

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



ESTUDOS CROMOSSÔMICOS EM ABELHAS SEM FERRÃO
(HYMENOPTERA, APIDAE, MELIPONINI) COM ÊNFASE EM
ESPÉCIES DO ESTADO DE MATO GROSSO

ANDERSON MEDEIROS DALBOSCO

ILHÉUS - BAHIA - BRASIL

NOVEMBRO DE 2020
ANDERSON MEDEIROS DALBOSCO

**ESTUDOS CROMOSSÔMICOS EM ABELHAS SEM FERRÃO
(HYMENOPTERA, APIDAE, MELIPONINI) COM ÊNFASE EM
ESPÉCIES DO ESTADO DE MATO GROSSO**

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

Área de concentração: Genética e
Biologia Molecular.

ILHÉUS - BAHIA - BRASIL
NOVEMBRO DE 2020

D137

Dalbosco, Anderson Medeiros.

Estudos cromossômicos em abelhas sem ferrão (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) com ênfase em espécies do Estado de Mato Grosso / Anderson Medeiros Dalbosco. – Ilhéus, BA: UESC, 2020.
viii, 48 f. : il.

Orientador: Marco Antonio Costa.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular.

Referências bibliográficas: f. 43-48.

1. Abelha sem ferrão. 2. Cromossomos. 3. Citogenética. 4. Heterocromatina. I. Título.

CDD 595.799

ANDERSON MEDEIROS DALBOSCO

ESTUDOS CROMOSSÔMICOS EM ABELHAS SEM FERRÃO (HYMENOPTERA,
APIDAE, MELIPONINI) COM ÊNFASE EM ESPÉCIES DO ESTADO DE MATO
GROSSO

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

Área de concentração: Genética e
Biologia Molecular.

APROVADA: 04 de novembro de 2020

Profa. Dra. Josiane Baccarin Traldi
(UFAM)

Prof. Dr. Euvaldo Marciano S. Silva Junior
(CEMAFAUNA - UNIVASF)

Profa. Dra. Olivia Maria Pereira Duarte
(UFSB)

Profa. Dra. Vanderly Andrade Souza
(Sem vínculo)

Profa. Dra. Fernanda Amato Gaiotto
(UESC)

Prof. Dr. Marco Antonio Costa
(UESC - Orientador)

Dedico à minha mãe Maria Salete Medeiros
por todo amor, força, atenção e apoio
que foram indispensáveis a minha
formação pessoal e profissional.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente à Universidade Estadual de Santa Cruz - Campus Soane Nazaré de Andrade pelo acolhimento e pelo ensino de qualidade.

Ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular pela oportunidade de realização deste curso.

A Capes pela bolsa que tornou possível a minha participação neste curso.

A todos os professores e a secretaria do programa por todo o apoio prestado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marco Antônio Costa por todo o apoio, incentivo, paciência e confiança prestada durante todo o desenvolvimento da pesquisa.

A minha Coorientadora prof. Dra. Adriane Barth por uma vez mais me auxiliar, apoiar e incentivar em todos os momentos necessários.

Aos estudantes e colegas de laboratório Vilmara, Cassio e Geovane por todo o auxílio.

Ao meu amigo Migel (Michel Bispo) por todo o apoio, disponibilidade e auxílio indispensável na busca e coleta de todas as colônias usadas neste projeto. Aos meus amigos Fábio e Didi pelo auxílio e disponibilidade no trabalho de coleta de colônias.

A minha namorada Eudelaine por toda paciência e espera durante o período de mestrado.

A FAPEMAT por todo o auxílio financeiro que tornaram as coletas possíveis.

E aos demais que direta ou indiretamente participaram e ou influenciaram em minha formação, deixo aqui o meu muito obrigado.

ÍNDICE

EXTRATO.....	v
ABSTRACT.....	vii
INTRODUÇÃO.....	9
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
<i>CAPÍTULO 1: Análise citogenética de duas espécies do gênero <i>Tetragona</i> Lepeletier & Serville, 1828 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)</i>.....	18
Resumo.....	18
1. Introdução.....	19
2. Materiais e Métodos.....	20
3. Resultados e discussão.....	21
4. Referências Bibliográficas.....	26
<i>CAPÍTULO 2: Caracterização citogenética de <i>Trigona pellucida</i> Cockerell, 1912 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)</i>.....	29
Resumo.....	29
1. Introdução.....	30
2. Materiais e Métodos.....	30
3. Resultados e Discussão.....	32
4. Referências Bibliográficas.....	37
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS COMPLEMENTARES.....	43

EXTRATO

Dalbosco, Anderson Medeiros. M.S. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, novembro de 2020. **Estudos cromossômicos em abelhas sem ferrão (HYMENOPTERA, APIDAE, MELIPONINI) com ênfase em espécies do estado de Mato Grosso.** Orientador: Dr. Marco Antonio Costa. Coorientadora: Adriane Barth.

As abelhas da tribo Meliponini, popularmente conhecidas como abelhas sem ferrão, são agentes que desempenham um importante papel na polinização de plantas nativas e cultivadas. Dada a importância destas abelhas para o meio ambiente, são fundamentais os estudos que ampliem o conhecimento sobre a diversidade de espécies, variabilidade genética e suas implicações evolutivas para esta tribo. O presente estudo teve como objetivo analisar citogeneticamente espécies de abelhas da Tribo Meliponini provenientes da fauna da região de Mato Grosso, até o momento pouco conhecida do ponto de vista citogenético. Neste estudo foram coletadas e analisadas comparativamente amostras das espécies *Tetragona clavipes* (i), *Tetragona dorsalis* (ii) e amostras de diferentes localidades da espécie *Trigona pellucida* (iii). A preparação das lâminas para obtenção dos cromossomos metafásicos foi realizada seguindo a técnica descrita por Imai et al. (1988). Posteriormente foram aplicadas as técnicas de coloração por fluorocromos CMA₃/DAPI e hibridização *in situ* fluorescente (FISH) utilizando sondas de rDNA 18S, sondas teloméricas e sonda microssatélite (GA)₁₅. No estudo comparativo das espécies do gênero *Tetragona* foi observado: (i) para a espécie *Tetragona clavipes* o número cromossômico de 2n=34 com fórmula cariotípica 2K = 32 M-SM + 2 A. Os cromossomos apresentaram predominância de regiões heterocromáticas no braço curto da maioria dos cromossomos. Marcações CMA₃⁺ foram observadas em 15 pares de cromossomos, resultado divergente ao encontrado em estudos anteriores com esta espécie. A hibridização por FISH das sondas de rDNA 18S ocorreu em quatro cromossomos, enquanto a sonda microssatélite (GA)₁₅ revelou marcações nas extremidades de um dos braços de todos os cromossomos da espécie. Um heteromorfismo de tamanho foi observado no primeiro par cromossômico; (ii) *Tetragona dorsalis* também apresentou o número cromossômico de 2n=34 com fórmula cariotípica 2K = 32 M-SM + 2 A. Entretanto, análises anteriores determinaram o número cromossômico de n=18 para esta espécie. Regiões heterocromáticas foram observadas no braço longo da maioria

dos cromossomos. Marcações CMA₃⁺ ocorreram em treze pares de cromossomos e, com padrão heteromórfico, em apenas um dos cromossomos do par dezessete. A FISH com sondas rDNA 18S revelou marcações em quatro cromossomos, e com sonda microssatélite (GA)₁₅ foram, também, visualizadas marcações em apenas um dos braços de todos os cromossomos. Foi observado também um heteromorfismo de tamanho envolvendo o par 17. Na segunda parte deste estudo foi caracterizado o cariótipo de (iii) *Trigona pellucida* de diferentes localidades, que apresentou número cromossômico de 2n=20 e fórmula cariotípica 2k = 18 M-SM + 2 A, resultado divergente das outras espécies do gênero *Trigona* analisados em outros trabalhos, que apresentaram 2n=34 em 11 espécies e 2n=32 em *Trigona braueri*. Para *Trigona pellucida* regiões heterocromáticas foram observadas ao longo do braço curto de seis pares e no braço longo de quatro pares de cromossomos. Marcações CMA₃⁺ foram visualizadas em todos os cromossomos. A FISH com sonda de rDNA 18S revelou uma marcação terminal no braço curto do nono par. Com a FISH usando sondas teloméricas foi observado marcações apenas em regiões terminais no cariótipo. A sonda microssatélite (GA)₁₅ revelou marcações em todos os cromossomos, em três pares as marcações ficaram restritas ao braço longo dos cromossomos, enquanto nos outros sete pares as marcações (GA)₁₅ envolveram a extremidade dos dois braços. Os estudos aqui realizados trazem novas contribuições para o conhecimento citogenético da Tribo Meliponini. A análise comparativa demonstrou que embora o número cromossômico se mantenha conservado em *T. clavipes* algumas variações evidenciam que a espécie esteja sofrendo processos de reorganizações estruturais em seu genoma. Para *T. dorsalis* pudemos confirmar que o número cromossômico da espécie é de 2n=34. Já a caracterização citogenética de *T. pellucida* acrescenta informações relevantes para o gênero *Trigona* e demonstra grandes diferenças cromossômicas numéricas que não foram vistas em outras espécies deste gênero, podendo indicar que *T. pellucida* tenha seguido um caminho evolutivo diferente das outras espécies do gênero *Trigona*.

Palavras-chave: Fluorocromos, FISH, heteromorfismo, heterocromatina

ABSTRACT

Dalbosco, Anderson Medeiros. M.S. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus November 2020. **Chromosomal studies in stingless bees (HYMENOPTERA, APIDAE, MELIPONINI) with an emphasis on species in the state of Mato Grosso.** Advisor: Dr. Marco Antonio Costa. Co-supervisor: Adriane Barth.

Stingless bees are agents that play an important role in the pollination of wild and cultivated plants. Given the importance of these bees to the environment, studies that expand knowledge about species diversity, genetic variability and their evolutionary implications for this tribe are essential. The present study aimed to analyze cytogenetically species of the Meliponini Tribe belonging to the fauna of the state of Mato Grosso, until now little known from the cytogenetic point of view. In this study, samples of *Tetragona clavipes* (i), *Tetragona dorsalis* (ii) and samples from different locations of the species *Trigona pellucida* (iii) were collected and comparatively analyzed. Metaphasic chromosomes were obtained using the technique described by Imai et al. (1988). Subsequently, the techniques of CMA₃/DAPI fluorochromic staining and fluorescent in situ hybridization (FISH), using 18S rDNA probes, telomeric probes and microsatellite probe (GA) 15 were applied. In the comparative study of the species of the genus *Tetragona* it was observed: (i) for *Tetragona clavipes* the chromosome number of $2n = 34$ with karyotypic formula $2K = 32 \text{ M-SM} + 2 \text{ A}$. There was a predominance of heterochromatic regions in the short arm of most chromosomes. CMA₃⁺ markings were observed on 15 pairs of chromosomes, a result that differs from that found in previous studies with this species. FISH hybridization of the 18S rDNA probes occurred on four chromosomes, while the microsatellite probe (GA)15 hybridized at the ends of one of the arms of all chromosomes of the species. A heteromorphism in size was observed in the first chromosome pair; (ii) *Tetragona dorsalis* also presented the chromosome number of $2n = 34$ with karyotype formula $2K = 32 \text{ M-SM} + 2 \text{ A}$. However, previous analyzes determined the chromosome number of $n = 18$ for this species. Heterochromatic regions were observed in the long arm of most chromosomes. CMA₃⁺ markings occurred on thirteen pairs of chromosomes, with a heteromorphic pattern on the chromosomes of pair seventeen. FISH with 18S rDNA probes marked four chromosomes, and with microsatellite probe (GA) 15, markings were also visualized on only one arm of all chromosomes. A size heteromorphism was also observed in the 17th chromosomal pair. In the second part of this study (iii) the

karyotype of *Trigona pellucida* from different locations showed a chromosome number of $2n = 20$, and a karyotype formula $2k = 18 \text{ M-SM} + 2 \text{ A}$, a result that is different from other species of the genus *Trigona* analyzed in other studies. , which presented $2n = 34$ in 11 species and $2n = 32$ in *Trigona braueri*. For *Trigona pellucida* heterochromatic regions were observed along the short arm of six pairs and on the long arm of four pairs of chromosomes. CMA3 + markings were visualized on all chromosomes. FISH with the 18S rDNA probe revealed a terminal marking on the short arm of the 9th pair. FISH using telomeric probes showed markings only in terminal regions on the karyotype. The microsatellite probe (GA)₁₅ revealed markings on all chromosomes, in three pairs the markings were restricted to the long arm of the chromosomes, while in the other seven pairs the markings (GA)₁₅ marked the end of both arms. The studies performed here bring new contributions to the cytogenetic knowledge of the Meliponini Tribe. The comparative analysis showed that although the chromosome number remains conserved in *T. clavipes*, some variations show that the species is undergoing structural reorganization processes in its genome. For *T. dorsalis* we could confirm that the chromosome number of the species is $2n = 34$. The cytogenetic characterization of *T. pellucida* adds relevant cytogenetic information for the genus *Trigona* and demonstrates greater numerical karyotype differences that were not seen in other species of this genus, which may indicate that *T. pellucida* has followed a different evolutionary path from the other species of the genus *Trigona*.

Keywords: Fluorochromes, FISH, heteromorphism, heterochromatin

INTRODUÇÃO

O estado do Mato Grosso compreende três biomas em seu território, Amazônia, Cerrado e Pantanal. Juntos Amazônia e Cerrado abrangem 72% do território brasileiro e 92% da área mato-grossense (IBGE, 2019), contando com uma ampla biodiversidade que apesar de ser muito estudada, devido a sua grandeza, pode ser considerada pouco conhecida. As abelhas sem ferrão, integrantes da tribo Meliponini, formam um grupo amplamente distribuído nestes biomas, possuindo uma importante função na manutenção de formas de vida vegetal e animal, por atuar como principais polinizadores de espécies vegetais nativas e cultivadas. Além disso, os meliponíneos desempenham grande importância econômica e cultural, através do extrativismo do mel e pólen (KERR et al., 2001).

Os representantes das abelhas sem ferrão estão distribuídos por quase todo o planeta, no entanto, a maior diversidade de meliponíneos encontra-se na região Neotropical (COSTA et al. 2003), que apresenta um total de 418 espécies já identificadas, sendo que no Brasil, já foram catalogadas 244 espécies de meliponíneos (CAMARGO; PEDRO 2013; PEDRO, 2014). As ações de desmatamento e queimadas principalmente ligadas a ampliação da agricultura coloca em risco a existência de muitas colônias, o que prejudica não só a manutenção dos ecossistemas, mas também a polinização da própria produção agrícola (KERR et al., 2001; MESSINGER et al., 2016).

Os primeiros estudos citogenéticos com a Tribo Meliponini abordavam apenas o número cromossômico das espécies (KERR, 1948). Com o avanço nas pesquisas, novas técnicas citogenéticas mais informativas e de maior resolução foram desenvolvidas e passaram a ser aplicadas, como o uso de fluorocromos e citogenética molecular, permitindo assim um maior detalhamento sobre a constituição e morfologia cromossômica nos meliponíneos (FERNANDES; BARTH; SAMPAIO, 2013, LOPES et al., 2014; MARTINS et al., 2013).

O gênero *Tetragona* Lepeletier & Serville, 1828 compreende um total de 13 espécies, das quais 8 ocorrem no Brasil, com predominância de espécies em regiões do bioma Amazônia (CAMARGO; PEDRO, 2013). *Tetragona clavipes* (Fabricius, 1804) apresenta grande apelo comercial com produtos como mel e própolis. Entre as espécies deste gênero apenas quatro foram analisadas citogeneticamente (KERR, 1969; ROCHA et al., 2003; TARELHO, 1973).

O gênero *Trigona* Jurine, 1807 apresenta um total de 32 espécies das quais 21 ocorrem no Brasil. Sua distribuição é ampla, ocorrendo por quase todo o território nacional (CAMARGO; PEDRO, 2013, PEDRO, 2014). As espécies do gênero são importantes polinizadoras de culturas como a manga e a acerola (GIANNINI et al., 2014). Estudos citogenéticos com o gênero *Trigona* foram realizadas até o momento em doze espécies (COSTA et al., 2004; DOMINGUES et al., 2005; FERNANDES; BARTH; SAMPAIO, 2013; FERREIRA, 2015; KERR, 1969; ROCHA et al., 2003; SILVEIRA, 1972; TARELHO, 1973; WALDSCHMIDT et al., 2005). Ninhos de *Trigona pellucida* Cockerell, 1912 foram encontrados nos estados de Mato Grosso, Pará e Rondônia (CAMARGO; PEDRO, 2013).

Considerando a importância e diversidade dos meliponíneos para o meio ambiente, a produção de estudos citogenéticos são de grande relevância para o entendimento de possíveis mecanismos envolvidos na evolução do cariótipo, podendo contribuir com o desenvolvimento de estratégias que visem a preservação do grupo e do ambiente em que vivem.

A proposta deste trabalho foi realizar estudos com a aplicação de citogenética clássica e molecular em espécies dos gêneros *Tetragona* e *Trigona* pertencentes da fauna do estado de Mato Grosso. O estudo teve como objetivos específicos:

- Obter amostras de abelhas do gênero *Trigona* e *Tetragona* no estado de Mato Grosso;
- Descrever o cariótipo das espécies coletadas e consequentemente ampliar as informações citogenéticas nestes gêneros.
- Comparar os dados obtidos neste estudo com outros estudos anteriores que envolvam os gêneros analisados;
- Inferir relações evolutivas entre as espécies com base nas diferenças e similaridades cariotípicas observadas, assim como sobre a evolução cariotípica nestes gêneros.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Características gerais das abelhas e da tribo Meliponini

As abelhas constituem o maior grupo dentro da ordem Hymenoptera, que também compreende as formigas e as vespas e, assim como os demais Hymenoptera, apresenta o sistema de determinação do sexo por haplodiploidia, no qual os machos haploides são originados a partir de ovos não fecundados através de partenogênese, e as fêmeas diploides se originam de ovos fecundados (MICHENER, 2007). Acredita-se que as abelhas surgiram a partir das vespas, há aproximadamente 125 milhões de anos, concomitante à grande radiação das plantas com flores que ocorreu entre 130 a 90 milhões de anos (CRANE; FRIIS; PEDERSEN, 1995; WING; BOUCHER, 1998).

São consideradas como fundamentais e principais polinizadores de várias espécies vegetais, o que pode ser explicado pela sua alta dependência de recursos florais, como o pólen e o néctar durante todos os estágios de sua vida (BAWA, 1990). Esta característica também as diferencia da maioria dos outros integrantes da ordem Hymenoptera, que se utilizam quase exclusivamente da captura de outros artrópodes para alimentação (SILVEIRA; MELO; ALMEIDA, 2002). No planeta existem mais de 20.000 espécies de abelhas, distribuídas principalmente nas regiões tropical e subtropical (MICHENER, 2007).

Os integrantes da tribo Meliponini são popularmente conhecidos como abelhas sem ferrão, devido ao fato de seu ferrão ser atrofiado, o que lhes impossibilita utilizar deste recurso para defesa (OLIVEIRA et al., 2013).

Na região Neotropical, foram catalogadas 418 espécies de Meliponini, distribuídas em 34 gêneros, enquanto no Brasil são conhecidas 244 espécies, distribuídas em 29 gêneros (CAMARGO; PEDRO 2013; PEDRO, 2014; MELO, 2016).

Os representantes da tribo Meliponini são abelhas sociais, formando colônias permanentes compostas por milhares de indivíduos. Seus ninhos são construídos em uma variedade de substratos, podendo se alojar em ocos e galhos de árvores, no solo, colmos de bambu, hastes florais, cavidades pré-existent em paredes, entre outros. Os ninhos geralmente são construídos utilizando cera, resina e barro e o tamanho pode ser variável, dependendo da quantidade de indivíduos na colônia de cada espécie e espaço disponível no local da nidificação (MICHENER, 2007).

Os meliponíneos são importantes integrantes da biodiversidade e do ecossistema brasileiro, atuando como polinizadores, de árvores nativas e cultivos agrícolas economicamente importantes (GIANNINI et al., 2015; KERR et al., 2001). Apesar de possuírem preferência por determinadas plantas, as abelhas sem ferrão costumam visitar várias espécies de flores. Seus ninhos são duráveis e muitas espécies são utilizadas de forma racional para a produção de mel, própolis, geoprópolis e o pólen, sendo a criação de suas colônias uma atividade muito atrativa comercialmente (HEARD, 1999; ROUBIK, 2006; SILVA, 2002).

Os biomas mato-grossenses

O estado de Mato Grosso abrange os biomas Amazônia, Cerrado e Pantanal em seu território. Amazônia é o bioma que compreende a maior extensão territorial no Brasil, estando presente em cerca de 49% do território nacional e 53% da área do estado de Mato Grosso. Seu clima é úmido e quente, com chuvas bem distribuídas durante todo o ano (IBGE, 2019). A biodiversidade do Bioma Amazônia, devido a sua vasta extensão territorial, ainda pode ser considerada pouco conhecida. Só entre 1999 e 2009 foram descobertas mais de 1.200 novas espécies na Amazônia, o que demonstra a grandeza da biodiversidade ainda desconhecida neste bioma (WWF, 2010).

O bioma Cerrado é o segundo maior bioma em extensão territorial tanto no Brasil como no estado de Mato Grosso, estando presente em aproximadamente 23% do território nacional e em 39% do território mato-grossense (IBGE, 2019). O clima neste bioma é tipicamente sazonal, devido aos regimes pluviais (PROENÇA; OLIVEIRA; SILVA, 2000). É considerada uma das regiões de maior biodiversidade do planeta, contando com mais de 160 mil espécies, sendo o grupo dos insetos o mais numeroso, ultrapassando as 90 mil espécies já encontradas (RATTER; RIBEIRO; BRIDGEWATER, 1997; MMA, 2016). Em estudos realizados com a biologia floral do Cerrado e análise de inventários base, foi estipulado a existência de 494 espécies de abelhas, distribuídas em cinco famílias, sendo a família Apidae a mais numerosa, compreendendo um total de 58% das abelhas do Cerrado (SANTOS, 2009).

O bioma Pantanal está presente apenas nos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, ocupando cerca de 2% do território brasileiro. Sua vegetação se assemelha à Caatinga, ao Cerrado e a pequenas áreas de floresta Amazônica e à

mata Atlântica, mas o que o diferencia destes biomas são suas planícies de inundação contínua, que são as maiores do planeta. Nos períodos de inundações, boa parte da fauna se refugia em áreas mais elevadas, retornando logo após as águas baixarem. Apesar de se assemelhar com biomas vizinhos, muitas espécies que vivem no entorno não ingressam na planície pantaneira, desta forma, o Pantanal pode atuar como barreira ecológica e corredor de dispersão de muitas espécies (FERNANDES; SIGNOR; PENHA, 2010; IBGE, 2019).

A Amazônia e o Cerrado, além de apresentarem ampla biodiversidade, também apresentam em comum um forte avanço na perda de habitats naturais, que são causados principalmente por ações de queimadas e desmatamento, sendo a ampliação da agropecuária um dos principais motivos que levam a estas ações (MMA, 2016). As abelhas sem ferrão não apresentam mecanismos que permitam deslocar as colônias em casos de destruição do ambiente, o que ocasiona na perda de colônias inteiras. Além do desmatamento e das queimadas, o uso indiscriminado de inseticidas em conjunto com a falta de preparo e conhecimento sobre a criação de maneira racional de meliponíneos vêm contribuindo para a redução de muitas colônias nos ambientes naturais, prejudicando a manutenção dos ecossistemas (KERR et al., 2001). Estas ações refletem diretamente na produção agrícola que com a polinização menos eficiente sofre com quedas na qualidade e quantidade dos frutos gerados (MESSINGER et al., 2016).

Com grande importância para o meio ambiente, estudos que acrescentem dados sobre a variabilidade genética, a riqueza de espécies e a compreensão dos fatores evolutivos dos meliponíneos são fundamentais, uma vez que estas abelhas se distribuem amplamente ao longo dos biomas mato-grossenses e apresentam papel fundamental para a manutenção dos ecossistemas ali presentes. Estes estudos podem auxiliar também na elaboração de políticas e estratégias que visam a preservação deste grupo, auxiliando na preservação dos ambientes em que estas vivem.

A Citogenética da Tribo Meliponini

A Citogenética é uma ciência que reúne estudos envolvendo a estrutura, função, variação e evolução dos cromossomos. As informações provenientes de análises citogenéticas têm sido amplamente usadas para auxiliar na compreensão da

filogenia de diversos grupos e também na separação de espécies que são morfologicamente semelhantes (GUERRA, 1988; SUMNER, 2003).

Os estudos citogenéticos com a tribo Meliponini iniciaram-se com Kerr (1948), que determinou o número cromossômico de algumas das espécies do gênero *Melipona* Illiger, 1806. No entanto, neste estudo foi utilizada a técnica de esmagamento para fixação do material biológico em lâminas, que apresentava baixa resolução.

Imai, Taylor e Crozier (1988) desenvolveram a técnica de fixação de cromossomos com secagem ao ar, que permite uma boa resolução para caracterização dos cromossomos. Esta técnica permitiu uma melhor visualização dos cromossomos de himenópteros e favoreceu a citogenética das abelhas. A maioria dos dados citogenéticos de abelhas sem ferrão foram levantados com o uso de técnicas de bandeamento clássicas (BRITO; POMPOLO, 1997; COSTA et al., 1992; COSTA; BRITO; MIYAZAWA, 2004; DOMINGUES et al., 2005; POMPOLO; CAMPOS, 1995).

Com o avanço nas pesquisas, novas técnicas citogenéticas de maior resolução e mais informativas passaram a ser aplicadas, como o uso de fluorocromos e hibridização in situ, permitindo assim um maior detalhamento sobre a morfologia e constituição cromossômica das abelhas sem ferrão (FERNANDES; BARTH; SAMPAIO, 2013; LOPES et al., 2014; MARTINS et al., 2013). As Técnicas de citogenética molecular são mais sensíveis na detecção de polimorfismos em organismos que apresentam constância em seu número cromossômico, quando comparadas com as técnicas de citogenética clássica (DUARTE et al., 2009; GODOY; FERREIRA; LOPES, 2013; MAMPUMBU, 2002).

O uso de sondas de rDNA e sequências repetitivas tem gerado dados importantes sobre a organização do genoma em eucariotos (CABRAL-DE-MELO et al., 2011; CIOFI; KEJNOVSKY; BERTOLLO, 2011; CUADRADO; CARDOSO; JOUVE, 2008; CUADRADO; JOUVE, 2011; KAVALCO et al., 2013; PALACIOS-GIMENEZ; CABRAL-DE-MELO, 2015), servindo de ferramenta útil em estudos evolutivos (CABRAL-DE-MELO et al., 2011; NGUYEN et al., 2010) e na diferenciação entre cromossomos supranumerários e autossômicos (MILANI; CABRAL-DE-MELO, 2014).

Em revisão realizada por Tavares, Lopes e Campos (2017) foram citadas 104 espécies de meliponíneos caracterizadas citogeneticamente. Trabalhos posteriores realizados por Andrade-Souza et al. (2018) e Novaes (2019) elevaram o número de

espécies para 107, representando 26% das espécies de meliponíneos da região neotropical cariotipadas. Os gêneros *Melipona* (23 espécies), *Trigona* (12 espécies) e *Partamona* (11 espécies), são os mais estudados entre os meliponíneos, enquanto os gêneros *Aparatrigona*, *Meliwillea*, *Nogueirapis*, *Paratrigonoides*, *Schwarzula* e *Trichotrigona* até o momento não apresentam nenhuma espécie analisada citogeneticamente.

Evolução cromossômica em Meliponini

Para tentar explicar as alterações cariotípicas relacionadas ao número e a estrutura cromossômica dos meliponíneos, dois caminhos evolutivos foram propostos. O primeiro deles foi sugerido por Kerr e Silveira (1972) que considerava eventos de poliploidia que surgiram de forma independente em diferentes gêneros, como o principal evento responsável pela evolução cromossômica das abelhas. Através de novos estudos citogenéticos, a teoria de poliploidia tem perdido força em prol da Teoria da Interação Mínima (HOSHIBA; IMAI, 1993; IMAI et al., 1994, 2001) que pressupõe fissão e fusão cêntricas como principais mecanismos envolvidos na evolução cromossômica em diversos grupos de himenópteros (HOSHIBA; IMAI, 1993).

A Teoria da Interação Mínima propõe que a evolução do cariótipo favorece um aumento no número de cromossomos através de fissão cêntrica, resultando em uma redução no tamanho dos cromossomos e, após a fissão, o crescimento em tandem da heterocromatina tende a ocorrer nos pontos de quebra, restaurando a estabilidade dos telômeros (IMAI et al., 1994, 2001). Com base na Teoria da Interação Mínima, o ancestral comum dos meliponíneos possuiria um número baixo de cromossomos, os quais aumentariam ao longo do tempo através de processos de fissões com subsequente aumento da heterocromatina (COSTA; BRITO; MIYAZAWA, 2004; GODOY; FERREIRA; LOPES, 2013; KRINSKI et al., 2010; MIRANDA; FERNANDES; LOPES, 2013). Também poderiam ocorrer reduções no número de cromossomos através de eventos de fusão cêntrica, que atuaria como um mecanismo de eliminação de heterocromatina constitutiva (HOSHIBA; IMAI, 1993; IMAI et al., 1988, 2001)

Análises filogenéticas realizadas por Rasmussen e Cameron (2010) reconhecem a presença de três clados distintos na linhagem Neotropical da Tribo

Meliponini: *Trigonisca s.l.*, *Melipona s.l.* e “demais meliponíneos neotropicais. Tavares, Lopes e Campos (2017), ao realizar uma revisão sobre a citogenética desta tribo, observaram que o número haploide de cromossomos dos seus integrantes variava entre $n=8$ a $n=18$, formando três grupos principais, com $n=9$, $n=15$ e $n=17$.

O número cromossômico de $n=17$ é o mais frequente na Tribo Meliponini sendo encontrado na maioria dos gêneros presentes no grupo dos demais meliponíneos neotropicais. Os cariótipos com $n=9$ foram visualizados apenas nos integrantes do clado *Melipona s.l.*, sendo esta uma característica do grupo. Em três subespécies de *Melipona seminigra* foi observado o número cromossômico haploide de $n=11$, indicando a ocorrência de fissão de dois cromossomos (ANDRADE-SOUZA et al., 2018). O conjunto haploide de $n=15$ foi observado em seis gêneros, sendo os gêneros *Celetrigona*, *Trigonisca* e *Leurotrigona* pertencentes ao clado *Trigonisca s.l.* e *Geotrigona*, *Duckeola* e *Frieseomelitta* ao clado dos “demais meliponíneos neotropicais”. Esta observação pode demonstrar que o cariótipo de $n=15$ surgiu de forma independente mais de uma vez durante a história evolutiva da Tribo Meliponini (TAVARES; LOPES; CAMPOS, 2017).

Considerando que os cariótipos com alto número de cromossomos são os mais comuns na tribo Meliponini, sugere-se que o ancestral comum do cariótipo de todos os meliponíneos tenha um número cromossômico elevado ($n=17-20$) e que este número pode ter sido mantido em alguns grupos. Os cariótipos com números haploides inferiores a $n=17$ podem ter se originado através de fusões cêntricas, o que poderia ajudar a explicar os cariótipos encontrados nas espécies dos clados *Trigonisca s.l.* e *Melipona s.l.* As análises citogenéticas realizadas até o momento com os meliponíneos da região Neotropical corroboram, com base no número cromossômico, com a filogenia proposta por Rasmussen e Cameron (2010) (TAVARES; LOPES; CAMPOS, 2017).

Em geral o número cromossômico das espécies de um mesmo gênero tende a ser conservado, mas alguns outros aspectos citogenéticos como a morfologia dos cromossomos, a quantidade e a disposição de heterocromatina e eucromatina podem apresentar variações, que são importantes para auxiliar em análises evolutivas e taxonômicas desta tribo (BARTH et al., 2011; BRITO, 1998; DUARTE; MARTINS; WALDSCHMIDT, 2009; LOPES et al., 2014; MIRANDA, 2012; MIRANDA et al., 2013; ROCHA et al., 2002). Desta forma, a aplicação de técnicas de citogenética clássica e

molecular podem resultar em dados importantes, que podem ser usados em estudos envolvendo a comparação de processos evolutivos que talharam a diversificação dos meliponíneos.

Cromossomos supranumerários também denominados de cromossomos B também foram visualizados em 6 espécies de três diferentes gêneros de meliponíneos (TAVARES; LOPES; CAMPOS, 2017).

Apesar da Teoria da Interação Mínima ser a mais citada para explicar a evolução dos meliponíneos, em alguns casos diversos tipos de rearranjos cromossômicos precisam ser considerados para explicar algumas variações (TAVARES; LOPES; CAMPOS, 2017).

CAPÍTULO 1: Análise citogenética de duas espécies do gênero *Tetragona* Lepeletier & Serville, 1828 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)

Resumo

O gênero *Tetragona* é composto por treze espécies das quais oito tem registro de ocorrência no Brasil; destas apenas quatro possuem dados citogenéticos disponíveis em literatura. Neste estudo, técnicas de coloração convencional com Giemsa, coloração sequencial com fluorocromos CMA₃/DAPI e FISH com sondas de rDNA 18S e microssatélite (GA)₁₅ foram utilizadas para caracterizar os cariótipos das espécies *Tetragona clavipes* e *Tetragona dorsalis*, provenientes do estado do Mato Grosso. *Tetragona clavipes* apresentou o número cromossômico de 2n=34, com fórmula cariotípica diploide 2K = 32 M-SM + 2A, e predominância de regiões heterocromáticas no braço curto da maioria dos cromossomos. Regiões ricas em pares de bases GC foram observadas em 15 dos 17 pares de cromossomos. A fórmula cariotípica e os resultados obtidos com fluorocromos CMA₃/DAPI divergiram dos observados em estudos anteriores. Com a hibridização fluorescente *in situ* de sondas de rDNA 18S, foram observadas quatro marcações terminais no braço curto de dois pares de cromossomos. Utilizando sondas microssatélites (GA)₁₅ as hibridizações ocorreram em todos os cromossomos, restritas às extremidades de um dos braços. Em *Tetragona clavipes* também foi observado um heteromorfismo de tamanho no primeiro par cromossômico. *Tetragona dorsalis* apresentou o número cromossômico de 2n=34 com fórmula cariotípica diploide 2K = 32 M-SM + 2 A, e regiões heterocromáticas nos braços longos da maioria dos cromossomos. Marcações de regiões ricas em GC foram visualizadas em 13 pares de cromossomos e na região terminal do braço curto de apenas um dos cromossomos do par 17, neste par também foi visualizado um heteromorfismo de tamanho cromossômico. A sonda de rDNA 18S hibridizou gerando marcações em quatro cromossomos, sendo que dois cromossomos marcaram em regiões terminais no braço curto e outros dois cromossomos marcaram em regiões intersticiais do braço longo. A sonda do microssatélite (GA)₁₅ gerou o padrão de marcações em apenas um dos braços de todos os cromossomos de *Tetragona dorsalis*. A análise comparativa das duas espécies demonstra que, embora o número

cromossômico dentro do gênero seja conservado, existem diferenças consideráveis entre os cariótipos destas.

Palavras-chave: abelhas sem ferrão, fluorocromos, número cromossômico, Hibridização Fluorescente in situ

1. Introdução

O gênero *Tetragona* Lepeletier & Serville, 1828 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) compreende um total de 13 espécies distribuídas do México até o sudeste do Brasil, com predominância de espécies em regiões de bioma Amazônia (CAMARGO & PEDRO, 2013). Oito das 13 espécies de *Tetragona* ocorrem no Brasil: *Tetragona clavipes* Fabricius, 1804; *Tetragona dorsalis* Smith, 1854; *Tetragona essequiboensis* Schwarz, 1940; *Tetragona goettei* Friese, 1900; *Tetragona handlirschi* Friese, 1900; *Tetragona kaieteurensis* Schwarz, 1938; *Tetragona quadrangula* Lepeletier, 1836 e *Tetragona truncata* Moure, 1971 (CAMARGO & PEDRO, 2013). Assim como outras espécies de abelhas sem ferrão da tribo Meliponini, durante as visitas as plantas para coletas de pólen e néctar para produção de mel, estas abelhas desempenham importante trabalho de polinização, o que as tornam espécies com apelo comercial e um atrativo para a sua criação e manejo.

Tetragona clavipes é uma espécie que apresenta colônias bem populosas, podendo produzir uma grande quantidade de mel e própolis (CORTOPASSI-LAURINO et al., 2006). É conhecida popularmente como abelha “borá” e, no Brasil, seus ninhos já foram encontrados em quase todos os estados, do Amazonas ao Rio grande do Sul (SILVEIRA et al., 2002; CAMARGO & PEDRO, 2013). *Tetragona dorsalis*, popularmente conhecida como abelha “boca de vidro” é menos conhecida quanto ao seu potencial de utilização comercial. Sua ocorrência parece estar restrita entre o estado do Amazonas e o Mato Grosso (SILVEIRA et al., 2002; CAMARGO & PEDRO, 2013).

Estudos citogenéticos foram realizados, até o presente, em apenas quatro das 13 espécies descritas de *Tetragona*. Os números cromossômicos $n=17$ e $2n=34$ foram registrados em *T. clavipes* em amostras de localidades nos Estados de São Paulo e Minas Gerais (ROCHA et al., 2003; TARELHO, 1973), $n=17$ em *T. quadrangula* de localidades de Goiás e São Paulo (TARELHO, 1973), $n=17$ em *T. truncata* de Goiás (TARELHO, 1973) e $n=18$ em *T. dorsalis* de localidade não conhecida (KERR, 1969).

A maioria dos estudos anteriores envolveram basicamente análises de citogenética clássica com coloração convencional. Em alguns casos, ainda foram utilizadas técnicas de preparação de lâminas por esmagamento, de menor poder de resolução para cromossomos de abelhas (TARELHO, 1973; KERR, 1969). *Tetragona clavipes* é a única com dados de coloração com fluorocromos (ROCHA et al., 2003).

O acúmulo e a reavaliação por novas técnicas de dados citogenéticos sobre as espécies de abelhas são importantes para subsidiar as análises citotaxonômicas, filogenéticas e evolutivas no grupo. Neste estudo, novas amostragens e técnicas citogenéticas clássicas e moleculares foram realizadas com as espécies *T. clavipes* e *T. dorsalis*, com a finalidade de se obter novos caracteres citogenéticos de melhor resolução para as duas espécies.

2. Materiais e Métodos

Foram coletadas amostras de favos contendo pré-pupas de um ninho de *T. clavipes* (11°30'12.5" S 58°34'37.5" W) e um ninho *T. dorsalis* (11°31'45.0" S 58°49'00.2" W) diretamente na natureza no município de Juína no estado de Mato Grosso. Os espécimes identificados pelo Dr. Gabriel A. R. Melo foram depositados na Coleção Entomológica Pe. J. S. Moure da Universidade Federal do Paraná (DZUP), Curitiba, Brasil.

A preparação das lâminas para a obtenção dos cromossomos metafásicos e coloração convencional com Giemsa foram feitas pela maceração individual de gânglio cerebral de pré-pupas, segundo a técnica descrita por Imai et al. (1988). A coloração com fluorocromos CMA₃/DAPI seguiu o protocolo de Schweizer (1980).

A técnica de FISH foi realizada seguindo o protocolo de Pinkel et al. (1986), com estringência de 77%. A sonda de rDNA 18S foi amplificada por reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se o kit de Taq polimerase (Fermentas) conforme recomendações do fabricante e com uso dos primers 629F AAAGCTCGTAGTTGAATCTGTG e 1300R CTGGTGAGGTTTCCCGT TTG (WARD; DOWNIE, 2005). Os produtos resultantes da PCR foram marcados com biotina utilizando o kit de BioNick™ Labeling System da Invitrogen®. Para a detecção do sinal o material foi incubado com Estreptavidina-FITC (Vector).

A sonda microssatélite (GA)₁₅ foi marcada diretamente com 6-Carboxytetramethyl Rhodamine (TAMRA) durante a sua síntese pela Sigma (Sigma-

Aldrich, MO, USA). Todas as lâminas de FISH foram montadas usando Antifading Vectashield (Vector laboratories) contendo DAPI.

Foram analisadas o mínimo de dez indivíduos por colônia e o mínimo de dez metáfases por lâmina. As metáfases foram analisadas e fotografadas em um Microscópio de Epifluorescência Olympus BX51 com câmera Olympus DP72 e software Image-Pro Plus, Versão 6.3. Os cariótipos foram editados no software Adobe Photoshop CC 20. Os cromossomos foram organizados nos cariogramas em ordem decrescente de tamanho com o auxílio do software ImageJ 1.52a, utilizado para determinar a razão entre os braços cromossômicos e classificar conforme a nomenclatura proposta por Levan et al. (1964).

3. Resultados e discussão

As duas espécies analisadas neste trabalho apresentaram o número cromossômico diploide de $2n=34$ e fórmula cariotípica diploide de $2K = 32 \text{ M-SM} + 2 \text{ A}$, entretanto, foram observadas diferenças interespecíficas na morfologia cromossômica (Figura 1).

Kerr (1969) relatou o número cromossômico de $n=18$ para *T. dorsalis*. Nenhuma análise posterior resgatou este número em *Tetragona* (ROCHA et al., 2003; TARELHO, 1973). Esta diferença, provavelmente pode ser atribuída a um artefato de técnica, uma vez que naquele estudo foi utilizada a técnica de esmagamento para coloração convencional. Esta técnica geralmente apresenta baixa resolução devido ao menor espalhamento dos cromossomos. A técnica de secagem ao ar utilizada atualmente oferece boa resolução conforme observada nos presentes resultados e na maioria dos estudos (BARBOSA, 2018; BARTH et al., 2011; BRITO, 1998; FERREIRA, 2015; IMAI et al., 1988; ROCHA et al., 2003; TRAVENZOLI et al., 2019) desenvolvidos com abelhas depois de Kerr (1969). Desta forma confirma-se a determinação com segurança do número $2n=34$ ($n=17$) para esta espécie, mas um aumento de amostragem nos pontos de distribuição da espécie analisada no estudo anterior, no entanto, pode trazer novidades quanto a isso e não deve ser descartada.

Tetragona clavipes apresentou segmentos heterocromáticos no braço curto de 12 pares cromossômicos (pares 1 ao 9, 11, 13 e 15) e no braço longo dos pares 14, 16 e 17. Os pares 10 e 12 são totalmente eucromáticos (Figura 1A e 1C). Em um estudo anterior, Rocha et al. (2003) ao analisarem uma colônia de *T. clavipes* de

Viçosa-MG, observaram segmentos heterocromáticos presentes no braço curto de 14 pares de cromossomos, no braço longo de dois pares e por toda a extensão de um par de cromossomos. Apesar de Rocha et al. (2003) classificarem os cromossomos usando nomenclatura cromossômica diferente (*i.e.* IMAI et al. 1988) para *T. clavipes*, observamos diferenças na fórmula cariotípica, visto que o estudo anterior registrou seis cromossomos acrocêntricos, tendo este número diminuído para dois cromossomos (par 10) em nossas amostras. Também foram observadas diferenças quando a distribuição de heterocromatina em alguns pares de cromossomos, e a presença de dois pares de cromossomos totalmente eucromáticos sem correspondentes no estudo anterior. Os dois cromossomos totalmente heterocromáticos observados por Rocha et al. (2003) não apresentaram correspondentes com este estudo. Variações intra-específicas são indicadas por estes resultados pelas incongruências observadas em *T. clavipes*, visto que as amostras do presente estudo e o de Rocha et al. (2003) foram coletadas em locais distintos.

O primeiro par cromossômico de *T. clavipes* apresentou heteromorfismo de tamanho nas amostras analisadas, sendo o primeiro cromossomo o maior do cariótipo e seu par mais curto. Este heteromorfismo de tamanho também foi observado nos cariótipos apresentados por Rocha et al. (2003).

A distribuição de segmentos heterocromáticos em *T. clavipes* diferiu substancialmente de *T. dorsalis*, espécie na qual apresentou regiões heterocromáticas nos braços longos da maioria dos cromossomos. *Tetragona dorsalis* apresentou sete pares cromossômicos com heterocromatina nos braços curtos (pares 1, 2, 5, 6, 7, 10 e 17) e em nove pares nos braços longos (pares 3, 4, 8, 9, 11, 12, 14, 15 e 16). O par 13 é predominantemente eucromático em toda sua extensão. O par 17 apresentou um heteromorfismo de tamanho (Figura 1B e 1D).

Os resultados da coloração com fluorocromos CMA₃/DAPI para a espécie *T. clavipes* também foram divergentes do encontrado por Rocha et al. (2003), que observaram marcações CMA₃⁺ na região terminal de três pares de cromossomos, enquanto neste trabalho foram observadas marcações CMA₃⁺ em 15 pares de cromossomos (Figuras 2A, 2C e 3A), sendo oito pares com marcações em regiões terminais (pares 1, 4, 6, 9, 10, 13, 14 e 17), três pares com marcações terminais em ambos os braços cromossômicos (2, 7 e 12) e três pares com marcações em regiões intermediárias e terminais dos cromossomos (5, 8 e 11). O par 3 foi o único par a

apresentar marcações terminais em ambos os braços cromossômicos e uma marcação intermediária no braço longo. Os pares 6 e 7 apresentaram toda a extensão do braço longo marcado por CMA₃⁺, enquanto o par 8 apresentou marcação CMA₃⁺ por toda a extensão do braço curto.

Estas observações indicam que apesar do número cromossômico ser conservado na espécie *T. clavipes*, divergências entre a disposição da cromatina e regiões ricas em pares de base GC podem indicar que a espécie esteja sofrendo um processo de reorganização estrutural no genoma através de rearranjos envolvendo estas regiões.

Em *T. dorsalis* (Figura 2B, 2D e 3B) observou-se marcações CMA₃⁺ em 13 pares e em um cromossomo do par 17, sendo sete pares com marcações apenas nas regiões terminais (pares 2, 4, 6, 8, 9, 10 e 15), cinco pares com marcações em regiões intermediárias e terminais dos cromossomos (1, 3, 5, 12 e 14) e o par 11 com marcações terminais em ambos os braços cromossômicos. Nos pares 7, 13 e 16 não foram observadas marcações CMA₃. A marcação CMA₃⁺ existente na região terminal de apenas um cromossomo do par 17 está relacionada com o heteromorfismo de tamanho observada neste par, indicando que vem ocorrendo um rearranjo nesta região do par cromossômico.

A técnica de FISH com sonda ribossomal 18S revelou quatro marcações em regiões terminais do braço curto de dois pares de cromossomos em *T. clavipes* (Figura 4A), que coincidem com uma das marcações CMA₃⁺ observadas nos pares 2 e 4. *Tetragona dorsalis* também apresentou quatro marcações em dois pares de cromossomos, sendo duas em regiões terminais no braço curto e duas em regiões intermediárias do braço longo (Figura 4B), que correspondem respectivamente com um das marcações CMA₃⁺ observadas nos pares 6 e 14.

Com a técnica de FISH usando sondas microssatélites (GA)₁₅ foram observadas marcações em apenas um dos braços de todos os cromossomos nas duas espécies analisadas. *Tetragona clavipes* apresentou marcações (GA)₁₅ no braço longo de 11 pares (1, 2, 5, 6, 9, 10, 11, 14, 15, 16, 17) e no braço curto de seis pares (3, 4, 7, 8, 12, 13) (Figuras 5A e 5C), enquanto para *T. dorsalis* foram visualizadas marcações no braço longo de seis pares (1, 4, 6, 9, 11, 16) e no braço curto de 11 pares cromossômicos (2, 3, 5, 7, 8, 10, 12, 13, 14, 15, 17) (Figura 5B e 5D).

Neste estudo foram observadas marcações (GA)₁₅ em regiões eucromática e heterocromáticas dos cromossomos nas duas espécies de *Tetragona*, no braço curto ou longo, não sendo constatado uma relação direta entre estas regiões e as marcações de (GA)₁₅ e CMA₃⁺.

Os dados apresentados com as técnicas de FISH com rDNA 18S e microssatélite (GA)₁₅ são inéditos para as duas espécies do gênero *Tetragona* analisados neste trabalho, bem como os resultados obtidos através da dupla coloração com Fluorocromos CMA₃/DAPI para a espécie *T. dorsalis*.

Os novos dados apresentados neste estudo, acrescentam informações citogenéticas importantes ao gênero *Tetragona*, demonstrando similaridades no número cromossômico, fórmula cariotípica e número demarcações de rDNA 18s, nas duas espécies de *Tetragona* analisadas neste estudo. Novas análises com amostras de outras localidades e espécies deste gênero ainda não cariotipadas são importantes para uma melhor compreensão cariotípica do grupo.

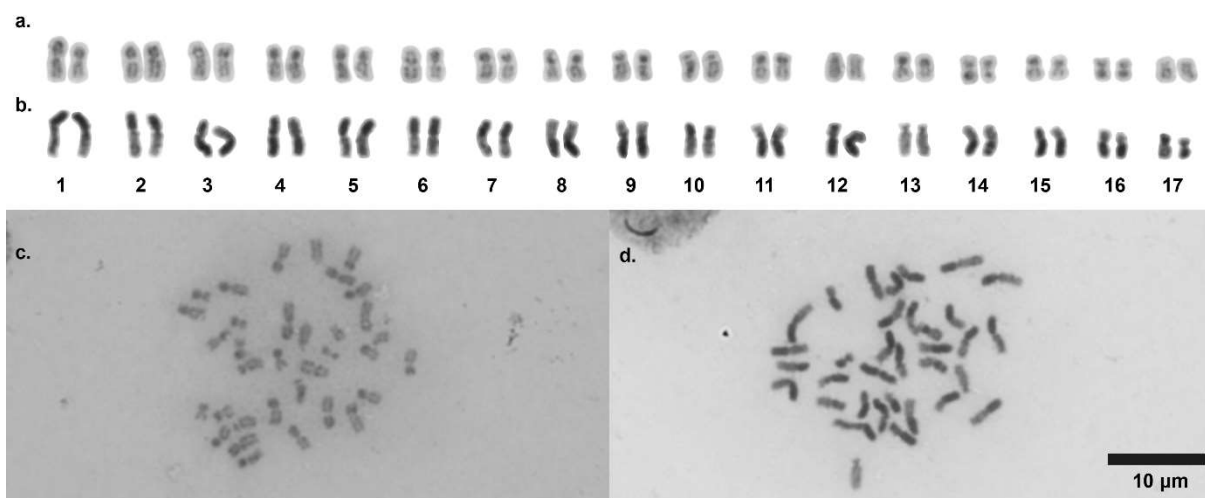


Figura 1. Cariótipos e metáfases de *Tetragona* submetidos à coloração com Giemsa. **A e C.** *T. clavipes*. **B e D.** *T. dorsalis*

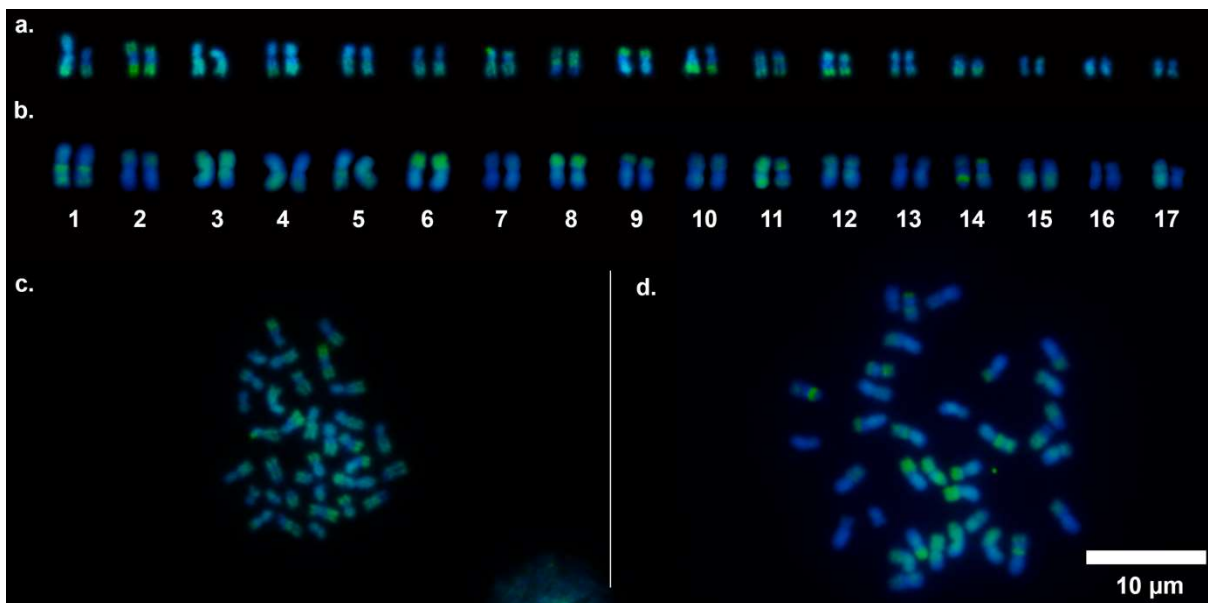


Figura 2. Cariótipos e metáfases de *Tetragona* submetidos à dupla coloração com CMA₃ em verde e DAPI em azul. **A** e **C.** *T. clavipes*. **B** e **D.** *T. dorsalis*.

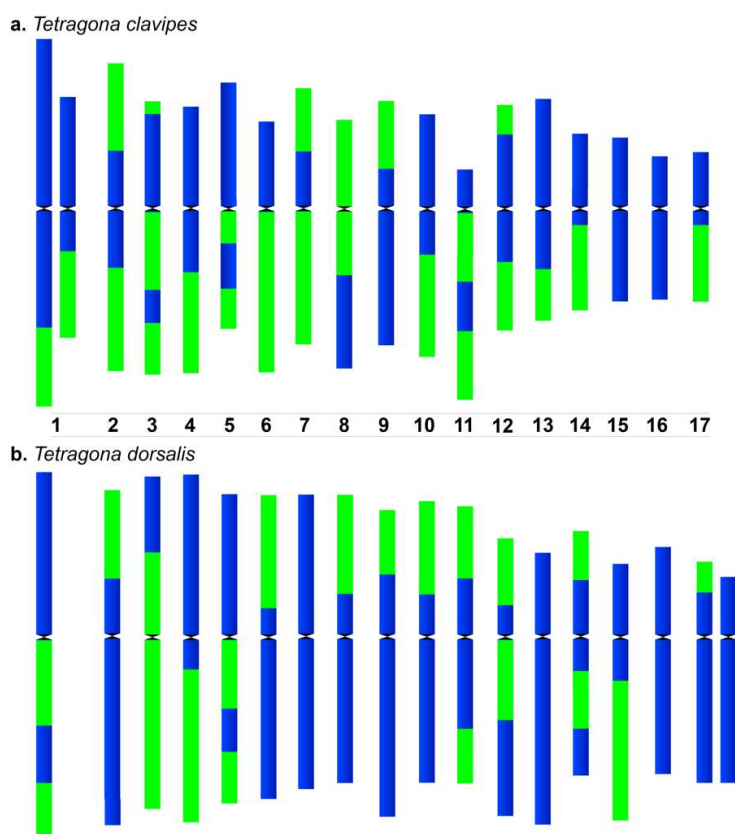


Figura 3. Ideograma representando o conjunto haploide com dados obtidos através da coloração sequencial com fluorocromos CMA₃/DAPI. Azul para DAPI e verde para CMA₃. **A.** *T. clavipes*, par 1 demonstra a heteromorfia de tamanho. **B.** *T. dorsalis*, par 17 demonstra a heteromorfia de tamanho e marcações CMA₃/DAPI.

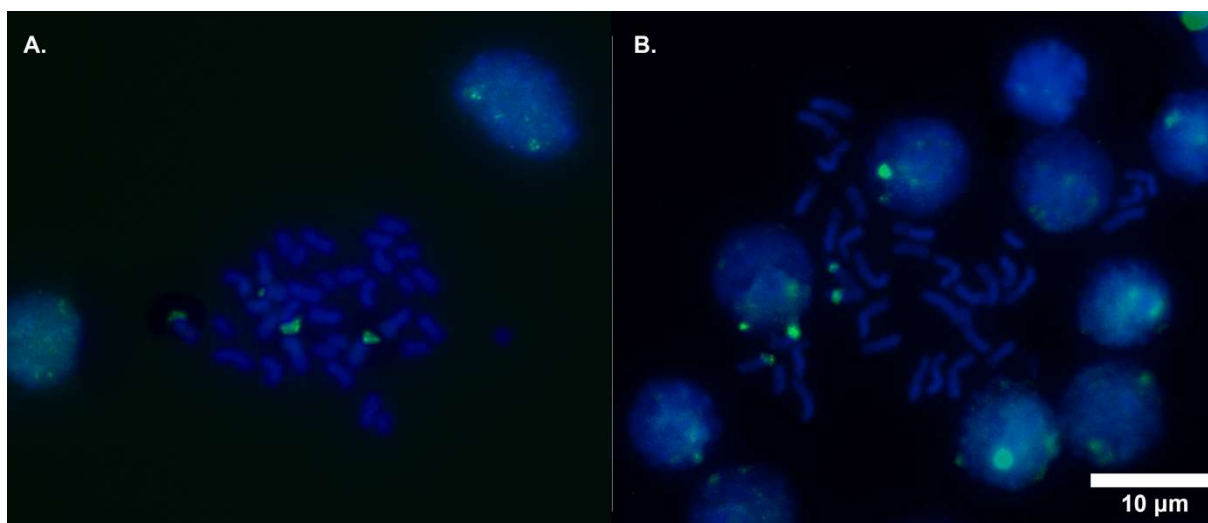


Figura 4. FISH com rDNA 18S em metáfases de *Tetragona*. **A.** *T. clavipes*. **B.** *T. dorsalis*.

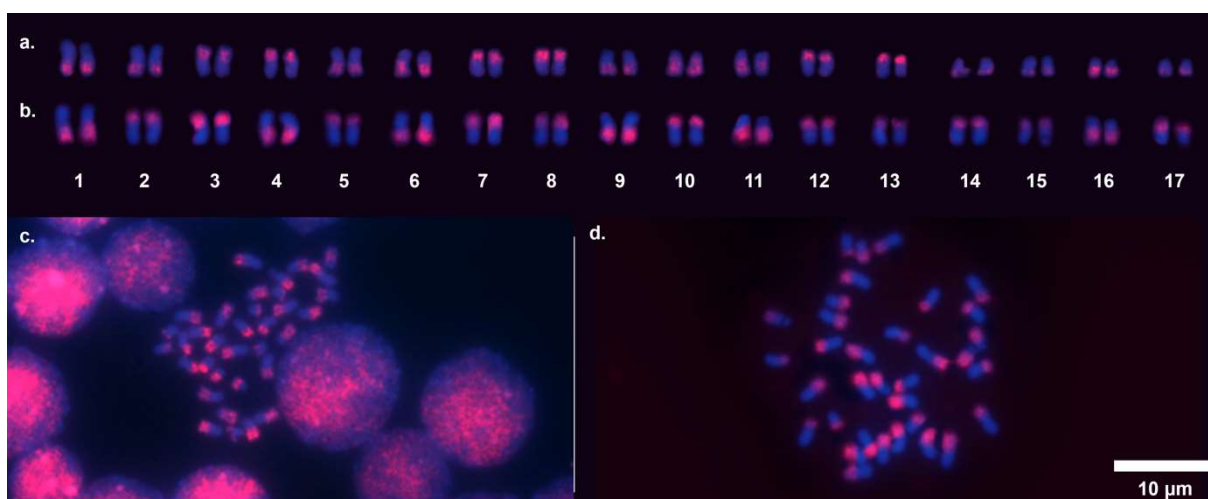


Figura 5. Cariótipos e Metáfases de *Tetragona* corados em vermelho com sondas de DNA repetitivo (GA)₁₅. **A e C.** *T. clavipes*. **B e D.** *T. dorsalis*.

4. Referências Bibliográficas

BARBOSA, I. C. de O. **Caracterização citogenética e análise do perfil de metilação em *Melipona seminigra merrillae* e *Melipona interrupta manausensis* (Hymenoptera, Apidae)**, Dissertação (mestrado em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus-AM, 2018.

BARTH, A.; FERNANDES, A.; POMPOLO, S. G.; COSTA, M. A. Occurrence of B chromosomes in *Tetragonisca Latreille*, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): A new contribution to the cytotaxonomy of the genus. **Gen. Mol Biol.** 34:7–79, 2011.

BRITO, R. M. **Caracterização citogenética de duas espécies do gênero Partamona Schwarz, 1939 (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae)**. Dissertation, Universidade Federal de Viçosa, 1998.

CAMARGO, J. M. F.; PEDRO, S. R. M. 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. 2013. Disponível em <<http://moure.cria.org.br>> Acesso em 20 dez 2019.

CORTOPASSI-LAURINO, M.; Imperatriz-Fonseca, V. L.; ROUBIK, D. W.; DOLLIN, A.; HEARD, T.; AGUILAR, I.; VENTURIERI, G. C.; EARDLEY, C.; NOGUEIRA-NETO, P.' Global meliponiculture: challenges and opportunities. **Apidologie**, v. 37, p. 275-292, 2006. <https://doi.org/10.1051/apido:2006027>

FERREIRA, R. P. **Análise citogenética de abelhas do gênero Trigona Jurine, 1807 (Hymenoptera: Meliponini)**, Tese (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2015.

IMAI, H. T.; TAYLOR, R. W.; CROZIER, R. H. Modes of spontaneous chromosomal mutation and karyotype evolution in ants with reference to the Minimun Interaction Hypothesis. **Japn J Genet.** V. 63, p. 159-185, 1988.

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

LEVAN A., FREDGA K.; SANDBERG A. A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, 52:201–220. 1964. doi: 10.1111/j.1601-5223.1964.tb01953.x

PINKEL D.; STRAUME T.; GRAY J.W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proc Natl Acad Sci USA**. 83:2934–2938, 1986. doi: 10.1073/pnas.83.9.2934

ROCHA M. P.; POMPOLO S.G.; CAMPOS L. A. O.; Citogenética da tribo Meliponini (Hymenoptera, Apidae). In: Melo G. A. R.; Santos I. A. (eds) **Apoidea Neotropica**. Homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure. UNESC, Santa Catarina, pp 311–320, 2003.

SCHWEIZER D. Simultaneous flourescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA-DAPI bands) in human chromosomes. **Cytogenet Cell Genet**. 27:190–193, 1980. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004

SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A. R.; ALMEIDA, E. A. B. Abelhas brasileiras - Sistemática e Identificação. **Editoração Eletrônica Composição e Arte**, Belo Horizonte-MG, 1a Edição, p. 253, 2002.

TARELHO Z. V. S. **Contribuição ao estudo citogenético dos Apoidea**. Dissertation, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP. 1973.

TRAVENZOLI, N. M.; LIMA, B. A.; CARDOSO, D. C.; DERGAM, J.A.; FERNANDES-SALOMÃO, T. M.; LOPES D. M. Cytogenetic Analysis and Chromosomal Mapping of Repetitive DNA in *Melipona* Species (Hymenoptera, Meliponini). **Cytogenetic and Genome Research**. 158:213–224, 2019. DOI: 10.1159/000501754

CAPÍTULO 2: Caracterização citogenética de *Trigona pellucida* Cockerell, 1912 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)

Resumo

O gênero *Trigona* é composto por 32 espécies, das quais 21 são foram encontradas no Brasil. Destas, 12 espécies já foram analisadas citogeneticamente e a maioria apresentou o número cromossômico de $2n=34$, exceto *Trigona braueri*, que apresentou $2n=32$ devido a uma provável redução numérica por fusão cromossômica. No presente estudo, utilizou-se de técnicas da citogenética clássica e molecular (coloração convencional com Giemsa, coloração com os fluorocromos CMA₃/DAPI e FISH utilizando sondas de rDNA 18S, teloméricas e microssatélite (GA)₁₅) para caracterizar citogeneticamente a espécie *Trigona pellucida* coletada nos municípios de Juína e Aripuanã no estado de Mato Grosso. O número cromossômico observado foi de $2n=20$ e fórmula cariotípica diploide de $2k = 18 \text{ M-SM} + 2 \text{ A}$ para as duas colônias analisadas. Este número se mostrou bastante divergente quando comparado a outras espécies já cariotipadas. A coloração com fluorocromos CMA₃/DAPI demonstrou a presença de regiões de marcação positiva para cromomicina A3 (CMA₃⁺) em todos os cromossomos de *T. pellucida*, o que também se mostrou divergente de outras espécies de *Trigona*, que apresentaram estas marcações em poucos cromossomos. A hibridização *in situ* com sondas de rDNA 18S ocorreu no braço curto de ambos os cromossomos do nono par, que coincidiram com regiões também CMA₃⁺. Com as sondas microssatélites (GA)₁₅ foi possível observar marcações em todos os cromossomos, sendo que em sete pares estas marcações ocorreram nas regiões terminais de ambos os braços. A FISH com sondas teloméricas apresentaram marcações somente em regiões terminais dos cromossomos, não sendo observadas marcações intersticiais que seriam indicadores de possíveis fusões. O presente estudo com *Trigona pellucida*, contribui com novos dados citogenéticos para o gênero *Trigona* e demonstra a ocorrência de mais uma variação numérica neste gênero, sugerindo uma maior reorganização cariotípica do que suposto previamente.

Palavras-chave: Hibridização Fluorescente in situ, Fluorocromos, abelhas sem ferrão, número cromossômico

1. Introdução

O gênero *Trigona* Jurine, 1807 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) compreende um total de 32 espécies, das quais 21 tem registro de ocorrência no Brasil (CAMARGO; PEDRO, 2013; PEDRO 2014). As espécies que compreendem este gênero são eficientes polinizadoras de culturas como acerola e a manga e também de outras plantas silvestres (GIANNINI et al., 2014), no entanto, algumas espécies são muito prejudiciais às flores de *Citrus*, sendo consideradas pragas nestas culturas (SILVA et al., 1997).

Estudos citogenéticos com o gênero *Trigona* foram realizados em 12 espécies, sendo que 11 destas apresentaram o número cromossômico de $2n=34$: *Trigona branneri* Cockerell, 1912; *Trigona hyalinata* Lepeletier, 1836 (COSTA et al., 2004); *Trigona chanchamayoensis* Schwarz, 1948; (COSTA et al., 2004; FERNANDES et al., 2013); *Trigona cilipes* Fabricius, 1804 (KERR, 1969); *Trigona fuscipennis* Friese, 1900 (TARELHO, 1973; WALDSCHMIDT et al., 2005); *Trigona hypogea* Silvestri, 1902; *Trigona pallens* Fabricius, 1798; *Trigona truculenta* Almeida, 1984; *Trigona williana* Friese, 1900 (FERREIRA, 2015); *Trigona recursa* Smith, 1863 (COSTA et al., 2004; ROCHA et al., 2003; SILVEIRA, 1972; TARELHO, 1973); *Trigona spinipes* Fabricius, 1793 (KERR, 1969; ROCHA et al., 2003; TARELHO, 1973). *Trigona braueri* Friese, 1900 apresentou $2n=32$ devido a uma provável redução numérica por fusão cromossômica (DOMINGUES et al., 2005).

Trigona pellucida Cockerell, 1912 é uma espécie com ocorrência restrita a região neotropical do planeta, suas colônias foram encontradas até o momento em localidades nos estados de Mato Grosso, Pará e Rondônia (CAMARGO; PEDRO, 2013).

Neste estudo foi desenvolvida a primeira caracterização cariotípica desta espécie por meio de diferentes técnicas citogenéticas clássicas e moleculares, visando fornecer novos dados que possam contribuir com o conhecimento citogenético e evolutivo do gênero *Trigona*.

2. Materiais e Métodos

As amostras de *T. pellucida* foram coletadas diretamente da natureza em um ninho localizado no município de Juína (11°32'07.6" S, 58°40'57.1" W) e um ninho localizado em Aripuanã (10°08'18.8" S, 59°23'50.1" W) no estado de Mato Grosso. Os

espécimes identificados pelo Dr. Gabriel A. R. Melo foram depositados na Coleção Entomológica Pe. J. S. Moure da Universidade Federal do Paraná (DZUP), Curitiba, Brasil.

A preparação das lâminas contendo cromossomos metafásicos para análise do cariótipo seguiu a técnica descrita por Imai et al. (1988) e coloração convencional com Giemsa. A técnica de coloração com fluorocromos CMA₃/DAPI foi realizada seguindo Schweizer (1980).

A hibridização fluorescente *in situ* (FISH) de sondas específicas seguiu o protocolo proposto por Pinkel et al. (1986), com estringência de 77%. Nesta análise foram utilizadas sondas rDNA 18S amplificadas por reação em cadeia da polimerase (PCR) com DNA extraído de espécimes adultos e os primers 629F-AAAGCTCGTAGTTGAATCTGTG e 1300R CTGGTGAGGTTTCCCGT TTG (WARD; DOWNIE, 2005). As sondas teloméricas foram obtidas a partir dos primers (TTAGG)₆ seguindo as recomendações de Ijdo et al. (1991), com modificações propostas por SAHARA et al. (1999). Os produtos da PCR foram posteriormente marcados com biotina, utilizando o kit de BioNick™ Labeling System da Invitrogen®, seguindo as recomendações do fabricante. Para a detecção do sinal, o material foi encubado com Estreptavidina-FITC (Vector).

As sondas microssatélite (GA)₁₅ foram sintetizadas pela Sigma (Sigma-Aldrich, MO, USA), sendo marcadas diretamente com 6-Carboxytetramethyl Rhodamine (TAMRA). Todas as lâminas de FISH foram montadas com Antifading Vectashield (Vector laboratories) contendo DAPI.

Nas análises citogenéticas foram analisadas o mínimo de dez indivíduos por colônia e dez metáfases em cada lâmina. As metáfases foram analisadas e fotografadas em um Microscópio de Epifluorescência Olympus BX51 equipado com câmera Olympus DP72 e software Image-Pro Plus, Versão 6.3. Os cariótipos foram editados através do software Adobe Photoshop CC 20. Os cariogramas foram organizados em ordem decrescente de tamanho dos cromossomos e classificados com base na nomenclatura proposta por Levan et al. (1964), utilizando-se do software ImageJ versão 1.52a, que estima a razão entre os braços dos cromossomos.

3. Resultados e Discussão

Nas duas colônias de *T. pellucida* analisadas neste estudo todos os espécimes apresentaram o número cromossômico $2n=20$ e fórmula cariotípica de $2k = 18 \text{ M-SM} + 2 \text{ A}$ (Figura 1). Este número cromossômico é divergente do determinado em estudos anteriores com outras espécies do gênero *Trigona*, que apresentaram, em sua maioria, o número cromossômico diploide $2n=34$.

Trigona pellucida apresentou cariótipo simétrico com pequeno e gradual decréscimo no tamanho dos cromossomos e pouca heterocromatina, presente em apenas um dos braços cromossômicos, sendo os pares 1, 3, 4, 6, 7 e 8 com heterocromatina no braço curto e os pares 2, 5, 9 e 10 no braço longo (Figura 1). A heterocromatina presente em apenas um dos braços cromossômicos é um padrão comum na maioria dos cromossomos das espécies do gênero *Trigona* (FERREIRA, 2015).

A coloração com fluorocromos CMA₃/DAPI revelou marcações CMA₃⁺ em todos os cromossomos de *T. pellucida*. O primeiro par foi tri-segmentado de marcações CMA₃⁺ no braço longo. O segundo par apresentou marcações CMA₃⁺ na região terminal do braço curto e padrão bi-segmentado no braço longo (Figuras 2 e 3). Os pares 3, 5 e 8 apresentaram marcações em regiões terminais de ambos os braços cromossômicos. O quarto par apresentou marcações na região terminal dos dois braços cromossômicos e uma marcação próxima ao centrômero no braço longo. No sexto par foi observada marcações CMA₃⁺ apenas no braço longo, sendo uma na região terminal e outra próxima ao centrômero. O sétimo par apresenta marcações em regiões terminais em ambos os braços cromossômicos e outra próxima ao centrômero no braço curto. O nono par apresenta o braço curto inteiramente marcado por CMA₃⁺ e outra marcação na região terminal do braço longo. O décimo par apresenta apenas uma marcação envolvendo a região terminal do braço longo (Figuras 2 e 3).

Estudos anteriores com fluorocromos CMA₃/DAPI foram realizados em quatro espécies do gênero *Trigona* e mostraram resultados diferentes. *Trigona branneri* apresentou marcações CMA₃⁺ em 4 cromossomos heteromórficos (COSTA et al., 2004), em *T. braueri* foram observadas marcações CMA₃⁺ em 2 pares de cromossomos (DOMINGUES et al., 2005), em *T. chanchamayoensis* em 1 par (COSTA et al., 2004; FERNANDES et al., 2013) e *T. recursa* não apresentou

marcações CMA₃⁺ (COSTA et al., 2004). Estes dados se mostram bastante divergentes quando comparados aos resultados obtidos neste estudo com *T. pellucida*, que apresentou marcações CMA₃⁺ em todos os seus cromossomos.

A hibridização da sonda para rDNA 18S revelou uma marcação na região terminal do braço curto do nono par em *T. pellucida* (Figura 4) que coincide com regiões heterocromáticas e CMA₃⁺. Em estudo realizado por Ferreira (2015), com 8 espécies do gênero *Trigona*, foi observado espécies com uma a quatro marcações de rDNA 18S neste gênero, sendo que *Trigona pallens* e *Trigona williana* apresentaram marcações em apenas um par de cromossomos, resultado semelhante ao encontrado neste estudo.

As sondas microssatélite (GA)₁₅ hibridizaram nas extremidades de ambos os braços em quase todos os pares cromossômicos de *T. pellucida* (Figura 5). Os pares 1, 9 e 10 apresentam marcações em regiões terminais apenas no braço longo. As marcações (GA)₁₅ coincidem com regiões CMA₃⁺ nos pares 1, 2, 3, 4, 5, 8 e 10 e com regiões de heterocromatina nos pares 9 e 10.

Em análises realizadas nas espécies *Austroplebeia australis* (TRAVERNIZOLI, 2018), *Partamona helleri* (NOVAES, 2019), *Tetragonisca fiebrigi* (CAPOCO, 2016) e *Trigona spinipes* (FERREIRA, 2015) que apresentam o número cromossômico de 2n=34, as marcações com sondas (GA)₁₅ com poucas exceções, ocorreram apenas em um dos braços cromossômicos. Já em análises realizadas em dezessete espécies do gênero *Melipona* que apresentam número cromossômico de 2n=18 e 2n=22, foi possível observar marcações (GA)₁₅ presentes em ambos os braços da grande maioria dos cromossomos destas espécies (BARBOSA, 2018; TRAVERNIZOLI et al., 2019). Análises anteriores em conjunto com os dados obtidos neste estudo podem indicar que espécies com um número baixo de cromossomos apresentem predominância de marcações de sequências repetitivas (GA)₁₅ em ambos os braços cromossômicos, enquanto, espécies com maior número de cromossomos apresentam regiões repetitivas (GA)₁₅ em apenas um de seus braços cromossômicos. Estas informações são consistentes com a Teoria da Interação Mínima HOSHIBA; IMAI, 1993; IMAI et al., 1994, 2001). Essas observações levantam questionamentos se regiões repetitivas de microssatélite (GA)₁₅ presentes em ambos os braços cromossômicos dos cromossomos seria um estado ancestral nos meliponíneos, que possuíam um baixo número cromossômico. Processos de diversificação por fissão

cêntrica, resultariam no aumento do número cromossômico e separação dos blocos de microssatélites. Quando um dos braços cromossômicos dos cromossomos resultantes do processo de fissão são refeitos através do crescimento de heterocromatina, eles acabam ficando sem as regiões de microssatélite.

A FISH usando sondas teloméricas tem sido amplamente utilizada pelo seu potencial de detectar envolvimento de algum mecanismo de fusão ou fissão cêntrica, resultando em redução ou aumento do número cromossômico (KASAHARA, 2009). Em casos de fusão, por exemplo, podem ocorrer a presença de segmentos teloméricos intersticiais detectáveis pela FISH. A aplicação da técnica de FISH usando sondas teloméricas foi aqui utilizada com o intuito de auxiliar a elucidar possíveis fusões no cariótipo de *T. pellucida*, que poderia vir a explicar o número cromossômico reduzido observado nesta espécie quando comparado a outras deste gênero. Os resultados observados demonstraram marcações teloméricas esperadas, apenas nas regiões terminais nos cromossomos de *T. pellucida* (Figura 6), o que enfraquece a hipótese de fusões cromossômicas nesta espécie.

Os novos dados apresentados neste estudo são inéditos para *Trigona*, expandindo as informações sobre este grupo e demonstrando a existência de mais variação no número cromossômico neste gênero, de $2n = 20$ a $2n = 34$. Porém poucos registros de números intermediários entre estes dois extremos foram feitos até o momento. Também foram observados padrões cromossômicos estruturais exclusivos, não vistos em outras espécies deste gênero, como marcações CMA₃⁺ em todos os cromossomos do cariótipo e marcações terminais em ambos os braços cromossômicos da maioria dos cromossomos usando a sonda microssatélite (GA)₁₅.

As diferenças observadas neste estudo quando comparados com estudos anteriores com espécies deste gênero podem indicar que *T. pellucida* pode ter seguido um caminho evolutivo diferente das outras espécies do gênero *Trigona*. Por fim, destaca-se a importância da realização de estudos citogenéticos com espécies de *Trigona* que ainda não foram analisadas, visando o preenchimento de lacunas, necessário para uma maior compreensão da evolução cariotípica no gênero.

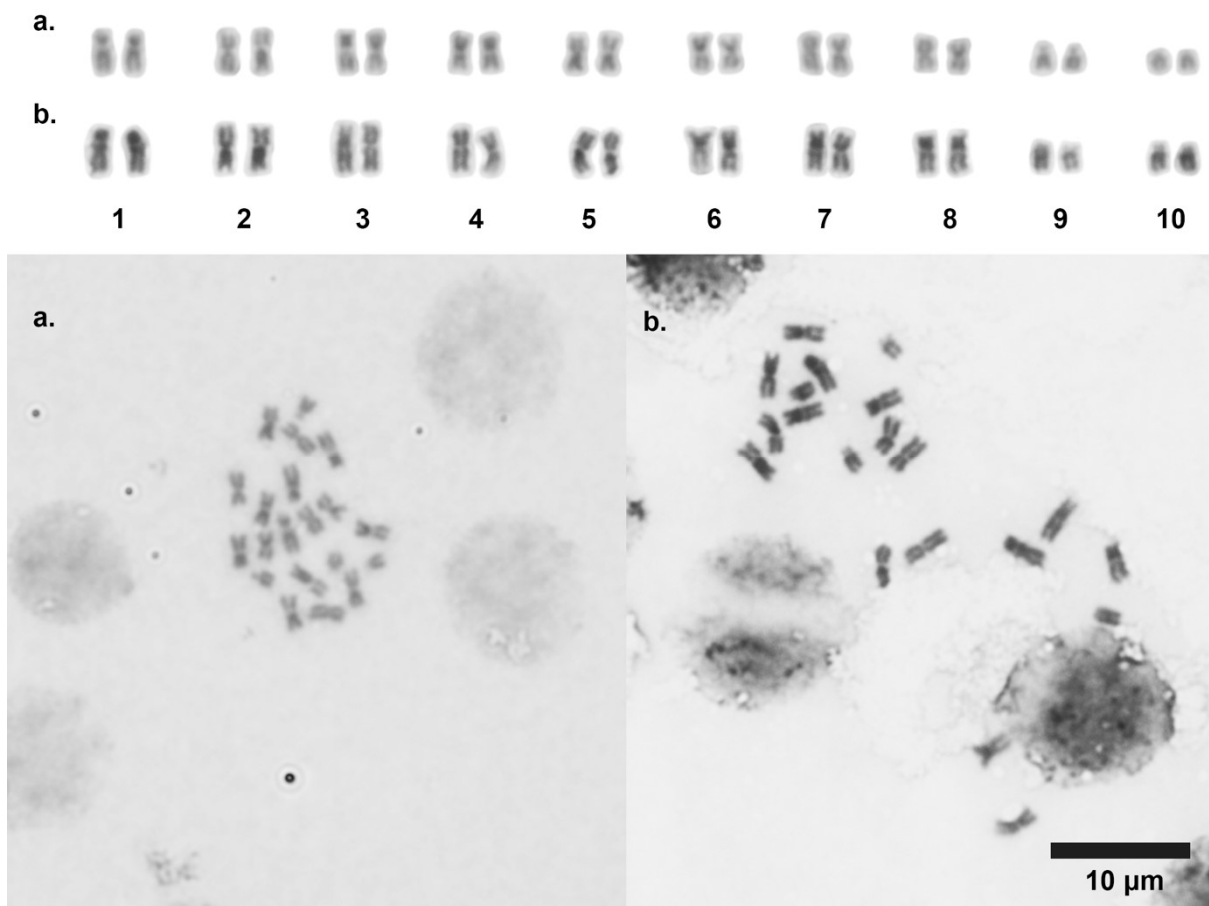


Figura 1. Cariótipos e metáfases de *T. pellucida* submetidos à coloração com Giemsa. **A.** *T. pellucida* de Juína-MT. **B.** *T. pellucida* de Aripuanã-MT.

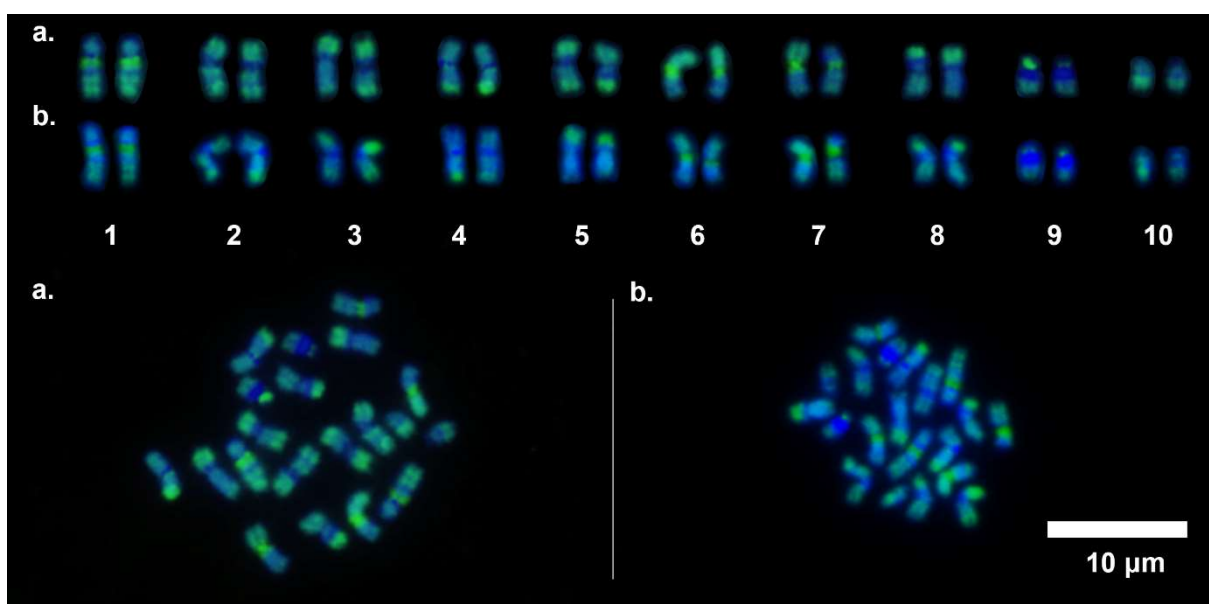


Figura 2. Cariótipos e metáfases de *T. pellucida* submetidos à dupla coloração com CMA₃ em verde e DAPI em azul. **A.** *T. pellucida* de Juína-MT. **B.** *T. pellucida* de Aripuanã-MT.

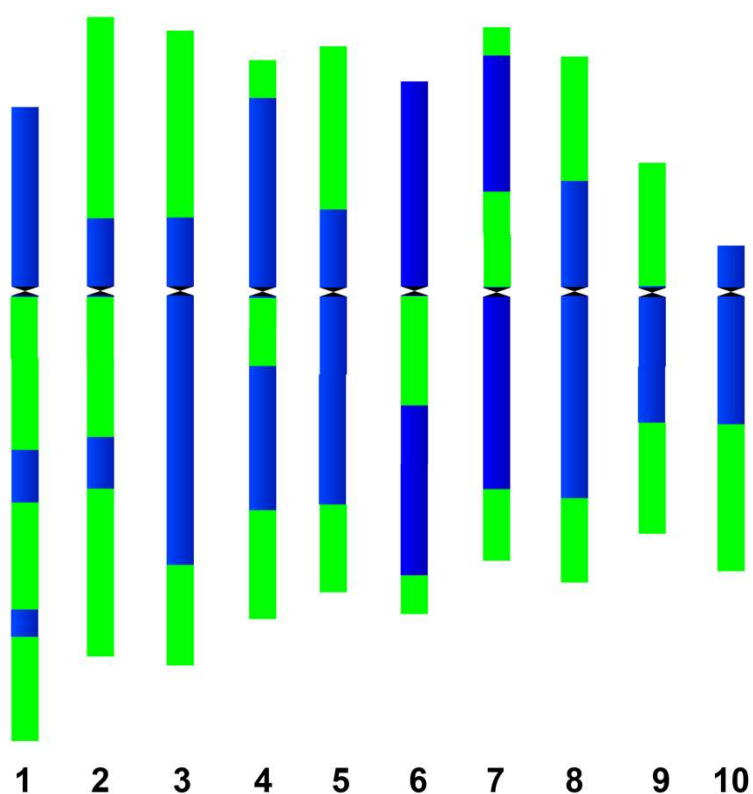


Figura 3. Ideograma de *T. pellucida* representando o conjunto haploide com dados obtidos através da técnica de fluorocromos CMA₃/DAPI. Azul para DAPI e verde para CMA₃.

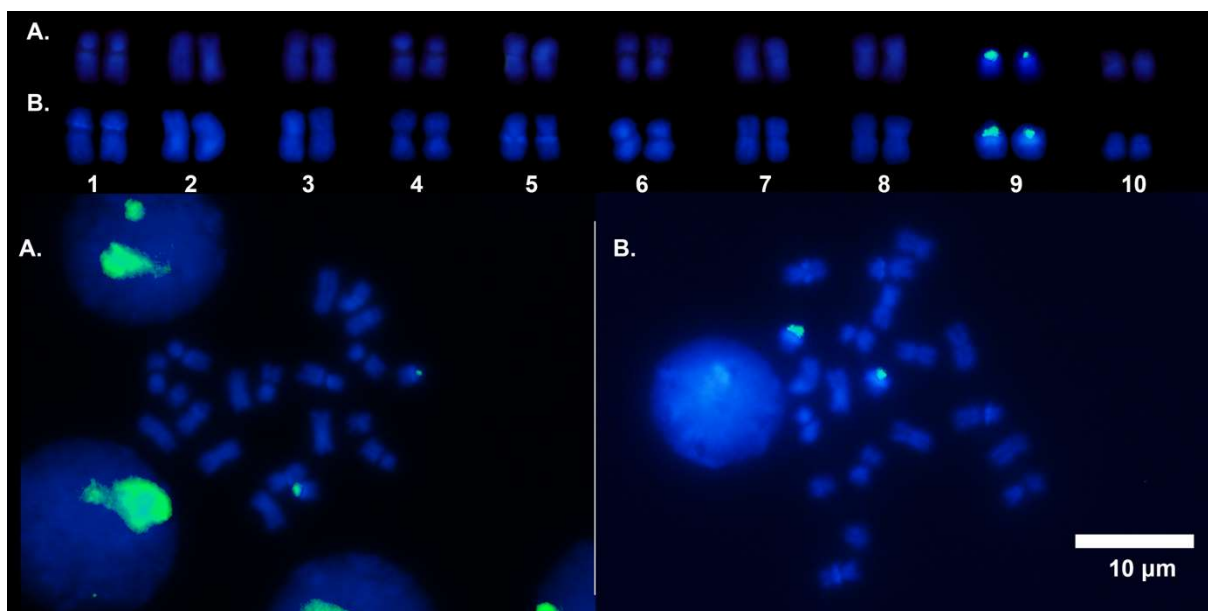


Figura 4. Cariograma e metáfases de *T. pellucida* submetidos a FISH com sondas de rDNA 18S. **A.** *T. pellucida* de Juína-MT. **B.** *T. pellucida* de Aripuanã-MT.

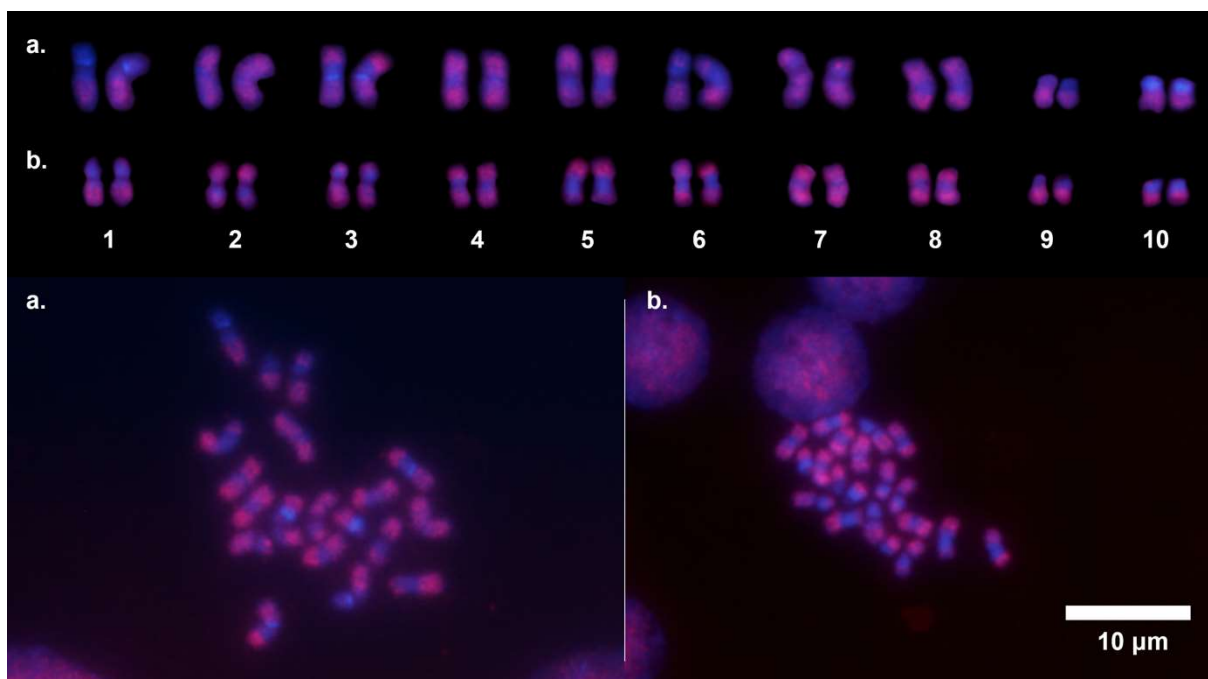


Figura 5. Cariótipos e Metáfases de *T. pellucida* corados em vermelho com sondas de DNA repetitivo (GA)₁₅. **A.** *T. pellucida* de Juína-MT. **B.** *T. pellucida* de Aripuanã-MT.

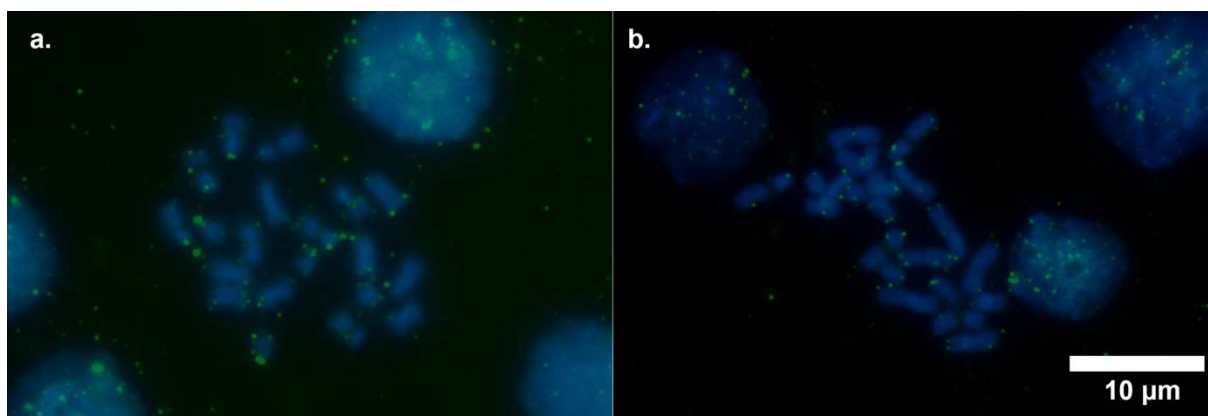


Figura 6. Metáfases de *T. pellucida* marcados em verde com sondas teloméricas. **A.** *T. pellucida* de Juína-MT. **B.** *T. pellucida* de Aripuanã-MT.

4. Referências Bibliográficas

BARBOSA, I. C. de O. **Caracterização citogenética e análise do perfil de metilação em *Melipona seminigra merrillae* e *Melipona interrupta manaosensis* (Hymenoptera, Apidae)**, Dissertação (mestrado em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus-AM, 2018.

CAMARGO, J. M. F.; PEDRO, S. R. M. 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. 2013. Disponível em <<http://moure.cria.org.br>> Acesso em 20 dez 2019.

CAPOCO, M. M. **Mapeamento de DNA repetitivo na abelha sem ferrão *Tetragonisca fiebrigi* (Schwarz, 1938) com ênfase nos cromossomos Bs.** Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2016.

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

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

FERNANDES, A., BARTH, A., SAMPAIO, W. S. Caracterização citogenética da espécie *Trigona chanchamayoensis* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) encontrada no cerrado brasileiro. **Evolução e Conservação da Biodiversidade**. 4(2), 63-67, 2013.

FERREIRA, R. P. **Análise citogenética de abelhas do gênero *Trigona* Jurine, 1807 (Hymenoptera: Meliponini)**, Tese (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2015.

GIANNINI, T. C.; BOFF, S.; CORDEIRO, G. D.; CARTOLANO Jr, E. A.; VEIGA, A. K.; Imperatriz-Fonseca, V. L.; Saraiva, A. M. Crop pollinators in Brazil: a review of reported interactions. **Apidologie**, 46(2), 209-223, 2014.

HOSHIBA, H.; IMAI, H. T. Chromosome evolution of bees and wasps (Hymenoptera, Apocrita) on the basis of C-banding pattern analyses. **Jpn J Entomol**. v.61, p. 465-492. 1993.

IJDO J. W.; WELLS R. A.; BALDINI A.; REEDERS S. T. Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. **Nucleic Acids Res**. 19:4780, 1991. doi: 10.1093/nar/19.17.4780

IMAI, H.T., TAYLOR, R.W., CROZIER, R.H. Modes of spontaneous chromosomal mutation and karyotype evolution in ants with reference to the Minimum Interaction Hypothesis. **Japn J Genet**. V. 63, p. 159-185, 1988.

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

IMAI, H. T.; SATTA, Y.; TAKAHATA, N. Integrative study on chromosome evolution of mammals, ants and wasps based on the minimum interaction theory. **J Theor Biol.** v. 210, p. 475-497, 2001.

KASAHARA, S. Introdução à pesquisa em Citogenética de Vertebrados. 1ª Ed. – Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética, p. 160, 2009.

LEVAN A., FREDGA K.; SANDBERG A. A. NOMENCLATURE FOR CENTROMERIC POSITION ON CHROMOSOMES. **Hereditas**, 52:201–220. 1964. doi: 10.1111/j.1601-5223.1964.tb01953.x

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

LEVAN A., FREDGA K.; SANDBERG A. A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, 52:201–220. 1964. doi: 10.1111/j.1601-5223.1964.tb01953.x

NOVAES, C. M. **Análises molecular, cariotípica e morfométrica de abelhas sem ferrão do gênero *Partamona* Schwarz, 1939**. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2019.

PEDRO, S. R. The Stingless Bee Fauna In Brazil (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**, 61(4), 348-354, 2014.

PINKEL D.; STRAUME T.; GRAY J.W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proc Natl Acad Sci USA**. 83:2934–2938, 1986. doi: 10.1073/pnas.83.9.2934

ROCHA M. P.; POMPOLO S.G.; CAMPOS L. A. O.; Citogenética da tribo Meliponini (Hymenoptera, Apidae). In: Melo G. A. R.; Santos I. A. (eds) **Apoidea Neotropica**. Homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure. UNESC, Santa Catarina, pp 311–320, 2003.

SAHARA K.; MAREC F.; TRAUT, W. TTAGG telomeric repeats in chromosomes of some insects and other arthropods. **Chromosom Res**. 7:449–460, 1999. doi: 10.1023/A:1009297729547

SCHWEIZER D. Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA-DAPI bands) in human chromosomes. **Cytogenet Cell Genet**. 27:190–193, 1980. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004

SILVA, M. M.; BUCKNER, C. H.; PICANÇO, M.; CRUZ, C. D. Influência de *Trigona spinipes* Fabr. (Hymenoptera: Apidae) na polinização do maracujazeiro amarelo. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, 26(2), 217-221, 1997.

SILVEIRA Z. V. Número de cromossomos em meliponídeos brasileiros. II. **Cien Cult**. 24(6):160, 1972.

TARELHO, Z. V. S. **Contribuição ao estudo citogenético dos Apoidea.** Dissertation, Universidade de São Paulo. 1973.

TRAVERNIZOLI, N. M. **Citogenética Clássica e molecular com ênfase na evolução cromossômica em Meliponini**, Tese (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2018.

TRAVERNIZOLI, N. M.; LIMA, B. A.; CARDOSO, D. C.; DERGAM, J.A.; FERNANDES-SALOMÃO, T. M.; LOPES D. M. Cytogenetic Analysis and Chromosomal Mapping of Repetitive DNA in *Melipona* Species (Hymenoptera, Meliponini). **Cytogenetic and Genome Research**. 158:213–224, 2019. DOI: 10.1159/000501754

WALDSCHMIDT, A. M.; DUARTE, O. M. P.; MARTINS, C. C. C.; SANTANA, S. E. A.; MIRANDA, E.A.; ALVES, R. N. O.; SILVA-JUNIOR, J. C.; CARNEIRO, P. L. S. **Análises citogenéticas em espécies de abelhas da subtribo Meliponina (Hymenoptera: Meliponina) da região sudoeste da Bahia.** In: Anais do 51º Congresso Brasileiro de Genética. Águas de Lindoia, São Paulo, p 253, 2005.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As análises citogenéticas realizadas neste trabalho constituíram um importante acréscimo nos estudos do cariótipo de abelhas sem ferrão, com as espécies *Tetragona clavipes*, *Tetragona dorsalis* e *Trigona pellucida*, permitindo a observação de algumas variações cromossômicas e análises comparativas destas espécies com outros meliponíneos.

A revisão dos dados citogenéticos e de evolução cromossômica sob uma perspectiva filogenética de abelhas sem ferrão da Região Neotropical, permitiu sugerir o número cromossômico de $n=17$ sendo ancestral dos meliponíneos, número este que se manteve ao longo da evolução na maioria das espécies. Números cromossômicos menores como observado em alguns gêneros pode ter se originado por processos de fusões cêntrica, a exemplo das espécies do gênero *Melipona*.

As análises realizadas com *Tetragona clavipes* e *Tetragona dorsalis* em conjunto com estudos anteriores demonstram que o número cromossômico de $2n=34$ manteve-se conservado no gênero *Tetragona*, no entanto, as espécies apresentam diferenças cromossômicas estruturais. Análises comparativas com *T. clavipes* mostrou resultado divergente do observado em estudos anteriores, o que demonstra que a espécie pode estar passando por processos de diferenciação cariotípica ao longo de sua distribuição geográfica. Diferenças interespecíficas detectadas na comparação com *T. dorsalis* mostram estas mudanças se estabelecendo em nível de gênero *Tetragona*.

Em *Trigona pellucida* foi observado o número cromossômico de $2n=20$, resultado muito diferenciado do encontrado em outras espécies do gênero *Trigona*, demonstrando a existência de mais uma variação numérica dentro deste gênero. Análises com fluorocromos CMA₃/DAPI, FISH com sondas de rDNA 18S e microssatélite (GA)₁₅ demonstraram padrões cromossômicos estruturais exclusivos nesta espécie. As diferenças observadas podem indicar que *T. pellucida* tenha seguido um caminho evolutivo diferente em relação as outras espécies do gênero *Trigona*.

Os dados citogenéticos totais aqui apresentados representam a primeira análise de *T. pellucida* e acrescentam novas informações ao gênero *Tetragona*, revelando novas alterações cromossômicas e diferenciações numéricas e estruturais entre os meliponíneos, o que demonstra a importância de análises citogenéticas

clássicas e moleculares para o enriquecimento do conhecimento genético das abelhas sem ferrão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS COMPLEMENTARES

- ANDRADE-SOUZA, V.; DUARTE, O. M. P.; MARTINS, C. C. C.; SANTOS, I. S.; COSTA, M. G. C.; COSTA, M. A. Comparative molecular cytogenetics of *Melipona* Illiger species (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**. v. 65(4), p. 696-705, 2018.
- BARTH, A.; FERNANDES, A.; POMPOLO, S. G.; COSTA, M. A. Occurrence of B chromosomes in *Tetragonisca* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): A new contribution to the cytotaxonomy of the genus. **Gen. Mol Biol.** 34:7–79, 2011.
- BAWA, K. Plant-pollinator interactions in tropical rain forests. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 21, p. 399-422, 1990.
- BRITO, R. M.; POMPOLO, S. G. C; G patterns and fluorochromes staining with DAPI and CMA3 in *Trigona* spinipes (Jurine, 1807) (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Revista Brasileira. Genética**, 20, 62, 1997.
- BRITO, R. M. **Caracterização citogenética de duas espécies do gênero Partamona Schwarz, 1939 (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae)**. Dissertation, Universidade Federal de Viçosa, 1998.
- CABRAL-DE-MELLO, D. C.; OLIVEIRA, S. G.; de MOURA, R. C.; MARTINS, C. Chromosomal organization of the 18S and 5S rRNAs and histone H3 genes in Scarabaeinae coleopterans: insights into the evolutionary dynamics of multigene families and heterochromatin. **BMC genetics**, 12(1), 88, 2011.
- CAMARGO, J. M. F.; PEDRO S. E. M. Meliponini Lepeletier, 1836. In: Moure J. S.; Urban D; Melo G. A. R. (orgs) **Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region**. 2013. Disponível em: [http:// www.moure.cria.org.br/catalogue](http://www.moure.cria.org.br/catalogue). Acesso em: 05 março de 2020.
- CIOFFI, M. B.; KEJNOVSKY, E.; BERTOLLO, L. A. C. 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(4), 289-296, 2011.
- COSTA, K. F.; BRITO, R.M.; MIYAZAWA, C.S. Karyotypic description of four species of *Trigona* (Jurine, 1807) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) from the State of Mato Grosso, Brazil. **Genet Mol Biol**. v. 27: p. 187-190, 2004.
- COSTA, M. A.; POMPOLO, S. G.; CAMPOS, L. A. Supernumerary chromosomes in *Partamona cupira* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Revista Brasileira de Genética**, 15, 801-806, 1992.
- COSTA, M. A.; DEL LAMA, M. A.; 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.
- CRANE, P. R.; FRIIS, E. M.; PEDERSEN, K. R. The origin and early diversification of angiosperms. **Nature**. 375:27-33, 1995.

- CUADRADO, A.; CARDOSO, M.; JOUVE, N. Physical organization of simple sequence repeats (SSRs) in Triticeae: structural, functional and evolutionary implications. **Cytogenetic and Genome Research**, 120 (3-4), 210-219, 2008.
- CUADRADO, Á.; JOUVE, N. Novel simple sequence repeats (SSRs) detected by ND-FISH in heterochromatin of *Drosophila melanogaster*. **BMC genomics**, 12(1), 205, 2011.
- DOMINGUES, A. M. T.; WALDSCHMIDT, A. M.; ANDRADE, S. E.; ANDRADE-SOUZA, V.; ALVES, R. M. D. O.; SILVA JUNIOR, J. C. D.; COSTA, M. A. (2005). Karyotype characterization of *Trigona fulviventris* Guérin, 1835 (Hymenoptera, Meliponini) by C banding and fluorochrome staining: Report of a new chromosome number in the genus. **Genetics and Molecular Biology**, 28 (3), 390-393, 2005.
- DUARTE, O. M. P.; MARTINS, C. C. C.; WALDSCHMIDT, A. M. Occurrence of multiple nucleolus organizer regions and intraspecific karyotype variation in *Scaptotrigona xanthotricha* Moure (Hymenoptera, Meliponini). **Gen Mol Res**. 8(3):831–839, 2009.
- FERREIRA, R. P. **Análise citogenética de abelhas do gênero Trigona Jurine, 1807 (Hymenoptera: Meliponini)**, Tese (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2015.
- FERNANDES, A., BARTH, A., SAMPAIO, W. S. Caracterização citogenética da espécie *Trigona chanchamayoensis* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) encontrada no cerrado brasileiro. **Evolução e Conservação da Biodiversidade**, 4(2), 63-67, 2013.
- FERNANDES, I. M.; SIGNOR, C.A.; PENHA, J. **Biodiversidade no Pantanal de Poconé**. Cuiabá: Centro de Pesquisa do Pantanal, 2010.
- GIANNINI, T. C.; BOFF, S.; CORDEIRO, G. D.; CARTOLANO Jr, E. A.; VEIGA, A. K.; Imperatriz- Fonseca, V. L.; Saraiva, A. M. Crop pollinators in Brazil: a review of reported interactions. **Apidologie**, 46(2), 209-223, 2014.
- GIANNINI T.C.; CORDEIRO G.D.; FREITAS B.M.; SARAIVA A.M.; IMPERATRIZ-FONSECA V.L. The dependence of crops for pollinators and the economic value of pollination in Brazil. **J. Econ. Entomol.** 108, 1-9, 2015.
- GODOY, D. C.; FERREIRA, R. P.; LOPES, D. M. Chromosomal Variation and Cytogenetics of *Plebeia lucii* and *P. phrynostoma* (Hymenoptera: Apidae). **Fla Entomol.** v. 96, p. 1559-1566. 2013.
- GUERRA, M. S. **Introdução à citogenética geral**. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara, p. 142, 1988.
- HEARD, T. A. The role of stingless bees in crop pollination. **Annual Review of Entomology**. 44.1: 183-206, 1999.

HOSHIBA, H.; IMAI, H. T. Chromosome evolution of bees and wasps (Hymenoptera, Apocrita) on the basis of C-banding pattern analyses. **Jpn J Entomol.** v.61, p. 465-492. 1993.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Biomass e Sistemas Costeiro-Marinho do Brasil**. Rio de Janeiro, RJ: IBGE, 2019. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/geociencias/informacoes-ambientais/15842-biomass.html?=&t=downloads>>. Acesso em: 02 de junho de 2020.

IMAI, H. T.; TAYLOR, R. W.; CROZIER, R. H. Modes of spontaneous chromosomal mutation and karyotype evolution in ants with reference to the Minimum Interaction Hypothesis. **Jpn J Genet.** V. 63, p. 159-185, 1988.

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

IMAI, H. T.; SATTA, Y.; TAKAHATA, N. Integrative study on chromosome evolution of mammals, ants and wasps based on the minimum interaction theory. **J Theor Biol.** v. 210, p. 475-497, 2001.

KAVALCO, K. F.; PAZZA, R.; de OLIVEIRA BRANDÃO, K.; de ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Biogeographic patterns in the chromosomal distribution of a satellite DNA in the banded tetra *Astyanax fasciatus* (Teleostei: Characiformes). **Organisms Diversity & Evolution**, 13(1), 67-76, 2013.

KERR, W. E. Studies about the *Melipona* genus. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.** p. 182-276. 1948.

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

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

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

KRINSKI, D.; FERNANDES, A.; ROCHA, M. P.; POMPOLO, S. D. G. Karyotypic description of the stingless bee *Oxytrigona* cf. *flaveola* (Hymenoptera, Apidae, Meliponina) of a colony from Tangará da Serra, Mato Grosso State, Brazil. **Genet Mol Biol.** v. 33, p. 494-498, 2010.

LOPES, D. M.; FERNANDES, A.; DINIZ, D.; SCUDELER, P. E. S.; FORESTI, F.; CAMPOS, L. A. O. Similarity of heterochromatic regions in the sting- less bees (Hymenoptera: Meliponini) revealed by chromosome painting. **Caryologia.** 67(3):222–226, 2014.

- MAMPUMBU, A. R. **Análise citogenética da heterocromatina e da NOR em populações de abelhas sem ferrão *Friesella schrottkyi* (FRIESE, 1900) (Hymenoptera: Apidae: Meliponini)**. Dissertação de mestrado, Unicamp. Campinas. Brasil, 2002.
- MARTINS, C. C. C.; DINIZ, D.; SOBRINHO-SCUDELER, P. E.; FORESTI, F.; CAMPOS, L. A. O.; COSTA, M. A. Investigation of *Partamona helleri* (Apidae, Meliponini) B chromosome origin. An approach by microdissection and whole chromosome painting. **Apidologie**, 44(1), 75-81, 2013.
- MELO, G. A. R. *Plectoplebeia*, a new Neotropical genus of sting - less bees (Hymenoptera: Apidae). **Zoologia**. 2016. doi:10.1590/ S1984-4689zool-20150153
- MESSINGER, J.; MARTINI, M. M.; ROSSI, G.; SAMUELS, J.; LAUERER, M. Succesful pollination of the Neotropical crop *Solanum quitoense* by *Bombus terrestris*: behavior, efficiency and yield. **Journal of Applied Entomology**. 140.1-2: 124-134, 2016.
- MICHENER, C. D. The bees of the world. 2. ed. Baltimore and London: **The Johns Hopkins University Press**. p. 913, 2007.
- MILANI, D.; CABRAL-DE-MELLO, D. C. Microsatellite organization in the grasshopper *Abracris flavolineata* (Orthoptera: Acrididae) revealed by FISH mapping: remarkable spreading in the A and B chromosomes. **PloS one**. 9(5): e97956, 2014. Doi: 10.1371/journal.pone.0097956.
- MIRANDA, A. F. Estudos citogenéticos e moleculares do gênero *Partamona*: filogenia e cromossomos B. **Thesis**, Universidade Federal de Viçosa, 2012.
- MIRANDA, R. V.; FERNANDES, A.; LOPES, D. M. Karyotype description of *Cephalotrigona femorata* Smith (Hymenoptera: Apidae) and the C-banding pattern as a specific marker for *Cephalotrigona*. **Sociobiology**. v. 60, p. 131-134, 2013.
- MMA - Ministério do Meio Ambiente. **Biodiversidade Brasileira: Avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros**. 2016. Disponível em: http://www.mma.gov.br/estruturas/chm/_arquivos/biodivbr.pdf. Acesso em: 01 de junho de 2020.
- NGUYEN, P.; SAHARA, K.; YOSHIDO, A.; MAREC, F. (2010). Evolutionary dynamics of rDNA clusters on chromosomes of moths and butterflies (Lepidoptera). **Genetica**, 138(3), 343-354, 2010.
- NOVAES, M. N. **Análises molecular, cariotípica e morfométrica de abelhas sem ferrão do gênero *Partamona* Schwarz, 1939**, Tese (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2019.

OLIVEIRA, F. F.; RICHERS, B. T. T.; DA SILVA, J. R.; FARIAS, R. C.; MATOS, T. A. de L. **Guia Ilustrado das Abelhas “Sem-Ferrão” das Reservas Amanã e Mamirauá, Brasil (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)**. p. 267, 2013.

PALACIOS-GIMENEZ, O. M.; CABRAL-DE-MELLO, D. C. 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, 2015.

PEDRO, S. R. M. **The Stingless Bee Fauna In Brazil (Hymenoptera: Apidae)**. p. 348-354, 2014.

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

PROENÇA, C.; OLIVEIRA, R. S.; SILVA, A. P. **Flores e frutos do cerrado**. Ed. UnB, Brasília. 2000.

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

ROCHA M. P.; POMPOLO S.G.; CAMPOS L. A. O.; Citogenética da tribo Meliponini (Hymenoptera, Apidae). In: Melo G. A. R.; Santos I. A. (eds) **Apoidea Neotropica**. Homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure. UNESC, Santa Catarina, pp 311–320, 2003.

ROUBIK, D. W. Stingless bee nesting biology. **Apidologie**. 37.2: 124-143, 2006.

RASMUSSEN C.; CAMERON S. A. Global stingless bee phylogeny supports ancient divergence, vicariance, and long distance dispersal. **Biol J Linnean Soc.** v. 99, p. 206–232, 2010.

RATTER, J. A.; RIBEIRO, J. F.; BRIDGEWATER, S. The Brazilian Cerrado vegetation and threats to its biodiversity. London: **Annals of Botany**, v. 80, p. 223-230, 1997.

SANTOS, I. A. dos. Bees of The Brazilian Savanna. In: CLARO, K. D.; OLIVEIRA P. S.; RICO-GRAY, V. **Tropical Biology and Conservation Management - Volume X: Savanna Ecosystems**. v. 10. EOLSS Publications, p. 301-322, 2009.

SILVA, W. P.; PAZ J. R. L. da. Abelhas sem ferrão: muito mais do que uma importância econômica. **Natureza on line**, v. 10, p. 146-152, 2002.

SILVEIRA, F. A; MELO, G. A. R; ALMEIDA, E. A. B. **Abelhas brasileiras – sistemática e identificação**. 1 ed. Belo Horizonte: IDM Composição e Arte, p. 253, 2002.

SILVEIRA Z. V. Número de cromossomos em meliponídeos brasileiros. **II. Cien Cult.** 24(6):160, 1972.

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

TARELHO Z. V. S. **Contribuição ao estudo citogenético dos Apoidea.** Dissertation, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP. 1973.

TAVARES, M. G.; LOPES, D. M.; CAMPOS, L. A. O. An overview of cytogenetics of the tribe Meliponini (Hymenoptera: Apidae). **Genetica.** v. 145, p. 241-258, 2017.

WALDSCHMIDT, A. M.; DUARTE, O. M. P.; MARTINS, C. C. C.; SANTANA, S. E. A.; MIRANDA, E.A.; ALVES, R. N. O.; SILVA-JUNIOR, J. C.; CARNEIRO, P. L. S. **Análises citogenéticas em espécies de abelhas da subtribo Meliponina (Hymenoptera: Meliponina) da região sudoeste da Bahia.** In: Anais do 51º Congresso Brasileiro de Genética. Águas de Lindoia, São Paulo, p 253, 2005.

WING, S. L.; BOUCHER, L. D. Ecological aspects of the Cretaceous flowering plant radiation. **Annu. Rev. Earth Planet. Sci.** 26:379-421, 1998.

WWF. **Amazon Alive! A decade of discovery 1999 - 2009.** p. 60. 2010. Disponível em: <
http://d2ouvy59p0dg6k.cloudfront.net/downloads/amazon_alive__web_ready_version_14sept10_final.pdf>. Acesso em: 02 de junho de 2020.