análises com sonda de sequências de DNA repetitivo além de apresentar dados consistentes que ajudam a compreender a evolução e o mapeamento físico de determinadas espécies (Paiva *et al.*, 2011) e auxiliam em estudos filogenéticos e taxonômicos (Blonco *et al.*, 2012.)

As abelhas da tribo Meliponini apresentam uma constância no número diploide e pouca variação cromossômica observada pelas técnicas de citogenética clássica (Mampumbu 2002; Godoy *et al.*, 2013). Assim, ferramentas da citogenética molecular podem revelar polimorfismos intra- e interespecíficos dentro da espécie. Dentre os marcadores citogenéticos, o mapeamento do gene ribossomal 18S em Meliponini revelou baixo polimorfismo no número de pares carregando esse gene entre espécies do mesmo gênero, mas apresentou diferenças numéricas, de posição e tamanho entre os gêneros de Meliponini (Brito *et al.*, 2005). Os trabalhos com mapeamento de sequências microssatélites em abelhas desta tribo são recentes, contudo, mostram promissores em revelar diferenças entre populações e entre gêneros de Meliponini (Paiva *et al.*, 2015, Novaes *et al.*, 2015).

Dessa forma, considerando que pouco é conhecido sobre a organização do DNA repetitivo em abelhas, principalmente em espécies com presença de cromossomos extras, este trabalho busca a partir de técnicas de citogenética molecular fornece mais informações sobre a organização dos cromossomos na espécie *T. fiebrigi*.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Araújo, S.M.S.R., Pompolo, S.G., Dergan, J.A.S., Campos, L.A. 2000. The B

chromosome system of *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* (Hymenoptera Sphecidae) 1. Banding analysis. *Cytobios* 107: 7-13.

Barth, A., Fernandes, A., Pompolo, S.D.G., Costa, M. A. 2011. Occurrence of B chromosomes in *Tetragonisca* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): a new contribution to the cytotaxonomy of the genus. *Genetics and molecular biology*, 34: 77-79.

Beatty, B., Mai, S., Squire, J. A. 2002. *FISH*. Toronto: Oxford University Press, 255 p.

Brito, R.M., Arias, M.C. 2005. Mitochondrial DNA characterization of two *Partamona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) by PCR+ RFLP and sequencing. *Apidologie*, 36.3 2005431.

Blanco, D.R., Vicari, M.R., Artoni, R.F., Traldi, J.B., & Moreira-Filho, O. 2012. Chromosomal characterization of armored catfish *Harttia longipinna* (Siluriformes, Loricariidae): First report of B chromosomes in the genus. *Zoological Science*, 29(9), 604-609.

Carvalho, A. F., Costa, M. A. 2011. Cytogenetic characterization of two species of *Frieseomelitta* Ihering, 1912 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Genetics and molecular biology*, 34: 237-239.

Camargo J.M.F. e Pedro S.R.M. 2013. Meliponini Lepeletier, 1836. In Moure, J.S., Urban, D., Melo, G.A.R. Orgs. *Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region - online version*. Available at <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Accessed Aug/17/2013.

Camacho, J.P.M., Perfectti, F., Teruel, M., Lopez-Leon, M.D., Cabrero, J. 2004. The odd-even effect in mitotically unstable B chromosomes in grasshoppers. *Cytogenetic and Genome Research*, 106: 325–331.

- Coluccia, E., Cannas, R., Cau, A., Deiana, A.M., Salvadori, S. 2004. B chromosomes in *Crustacea Decapoda*. *Cytogenetic and Genome Research*, 106: 215–221.
- Cuadrado, A., Cardoso, M., Jouve, N. 2008. Physical organization of simple sequence repeats (SSRs) in *Triticeae*: structural, functional and evolutionary implications. *Cytogenetic and genome research*, 120, 210-219.
- Cuadrado, A., Jouve, N. 2011. Novel simple sequence repeats (SSRs) detected by ND-FISH in heterochromatin of *Drosophila melanogaster*. *BMC genomics*, 12, 205.
- Duarte, O.M.P., Martins, C.C.C., Waldschmidt, A.M., Costa, M.A. 2009. Occurrence of multiple nucleolus organizer regions and intraspecific karyotype variation in *Scaptotrigona xanthotricha* Moure (Hymenoptera, Meliponini). *Genetics and Molecular Research*, 8: 831-839.
- Ferreira, D.C., Oliveira, C., & Foresti, F. 2011. Chromosome mapping of retrotransposable elements Rex1 and Rex3 in three fish species in the subfamily Hypoptopomatinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). *Cytogenetic and genome research*, 132(1-2), 64-70.
- Ferreira, R.P., Novaes, C.M., Travenzoli, N.M., Lopes D.M. 2015. Intraspecific variation revealed by chromosomal mapping of microsatellite in stingless bee *Trigona spinipes*. *Chromosome Research*.130.
- Ferreira, RD.P. 2015. Análise citogenética de abelhas do gênero *Trigona* Jurine, 1807 (Hymenoptera: Meliponini). Dissertação.
- Francini, I.B., Gross, M.C., Nunes-Silva, C.G., Carvalho-Zilse, G.A. 2011. Cytogenetic analysis of the Amazon stinglessbee *Melipona seminigra merrillae* reveals different chromosome number for the genus. *Scientia Agricola*, 68: 592-593.

Green, D.M. 2004. Structure and evolution of B chromosomes in *amphibians*. *Cytogenetic and Genome Research*, 106: 235–242.

Godoy, D.C., Ferreira, R.P., Lopes, D. M. 2013. Chromosomal Variation and Cytogenetics of *Plebeia lucii* and *P. phrynostoma* (Hymenoptera: Apidae). *Florida Entomologist*, 96: 1559-1566.

Guerra, M.S. 1988. Introdução à citogenética geral. Rio de Janeiro: Guanabara, 143 p.

Hoshiba, H. and Imai, H. T. 1993. Chromosome evolution of bees and wasps (Hymenoptera, Apocrita) on the basis of C-banding pattern analyses. *Jpn J Entomol* 61:465-492.

Imperatriz-fonseca V.L., Jong, D., Saraiva, A.M. 2006 As abelhas como polinizadores no Brasil: avaliação da situação e sugerindo as melhores práticas. Holos Edição. Ribeirão Preto, p 114.

Jenkins, G., Jones, R.N. 2004. B chromosomes in hybrids of temperate cereals and grasses. *Cytogenetic and Genome Research*, 106:314–319.

Jones, R.N. 2012. B chromosomes in plants *Plant Biosystems*, 146: 727–737.

Kerr, W. E., 1948. Estudos sobre o gênero *Melipona*. – *Anais da E.S.A. Luiz de Queiroz* 5: 182–276.

Lopes, D.M., Pompolo, S.D.G., Campos, L. A. D. O., Tavares, M.G. 2008. Cytogenetic characterization of *Melipona rufiventris* Lapeletier 1836 and *Melipona mondury* Smith 1863 (Hymenoptera, Apidae) by C banding and fluorochromes staining. *Genetics and Molecular Biology*, 31(1), 49-52.

Lopes, D.M., Fernandes, A., Diniz, D., Scudeler, P.E.S., Foresti, F., Campos, L.A.D.O. 2014. Similarity of heterochromatic regions in the stingless bees

(Hymenoptera: Meliponini) revealed by chromosome painting. *Caryologia*, 67(3), 222-226.

Martins, C.C.C., Duarte, O.M.P., Waldschmidt, A.M., Alves, R.M.D.O., Costa, M.A. 2009. New occurrence of B chromosomes in *Partamona helleri* (Friese, 1900) (Hymenoptera, Meliponini). *Genetics and molecular biology*, 32(4): 782-785.

Martins, C. Cabral-de-Mello D.C., Valente G.T., Mazzuchelli J. and Oliveira S.G. 2011. Cytogenetic mapping and its contribution to the knowledge of animal genomes. *Advances in Genetics Research*. Volume 4, Cap 1: 1-81.

Mariano, C.F.S., Pompolo, S.G., Delabie, J.H.C., Campos, L.A.O. 2001. Estudos cariotípicos de algumas Espécies neotropicais de *Camponotus Mayr* (Hymenoptera, Formicidae) *Rev Bras Entomol.*, 45: 267-274.

Mampumbu, A.R., 2002. Análise citogenética da heterocromatina e da NOR em populações de abelhas SEM ferrão *Friesella schrottkyi* (FRIESE, 1900) (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Magister Scientiae* dissertation, Unicamp. Campinas. Brazil.

Milani, D., Cabral-de-Mello, D.C. 2014. Microsatellite organization in the grasshopper *Abracris flavolineata* (Orthoptera: Acrididae) revealed by FISH mapping: remarkable spreading in the A and B chromosomes, 9: e97956.

Michener, CD. 2000. *The Bees of the World*. Baltimore and London The John Hopkins University Press. – 913 S., 48 Farbfotos und zahlr. S/w Illustrationen. ISBN 0-8018-6133-0.

MICHENER, C.D. 2007. *The Bees of the World*, 2nd Ed. The John Hopkins 965 University Press, Baltimore, 953 pp.

Moure. J.S., Urban, D. and Melo, G.A.R. 2007. Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region. Sociedade Brasileira de Entomologia, Curitiba, 1058 pp.

Moreira-Filho, O., Galetti Jr. P. M., Bertollo, L.A.C., 2004. B chromosomes in the fish *Astyanax scabripinnis* (Characidae, Tetragonopterinae): An overview in natural populations. Cytogenetic and Genome Research, 106: 230–234.

Oliveira, C. Wright, J.M. 1998. Molecular cytogenetic analysis of heterochromatin in the chromosomes of tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae). Chromosome Research, 6: 205- 11.

Palacios-Gimenez, O.M., Cabral-de-Mello, D.C. 2015. Repetitive DNA chromosomal organization in the cricket *Cycloptiloides americanus*: a case of the unusual X1X20 sex chromosome system in Orthoptera. Molecular Genetics and Genomics, 290 (2). 623-631.

Pedro, S.R.M., Camargo, J.M. F. 1999 "Apoidea apiformes." Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil. 5: 195-211.

Pompolo, S.G., Campos, L.A.O. 1995. Karyotypes of two species of stingless bees, *Leurotrigona muelleri* and *Leurotrigona pusilla* Hymenoptera, Meliponinae. Revista. Brasil. Genetica, 18: 181-184.

Phillips, R.B., Reed, K.M. 1996. Application of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) techniques to fish genetics: a review. Aquaculture, 140: 197-216.

Rocha, M.P., Pompolo, S.G., Campos, L.A.O. 2003. Citogenética da tribo Meliponini (Hymenoptera, Apidae). In: Melo G.A.R., Santos, I.A., *Apoidea Neotropica*. Homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure. UNESC, Santa Catarina, Brasil, pp 311-320.

Spakulova, M. Casanova, J.C. 2004. Current knowledge on B chromosomes in natural populations of helminth parasites: a review. *Cytogenetic and Genome Research*, 106: 222–229.

Silva, M.J.J., Yonenaga-Yassuda, Y. 2004. B chromosomes in Brazilian rodents. *Cytogenetic and Genome Research*, 106:257–263.

Sumner, A.T. 2003. *Chromosomes: organization and function*. Blackwell Publishing, London, 287p.

Tosta, V.C., Fernandes-Salomão, T.M., Tavares, M.G., Pompolo, S.G., Barros, E.G., Campos, L.A.O. 2004. A RAPD marker associated with B chromosomes in *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae). *Cytogenetic and Genome Research*, 106: (2-4): 279-283.

Tosta, V.C., Tavares, M.G., Fernandes-Salomão, T.M., Barros, E.G., Campos, L.A.O. Camacho, J.P.M. 2007. Development of a SCAR marker for the analysis of B chromosome presence in *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae). *Cytogenetic and Genome Research*, 116 (1-2): 127-129.

Werren, J.H. 1991. The paternal-sex-ratio chromosome of *Nasonia*. *Amer. Natur.*142: 224-241.

3. OBJETIVO GERAL

Analisar a estrutura cromossômica de populações da espécie *Tetragonisca fiebrigi*, utilizando o mapeamento cromossômico de DNA repetitivo com ênfase nos cromossomos B.

3.1 Objetivos específicos

- Verificar a presença do cromossomo supranumerário (B) no cariótipo e populações *T. fiebrigi*;
- Mapear os cromossomos com a utilização de microssatélite pela técnica de hibridização *in situ* fluorescente;
- Localizar os sítios de rDNA 18S nos cromossomos dos indivíduos das populações analisadas;
- Analisar a marcação das sondas de DNA repetitivo (CAA)₁₀ (GA)₁₅ e 18S nos cariótipos das populações de *T. fiebrigi*, e verificar se essas sondas apresentam marcações nos cromossomos supranumerários (B).

4. CAPITULO 1

Mapeamento de DNA repetitivo na abelha sem ferrão *Tetragonisca fiebrigi* com ênfase nos cromossomos Bs.

Resumo

A citogenética molecular têm surgido como uma ferramenta alternativa para o estudo dos cromossomos, podendo auxiliar no entendimento da sua organização e evolução. Assim neste trabalho foi mapeado o cariótipo de *T. fiebrigi*. Três populações foram analisadas coletadas em Palotina (PR), Tangará da Serra (MT) e Ribeirão Preto (SP) com sondas de DNA repetitivo sendo $(CAA)_{10}$, $(GA)_{15}$ e o rDNA 18S com o intuito de aumentar as informações sobre o cariótipo de *T. fiebrigi* e tentar compreender melhor a organização e origem dos cromossomos Bs nessa espécie. Nas três populações o microssatélite $(CAA)_{10}$ mostrou sinais em forma de blocos em todos os cromossomos autossômicos, na região do braço longos da eucromatina sem nenhum padrão de marcação no cromossomo B. E o microssatélite $(GA)_{15}$ apresentou marcações fortes bem evidentes em todas as regiões do braço longo da eucromatina e o cromossomo B também não apresentou nenhum sinal de hibridização. A sonda de rDNA 18S marcou nas regiões terminais dos braços curtos em cinco cromossomos autossômicos nas populações analisadas. Na população de Palotina (PR) a sonda 18S marcou de forma fraca em um cromossomo B, na região terminal o que indica presença deste gene nesse cromossomo. Apesar de relatos de que o cromossomo B em Meliponini possui uma grande quantidade de heterocromatina na qual é comum a presença de DNA repetitivo, não foram vistas marcações nessas regiões. Esse padrão tem sido observado em outras espécies de Meliponini em que se observa um acúmulo de microssatélites em regiões de eucromatina, mostrando uma similaridade entre as espécies dessa tribo. Só um indivíduo da população de Ribeirão Preto (SP) apresentou cromossomo B e a metáfase não teve qualidade.

Palavras-chave: Meliponini, FISH, cromossomo B, DNA repetitivo.

4.1. Introdução

Durante muito tempo a caracterização cromossômica em Meliponini era baseada em parâmetros morfológicos, como tamanho dos braços, posição do centrômero e localização da heterocromatina (Rocha *et al.*, 2003). Técnicas de bandeamento, foram introduzidas nos estudos citogenéticos permitindo uma melhor caracterização cromossômica das espécies embora estas ainda apresentem muitas limitações (Sumner, 2003).

Com o avanço das técnicas de biologia molecular associadas à citogenética, surgiu a citogenética molecular que possibilitou a geração de novas informações, que possibilitou inferir a respeito de evolução, composição e rearranjos do cariótipo das espécies (Guerra, 1988).

As abelhas da tribo Meliponini apresentam uma constância no número diploide e pouca variação cromossômica observada pelas técnicas de citogenética clássica (Rocha *et al.*, 2003, Godoy *et al.*, 2013). Assim, ferramentas da citogenética molecular podem revelar polimorfismos intra- e interespecíficos dentro da espécie (Sumner, 2003).

Diferenças numéricas foram encontradas nos gêneros *Partamona* (Costa *et al.*, 1992, Rocha *et al.*, 2003, Brito, 2005, Tosta *et al.*, 2004 e 2007 Martins *et al.*, 2009), *Melipona* (Lopes *et al.*, 2008) e *Tetragonisca* (Barth *et al.*, 2011), e estavam relacionadas à presença de cromossomos Bs. Os cromossomos Bs são elementos supranumerários presentes em muitas espécies de eucariotos, como mamíferos (Silva e Yonenaga-Yassuda, 2004), peixes (Moreira-Filho *et al.*, 2004), insetos (Camacho *et al.*, 2000), anfíbios (Green, 2004); crustáceos (Coluccia *et al.*, 2004), plantas (Jenkins e Jones, 2004) e helmintos (Spakulova e Casanova, 2004). Normalmente esses cromossomos são relativamente pequenos quando comparados com os cromossomos do grupo A, são compostos de sequência de DNA repetitivo, e podem ser considerados dispensáveis nos organismos que os carregam (Camacho *et al.*, 2000).

Um dos Meliponini que apresentam cromossomos B é a espécie *T. fiebrigi* que ocorre na região Neotropical, nos países como Bolívia, Argentina, Paraguai. No Brasil ela é encontrada nos estados do Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Paraná, Rio Grande do Sul e São Paulo. Essa espécie se distingue da *T. angustula* em alguns caracteres morfológicos, como coloração

da mesopleura e em caracteres citogenéticos. Ambas as espécies *T. fiebrigi* e *T. angustula* possuem um cariótipo de $2n=34$ para fêmeas e $n=17$ para machos uma variação numérica no cariótipo da espécie *T. fiebrigi* foi observada com dois cromossomos Bs em fêmeas $2n=36$ e um cromossomo B nos machos $n=18$ (Barth *et al.*, 2011). O cromossomo B tem sido pouco estudado em Hymenoptera, foram analisados em formiga das espécies do gênero *Camponotus* Mariano *et al.*, (2001), ocorrência de cromossomo B em macho e em fêmea foi relatada em vespa *Trypoxylon albitarse* (Rocha-Sanchez e Pompolo, 2004). Em abelhas foram observados em *Partamona helleri* (Costa 1992, Brito *et al.*, 2007, Tosta *et al.*, 2004), *Melipona rufiventris* (Lopes *et al.*, 2008), *Melipona quinquefasciata* (Rocha, 2002), análises de citogenética molecular (Tosta *et al.*, 2004,2007, Marthe *et al.*, 2010).

4.2. Material e Métodos

Espécimes, preparação dos cromossomos mitóticos, coloração

Os indivíduos de *T. fiebrigi* foram coletados em três cidades diferentes do Brasil sendo, 5 colônias em Palotina – PR, 4 colônias de Ribeirão Preto - SP e 4 colônias de Tangará da Serra - MT. Para obtenção dos cromossomos metafásicos utilizou-se gânglios cerebrais de larvas em estágio pós-defecante conforme protocolo proposto por Imai *et al.* (1988). Os gânglios cerebrais retirados foram submetidos a tratamento com colchicina 0,005% e citrato de sódio 1% por aproximadamente 1:30h. As lâminas foram coradas com Giemsa para confirmação do número cromossômico e presença/ausência dos cromossomos B. As metáfases foram analisadas e fotografadas em microscópio OLYMPUS BX-53 acoplado a um sistema de captura e análise de imagens.

Hibridização fluorescente *in situ*

Foram utilizados três microssatélites $CAA_{(10)}$, $GA_{(15)}$, rDNA 18S para análises. Os microssatélites $CAA_{(10)}$, $GA_{(15)}$, foram marcados diretamente com Cy3 na extremidade 5' durante a síntese por Sigma (St. Louis, MO, EUA). No

procedimento de hibridização das sondas foi seguido o protocolo proposto por Kubat *et al.* (2008) modificado por Cioffi *et al.* (2010). Os cromossomos foram contrastados com DAPI (1,2ug /ml), montado em solução antifading (Vector, Burlingame, CA, EUA) e analisados em microscópio de epifluorescência Olympus BX53 (Olympus Corporation, Ishikawa, Japão), sendo fotografadas as melhores metáfases.

As sondas das regiões de rDNA 18S foram obtidas por amplificação via PCR, utilizando-se *primers* de rDNA 18S F1(5'-GTCATATGCTTGTCTCAAAGA-3') e 18S R (3'- TCTAATTTTTTCAAAGTAAACGC -5'), desenhados para a espécie de abelha *Melipona quinquefasciata* (Pereira, 2006). As sondas de rDNA 18s foram marcadas utilizando-se digoxigenina-11-dUTP (Roche, Mannheim, Germany) durante a amplificação. A reação de PCR foi realizada conforme condições sugeridas por Pereira (2006) em um volume de 25 µL [tampão 1X (200 mM Tris-HCl pH 8,4, 500 mM KCl)], 0,75 µL de MgCl₂ (100 mM), os dNTps (1,5 µl de dATP, dCTP e dGTP (2µM), 1,5 µl dTTP (2µM) e 0,6 µM dUTP-digoxigenina (2µM), 1,0 µL de cada primer (10µM), 0,2 µL (2.5 U) de Taq polimerase (Phoneutria) e 2µL de DNA (100 ng/µl)]. Os procedimentos do FISH foram realizados de acordo com Pinkel *et al.*, (1986). Para a detecção da marcação, o material foi incubado com antidigoxigenina-rodamina. Ao final as lâminas foram montadas com Antifading contendo DAPI (Fluoroshield com DAPI- SIGMA F6057). Foram analisadas, em média, 10 metáfases por lâmina em um fotomicroscópio de epifluorescência OLYMPUS BX-53, e as melhores metáfases foram fotografadas.

4.3. Resultados

Três populações de *T. fiebrigi* foram analisadas e o número diploide foi de 2n=38 com variações numéricas devido à presença de cromossomos Bs. Cromossomos Bs foram observados em todas as populações analisadas com variações de 1 a 4 cromossomos nos indivíduos analisados (2n=35 a 2n=38).

Nas amostras de Palotina - PR observou-se variação entre os indivíduos quanto ao número de cromossomo B sendo detectados até 4 cromossomos dentro da mesma colônia, enquanto que nas de Tangará da Serra detectou-se indivíduos com até 2 cromossomos B. Um único cromossomo B foi observado

nas populações de Ribeirão Preto. Os cromossomos Bs apresentaram a mesma morfologia, tamanho grande quando comparável aos autossômicos de maior tamanho e visivelmente diferentes destes devido a uma coloração mais forte correspondente a heterocromatina presente em toda extensão.

Nas três populações analisadas a sonda microssatélite (CAA)₁₀ resultou marcações em formas de blocos, nos braços longos das regiões eucromáticas de todos os cromossomos autossomos não sendo observado portanto, marcações no cromossomo B (**Figura 1**). Esta mesma figura mostra que as amostras provenientes de Palotina – PR apresentam variação no padrão de marcação com sinais mais fracos para os cromossomos autossômicos.

A sonda de microssatélite (GA)₁₅ também marcou os braços longos nas regiões eucromáticas de todos os cromossomos autossomos, com um padrão mais forte que o observado quando utilizado o microssatélite (CAA)₁₀. Do mesmo modo, os cromossomos B que são totalmente heterocromáticos, não apresentaram nenhuma marcação quando analisados de Palotina - PR e Tangará da Serra -MT. No indivíduos da colônia de Ribeirão Preto –SP analisados este tipo de cromossomo não foi observado em metáfase de qualidade (**Figura 2**). Entretanto, como este se assemelha em morfologia e distribuição da heterocromatina, é possível que o padrão de marcação seja o mesmo das outras populações.

Embora as sondas empregadas neste estudo estejam marcando regiões de eucromatina, não foram observadas marcações nas regiões pericentroméricas, com um acúmulo nas porções terminais do braço longo eucromático.

Em todas as populações analisadas a utilização da sonda de rDNA 18S resultou marcações intensas na região terminal braço curto na eucromatina de 5 cromossomo autossômicos. Semelhante às outras sondas utilizadas neste estudo os cromossomos B não apresentaram sítios para o rDNA 18S, exceto para um indivíduo da colônia oriunda de Palotina - PR (**Figura 3**).

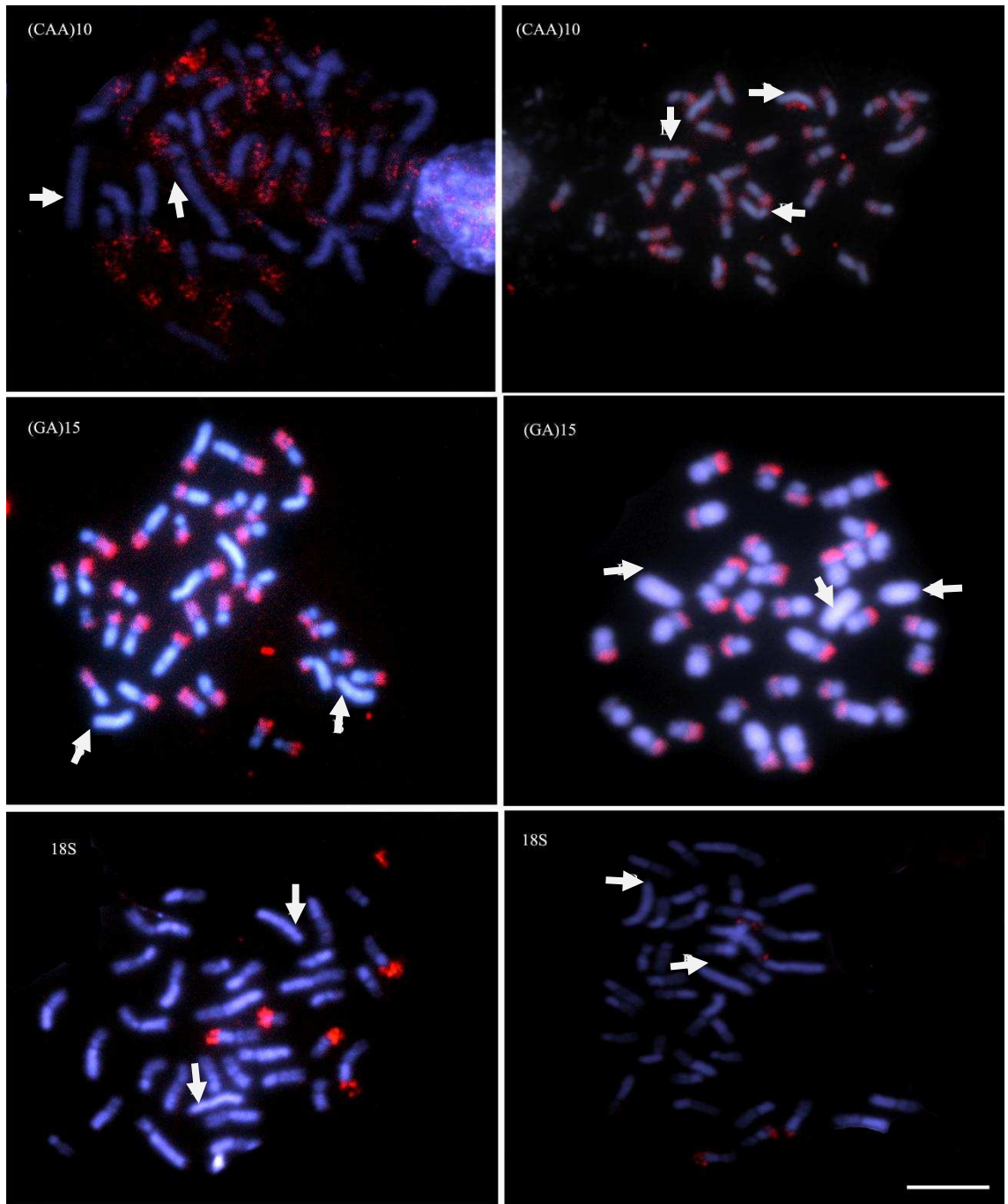


Figura 1- Mapeamento de DNA repetitivo (CAA)₁₀ (GA)₁₅ e rDNA 18S de duas populações de *Tetragonisca fiebrigi*. À esquerda populações de Tangará da Serra (MT). À direita populações de Palotina - PR. A seta indica a presença do cromossomo B. Barra = 5µm.

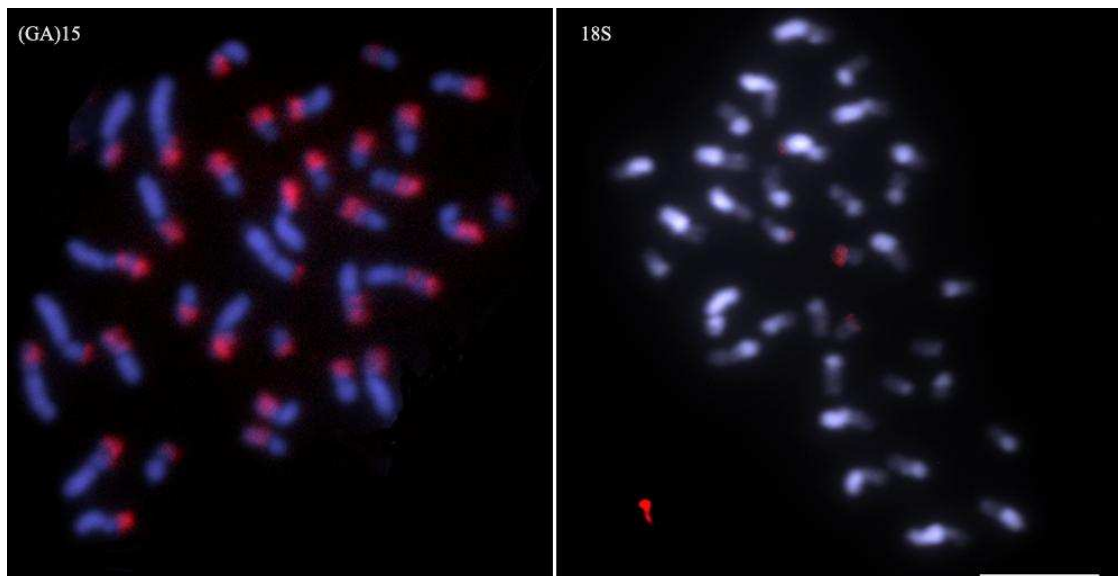


Figura 2- Mapeamento de DNA repetitivo (GA)₁₅ e rDNA18S em *T. fiebrigi* de Ribeirão Preto (SP) sem o cromossomo B. Barra=5µm.

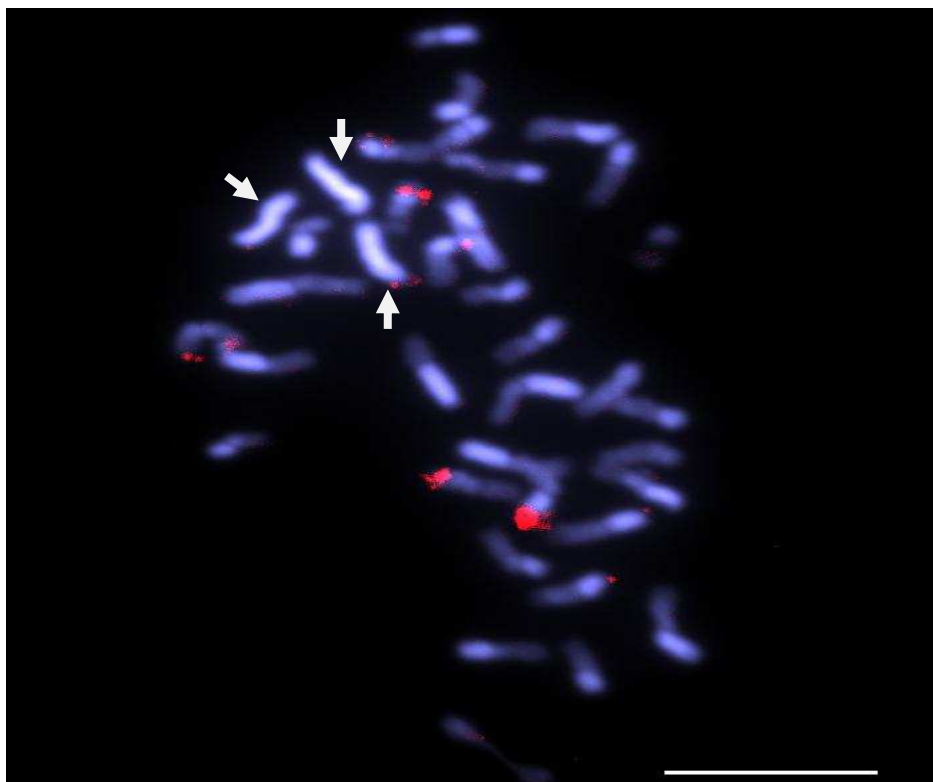


Figura 3 – Mapeamento do DNA ribossomal 18S *T.fiebrigi*, Palotina com 5 cromossomos marcados incluindo 1 cromossomo B. Barra= 5µm.

4.4. Discussão

O cariótipo da *Tetragonisca fiebrigi* apresentou $2n=34$, corroborando com o cariótipo já descrito na literatura (Barth *et al.*, 2011). A espécie possui a fórmula cariotípica de $2k=32A^M+2A^{Mc} + 1 a 2 B$, presença do cromossomo B foi confirmada com a técnica de bandamento C (Barth *et al.*, 2011). Miranda *et al.*, (2013), (em preparação) analisando outras populações desta espécie encontraram diferenças em relação ao número de cromossomos B bem como variações morfológicas nos autossomos. Essas variações morfológicas e numéricas também, foram observadas nas populações analisadas no presente estudo. Análises citogenética e moleculares suportam a hipótese de que a maioria dos cromossomos Bs parecem ser derivados do complemento autossômico/sexuais de suas espécies hospedeiras (Camacho, 2000). Outros estudos demonstraram que o cromossomo B pode se originar por hibridização, essa origem se observa quando a sequência do DNA dos cromossomos autossômicos não é encontrada nas sequências do cromossomo B (Tosta *et al.*, 2004, Martins *et al.*, 2014). Em Meliponini, a espécie *Partamona helleri* é a mais estudada até o momento (Costa *et al.*, 1992, Tosta *et al.*, 2004, 2007 e 2014, Brito *et al.*, 2005, Martins, 2009). A análise desta espécie *Partamona helleri* não mostrou similaridade entre sequências de fragmentos de cromossomo Bs e autossômicos sugerindo que sua origem tenha ocorrido durante um único evento seguido de transmissão deste cromossomo por cruzamentos interespecíficos (Marthe *et al.*, 2010). Para análises desta espécie foi com base na técnica de microdissecação seguida de FISH (Martins *et al.*, 2014).

No presente trabalho foram observados cromossomos extras indicando uma dispersão e frequência desses cromossomos nas populações de *T. fiebrigi*. A variação no número de cromossomos Bs numa espécie depende principalmente da capacidade e da tolerância que são regulados por fatores como história ecológica e genética do grupo (Camacho *et al.*, 2005). A variação numérica observada entre as populações indica que esses cromossomos estão de maneira aleatória na dentro da espécie. Polimorfismo numérico e também estrutural inter e intra-populacional de cromossomo B tem sido relatado em outras espécies (Bakkali *et al.*, 2004, Lia *et al.*, 2007). Em populações da

espécie do gafanhoto *Eyprepocnemis plorans* os cromossomos Bs apresentaram as duas variações, tanto numéricas quanto estruturais (Camacho *et al.*, 2004). Em algumas espécies de plantas o polimorfismo do cromossomo B é apenas numérico como foi observado no Centeio *Secale cereale* (Lia *et al.*, 2007).

O presente estudo é o primeiro relato de mapeamento cromossômico de repetições de microssatélites em abelhas sem ferrão que possui cromossomos extras ao complemento A. A presença de DNA repetitivo dispersos no genoma é uma característica comum a muitos eucariotos (Rocha *et al.*, 2003). Um dos locais em que se tem encontrado acúmulo desse tipo de DNA são nas regiões constituídas por heterocromatina, incluindo cromossomos extras que em geral são heterocromáticos (Milani *et al.*, 2014). Os cromossomos de abelhas sem ferrão possuem grandes proporções de heterocromatina (Rocha *et al.*, 2003, Paiva, 2015), e dessa forma, era esperado que a espécie *T. fiebrigi* apresentasse sinais positivos dos microssatélites nessas regiões da heterocromatina, porém essas sequências estão presentes predominantemente em regiões de eucromatina, diferindo do esperado. A presença de sinais positivos dos microssatélites (CAA)₁₀ e (GA)₁₅ nos cromossomos autossômicos na região da eucromatina de *T. fiebrigi*, pode estar associada ao acúmulo dessas sequências no genoma de Meliponini, uma vez que outras espécies deste grupo testadas em nosso laboratório apresentou o mesmo padrão de distribuição (Paiva *et al.*, 2015). No entanto a ausência de marcações em alguns cromossomos, mostra uma distribuição diferente de microssatélites entre os cromossomos, sendo provável que essas sequências estão ausentes nesses cromossomos.

Uma relação estreita entre cromossomos Bs e DNA repetitivo tem sido demonstrada em vários estudos onde diferentes classes de DNA repetitivo como elementos transponíveis, DNA satélite, família multigênica foram identificados (Milani *et al.*, 2014). Embora em *T. fiebrigi* o cromossomo B apresente regiões heterocromáticas relacionadas com acúmulo de DNA repetitivo, (Barth *et al.*, 2011) nenhuma marcação com as sondas de microssatélites (CAA)₁₀ e (GA)₁₅, foi observada nas amostras analisadas no presente estudo. Os resultados indicam uma distribuição intensa do microssatélite (GA)₁₅ e foram menos enriquecidos para (CAA)₁₀ nos

cromossomos autossômicos, diferindo do padrão encontrado para a espécie de gafanhoto *Abracis flavolinata* onde os cromossomos Bs de constituição inteiramente eucromática apresentam sinais positivos para diferentes microssatélites (Milani *et al.*, 2014). Esses dados demonstram que os microssatélites (CAA)₁₀ e (GA)₁₅ tem uma distribuição aleatória ao longo dos cromossomos bem como padrão de distribuição específico em cada espécie. Sequências repetidas podem estar presentes em várias espécies de um mesmo grupo filogenético ou serem específicas para uma determinada espécie (Ananiev *et al.*, 2002). Na espécie do gafanhoto *Abracis flavolinata* os microssatélites (CAA)₁₀ e (GA)₁₅ apresentam um padrão de distribuição generalizados em todas regiões da eucromatina e também da heterocromatina e o cromossomo B nessa espécie de gafanhoto é totalmente eucromático como foi demonstrado pela técnica de bandamento C. (Milani *et al.*, 2014), esses resultados diferem dos encontrados nesse estudo, pelo padrão de distribuição aleatória dos microssatélites e da constituição do cromossomo B. Em análise realizada em *Ceteio* uma espécie de trigo com o microssatélite (CAA)₁₀ foi observado sinais específicos nos cromossomo autossômico, e esses sinais também estavam presentes em regiões terminais do braço curto dos cromossomo B Marques *et al.*, (2012). A acumulação de DNA repetitivo no genoma pode não ser o evento principal para a ocorrência de marcação (Moreira e filho *et al.*, 1993). Estudos têm demonstrado que sequências repetitivas podem evoluir de forma rápida e assim contribuem para a variação dos genomas das espécies (Li *et al.*, 1995).

Com base no gene rDNA 18S, foi identificada região organizadora de nucléolo, em um cromossomo B da colônia de Palotina (PR), sendo marcações fracas na região terminal do braço eucromático e mais intensas nos autossomos de cinco cromossomos. Nas outras populações analisadas não foram observadas marcações no cromossomo B. A ausência de marcação nestes cromossomos pela sonda rDNA 18S pode estar relacionada com a origem desses cromossomos a partir de fragmentos dos cromossomos autossômicos e o cromossomo B originado do complemento A, podem ter perdido essa região de rDNA por recombinação intra-cromossômica, um evento que pode ocorrer nesses cromossomos como sugerido por (Camacho *et al.*, 2005). A ausência de marcação no cromossomo B pode-se dar a hipótese do

surgimento de um novo cromossomo B na espécie *T. fiebrigi*, como ocorreu no estudo realizado na espécie de *Partamona helleri* (Tosta *et al.*, 2014). O rDNA região de 18s vem sendo utilizados com grande frequência em estudos citogenéticos de várias espécies, essas regiões variam em número e na sua localização dentro do genoma de uma mesma espécie ou de espécies diferentes (Camacho *et al.*, 2005).

A constituição inteiramente heterocromática e a ausência de marcações nos cromossomos Bs sugere que esses cromossomos podem partilhar regiões com os autossomos, além disso, na população de Ribeirão Preto (SP) foi observado um cromossomo autossômico totalmente heterocromático (Miranda, em preparação) que pode ser a fonte de origem dos cromossomos B devido à sua semelhança morfológica. Brito *et al.*, 2005 no estudo realizado em com a espécie de *Partamona helleri* não observou aglomerados do gene de rDNA 18S. (Brito *et al.*, 2005) A regiões organizadoras de nucléolo são responsáveis pela produção e processamento de rRNA (Sumner, 2003). A dispersão de grandes aglomerados de rDNA é favorecida pela associação de elementos transponíveis e ocorrências de recombinação dentro do próprio genoma (Camacho *et al.*, 2000). A maioria dos NORs localizados no cromossomo B encontram-se em estado latente e podem ser ativados ao se fundirem com os cromossomos do padrão normal por rearranjos cromossômico (Jones, 1995). Estudos realizados em coleóptera, com a sonda do rDNA 18S demonstrou aglomeração em distintos cromossomos, tais aglomerações foram marcantes em quatro pares de cromossomo autossômico, e não foi observado nenhum sinal de hibridização no cromossomo B (Oliveira *et al.*, 2012). Na espécie *Ceanothus americanus*, a região de rDNA 18S revelou sinais de hibridação em quase todos os cromossomos, o que indica que essa região deve coincidir com a banda (NOR), regiões organizadoras de nucléolos, as marcações formaram blocos nas regiões centoméricas de alguns pares cromossômicos e em regiões terminais (Palacios-Gimenaz *et al.*, 2015).

O crescente interesse em estudos de Meliponini com base em citogenética molecular é evidente. Deste modo, o conhecimento obtido em estudos anteriores bem como no presente estudo somados com aos obtidos em possíveis estudos futuros certamente contribuirão para entendimento dos processos que levaram a modificações cromossômicas nesse grupo. Neste

sentido os resultados obtidos no presente estudo contribuem para esse panorama.

4.5. CONCLUSÕES

Neste estudo fica evidente que as técnicas de citogenética molecular permitem localizar regiões de DNA que constituem ferramenta importante que pode auxiliar no entendimento da estrutura dos cromossomos e organização do genoma de diferentes espécies.

Confirmou-se o número diploide de $2n=34$ com variação de $2n=35$ a 38 devido à presença do cromossomo B.

A técnica de FISH, junto as sondas utilizadas nesse estudo mostrou que o cromossomo B possui similaridade com regiões heterocromáticas do complemento normal A, o que pode sugerir que sua origem seja intraespecífica.

Agradecimentos

Agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro e à CAPES pela bolsa de Mestrado concedida à Martinha Mappingala Capoco.

Referências Bibliográficas

Ananiev, E.V., Vales, M.I., Phillips, R.L., Rines, H.W. 2002 Isolation of A/D and C genome specific dispersed and clustered repetitive DNA sequences from *Avena sativa*. *Genome*, 45: 431-441.

Barth, A., Fernandes, A., Pompolo, S.D.G., Costa, M. A. 2011. Occurrence of B chromosomes in *Tetragonisca* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): a new contribution to the cytotaxonomy of the genus. *Genetics and molecular biology*, 34: 77-79.

Bakkali, M., Camacho, J.P.M. 2004. The B chromosome polymorphism of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* in North África. IV. Transmission of rare B chromosome variants. *Cytogenetic and Genome Research*, 106: 332–337.

Beatty, B., Mai, S., Squire, J. A. 2002. FISH. Toronto: Oxford University Press, 255 p.

Brito, R. M., das Graças Pompolo, S., Magalhães, M.F.M., de Barros, E.G., Sakamoto-Hojo, E.T. 2005. Cytogenetic characterization of two *Partamona* species (Hymenoptera, Apinae, Meliponini) by fluorochrome staining and localization of 18S rDNA clusters by FISH. *Cytologia*, 70 (4), 373-380.

Blanco, D.R., Vicari, M.R., Artoni, R.F., Traldi, J.B., & Moreira-Filho, O. 2012. Chromosomal characterization of armored catfish *Harttia longipinna* (Siluriformes, Loricariidae): First report of B chromosomes in the genus. *Zoological Science*, 29(9): 604-609.

Carvalho, A.F., Costa, M.A. 2011. Cytogenetic characterization of two species of *Frieseomelitta* Ihering, 1912 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Genetics and molecular biology*, 34: 237-239.

Camargo J.M.F. e Pedro, S.R.M. 2013. Meliponini Lepeletier, 1836. In Moure, J.S., Urban, D., Melo, G.A.R. Orgs. Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region - online version. Available at <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Accessed Aug/17/2013

Camacho, J.P.M., Sharbel. T.F., Beukeboom, L.W. 2000. B chromosome evolution. *Phil Trans R Soc Lond B* 355: 163–178.

Camacho, J.P.M., Perfectti, F., Teruel, M., Lopez-Leon, M.D., Cabrero, J. 2004. The odd-even effect in mitotically unstable B chromosomes in grasshoppers. *Cytogenetic and Genome Research*, 106: 325–331.

Camacho J.P.M. 2005. B Chromosomes. In: Gregory TR edition *The Evolution of The Genome*. San Diego: Elsevier, pp 223–286.

Cabral-de-Mello, D.C., de Moura, R.D.C., de Souza Melo, A. Martins, C. 2011. Evolutionary dynamics of heterochromatin in the genome of *Dichotomius* beetles based on chromosomal analysis. *Genetica*, 139: 315-325.

Cioffi, M.B., Kejnovsky, E., Bertollo, L.A.C. 2011. The chromosomal distribution of microsatellite repeats in the genome of the wolf fish *Hoplias malabaricus*, focusing on the sex chromosomes. *Cytogenetic and genome research*, 132: 289-296.

Coluccia, E., Cannas, R., Cau, A., Deiana, A.M., Salvadori, S. 2004. B chromosomes in *Crustacea Decapoda*. *Cytogenetic and Genome Research*, 106: 215–221.

Cuadrado, A., Cardoso, M., Jouve, N. 2008. Physical organization of simple sequence repeats (SSRs) in *Triticeae*: structural, functional and evolutionary implications. *Cytogenetic and genome research*, 120: 210-219.

Cuadrado, A., Jouve, N. 2011. Novel simple sequence repeats (SSRs) detected by ND-FISH in heterochromatin of *Drosophila melanogaster*. BMC genomics, 12, 205.

Duarte, O.M.P., Martins, C.C.C., Waldschmidt, A.M., Costa, M.A. 2009. Occurrence of multiple nucleolus organizer regions and intraspecific karyotype variation in *Scaptotrigona xanthotricha* Moure (Hymenoptera, Meliponini). Genetics and Molecular Research, 8: 831-839.

Ferreira, D.C., Oliveira, C., & Foresti, F. 2011. Chromosome mapping of retrotransposable elements Rex1 and Rex3 in three fish species in the subfamily *Hypoptopomatinae* (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). Cytogenetic and genome research, 132(1-2): 64-70.

Ferreira, R.P., Novaes, C. M., Travenzoli, N. M., Lopes D. M. 2015. Intraspecific variation revealed by chromosomal mapping of microsatellite in stingless bee *Trigona spinipes*. Chromosome Research.130.

Ferreira, R.D.P. 2015. Análise citogenética de abelhas do gênero *Trigona* Jurine, 1807 (Hymenoptera: Meliponini). Dissertação de Doutorado.

Francini, I.B., Gross, M. C., Nunes-Silva, C.G., Carvalho-Zilse, G.A. 2011. Cytogenetic analysis of the Amazon stinglessbee *Melipona seminigra merrillae* reveals different chromosome number for the genus. Scientia Agricola, 68: 592-593.

Green, D.M. 2004. Structure and evolution of B chromosomes in *amphibians*. Cytogenetic and Genome Research, 106: 235–242.

Godoy, D.C., Ferreira, R. P., Lopes, D., M. 2013. Chromosomal Variation and Cytogenetics of *Plebeia lucii* and *P. phrynostoma* (Hymenoptera: Apidae). Florida Entomologist, 96: 1559-1566.

Guerra, M.S. 1988. Introdução à citogenética geral. Rio de Janeiro: Guanabara, 142 p.

Imai, H.T., Taylor, R.W., Crosland, M.W., Crozier, R., H. 1988. Modes of spontaneous chromosomal mutation and karyotype evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis. Japanese Journal of Genetic, 63: 159-185.

Imperatriz-fonseca V.L., Jong, D., Saraiva, A.M. 2006. As abelhas como polinizadores no Brasil: avaliação da situação e sugerindo as melhores práticas. Holos Edição. Ribeirão Preto, p 114.

Jenkins, G., Jones, R.N. 2004. B chromosomes in hybrids of temperate cereals and grasses. Cytogenetic and Genome Research, 106: 314–319.

Jones, R. N., T. 1995. B chromosomes in plants. New Phytologist 131: 411-434

Jones, R.N., 2012. B chromosomes in plants Plant. Biosystems 146: 727–737.

Kerr, W. E., 1948. Estudos sobre o gênero *Melipona*. – Anais da E.S.A. Luiz de Queiroz 5: 182–276.

Kubat, Z., Hobza, R., Vyskot, B., Kejnovsky, E. 2008. Acumulação de microsateélites no cromossomo Y de *Silene latifolia*. Genome 51: 350-356.

Lia, V.V., Confalonieri, V.A., Poggio, L. 2007. Polimorfismo cromossomo B em populações de *milho crioulo*: adaptativo hipótese demográfica vs. de variação clinal. Genética, 177: 895-904.

Li, W.L. Chen, P.D., Qi, L.L. Liu, D.J. 1995. Isolation, characterization and application of a species-specific repeated sequence from *Haynaldia villosa*. Theor. Appl. Genet. 90: 526-533.

Lopes, D.M., Pompolo, S.G., Campos, L.A.O., Tavares, M.G. 2008. Cytogenetic characterization of *Melipona rufiventris* Lepeletier 1836 and *Melipona mondury* Smith 1863 (Hymenoptera, Apidae) by C banding and fluorochromes staining. *Genetics and Molecular Biology*, São Paulo, Vol.31, no.1.

Lopes, D.M., Fernandes, A., Diniz, D., Scudeler, P.E.S., Foresti, F., Campos, L.A.D.O. 2014. Similarity of heterochromatic regions in the stingless bees (Hymenoptera: Meliponini) revealed by chromosome painting. *Caryologia*, 67(3): 222-226.

Marthe, J.D.B., Pompolo, S.D.G., Campos, L.A.D.O., Salomão, T.M.F., & Tavares, M.G. 2010. Cytogenetic characterization of *Partamona cupira* (Hymenoptera, Apidae) by fluorochromes. *Genetics and molecular biology*, 33(2): 253-255.

Martins, C.C.C., Duarte, O.M.P., Waldschmidt, A.M., Alves, R.M.D.O., Costa, M.A. 2009. New occurrence of B chromosomes in *Partamona helleri* (Friese, 1900) (Hymenoptera, Meliponini). *Genetics and molecular biology*, 32(4): 782-785.

Martins, C.C.C., Waldschmidt, M.O., Costa, M.A. 2014. 955 Unprecedented record of ten novel B chromosomes in the stingless bee 956 *Partamona helleri* (Apidae, Meliponini). *Apidologie*, 45(4): 431-439.

Mariano, C.F.S., Pompolo, S.G., Delabie, J.H.C., Campos, L.A.O. 2001. Estudos cariotípicos de algumas espécies neotropicais de *Camponotus Mayr* (Hymenoptera, Formicidae) *Revista Brasileira Entomologia*. 45: 267-274.

Mampumbu, A.R., 2002. Análise citogenética da heterocromatina e da NOR em populações de abelhas sem ferrão *Friesella schrottkyi* (FRIESE, 1900) (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). Magister Scientiae dissertation, Unicamp. Campinas. Brazil.

- Marques, A. Klemme S, Guerra, M. Houben, A. 2012. Cytomolecular characterization of de novo formed rye B chromosome variants. *Molecular Cytogenetics* 5: 34.
- Milani, D., Cabral-de-Mello, D.C. 2014. Microsatellite organization in the grasshopper *Abracris flavolineata* (Orthoptera: Acrididae) revealed by FISH mapping: remarkable spreading in the A and B chromosomes, 9: e97956.
- Michener, CD. 2000. *The Bees of the World*. Baltimore and London The John Hopkins University Press. – 913 S., 48 Farbfotos und zahlr. S/w Illustrationen. ISBN 0-8018-6133-0.
- Miranda, R.V., Fernandes, A. Lopes, D.M., 2013. Karyotype description of *Cephalotrigona femorata* Smith (Hymenoptera: Apidae) and the C-banding pattern as a specific marker for *Cephalotrigona*. *Sociobiology*, 60 (1): 125-127.
- Moure, J.S.D.U., Melo, G.A.R., 2007. *Catalogue of Bees Hymenoptera, Apoidea in the Neotropical Region*. Curitiba: Sociedade Brasileira de Entomologia. 1058 p.
- Moreira-Filho, O., Galetti Jr. P.M., Bertollo, L.A.C., 2004. B chromosomes in the fish *Astyanax scabripinnis* (Characidae, Tetragonopterinae): An overview in natural populations. *Cytogenetic and Genome Research*, 106: 230–234.
- Moure, J.S., Urban, D. Melo, G.A.R. 2007 *Catálogo das Abelhas (Hymenoptera, Apoidea) na Região Neotropical*. Sociedade Brasileira de Entomologia, Curitiba. p. 1058.
- Munoz-Pajares, A.J., Martínez-Rodríguez, L., Teruel, M., Cabrero, J., Camacho, J.P.M., & Perfectti, F. 2011. A single, recent origin of the accessory B chromosome of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Genetics*, 187(3): 853-863.

Oliveira, S.G., de Moura, R.C., & Martins, C. 2012. B chromosome in the beetle *Coprophanæus cyanescens* (Scarabaeidae): emphasis in the organization of repetitive DNA sequences. *BMC genetics*, 13(1), 96.

Palacios-Gimenez, O.M., Cabral-de-Mello, D.C. 2015. Repetitive DNA chromosomal organization in the cricket *Cycloptiloides americanus*: a case of the unusual X1X20 sex chromosome system in Orthoptera. *Molecular Genetics and Genomics*, 290 (2): 623-631.

Pereira, J.O.P. 2006. Diversidade genética da abelha sem ferrão *Melipona quinquefasciata* baseada no sequenciamento das regiões ITS1 parcial e 18S do DNA ribossômico nuclear (Doutoral dissertation, Tese de Doutorado. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará. 142p.

Pedro, S.R.M., Camargo, J.M.F. 1999 "Apoidea apiformes." *Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil*. 5: 195-211.

Pinkel, D., Straume, T., Gray, J.W. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83 (9): 2934-2938.

Pompolo, S.G., Campos, L.A.O. 1995. Karyotypes of two species of stingless bees, *Leurotrigona muelleri* and *Leurotrigona pusilla* Hymenoptera, Meliponinae. *Revista Brasileira de Genética*. v. 18, p. 181-184.

Rocha, M.P., Pompolo, S.G., Campos, L.A.O. 2003. Citogenética da tribo Meliponini (Hymenoptera, Apidae). In: Melo G.A.R., Santos, I.A., *Apoidea Neotropicalis*. Homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure. UNESCO, Santa Catarina, Brasil, pp 311-320.

Rocha, M.P., Cruz, M.P., Fernandes, A. Waldschmidt, A. M., Silva-Junior, J. C., Pompolo, S.G. 2003. Longitudinal differentiation in *Melipona mandacaia* (Hymenoptera, Meliponini) chromosomes. *Hereditas*, 138: 133-137.

Rocha, M.P. 2002. Análises citogenética em abelhas do gênero *Melipona* (Hymenoptera, Meliponinae). Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas.

Rocha-Sanchez, S.M.S. e Pompolo, S.G. 2004. Imitate to integrate reviewing the pathway for B chromosome integration in *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* (Hymenoptera, Sphecidae). *Cytogenetic and Genome Research*, 106(2-4): 398-401.

Spakulova, M. Casanova, J.C. 2004. Current knowledge on B chromosomes in natural populations of helminth parasites: a review. *Cytogenetic and Genome Research*, 106: 222–229.

Silva, M.J.J., Yonenaga-Yassuda, Y. 2004. B chromosomes in Brazilian rodents. *Cytogenetic and Genome Research*, 106: 257–263.

Sumner, A.T. 2003. Chromosomes: organization and function. Blackwell Publishing, London, 287p.

Tosta, V.C., Fernandes-Salomão, T.M., Tavares, M.G., Pompolo, S.G., Barros, E.G., Campos, L.A.O. 2004. A RAPD marker associated with B chromosomes in *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae). *Cytogenetic and Genome Research*, 106 (2-4): 279-283.

Tosta, V.C., Tavares, M.G., Fernandes-Salomão, T.M., Barros, E.G., Campos, L.A.O. Camacho, J.P.M. 2007. Development of a SCAR marker for the analysis of B chromosome presence in *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae). *Cytogenetic and Genome Research*, 116 (1-2): 127-129.

Tosta, V.C., Marthe, J.B., Tavares, M.G., Fernandes-Salomão, T.M., Pompolo, S.G., Recco-Pimentel, S.M., & Camacho, J.P.M. 2014. Possible Introgression of B Chromosomes between Bee Species (Genus *Partamona*). *Cytogenetic and genome research*, 144(3): 217-223.