

Melipona – SEIS DÉCADAS DE CITOGENÉTICA

Melipona – SIX DECADE OF CYTOGENETIC

Marla Piumbini ROCHA¹; Silvia das Graças POMPOLO²; Anderson FERNANDES³; Lucio Antonio de Oliveira CAMPOS²

1. Departamento de Morfologia, Universidade Federal de Pelotas; 2. Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa; 3. Departamento de Ciências Biológicas, Universidade do Estado de Mato Grosso. marlapi@yahoo.com.br

RESUMO: São 59 anos de estudos citogenéticos no gênero *Melipona* e esse artigo é uma revisão dessa história, que vai desde trabalhos com apenas a determinação do número cromossômico até os trabalhos de citogenética molecular. Os principais focos do artigo são: o número e morfologia dos cromossomos, conteúdo heterocromático e a natureza da cromatina. Fundamentadas nesses dados são feitas inferências sobre a evolução cariotípica do gênero.

PALAVRAS-CHAVE: Heterocromatina. Evolução cariotípica. Bandamentos cromossômicos.

INTRODUÇÃO

O gênero *Melipona* Illiger, 1806, faz parte da tribo Meliponini, que se encontra distribuída nas regiões de clima tropical do planeta (MICHENER, 2000). Como as demais abelhas da tribo, o gênero possui uma grande importância ecológica e econômica, devido à polinização de plantas nativas e cultivadas (KERR e colaboradores, 1996; HEARD, 1999).

Os estudos citogenéticos de *Melipona* iniciaram-se com Kerr (1948), que também foi o precursor da citogenética de toda a tribo. Atualmente é o gênero de meliponíneo mais estudado nesse nível. Este trabalho tem como objetivo, revisar toda a história da citogenética do gênero *Melipona*.

Número Cromossômico

Desde 1948 até o presente, já foram estudados citogeneticamente dezoito espécies do gênero *Melipona*, sendo que para dezoito dessas espécies o lote haplóide ou valor de n foi igual a 9 (macho) e $2n=18$ (fêmea): *Melipona marginata*, *Melipona quadrifasciata* (KERR, 1948), *Melipona rufiventris*, *Melipona interrupta*, *Melipona schencki* (KERR, 1952), *Melipona bicolor* (KERR, 1952; ROCHA e POMPOLO, 1998), *Melipona compressipes* (KERR, 1969), *Melipona subnitida* (KERR, 1972), *Melipona scutellaris* (ALMEIDA, 1981), *Melipona favosa* (HOSHIBA, 1988), *Melipona asilvae*, *Melipona seminigra fuscopilosa*, *Melipona capixaba*, *Melipona captiosa* (ROCHA e POMPOLO, 1998), *Melipona crinita* (ROCHA e colaboradores, 2002), *Melipona mandacaia* (ROCHA e colaboradores, 2003), *Melipona mondory* (LOPES e colaboradores, 2006) e

Melipona orbigny (ROCHA, com. pessoal).

A outra espécie estudada, *Melipona quinquefasciata*, o número cromossômico variou de $2n=19$ a 22 (fêmea) e de $n=9$ a 13 (macho) para alguns indivíduos. Rocha (2002) constatou que a variação foi devida à presença de cromossomos B. Essa espécie já havia sido estudada citogeneticamente por Kerr (1972) e Pompolo (1994), porém ambos não citaram a presença desse tipo de cromossomo. Recentemente, Lopes e colaboradores (2006) também encontraram cromossomo B em uma colônia de *Melipona rufiventris*, sendo que em 1952 Kerr não detectou esse tipo de cromossomo na colônia analisada. Portanto, apesar da variação observada, pode-se considerar que o número cromossômico é uma característica conservada do gênero.

Morfologia Cromossômica e Conteúdo de Heterocromatina

Rocha e Pompolo (1998) observaram que existem diferenças na morfologia e na distribuição de heterocromatina nos cromossomos do gênero *Melipona*. Algumas espécies apresentam cromossomos meta, submetá e acrocêntricos, e pela técnica de Banda-C (método BSG) verifica-se que a heterocromatina está distribuída na região pericentromérica ou no braço curto do único par acrocêntrico. Perfazem este grupo: *M. marginata*, *M. quadrifasciata*, *M. subnitida*, *M. bicolor*, *M. asilvae* e o complemento A de *M. quinquefasciata*. Para outras espécies, *M. crinita*, *M. rufiventris*, *M. compressipes*, *M. scutellaris*, *M. seminigra fuscopilosa*, *M. capixaba* e *M. captiosa* e *M. mondory*, não foi possível definir a morfologia dos cromossomos, pois eles apresentam heterocromatina distribuída em quase toda extensão dos

cromossomos, o que dificulta a localização do centrômero. É interessante notar que os cromossomos B de *M. quinquefasciata* e de *M. rufiventris* mostraram padrões semelhantes (ROCHA, POMPOLO, 1998; ROCHA, 2002, ROCHA e colaboradores, 2002, ROCHA e colaboradores, 2003, LOPES e colaboradores, 2006).

Em 2002, Rocha e colaboradores calcularam a porcentagem da heterocromatina para algumas espécies do gênero: *M. bicolor* (8%), *M. subnitida* (17%), *M. crinita* (54%), *M. compressipes* (61%) e *M. seminigra fuscopilosa* (73%). Verificaram ainda que as espécies com a heterocromatina distribuída por quase toda extensão dos cromossomos

apresentavam porcentagem sempre maior que 50%, enquanto as demais espécies possuíam menos que 50% de heterocromatina no seu cariótipo. Com base nos dados de porcentagem e distribuição da heterocromatina, os autores dividiram o gênero *Melipona* em dois grupos: no Grupo I foram incluídas as espécies com baixa proporção de heterocromatina (menor que 50%) e com distribuição pericentromérica ou no braço curto dos acrocêntricos (Figura 1A); e no Grupo II, as espécies com mais de 50% de heterocromatina e distribuição por quase toda extensão dos cromossomos, com eucromatina apenas nas extremidades (Figura 1B).

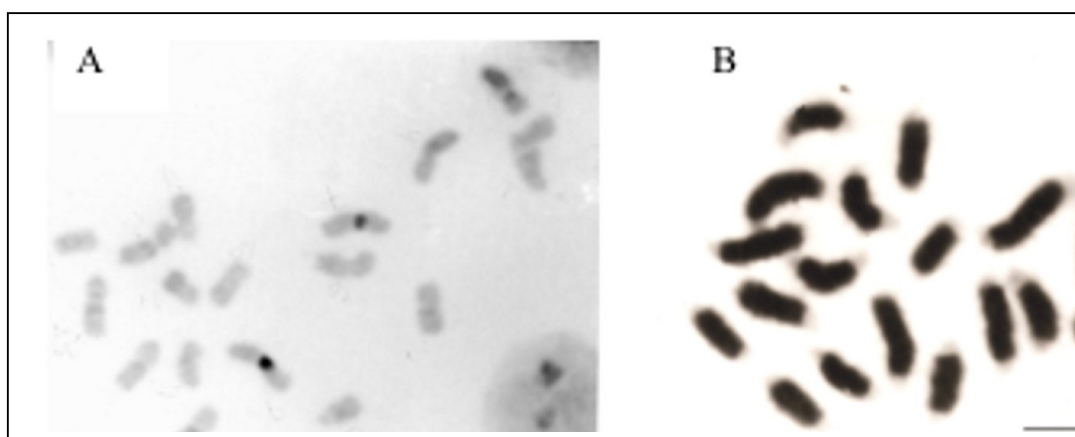


Figura 1. Banda-C de *Melipona bicolor* (A) e *Melipona scutellaris* (B). Regiões escuras são heterocromáticas e as claras, eucromáticas. Barra = 5µm. (Fotos inéditas)

Natureza da Cromatina

Os primeiros estudos citogenéticos do gênero *Melipona* descreviam apenas o número e a morfologia dos cromossomos. Com o avançar da tecnologia, outros métodos foram utilizados para analisar a natureza da cromatina, como as técnicas de bandamentos. A primeira técnica utilizada para o gênero *Melipona* foi a Banda-G, em 1979, por Tambasco e colaboradores. Essa técnica era comumente utilizada na época para estudar cromossomos humanos.

A partir de então foram utilizadas outras técnicas de bandamentos para caracterizar os cromossomos de doze espécies dentro do gênero (Tabela 1).

A Banda-C permitiu diferenciar as regiões de eucromatina e de heterocromatina nos cromossomos. Com essa técnica, verificou-se que dentro de cada Grupo (I e II) do gênero *Melipona* há similaridade no padrão de distribuição dos blocos

heterocromáticos nos cromossomos. Porém, somente com essa técnica não foi possível saber se esses blocos heterocromáticos têm a mesma natureza. Para esse fim, utilizou-se a técnica de coloração seqüencial com os fluorocromos (Tabela 1), que são corantes que se ligam especificamente a certas regiões dos cromossomos e emitem fluorescência. Por exemplo, a Quinacrina Mostarda (QM) e o 4-6-diamidino2-phenylindole (DAPI) se ligam a regiões ricas em AT, enquanto a Cromomicina A₃ (CMA₃) se liga a regiões ricas em pares de base GC.

Tabela 1. Técnicas de bandamentos aplicadas ao gênero *Melipona*.

TÉCNICA	ESPÉCIES	REFERÊNCIAS
Banda-G	<i>M. quadrifasciata</i>	Tambasco e colaboradores, 1979
Banda-C (BSG)	<i>M. marginata</i> , <i>M. bicolor</i> , <i>M. quadrifasciata</i> , <i>M. quinquefasciata</i> , <i>M. compressipes</i> , <i>M. subnitida</i> , <i>M. asilvae</i> , <i>M. seminigra</i> , <i>M. capixaba</i> , <i>M. scutellaris</i> e <i>M. mandacaia</i> , <i>M. mondory</i> , <i>M. rufiventris</i> .	Rocha e Pompolo, 1998; Rocha e colaboradores, 2002; Rocha e colaboradores; 2003; Lopes e colaboradores, 2006
Banda Ag-NOR	<i>M. asilvae</i> e <i>M. marginata</i>	Maffei e colaboradores, 2001; Rocha e colaboradores, 2002
FISH	<i>M. compressipes</i> , <i>M. quinquefasciata</i> , <i>M. capixaba</i> , <i>M. quadrifasciata</i> e <i>M. bicolor</i>	Rocha e colaboradores, 2002; Rocha, 2002
Fluorocromos	<i>M. marginata</i> , <i>M. bicolor</i> , <i>M. quadrifasciata</i> , <i>M. quinquefasciata</i> , <i>M. compressipes</i> , <i>M. subnitida</i> , <i>M. asilvae</i> , <i>M. seminigra</i> , <i>M. capixaba</i> , <i>M. scutellaris</i> , <i>M. mandacaia</i> , <i>M. orbigny</i> , <i>M. mondory</i> e <i>M. rufiventris</i> .	Rocha e colaboradores, 2002; Rocha, 2002, Lopes e colaboradores, 2006.
Enzimas de Restrição (ER)	<i>M. quinquefasciata</i> , <i>M. mandacaia</i> , <i>M. compressipes</i>	Rocha e colaboradores, 2002; Rocha, 2002; Fernandes, 2004.

Para se obter um padrão complementar de bandas, ou seja, regiões QM e DAPI positivos e CMA₃ negativo, foram realizadas as colorações seqüenciais com QM/DA/CMA₃/DAPI. Essa técnica permitiu diferenciar dentro de cada Grupo do gênero tipos de bandas conforme a sua natureza, o que não foi possível com a Banda-C. No Grupo I, a coloração seqüencial com fluorocromos permitiu diferenciar tipos de bandas em diferentes cromossomos (Figura 2, Tabela 2)

As Enzimas de Restrição (ER) também auxiliam na descoberta da natureza da cromatina, pois clivam regiões específicas do cromossomo. O tratamento com a ER *DraI*, que cliva sítios AAA↓TTT, seguido pela coloração com QM (*DraI*/QM), além de confirmar os resultados obtidos com o uso de DAPI em *M. mandacaia*, demonstrou outro tipo de banda (B6) nos pares 1, 2, 5 e 8, as quais provavelmente possuem maior quantidade de pares AT (ROCHA e colaboradores, 2003). Pelo tratamento com a enzima de restrição *HaeIII* os cromossomos B de *M. quinquefasciata* aparentemente não foram clivados (ROCHA, 2002).

Já nas espécies do Grupo II, a técnica de coloração seqüencial não permitiu diferenciar os cromossomos e assim fazer o pareamento correto. Isso foi possível quando foram utilizadas as ER, pois elas digeriram a heterocromatina de forma

heterogênea nessas espécies (ROCHA, 2002; ROCHA e colaboradores, 2002; MIRANDA, 2004).

A Região Organizadora de Nucléolos pôde ser detectada aplicando uma técnica específica, a Banda Ag-NOR, que impregna proteínas presentes nessa região. Essa técnica é a mais utilizada para esse fim, porém ela apresentou resultados satisfatórios apenas para duas espécies do gênero, a *M. asilvae* (ROCHA e colaboradores, 2002) e a *M. marginata* (MAFFEI e colaboradores, 2001). Em ambas as espécies o primeiro par apresentou um bloco heteromórfico Ag-NOR⁺.

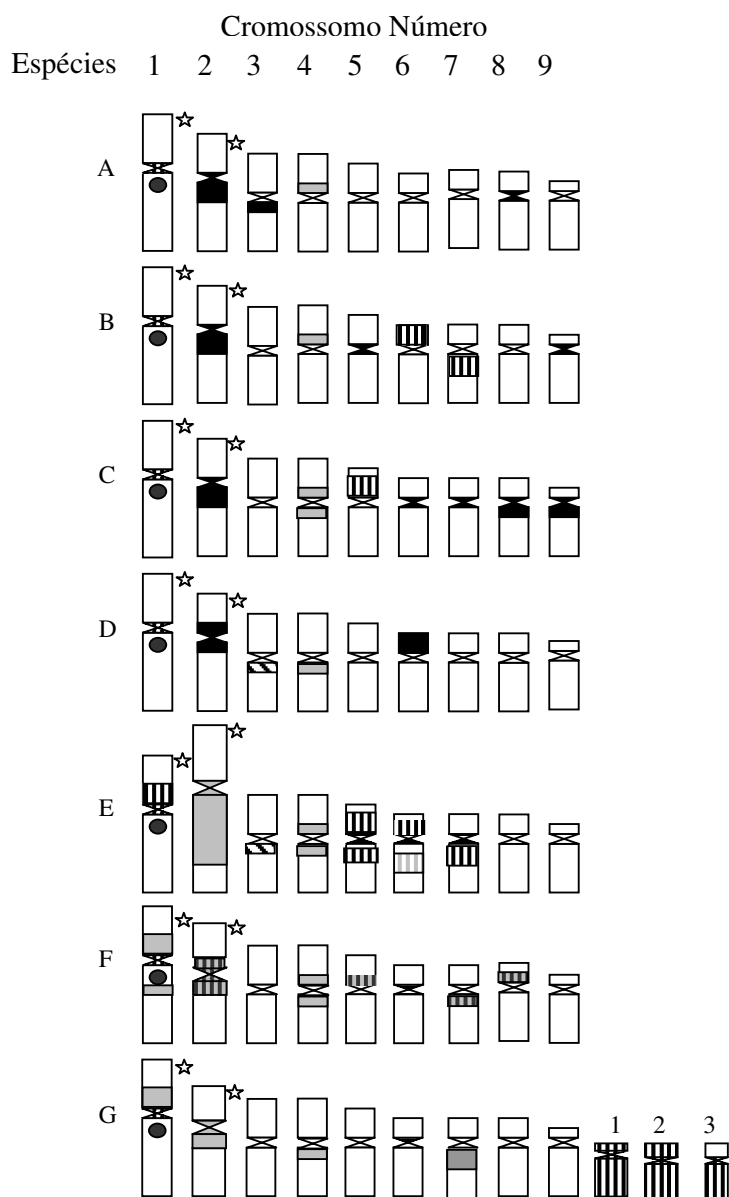


Figura 2. Idiograma de *M. bicolor* (A), *M. quadrifasciata* (B), *M. marginata* (C), *M. asilvae* (D), *M. subnitida* (E), *M. mandacaiá* (F) e *M. quinquefasciata* (G). Tipos de bandas BO■, B1●, B2■, B3▣, B4▤, B5▥, B6▦. Par com heteromorfismo de banda ☆. (Extraído de ROCHA, 2002; ROCHA e colaboradores; 2002; ROCHA e colaboradores; 2003).

Tabela 2. Tipos de bandas conforme afinidade com fluorocromos.

Tipo de banda	GC específico (CMA ₃)	AT específico (DAPI e QM)
BO	Neutro	Neutro
B1	Positivo	Negativo
B2	Negativo	Positivo
B3	Neutro	Positivo
B4	Neutro	Negativo
B5	Positivo	Positivo
B6*	Neutro	Positivo

* Banda obtida somente após clivagem com *Dra*I. Dados extraídos de Rocha e colaboradores (2002, 2003).

Para algumas espécies de *Melipona* (Tabela 1) foi possível localizar a RON graças à utilização de outras técnicas, como por exemplo, a coloração com CMA₃. Utilizou-se esse corante porque ele se liga em regiões ricas em GC e a RON apresenta essa característica. Além disso, já foi verificada uma relação direta entre banda-NOR⁺ e CMA₃⁺ para alguns organismos, como, por exemplo, os insetos: abelhas, *Tetragonisca angustula* (MENEZES, 1997) e *Partamona helleri* (BRITO e colaboradores, 2005); formiga, *Tapinoma nigerrimum* (LORITE e colaboradores, 1997); e gafanhotos *Eyprepocnemis plorans* e *Locusta migratoria* (CAMACHO e colaboradores, 1991).

Outra forma de detectar a RON é evidenciar o próprio DNAr, com a utilização de uma sonda específica e marcada com fluorocromos, ou seja FISH. Essa técnica também evidenciou a RON no primeiro par de cromossomos em *M. quinquefasciata*, *M. quadrifasciata*, *M. bicolor*, *M. capixaba* e *M. compressipes*. Em *M. mandacaia* (ROCHA e colaboradores, 2002; ROCHA e colaboradores, 2003) o bloco heterocromático do primeiro par foi clivado pela enzima de restrição *HaeIII*, que cliva em regiões ricas em GC (GC↓GC), como é a natureza do sítio da RON. Portanto, o número de RONS e a sua distribuição são constantes para todas as espécies estudadas, independente do grupo ao qual elas pertencem.

Evolução Cariotípica

Kerr (1969), fundamentado no número cromossômico, postulou que a evolução cariotípica da tribo Meliponini teria ocorrido, principalmente, por alterações no nível de ploidia. Enquanto Pompolo (1992; 1994) sugeriu que essa evolução seguia a teoria da mínima interação proposta por Imai e colaboradores (1986), em que o principal evento seria a fissão seguida de aumento da heterocromatina em um dos braços cromossômicos. O cariótipo da maioria dos gêneros de meliponíneos parece evoluir de acordo com essa teoria, contudo os dados citogenéticos de *Melipona* indicam que o gênero não segue nenhum desses dois modelos propostos.

A diferença na quantidade de heterocromatina do gênero *Melipona* sugere que

deve ter ocorrido uma mudança, um aumento ou diminuição, no conteúdo de heterocromatina entre as espécies. Na tentativa de determinar o caráter de polaridade do conteúdo heterocromático dentro do gênero *Melipona*, Rocha e colaboradores (2002) consideraram como grupo externo, *Leurotrigona muelleri* (*Hypotrigona muelleri* sensu MICHENER, 1990), por ser o meliponíneo que apresenta número cromossômico semelhante ao de *Melipona*, com n=8, 2n=16 (POMPOLO; CAMPOS, 1995). Houve uma maior semelhança do conteúdo e distribuição da heterocromatina dos cromossomos de *L. muelleri* com os cromossomos das espécies do Grupo I de *Melipona*, de onde se inferiu que o Grupo II é caracterizado como um grupo natural ou clado dentro do gênero *Melipona*. Caso se considere a posição filogenética dos gêneros na determinação do grupo externo, o gênero escolhido seria *Plebeia*. Contudo, a inferência seria a mesma.

CONCLUSÃO

Os estudos da citogenética do gênero *Melipona* foram iniciados com trabalhos de contagem do número cromossômico, passaram por técnicas de bandamento e alcançaram as técnicas de citogenética molecular, como a FISH. Os dados revelaram que o gênero *Melipona* apresenta características conservadas, como o número cromossômico (n=9 e 2n=18), número e localização da RON. Porém, em relação às características divergentes da heterocromatina, foi possível dividir o gênero em dois grupos e considerar que um grupo de espécies, que apresenta maior quantidade de heterocromatina, é um grupo natural dentro do gênero *Melipona*.

AGRADECIMENTOS

Projeto financiado pela FAPEMIG, CNPq, UFV. Agradecemos aos Dr. Paulo Nogueira Neto, Dr. Elder F. Morato, Dr^a Ana Maria Waldschmidt, Sebastião de Paula Pereira Sobrinho e Ezequiel Roberto Medeiros de Macedo pelo fornecimento das espécies. Ao Dr. João M. F. Camargo e Dr. Gabriel A. R. Melo pela identificação das espécies.

ABSTRACT: they are 59 years of cytogenetics study in *Melipona* genus and this paper has a review about this history, going to the works only with the chromosome number determination, up to molecular cytogenetic. The mainly focuses of this paper are: chromosome number and morphology, heterochromatin content and the chromatin nature. With base of this data they are realized inferences about the karyotype evolution of this genus.

KEYWORDS: Heterochromatin. Karyotypic evolution. Banding chromosomic

REFERENCIAS

- ALMEIDA, M. G. Estudo sobre o número de cromossomos e contagem de espermatozoides na abelha *Melipona scutellaris*, Latreille, 1811. **Ciênc. Cult.**, v. 33, p. 539-542, jan., 1981.
- 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 r DNA clusters by FISH. **Cytologia**, v. 70, p. 373-380, dez. 2005.
- CAMACHO, J. P. M.; CABRERO, J.; VISERAS, E.; LÓPEZ-LEÓN, M. D.; NAVAS-CASTILHO, J.; ALCHE, J. P. G banding in two species of grasshoppers and its relationship to C, N and fluorescence banding techniques. **Genome**, v. 34, p. 638-643, fev. 1991.
- FERNANDES, Anderson. **Bandeamento cromossômico com enzimas de restrição e fluorocromos no gênero *Melipona* (Hymenoptera: Apidae)**. 2004. 43 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.
- HEARD, T. A. The role of stingless bees in crop pollination. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 44, p. 183-206, jan. 1999.
- HOSHIBA, H. Karyological analysis of a stingless bee, *Melipona favosa* (Apidae, Hymenoptera). **Cytologia**, v. 53, p. 153-156, 1988.
- IMAI, H. T.; MARUYAMA, T.; GOJOBORI, T.; INOUE, Y.; CROZIER, R. H. Theoretical bases for karyotype evolution. The minimum-interaction hypothesis. **Amer. Nat.**, v. 128, p. 900-920, dez. 1986
- KERR, W.E. (1948). **Estudos sobre o gênero *Melipona***. *Anais da E. S. A. "Luiz de Queiroz"*, 5: 182-276.
- KERR, W. E. A variação do número de cromosomas na evolução dos Hymenoptera. **Sci. Genet.**, v. 4, p. 182-190, 1952.
- KERR, W. E. Some aspects of the evolution of the social bees. *Evol. Biol.*, v. 3, p. 119-175, 1969.
- KERR, W. E. Numbers of chromosomes in some species of bees. **J. Kans. Entomol. Soc.**, v. 45, p. 11-122, 1972.
- KERR, Warwick Estevam; CARVALHO, Gislene Almeida; NASCIMENTO, Vânia. Alves. **Abelha Uruçu – Biologia, Manejo e Conservação**. 1. ed. Belo Horizonte: Fundação Acangaú, 1996. p. 141.
- LOPES, D. M.; POMPOLO, S. G. ; TAVARES, M. T. ; CAMPOS, L. A. O. Caracterização citogenética de *Melipona mondury* Smith 1863 e *Melipona rufiventris* Lepeletier 1836 (Hymenoptera: Apidae) por banda C e fluorocromos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 52. 2006, Foz do Iguaçu. **Resumos...**Foz do Iguaçu, SBG, 2006. p. 234.
- LORITE, P.; ARÁNEGA, A. E., LUQUE, F.; PALOMEQUE, T. Analysis of the nucleolar organizing regions in the ant *Tapinoma nigerrimum* (Hymenoptera, Formicidae). **Heredity**, v. 78, p. 578-582, jul. 1997.
- MAFFEI, E. M. D.; POMPOLO, S. G.; SILVA-JUNIOR, J. C.; CAIXEIRO, A. P. A.; ROCHA, M. P.; DERGAM, J. A. Silver staining of nucleolar organizer regions (NORs) in some species of Hymenoptera (bees and parasitic wasp) and Coleoptera (lady-beetle). **Cytobios**, v. 104, p. 119-125, 2001.
- MENEZES, Marcia. Barros Ferreira. **Caracterização citogenética e análise da heterocromatina constitutiva em *Tetragonisca angustula angustula* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae)**. 1997. 62 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1997.

MICHENER, C. D. Classification of the Apidae (Hymenoptera). *Univers. Kansas Scien. Bul.*, v. 54, p. 75-164, 1990.

MICHENER, Charles Duncan. **The bees of the world**. 1. ed. Baltimore and London: The Johns Hopkins University Press, 2000. 913 p.

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

POMPOLO, Silvia das Graças. Análise dos cariótipos de 19 gêneros de abelhas da subfamília Meliponinae. In: 1º ENCONTRO SOBRE ABELHAS, 1., 1994, Ribeirão Preto **Anais...** Ribeirão Preto: Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP, 1994, p.143-146.

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, jul. 1995.

ROCHA, Marla Piumbini. **Análises citogenéticas em abelhas do gênero *Melipona* (Hymenoptera, Meliponinae)**. 2002, 84 f. Dissertação (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural) – Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

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

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, abr. 2002.

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

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