

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO UNIVERSITÁRIO NORTE DO ESPÍRITO SANTO
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - BACHARELADO**

**CARACTERIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DA
Melipona mondury (URUÇU- AMARELA) EM
MELIPONÁRIOS DO ESPÍRITO SANTO**

JÚLIA SOUZA ROCHA

São Mateus/ES

Dezembro/2023

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO UNIVERSITÁRIO NORTE DO ESPÍRITO SANTO
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – BACHARELADO**

**CARACTERIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DA
Melipona mondury (URUÇU- AMARELA) EM
MELIPONÁRIOS DO ESPÍRITO SANTO**

JÚLIA SOUZA ROCHA

Monografia de conclusão de curso apresentada ao curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de BACHAREL EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS.

Orientador: Vander Calmon Tosta

São Mateus/ES

Dezembro/2023



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO UNIVERSITÁRIO NORTE DO ESPÍRITO SANTO

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: Júlia Souza Rocha

Título:

Caracterização cromossômica da *Melipona mondury* (Uruçu-amarela) em meliponários do Espírito Santo

Monografia do Curso de Ciências Biológicas (Bacharelado)
Defendida e aprovada em 01/12 / 2023

Com nota 9,5 pela comissão julgadora:

Documento assinado digitalmente
gov.br VANDER CALMON TOSTA
Data: 14/12/2023 11:00:52-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Orientador(a) e presidente da Comissão Examinadora
Prof. Dr. Vander Calmon Tosta (UFES)

Documento assinado digitalmente
gov.br CHRISTYAN LEMOS BERGAMASCHI
Data: 13/12/2023 15:38:44-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Examinador 1
Me. Christyan Lemos Bergamaschi (IFES)

Documento assinado digitalmente
gov.br ZULEMARA BOLDRINI MANHAGO VIGNATI
Data: 14/12/2023 08:55:18-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Me. Zulemara Boldrini Manhago Vignatti (UFV)

“A única constante é a mudança”.

(Heráclito de Éfeso)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Lucimar e César, por sempre acreditarem em mim e me darem todo incentivo, apoio e amor! À minha avó, Ildete, minha grande incentivadora nesse processo! Aos meus tios, Rose e Vilmar, que mesmo na distância se fizeram presentes. À todos da família que me ajudaram e contribuíram de alguma forma.

Ao meu orientador, professor Vander Calmon Tosta por todo direcionamento e confiança. Por me apresentar a citogenética e se esforçar para que eu tivesse experiências que foram cruciais para o meu amadurecimento na área.

À equipe do LABELHAS, Alice, Guilherme, Letícia, Maria Eduarda, Raíssa e Tatiele, pelas conversas, amizade, ajuda e pelos melhores campos que eu poderia ter tido. Sou muito grata por ter conhecido vocês!

À Letícia, pela amizade e apoio imenso que me deu. Pelas conversas sobre genética e também sobre a vida.

À minha amiga Raquel, pelo apoio mesmo na distância.

À Zulemara, por me ajudar na sobreposição do FISH e por toda força.

À professora Denilce Lopes Menezes e às meninas do Laboratório de Citogenética de insetos, Eduarda, Gabriela, Ana Paula e Gisele por me receberem e auxiliarem no FISH.

Ao Christian, pelas aulas maravilhosas durante a disciplina de Monografia I.

À professora Ana Paula, pelas aulas de genética, principalmente as de genética da conservação.

Ao professor Eduardo Ferreira, pelos ensinamentos no curso de capacitação em meliponicultura.

À Tânia por sempre me salvar com a chave do laboratório.

À todos os amigos e colegas de turma que fizeram parte dessa jornada.

Ao CNPQ, pelo apoio financeiro.

À UFES, por proporcionar todo ensino necessário para a realização desta pesquisa.

SUMÁRIO

RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	4
2.1 Objetivo geral	4
2.2 Objetivos específicos	4
3 METODOLOGIA	5
3.1 Área de estudo	5
3.2 Citogenética clássica	6
3.3 Hibridização <i>in situ</i> fluorescente.....	7
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	8
5 CONCLUSÃO	11
6 REFERÊNCIAS.....	11

SUMÁRIO DE FIGURAS

Figura 1. Ninho racional de Uruçu- amarela.	2
Figura 2. Locais de coleta	5
Figura 3. Cariótipos de <i>Melipona mondury</i>	9
Figura 4. FISH com a sonda (TTAGG) de <i>Melipona mondury</i> . Os cromossomos estão corados com DAPI, os sinais da sonda estão em vermelho. Metáfase com marcação interna.	10
Figura 5. FISH com a sonda (TTAGG) de <i>Melipona mondury</i> . Os cromossomos estão corados com DAPI, os sinais da sonda estão em vermelho.	11

SUMÁRIO DE QUADROS

Quadro 1. Coleta em meliponários.	8
--	---

RESUMO

A urucu-amarela (*Melipona mondury*) é uma abelha pertencente ao gênero *Melipona* Illiger, 1806, que faz parte da tribo Meliponini. São consideradas abelhas eussociais, conhecidas como abelhas indígenas sem ferrão, ou meliponíneos e se encontram no domínio morfoclimático Mata Atlântica. Os estudos citogenéticos em *Melipona mondury* na presente pesquisa teve como foco realizar uma caracterização cariotípica da espécie, levando em consideração índices de heterocromatina e sequências de DNA repetitivo, verificando possíveis alterações estruturais e numéricas no cariótipo padrão. Foram utilizadas abelhas coletadas em meliponários de três municípios do Espírito Santo e os cromossomos utilizados se encontravam em estágio metafásico. Com base no exposto, informações relacionadas à diversidade cariotípica da *M. mondury* nas três cidades analisadas mostrou-se sem nenhuma alteração numérica e estrutural e a sonda de microssatélite “TTAGG” não apresentou marcação interna considerável.

Palavras-chave: Citogenética. Meliponíneos. Abelhas nativas. FISH.

ABSTRACT

The yellow urucu (*Melipona mondury*) is a bee belonging to the genus *Melipona* Illiger, 1806, which is part of the Meliponini tribe. They are considered eusocial bees, known as indigenous stingless bees, or meliponines and are found in the Atlantic Forest morphoclimatic domain. The cytogenetic studies on *Melipona mondury* in this research focus on carrying out a karyotypic characterization of the species, taking into account heterochromatin indices and repetitive DNA sequences, verifying possible structural and numerical changes in the standard karyotype. Bees collected from meliponaries in the state of Espírito Santo were used and the chromosomes used were in the metaphase stage. Based on the above, information related to the karyotypic diversity of *M. mondury* in the three cities analyzed showed no numerical and structural changes and the “TTAGG” microsatellite probe did not show considerable internal marking.

Keywords: Cytogenetics. Meliponines. Stingless bees. FISH.

1 INTRODUÇÃO

Os insetos são divididos em várias ordens, uma delas é Hymenoptera, que abrange as formigas, as vespas e as abelhas (Silveira, 2002). Na superfamília Apoidea, as abelhas podem ser reunidas em várias famílias (Silveira, 2002). Apidae é a família com hábitos mais sociais, que conta com cinco subfamílias: Apini, Bombini, Meliponini, Euglossini e Centridini, sendo as três primeiras com um estágio social avançado, pois a grande maioria das outras Apoidea são abelhas solitárias ou de hábitos sociais primitivos (Bossert, 2019).

Um dos serviços ecossistêmicos mais importantes das abelhas é a polinização, sendo consideradas como as principais polinizadoras de plantas silvestres (Da Rocha Filho *et al.*, 2018). Estima-se que as abelhas brasileiras sem ferrão são responsáveis por 40 a 90% da polinização das árvores nativas (Cámara, 2004). Como elas são ótimos polinizadores e fundamentais para interações mutualísticas com as plantas, alterações resultantes da fragmentação de habitats e mudanças no uso da terra podem causar comprometimento não apenas da composição das espécies vegetais, mas também de todo um ecossistema (Da Rocha Filho *et al.*, 2018).

O desmatamento, queimadas e a expansão das zonas urbanas em regiões que antes eram de florestas nativas tem provocado a diminuição das populações de abelhas sem ferrão por impactar sobre seus recursos alimentares e sítios de nidificação (Barbieri, 2018). No Brasil, muitas espécies de abelhas correm risco de extinção pela degradação de seus habitats e pelo uso indiscriminado de agrotóxicos. Uma das ações que podem impactar positivamente a preservação das abelhas sem ferrão é o desenvolvimento da meliponicultura (Barbieri, 2018).

A meliponicultura ou criação racional de abelhas sem ferrão foi um termo elaborado em pelo pesquisador Paulo Nogueira Neto em 1953, um dos iniciadores dos estudos sobre abelhas sem ferrão no Brasil. A criação racional de abelhas sem ferrão é extremamente antiga, com relatos que datam de antes da colonização das Américas pelos povos europeus, se mostrando uma atividade importante para a geração de renda e emprego, promovendo uma atividade com características ecologicamente sustentáveis, economicamente viáveis e socialmente justas (Barbieri, 2018).

Uma das características dos Meliponini é não construírem células reais, pois todos os indivíduos, rainhas, operárias e machos, nascem e se desenvolvem, até o estágio adulto, dentro de células de cria de tamanho igual. Na *Melipona mondury* a entrada dos ninhos é localizada quase sempre, na maioria das espécies, no centro de uma armação de terra,

ou de geoprópolis (argila e resinas vegetais), em formato de cratera, com ranhuras (Nogueira-Neto, 1997).

A uruçú-amarela (Figura 1) é uma abelha pertencente ao gênero *Melipona* Illiger, 1806, que faz parte da tribo Meliponini. Sua área de ocorrência está situada no bioma Mata Atlântica, se estendendo do Estado da Bahia à Santa Catarina, sendo a preservação da espécie ameaçada, pois seu estado de conservação ocorre de forma desigual ao longo de sua área original de distribuição e sua ocorrência é limitada às áreas restantes (Melo, 2003). Foi diferenciada da *Melipona rufiventris* Lepeletier, 1836, por Melo (2003), através das variações morfológicas observadas entre os indivíduos de diferentes regiões, sugerindo que a forma encontrada no bioma Cerrado deveria ser chamada de *M. rufiventris* Lepeletier 1836, enquanto a forma encontrada na Mata Atlântica deveria ser chamada de *M. mondury* Smith 1863. No entanto, não é fácil diferenciar ambas as espécies com base em caracteres morfológicos, sendo assim, a utilização de dados filogenéticos é importante para uma melhor definição da taxonomia destas espécies (Lopes, 2008).

Figura 1- Ninho racional de uruçú-amarela



Fonte: Próprio autor, 2022

Kerr (1948), iniciou os estudos citogenéticos com o gênero *Melipona* e foi o precursor da citogenética de toda a tribo. Estudos realizados por Pompolo (1992), Rocha *et al.* (2003) e Brito *et al.* (2005) propuseram uma relação entre a evolução do cariótipo

de Meliponini e a Teoria da Interação Mínima, sugerindo que a evolução cariotípica acompanha o ciclo de modificações da Teoria. Ela explica a evolução do cariótipo através de um aumento no número de cromossomos por fissão cêntrica, ocasionando na diminuição do tamanho dos cromossomos e um aumento de regiões heterocromáticas estabilizadoras dos telômeros (Imai et al. 1988; Imai 1991; Hoshiba e Imai 1993). Este procedimento teria o intuito de reduzir a ocorrência de translocações cromossômicas deletérias (Imai 1991; Imai *et al.* 2001). Mas, em algumas espécies do gênero *Melipona*, foi possível observar que ocorreu um aumento no conteúdo de heterocromatina sem que tenha ocorrido fissão (Rocha e Pompolo 1998; Rocha *et al.* 2007). Através disso, é possível perceber que mecanismos distintos fazem parte do processo, pois a Teoria da Interação Mínima, embora seja frequentemente utilizada para dar uma explicação para a evolução cariotípica, não consegue esclarecer todas as situações, requerendo então em alguns casos outro tipo de análise (Rocha e Pompolo 1998; Rocha *et al.* 2007).

Para analisar a distribuição de heterocromatina nos cromossomos de abelhas, uma das técnicas da citogenética clássica mais utilizada é o bandeamento C (Miranda *et al.*, 2013; Cunha *et al.*, 2018). Com base nessa distribuição o gênero pode ser subdividido em dois grupos: um com baixa (Grupo I) e outro com alta (Grupo II) quantidade de heterocromatina em seu cariótipo (Rocha & Pompolo, 1998; Rocha *et al.*, 2002; Rocha *et al.*, 2003). Todas as espécies de *Melipona*, independente do subgênero, possuem heterocromatina rica em pares de bases AT (DAPI +), sugerindo que tanto no Grupo I quanto no Grupo II, as regiões de heterocromatina possuem a mesma estrutura e composição de nucleotídeos e possivelmente a mesma história evolutiva .

Na citogenética molecular, estudos utilizando a técnica de Hibridação Fluorescente *in situ* (FISH) na análise de sítios ribossomais e de sequências de DNA repetitivo, tem fornecido importantes informações sobre a estrutura cariotípica e de evolução em diferentes táxons (Cabrero *et al.*, 2009; Cabral-de Mello *et al.*, 2011; Kavalco *et al.*, 2013; Peixoto *et al.*, 2016; Cunha *et al.*, 2016). Essas sequências de DNA repetitivos são segmentos de diferentes tamanhos que se repetem milhares de vezes no genoma (Martins *et al.*, 2011). De acordo com o tamanho de suas unidades de repetição, essas sequências podem ser classificadas em 3 tipos: satélite (100 a 300 pb), microssatélites (10 a 100 pb) e minissatélites (1 a 6 nucleotídeos) (Martins *et al.*, 2011), ocorrendo em todas as regiões dos cromossômicas, tais como: telômeros, centrômeros, *em locus* ou braços cromossômicos (Martins *et al.*, 2011).

A *M. mondury* apresenta números cromossômicos igual a outras espécies do gênero *Melipona*, $2n = 18$ em fêmeas e $n = 9$ em machos (Lopes *et al.*, 2008; Rocha *et al.*, 2003). Estudos utilizando bandeamento C mostraram um alto índice heterocromático nos cromossomos da espécie localizados nas regiões intersticiais, estendendo-se pelos braços cromossômicos, já as regiões com eucromatina ficaram restritas às extremidades dos cromossomos (Lopes *et al.*, 2008). Por apresentar um alto conteúdo heterocromático a *Melipona mondury* pode assim ser incluída no grupo II juntamente com outras espécies do gênero (Lopes *et al.*, 2008).

Apesar de uma certa normalidade no número cromossômico entre as espécies de um mesmo gênero, as características citogenéticas como morfologia dos cromossomos, quantidade, distribuição e composição da heterocromatina vão seguir diferentes padrões (Tavares *et al.*, 2017). Informações de análises cromossômicas, juntamente com informações de sequência de DNA, ajudaram no estabelecimento de padrões na evolução cromossômica com base em hipóteses filogenéticas dentro de diferentes grupos taxonômicos, como formigas (Cardoso *et al.*, 2014, 2018; Micolino *et al.*, 2019) e vespas (Paladino *et al.*, 2015; Fuso, 2017; Menezes *et al.*, 2017). A contribuição da análise citogenética pode ser muito importante para o entendimento dos tipos de alterações cromossômicas que podem ter ocorrido durante a diferenciação de espécies de abelhas sem ferrão e como aconteceu a evolução cromossômica nos diferentes táxons deste grupo (Tavares *et al.*, 2017). Portanto, nota-se que há uma lacuna no conhecimento sobre os aspectos cromossômicos da Uruçu-amarela (*Melipona mondury*) no estado do Espírito Santo que precisa ser preenchida.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar populações da espécie *Melipona mondury* (uruçu-amarela), através de análises citogenéticas, em meliponários de três municípios do Espírito Santo.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Averiguar diversidade cromossômica numérica e estrutural em populações de meliponários de Uruçu-amarela através da análise de cariótipos;

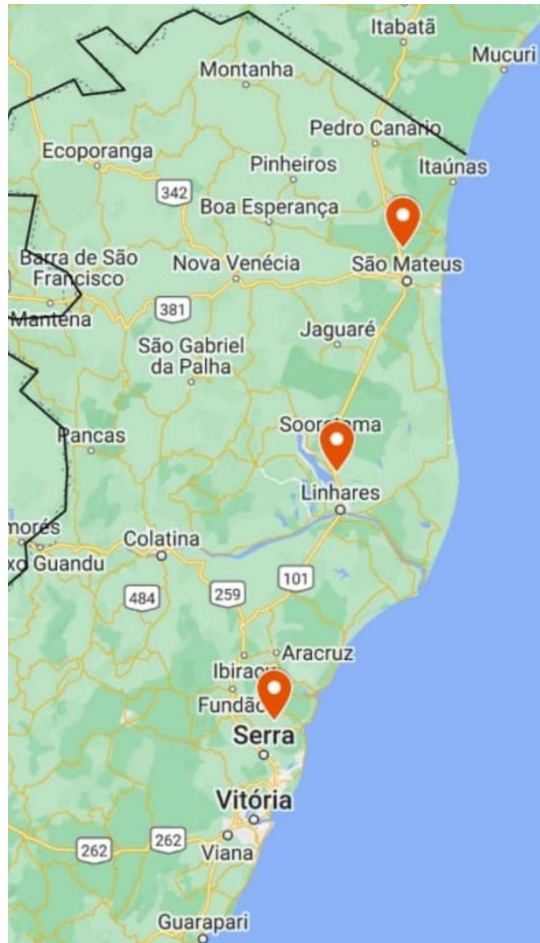
- Analisar a variação estrutural da distribuição e localização cromossômica das classes de rDNA e DNA repetitivos através da hibridização *in situ* fluorescente (FISH) em Uruçu- Amarela.

3 METODOLOGIA

3.1- Área de estudo

O trabalho foi realizado ao longo de alguns municípios do Espírito Santo (Figura 2), sendo eles: São Mateus, Linhares (Regência) e Serra (Nova Almeida). O estado conta com um clima tropical úmido, sendo a temperatura anual na média dos 23°C e o volume de precipitação maior que 1.400 mm por ano, concentrada no verão (Governo ES, 2022). Com relação à vegetação, a predominante é a floresta tropical e litorânea (Governo ES, 2022), inserido no bioma Mata Atlântica. No relevo, sua área abrange duas regiões naturais diferentes, o litoral que vai se espalhar por 400 km, e o planalto (Governo ES, 2022). No decorrer da costa, é possível encontrar uma faixa de planície representando 40% da área total do ES, e à medida que se entra em direção ao interior, pode-se observar que o planalto dá origem a uma região serrana, com altitudes maiores que 1.000 metros (Governo ES, 2022).

Figura 2- Locais de coleta



Fonte: Google Maps, 2023.

3.2- Coleta de dados/Procedimentos laboratoriais/Análises citogenéticas

Para obtenção dos cromossomos em metáfase, foram coletadas em cada meliponário larvas em estágio pós-defecante (período em que as larvas irão se transformar em pupa) e armazenadas em placas de Petri.

Após a coleta, as amostras foram levadas para o laboratório, onde se iniciou a preparação das lâminas seguindo o protocolo desenvolvido por Imai *et al.* (1988). O gânglio cerebral de cada larva foi extraído com o auxílio de uma lupa e deixado de molho em solução de Colchicina por no máximo uma hora. Nesta fase a divisão celular é intensa, principalmente na região do gânglio cerebral que dará origem aos olhos, antenas e aparelho bucal. Desta forma é mais fácil de se obter células em estágio metafásico. Após esse processo o gânglio foi cortado e houve a adição de três fixadores à base de água destilada, álcool etílico absoluto e ácido acético glacial. Ao final do procedimento a lâmina secou em temperatura ambiente por no mínimo 24h. Depois do preparo, foi realizada a coloração das lâminas com o corante Giemsa.

Posteriormente iniciou-se a triagem, onde as lâminas foram analisadas em microscópio, observando-se quais tinham melhor qualidade, que foram selecionadas e fotografadas em lente de 100x.

Em seguida, a montagem dos cariótipos iniciou-se, através do corte, organização e tratamento das imagens dos cromossomos metafásicos, sendo feito um pareamento dos cromossomos e ordenação decrescente dos mesmos. Uma escala também foi adicionada para referência de tamanho e o programa utilizado para essas edições foi o Photoshop CC. 2024.

3.3- Hibridização *in situ* fluorescente (FISH)

Foram utilizados dois tipos de sonda, “18S” (rDNA) e “TTAGG” (microssatélite). A sonda telomérica “TTAGG” é uma sonda pronta, sendo assim não se fez necessário passar pelo processo de obtenção de sonda. A “18S” foi obtida através do DNA da formiga *Camponotus rufipes* e amplificada por PCR. A marcação das sondas foi realizada com 5 µl de Dig-Nick translation, 5 µl da sonda escolhida e 10 µl de água destilada. A descoloração das lâminas escolhidas foi feita através de uma solução à base de água, detergente e álcool etílico. A hibridização *in situ* fluorescente foi realizada seguindo o protocolo de Pinkel *et al.* (1986), com algumas modificações. Adicionou-se 100 µl de RNase nas lâminas, cobriu as mesmas com lamínula e colocou-as para incubar em câmara úmida 37°C por 1h. O MIX das sondas foi preparado com 2 µl da sonda escolhida + 18 µl de HybMix. Após esse processo as lâminas foram lavadas em 2xSSC por 5 min. Foram adicionados ainda 50 µl de pepsina 0,005% por 10 min e 1xPBS por 5 min. Formaldeído 1% por 10 min e 1xPBS por 5 min também foram adicionados. Em seguida as lâminas foram desidratadas em série alcoólica: 70%, 95% e 100% por 2 min cada. Por conseguinte, adicionou-se 100 µl de formamida 70%, foram cobertas com lamínulas e colocadas na placa aquecedora à 72°C por 2 min e 30 seg. Novamente desidratadas em série alcoólica: 50% (gelado), 95% e 100% por 5 min cada. O MIX foi desnaturado em termociclador (10 min à 85 °C e 2 min 4°C). Foram adicionados 20 microlitros do MIX em cada lâmina, cobertas com lamínula e deixadas dentro de uma câmara úmida 37°C overnight. No dia seguinte adicionou-se 2xSSC por 5 min (shaker) e 1xSSC por 5 min (shaker). Incubou-se por 10 min em 3% NFDm 4xSSC (80 ml de água destilada + 20 ml 20xSSC + 3 gramas de leite em pó). Depois, as lâminas foram lavadas em 2xSSC rapidamente. Aplicou-se 100 µl de solução de detecção em cada lâmina e incubou-se por

uma hora em câmara úmida à 37°C (976 µl de NFDM + 9 µl de FITC-Avidina + 15 µl de antidigoxigenina). Adicionou-se 4xSSCTween, 1x por 5 min (shaker) e em seguida, lavou-as rapidamente em 1xPBS. As lâminas foram desidratadas em série alcoólica 50%, 70% e 100% por 2 min cada. Por último foram adicionados 35 µl de solução DAPI. As metáfases foram analisadas utilizando um microscópio Olympus com o software *CellSens Imaging* equipado com uma lâmpada de fluorescência e filtros apropriados. As imagens foram capturadas em escala de cinza e os sinais de FISH foram pseudo-coloridos em vermelho e as imagens dos cromossomos em azul (DAPI). Os sinais foram combinados e otimizados para brilho e contraste usando o software Adobe Photoshop CC 2024.

Uma média de cinco metáfases foram analisadas para determinar os padrões das técnicas citogenéticas usadas neste estudo, analisando lâminas de quatro indivíduos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram coletadas larvas de seis meliponários, totalizando 117 lâminas confeccionadas. (Quadro 1).

Quadro 1 – Coleta em meliponários

Meliponários	Quantidade de lâminas
1- Joaquim	10
2- P1	10
3- INCAPER	11
4- Natalino -roça 1	67
5- Natalino- roça 2	9
6- UFES	10

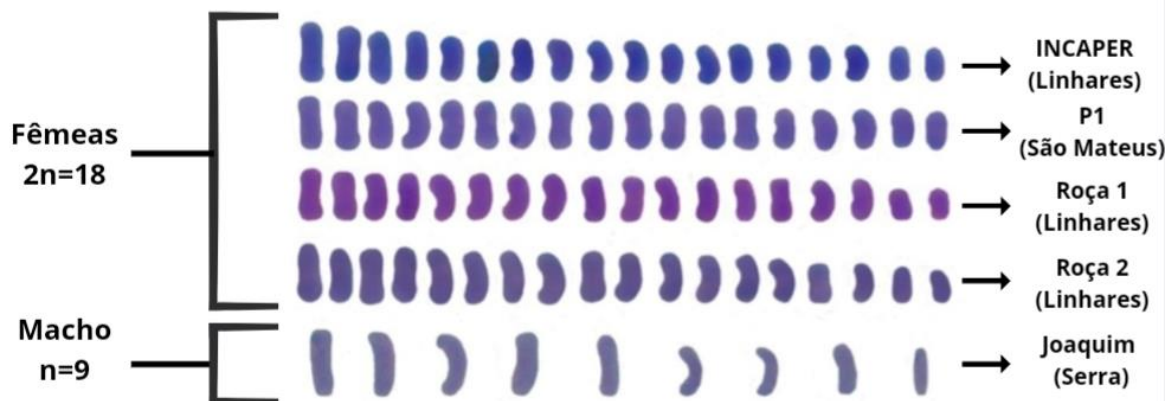
Fonte: Próprio autor (2023).

A espécie não apresentou nenhum polimorfismo estrutural ou numérico (Figura 3), visto que, os cromossomos B não estão muito presentes nos Hymenoptera, sendo observados apenas em três espécies de abelhas nativas, *M. quinquefasciata*, *Partamona helleri* e *Melipona rufiventris* (Costa *et al.*, 1992; Tosta *et al.*, 2004; Lopes *et al.*, 2008). As abelhas apresentam raras alterações no número cromossômico dentro de um gênero, sendo as variações estruturais mais frequentes (Travenzoli *et al.*, 2019). Provavelmente muitas alterações cromossômicas não são suportadas por esses animais, sugerindo que para a

manutenção dos números cromossômicos constantes existe um mecanismo que previne alterações cromossômicas, como rearranjos robertsonianos e aneuploidias (Travenzoli *et al.*, 2019). Há outra hipótese que relaciona à haplodiploidia, sugerindo que em organismos haplodiplóides as variações genéticas são transmitidas lentamente e que grandes rearranjos só são observados entre espécies filogeneticamente distantes, mas formigas, que também são haplodiplóides mostram variabilidade significativa no número de cromossomos entre espécies do mesmo gênero (Barros *et al.*, 2018; Cardoso *et al.*, 2018; Travenzoli *et al.*, 2019). Assim, o sistema haplodiplóide de determinação do sexo não pode ser completamente responsável pela baixa variabilidade no número cromossômico dentro dos diversos gêneros da família Apidae (Travenzoli, 2019). A ideia mais apoiada para a conservação numérica dos cariótipos é a de Bickham e Baker (1979), a do “cariótipo ideal”, mostrando que as variações cromossômicas são fruto da pressão seletiva e que, com o passar do tempo, as taxas de evolução cromossômica seriam mais lentas, em última análise, culminando na estabilidade do cariótipo.

O centrômero não pôde ser localizado devido a morfologia dos cromossomos da espécie, impossibilitando a definição quanto ao morfotipo cromossômico.

Figura 3 – Cariótipos da *Melipona mondury*

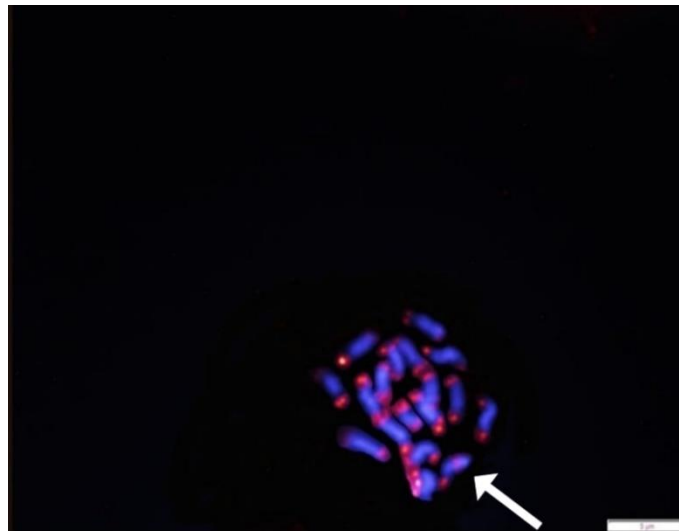


Fonte: Próprio autor, 2023.

A sonda “TTAGG” apresentou marcações teloméricas em quase todos os cromossomos (Figura 4 e 5), com exceção de um único cromossomo (Figura 4), no qual, foi observado uma marcação interna. Seria necessário que mais indivíduos fossem analisados e identificados com marcações internas para afirmar possíveis rearranjos cromossômicos. A integridade cromossômica é mantida pelos telômeros, e sua localização na parte interna

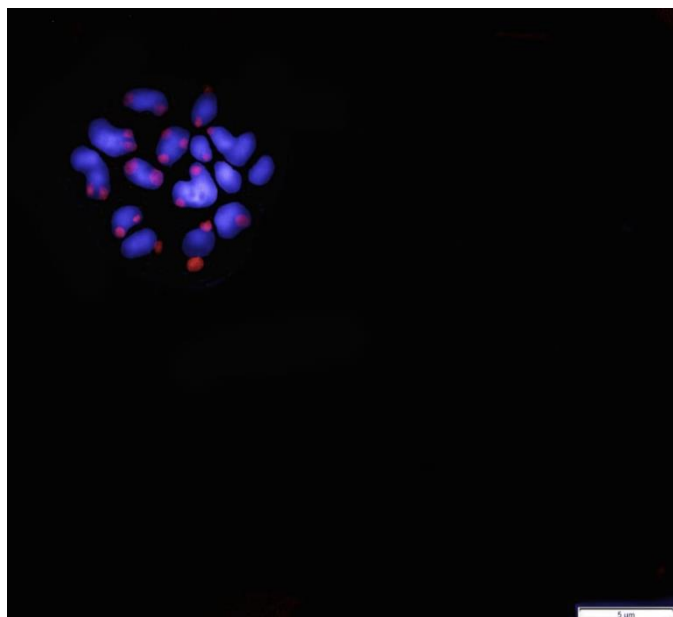
dos braços cromossômicos pode indicar rearranjos que ocorreram durante a evolução cariotípica de um táxon (Nanda *et al.*, 2002; Bueno *et al.*, 2013; Lanzone *et al.*, 2015). Embora tenha sido sugerido que no gênero *Melipona* fusões cromossômicas em cadeia são responsáveis por um número menor de cromossomos ao se comparar com os demais gêneros de Meliponini (Travenzoli, 2018), não houve hibridização intersticial da sonda “TTAGG” nos cromossomos. Para formigas, por exemplo, *Acromyrmex striatus*, foi notado que a falta de sinais intersticiais poderia ser indicativo de fusão e consequente inativação dos telômeros (Pereira *et al.*, 2018). Visto que um dos requisitos para anteceder eventos de fusão do tipo robertsoniano seria a perda ou inativação dos telômeros (Slijepcevic, 1998), a ausência de sítios intersticiais em *Melipona* mostra que provavelmente houve uma perda, em vez de inativação dos telômeros. A Sonda de rDNA “18s” não hibridizou, impossibilitando a análise.

Figura 4- FISH com a sonda (TTAGG) de *Melipona mondury*. Os cromossomos estão corados com DAPI, os sinais da sonda estão em vermelho. Metáfase com marcação interna (seta).



Fonte: Próprio autor (2023).

Figura 5- FISH com a sonda (TTAGG) de *Melipona mondury*. Os cromossomos estão corados com DAPI, os sinais da sonda estão em vermelho.



Fonte: Próprio autor (2023).

5 CONCLUSÃO

As características citogenéticas da *Melipona mondury* no Espírito Santo apresentaram um padrão cariotípico sem nenhuma variação numérica ou estrutural, acompanhando o padrão já esperado para a espécie. A sonda TTAGG não apresentou hibridização interna considerável em nenhuma das metáfases analisadas. O presente estudo contribuiu com informações sobre a evolução da espécie e conseqüentemente do gênero *Melipona*, sendo necessário pesquisas futuras para investigar sobre a evolução das populações de *Melipona mondury* no Espírito Santo.

REFERÊNCIAS

- BARROS, L. A. C.; TEIXEIRA, G. A.; AGUIAR, H. J. A. C.; LOPES, D. M.; POMPOLO, S. G. Estudos citogenéticos em *Trachymyrmex holmgreni* Wheeler, 1925 (Formicidae: Myrmicinae) por métodos convencionais e moleculares. **Sociobiologia**, v. 65, p. 185-190, 2018.
- BARBIERI, J. C. **Caracterização da meliponicultura e do perfil do meliponicultor no estado de São Paulo: ameaças e estratégias de conservação de abelhas sem ferrão**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2018.
- BICKHAM, J. W.; BAKER, R. J. Modelo de canalização da evolução cromossômica. **Bull Carnegie Mus Nat Hist**, V. 13, p.70-84, 1979.
- BOSSERT, S; MURRAY, E. A; ALMEIDA, E. A. B; BRADY, S. G; BLAIMER, B. B; DANFORTH, B. N. Combining transcriptomes and ultraconserved elements to illuminate the phylogeny of Apidae. **Elsevier**, v. 130, p. 121- 131, 2019.
- BRITO, R. M. ; POMPOLO, S. G. ; MAGALHAES, M. F .M. ; BARROS, E. G.; SAKAMOTO-HOJO, E. T. Cytogenetic characterization of two Partamona species (Hymenoptera, Apinae, Meliponini) by fluorochrome staining and localization of 18S rDNA clusters by FISH. **Cytologia**. v.70, p.373-380, 2005.

- BUENO, D.; PALACIOS-GIMENEZ, O. M.; CABRAL-DE-MELLO, D. C. O mapeamento cromossômico de DNAs repetitivos no gafanhoto *Abracris flavolineata* revela possível ancestralidade do cromossomo B e disseminação de histonas H3. **PLoS One**, v. 8, p. 66532, 2013.
- CABRAL-DE-MELLO, D.C.; MARTINS, C.; SOUZA, M.J.; MOURA, R.C. Cytogenetic mapping of 5S and 18S rRNAs and H3 histone genes in 4 ancient Proscopiidae grasshopper species: contribution to understanding the evolutionary dynamics of multigene families. **Cytogenet Genome Res**, v. 132, p. 89-93, 2011.
- CABRERO, J.; LÓPEZ-LEON, M.D.; RUÍZ-ESTEVEZ, M.; GÓMEZ, R.; PETITPIERRE, E., RUFAS, J.S.; MASSA, B.; HALIMA, M.K.B.; CAMACHO, J.P.M. B1 was the ancestor B chromosome variant in the western Mediterranean area in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. **Cytogenet Genome Res**, v. 142, p. 54-58, 2014.
- CARDOSO, D. C.; HEINZE, J.; MOURA, M. N.; CRISTIANO, M. P. Variação cromossômica entre populações de formigas que cultivam fungos: implicações para a evolução do cariótipo e potencial restrição ao fluxo gênico. **BMC Evol. Biol.**, v.18, p.1-10, 2018.
- CARDOSO, D. C.; POMPOLO, S. G.; CRISTIANO, M. P.; TAVARES, M. G. O papel da fusão na evolução do cromossomo de formigas: insights da análise citogenética usando uma abordagem filogenética molecular no gênero *Mycetophylax*. **PLOS ONE**, v. 9(1), p.e87473, 2014.
- COSTA, M. A., POMPOLO, S. G., CAMPOS, L. A. Supernumerary chromosomes in *Partamona cupira* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Revista Brasileira de Genética.**, v. 15, p. 801-801, 1992.
- CUNHA, M.S.; REIS, V.J.C.; DERGAM, J.A. Closely related syntopic cytotypes of *Astyanax taeniatus* (Jenyns, 1842) from the Upper Piranga River, Upper Doce Basin in Southeastern Brazil. **Zebrafish**, v. 13, p. 112-117, 2016.
- CUNHA, M.S.; TRAVENZOLI, N.M.; FERREIRA, R.P.; CASSINELA, E.K.; SILVA, H.; SALOMÃO, T.M.F.; LOPES, D.M. Comparative cytogenetics in three *Melipona* species (Hymenoptera: Apidae) with two divergent heterochromatic patterns. **Genet Mol Biol**, v. 41, p. 806-813, 2018.
- DA ROCHA FILHO, L. C.; MOURE-OLIVEIRA, D.; GAROFÁLO, C. A. Baixa sobreposição de nicho trófico entre espécies de abelhas que nidificam armadilhas (Hymenoptera: Anthophila) em um fragmento de floresta semidecídua. **Apidologie**, v. 49 , p. 759–772, 2018.
- FUSU, L. Um estudo taxonômico integrativo de *Eupelmus Europeu* (Macroneura) (Hymenoptera: Chalcidoidea: Eupelmidae), com uma análise molecular e citogenética de *Eupelmus* (Macroneura) *vesicularis*: várias espécies escondidas sob um nome por 240 anos. **Zool J Linn Soc.**, v.181, p. 519–603, 2017.
- GOVERNO DO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO. Governo ES, 2022. Geografia. Disponível em: <<https://www.es.gov.br/geografia#:~:text=O%20clima%20do%20Estado%20do,ano%2C%20especialmente%20concentrada%20no%20ver%C3%A3o>>. Acesso em: 14 de nov. de 2022.
- HOSHIBA, H., IMAI, H. Chromosome evolution of bees and wasps (Hymenoptera, Apocrita) on the basis of C-banding pattern analyses. **Insect**, v.61, p. 465-492, 1993.

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

IMAI, H. T., SATA, Y., TAKAHATA, N. Integrative study on chromosome evolution of mammals, ants and wasps based on the minimum interaction theory. **Journal of Theoretical Biology**. v.210, p. 475-497, 2001.

IMAI, H. T.; TAYLOR, R. W.; CROSSLAND, M. W. J.; CROZIER, R. H. Modes of spontaneous chromosomal mutation and karyotype evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis. **The Japanese journal of genetics**, v. 63, p. 159-185, 1988.

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). **Org. Divers**, v. 13, p. 67-76, 2013.

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

LANZONE, C., LABORONI, C., SUAREZ, N.; RODRIGUEZ, D.; HERRERA, M. L.; BOLZAN, A. D. Distribuição de sequências teloméricas (TTAGGG) em cromossomos rearranjados de roedores filotinos (Cricetidae, Sigmodontinae). **Genoma Cytogenet Res**, v. 147, p. 247-252, 2015.

LOPES, D. M. **Análises moleculares em *Melipona rufiventris* e *Melipona mondury* (Hymenoptera: Apidae)**. 2008. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural)- Centro Tecnológico, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2008.

LOPES, D. M.; POMPOLO, S. G.; CAMPOS, L. A. O.; TAVARES, M. G. Caracterização citogenética de *Melipona rufiventris* Lepeletier 1836 e *Melipona mondury* Smith 1863 (Hymenoptera, Apidae) por bandamento C e coloração com fluorocromos. **Genet Mol Biol**, v. 31, p. 49-52, 2008.

MARTINS, C.; CABRAL-DE-MELLO, D.C., VALENTE, G.T.; MAZZUCHELLI, J.; OLIVEIRA, S.G. Cytogenetic mapping and its contribution to the knowledge of animal genomes. **Advances in Genetics Research**, v. 4, p. 82, 2011.

MELO, G. A. R. Notas sobre meliponíneos neotropicais, com a descrição de três novas espécies (Hymenoptera, Apidae). **Apoidea Neotropica: Homenagem aos**, v.90, p.84-91, 2003.

MENEZES, R. S. T.; BRADY, S. G.; CARVALHO, A. F.; DEL LAMA, M. A.; COSTA, M. A. Os papéis de barreiras, refúgios e inclinações cromossômicas subjacentes à diversificação em vespas sociais da Mata Atlântica. **Scientific reports**, v. 7, p. 1-16, 2017.

MICOLINO, R.; CRISTIANO, M. P.; TRAVENZOLI, N. M.; LOPES, D. M.; CARDOSO, D. C. Dinâmica cromossômica no espaço e no tempo: história evolutiva de formigas Mycetophylax através de mudanças climáticas passadas na costa atlântica brasileira. **Scientific Reports**, v. 9, p. 1-13, 2019.

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.

- NANDA, I.; SCHRAMA, D.; FEICHTINGER, W.; HAAF, T.; SCHARL, M.; SCHMID, M. Distribuição de seqüências teloméricas (TTAGGG), em cromossomos aviários. **Cromossoma**, v. 111, p. 215-227, 2002.
- NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão**. 1. ed.. São Paulo: Nogueirapis, 1997.
- PALADINO, L. C.; MUNTAABSKI, I.; LANZAVECCHIA, S.; BAGOUSSE-PINGUET, Y. L.; VISCARRET, M.; JURI, M.; et al. Determinação complementar do sexo na vespa parasita *Diachasmimorpha longicaudata*. **PLOS ONE**, v.10, p.e0119619, 2015.
- PEREIRA, T. T. P.; DOS REIS, A. C. C. C.; CARDOSO, D.C.; CRISTIANO, M.P. Reconstrução filogenética molecular e localização das repetições teloméricas (TTAGG)_n nos cromossomos de *Acromyrmex striatus* (Roger, 1863) sugere um cariótipo ancestral inferior para formigas cortadeiras (Hymenoptera). **Comp Cytogenet**, v. 12, p. 13-21, 2018
- PEIXOTO, M.A.A.; OLIVEIRA, M.P.; FEIO, R.N.; DERGAM, J.A. Karyological study of *Oloolygon tripui*, (Anura, Hylidae) with comments on chromosomal traits among populations. **Comp Cytogenet**, v.10, p. 505, 2016.
- POMPOLO, S. G. CAMPOS, L. A. O. Karyotypes of two species of stingless bees, *Leurotrigona muelleri* and *Leurotrigona pusilla* (Hymenoptera, Meliponinae). **Rev. Brasil. Genet.**, v. 18, p. 181-184, 1995.
- POMPOLO, S.G. Estudos citogenéticos em meliponinae. **Naturalia (São José do Rio Preto)**, p.62-66, 1992.
- 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**, v. 136, p. 19-27, 2002.
- ROCHA, P. B.; POMPOLO, S. G.; CAMPOS, L. A. O. Citogenética da tribo Meliponini (Hymenoptera, Apidae) In: Melo GAR and Santos IA (eds). **Apoidea Neotropica**, p.311-320, 2003.
- ROCHA, M. P., POMPOLO, S. G., FERNANDES, A., CAMPOS, L. A. O. *Melipona*: seis décadas de citogenética. **Bioscience Journal**, v. 23, p. 111-117, 2007.
- ROCHA, M. P., POMPOLO, S. G. Karyotypes and heterochromatin variation (C-bands) in *Melipona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Genética e Biologia Molecular**, v.21, p.41-45, 1998.
- SILVEIRA, F. A; MELO, G. A. R.; ALMEIDA, E. A. B. **Abelhas brasileiras : sistemática e identificação**. 1. ed.. Belo Horizonte, 2002.
- SLIJEPCEVIC, P. Telômeros e mecanismos de fusão Robertsoniana. **Cromossoma**, v. 107, p. 136-140, 1998.
- TAVARES, M. G.; LOPES, D. M.; CAMPOS, L. A. O. An overview of cytogenetics of the tribe Meliponini (Hymenoptera: Apidae). **Genetica (Dordrecht. Online)**, v. 145, p. 241-258, 2017.
- TOSTA, V. C., FERNANDES-SALOMÃO, T. M., TAVARES, M. G., POMPOLO, S. G., BARROS, E. G., CAMPOS, L. A. O. A RAPD marker associated with B chromosomes in

Partamona helleri (Hymenoptera, Apidae). **Cytogenetic and Genome Research.**, v. 106, p. 279-283, 2004.

TRAVENZOLI, M. N.; LIMA, B. A.; CARDOSO, D. C.; DERGAM, J. A.; FERNANDES-SALOMÃO, T. M.; LOPES, D. M. Análise Citogenética e Mapeamento Cromossômico de DNA Repetitivo em Espécies de *Melipona* (Hymenoptera, Meliponini). **Cytogenetic and Genome Research.** v. 158, p. 213–224, 2019.