

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA
MOLECULAR

DIANA DE PAULA MACHADO

**CROMOSSOMOS B NO GÊNERO *Partamona* (HYMENOPTERA: APIDAE:
MELIPONINI): OCORRÊNCIA, TRANSMISSÃO E ORIGEM**

SÃO CARLOS - SP

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA
MOLECULAR

DIANA DE PAULA MACHADO

**CROMOSSOMOS B NO GÊNERO *Partamona* (HYMENOPTERA: APIDAE:
MELIPONINI): OCORRÊNCIA, TRANSMISSÃO E ORIGEM.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Genética e Evolução, Área de Concentração: Genética Evolutiva.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Del Lama

SÃO CARLOS - SP

2016

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M149c Machado, Diana de Paula
Cromossomos B no gênero Partamona (Hymenoptera:
Apidae: Meliponini) : ocorrência, transmissão e
origem / Diana de Paula Machado. -- São Carlos :
UFSCar, 2016.
67 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de
São Carlos, 2016.

1. Cromossomos supranumerários. 2. Abelhas sem
ferrão. 3. Marcador SCAR. 4. Variação geográfica. 5.
Frequência. I. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia
Molecular

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Diana de Paula Machado, realizada em 26/02/2016:

Prof. Dr. Marco Antonio Del Lama
UFSCar

Prof. Dr. Orlando Moreira Filho
UFSCar

Prof. Dr. Vander Calmon Tosta
UFES

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os que possibilitaram a realização deste trabalho, direta ou indiretamente:

À CAPES, pela concessão da bolsa de pesquisa e à FAPESP pelo financiamento deste trabalho;

Ao programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular (PPGGev) da Universidade Federal de São Carlos;

Ao meu orientador, professor Marco Antonio Del Lama, pela oportunidade de estar neste laboratório, de realizar este trabalho e por tudo que me possibilitou aprender nestes dois anos. Agradeço também por estar sempre disponível para os seus alunos e pelo exemplo que nos passa como profissional;

Aos colegas que participaram ativamente deste trabalho - Camila, Mariana, Elder, Victor e à técnica de nosso laboratório, Isabel, pela ajuda com as extrações, bem como aos demais colegas de laboratório que contribuíram com algum tipo de sugestão ou discussão;

À Doutora Sílvia Regina de Menezes Pedro, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP, pela identificação das amostras;

A todas as pessoas que participaram de coletas ou cederam amostras que foram usadas neste trabalho;

Aos professores do PPGGev que possibilitaram meu aprendizado nas disciplinas cursadas e aos professores componentes da Banca Examinadora de Qualificação ao Mestrado, pelas sugestões;

Aos membros da Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado, Prof. Dr. Vander Calmon Tosta e Prof. Dr. Orlando Moreira Filho, pela disponibilidade e pelas valiosas contribuições dadas;

Às pessoas que ajudaram de alguma forma nas coletas que realizei no Espírito Santo.

Outras pessoas não tiveram uma participação direta na realização deste trabalho, mas, com certeza, foram importantes para que esta etapa fosse concluída. Portanto, agradeço também a estas pessoas:

Aos meus pais Rosy e Sebastião, por todo o incentivo e suporte. Obrigada por me proporcionarem oportunidades para que pudesse seguir meus objetivos. Qualquer conquista na minha vida é uma conquista de vocês também, pois nada teria sido realizado sem todo o incentivo e amor de vocês;

Ao meu irmão Dominique e a toda a minha família, que sei que estão sempre torcendo por mim, mesmo de longe;

A todos os colegas de laboratório - Pedro, Teca, Dani, Kátia, Elder, Jamile, Camila, Mariana, Isabel, Dani e Tony, por proporcionarem um excelente ambiente de trabalho. Foi um prazer fazer parte deste grupo. Aos que tive maior convivência, muito obrigada também pela amizade proporcionada;

Ao professor Vander Calmon Tosta, da Universidade Federal do Espírito Santo, meu orientador na graduação que participou dos meus primeiros passos na vida acadêmica, sempre incentivando e ajudando a seguir o melhor caminho;

A todos os professores que participaram da minha formação;

Às meninas da República Aloha - Jé, Mari, Anatterra, Gi, Luiza, Malau e Carol - por terem me acolhido em São Carlos. Sou muito grata por ter convivido com pessoas tão legais;

Aos amigos que deixei no Espírito Santo que continuam fazendo parte do meu dia a dia mesmo de longe, seja por grupos de *whatsapp* ou por conversas no *facebook*, que contribuíram com uma parcela importante para a minha felicidade nesses dois anos;

Ao Vizinho, Rodrigo A. “Mozão”. Sou grata a você por tantas coisas que é difícil descrever.

Com você tudo fica muito melhor. Obrigada!

Aos meus filhos de quatro patas (Sa)Thomás e (Ma)Luke, por terem feito os meus dias muito mais felizes.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	VI
LISTA DE TABELAS	VII
RESUMO	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUÇÃO	5
2. OBJETIVOS	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
Amostragem	20
Extração, Amplificação e Sequenciamento.....	21
Frequência	24
Transmissão.....	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
Ocorrência e Frequência.....	27
Transmissão.....	37
Origem.....	45
5. PERSPECTIVAS	56
6. REFERÊNCIAS	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama mostrando o modelo de evolução de cromossomos B proposto por Martis <i>et al.</i> (2012).....	8
Figura 2. Espécimes de operárias do gênero <i>Partamona</i>	13
Figura 3. Variedade de formas das estruturas de entrada construídas por espécies do gênero <i>Partamona</i>	14
Figura 4. Representação da amostragem utilizada	21
Figura 5. Método empregado para a visualização de fragmentos obtidos com os <i>primers</i> SCAR, específicos para cromossomos B de <i>Partamona</i>	22
Figura 6. Mapa mostrando a frequência de colônias com cromossomos supranumerários em cada estado onde ocorre a espécie <i>P. helleri</i>	30
Figura 7. Relação entre latitude e frequência de colônias com cromossomo B em <i>P. helleri</i>	32
Figura 8. Eletroferogramas das sequências SCAR parciais obtidas com o par de <i>primers</i> OPK14A + Crb1R (A) e o par de <i>primers</i> Crb1F + OPK14B (B)	46
Figura 9. Haplótipos obtidos em nosso laboratório para região SCAR	47
Figura 10. Alinhamento das sequências obtidas com os <i>primers</i> SCAR específicos para cromossomos B de <i>Partamona</i> mostrando as regiões onde as sequências obtidas em nosso laboratório foram diferentes das obtidas em outros trabalhos.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de amostras sequenciadas para a região SCAR, incluindo todas as espécies que apresentaram este marcador.....	24
Tabela 2. Frequência de colônias (col) e de indivíduos (ind) com o marcador SCAR nas espécies que apresentaram este marcador	31
Tabela 3. Resultados dos testes de χ^2 considerando como hipótese nula que os cromossomos B de <i>P. rustica</i> , <i>P. cupira</i> e para a população total (t), norte (n) e sul (s) de <i>P. helleri</i> apresentam uma transmissão usual.....	38
Tabela 4. Análise de transmissão dos cromossomos B a partir de dados citogenéticos extraídos de outros trabalhos	40

RESUMO

Partamona (Schwarz, 1939) é um gênero de abelhas sem ferrão que apresenta como interessante característica a presença de cromossomos B em algumas espécies. Até o momento, esses cromossomos haviam sido identificados em seis espécies intimamente relacionadas, todas incluídas no clado cupira, e *P. helleri*, de posição incerta na filogenia de *Partamona*, mas possivelmente relacionada a este clado. A análise de 894 colônias provenientes de 128 localidades de 13 espécies do gênero, utilizando um marcador SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*) específico para os cromossomos B de *Partamona*, permitiu ampliar o conhecimento do número de espécies do gênero portadoras destes cromossomos, incluindo espécies do clado pearsoni. A partir dos resultados desta análise foi possível também, definir a frequência dos cromossomos B nas espécies portadoras. Em *P. helleri* foi encontrada uma correlação positiva significativa entre latitude e frequência de cromossomos B, com maior frequência no norte e diminuição em direção ao sul da distribuição da espécie. A taxa de transmissão de cromossomos B foi estimada para as três espécies em que estes cromossomos foram mais frequentes (*P. helleri*, *P. cupira* e *P. rustica*). O resultado foi consistente com o esperado para um comportamento meiótico regular na transmissão dos cromossomos B da rainha para a prole, sugerindo que nessas espécies não ocorra um desvio meiótico que favoreça a transmissão. As sequências obtidas com os *primers* SCAR apresentaram alta qualidade e foram diferentes das sequências reportadas na literatura, não apresentando sítios indefinidos, apontando para uma maior acurácia de sequenciamento com o uso dos *primers* internos desenhados em nosso laboratório. A comparação entre as sequências revelou uma alta similaridade entre espécies, com apenas dois haplótipos e ausência de diferenças intraespecíficas, sugerindo uma origem única para os cromossomos B de *Partamona*. A sequência obtida para *P. helleri* foi diferente da sequência obtida para as

outras espécies do clado cupira, sugerindo que essa espécie não transmitiu os cromossomos B para as outras espécies do grupo, como previamente sugerido. A alta frequência de cromossomos B em algumas espécies do gênero e a presença de cromossomos B em espécies do clado pearsoni sugere uma história evolutiva mais complexa e uma origem mais antiga do que se presumia anteriormente para os cromossomos B de *Partamona*.

Palavras-chaves: Cromossomos supranumerários, abelhas sem ferrão, Marcador SCAR, variação geográfica, frequência, acumulação, origem interespecífica.

ABSTRACT

Partamona (Schwarz, 1939) is a stingless bee genus which has as an interesting trait, the presence of B chromosomes in some species. These chromosomes were identified in six closely related species so far, all included in the cupira group, except *P. helleri*, which has an uncertain position in *Partamona* phylogeny, but it is possibly related to this group. We analyzed 894 colonies from 128 locations of thirteen species, using a SCAR marker specific for *Partamona* B chromosomes. The results enabled an increase in knowledge about species number with supernumerary chromosomes in this genus, including species from the pearsoni clade. The high number of colonies analyzed allowed to set the B chromosomes frequency on carrier species. A significant positive correlation between latitude and B chromosomes frequency was found in *P. helleri*, with higher frequency in north decreasing towards the south of the species distribution. The B chromosome transmission rate was estimated for three species that showed the highest frequencies of these chromosomes (*P. helleri*, *P. cupira* and *P. rustica*). The result was as expected for a regular meiotic behavior, which queens with one supernumerary chromosome have 50% chance to transfer the B chromosome to the offspring, suggesting an absence drive in these species. The Sequences obtained using SCAR primers had high quality and were different from those previously reported in another studies, showing no undefined sites, indicating greater effectiveness for sequencing using the internal primers designed in our laboratory. The comparison between obtained sequences revealed a high similarity between species, with only two haplotypes and no intraspecific differences, suggesting a single origin for *Partamona* B chromosomes. The sequence obtained for *P. helleri* was different from that obtained for the cupira clade species, suggesting that *P. helleri* did not transmit the B chromosomes to the other species, as previously suggested. The high frequency in some species and the presence in the pearsoni clade suggest a more complex

evolutionary history and an older origin than previously thought for *Partamona* B chromosomes.

Keywords: Supernumerary chromosomes, stingless bee, SCAR marker, geographic variation frequency, drive, interspecific origin.

1. INTRODUÇÃO

Além do complemento cromossômico regular, algumas espécies apresentam cromossomos extras, chamados cromossomos B ou supranumerários, que possuem características peculiares que os diferem dos cromossomos do complemento padrão (cromossomos A). A definição mais usual para estes cromossomos foi cunhada na primeira conferência sobre cromossomos B por J. P. M. Camacho e J. S. Parker, onde foram definidos como “*cromossomos supranumerários dispensáveis que não recombinaem com cromossomos A e seguem seus próprios padrões evolutivos*” (Beukeboom 1994). Esta definição traz algumas das principais características dos cromossomos supranumerários: são considerados dispensáveis, pois estão presentes em apenas alguns indivíduos, colônias ou populações das espécies que os carregam, não sendo necessários para o ciclo de vida normal destas espécies; são provavelmente originados dos cromossomos A, mas diferem destes cromossomos e não pareiam com nenhum deles, apresentando seu próprio padrão de evolução com herança independente do genoma do hospedeiro.

A presença de cromossomos supranumerários já foi relatada na maioria dos grupos de animais e plantas, além de espécies de fungos (Camacho *et al.*, 2000). Nas espécies que os apresentam, a frequência pode variar entre populações, podendo inclusive estar ausentes em alguns locais, enquanto em outros aparecem em alta frequência, como é o caso do gafanhoto *Eyprepocnemis plorans*, para o qual existe um limite geográfico para a presença de cromossomos supranumerários (Cabrero *et al.*, 1997). Diferenças interpopulacionais na frequência destes cromossomos dependem de quatro principais fatores: 1) fatores seletivos, ou seja, se as condições ecológicas em que a população hospedeira se encontra influenciam na presença de cromossomos B; 2) fatores históricos, pois a frequência de cromossomos supranumerários pode ser diferente entre populações devido ao número de gerações em que

eles estão presentes em cada população; 3) transmissão, já que a intensidade de acumulação pode ser diferente entre populações e, 4) fatores aleatórios, que são expressos pela ação da deriva genética em populações finitas. Porém, os quatro tipos de fatores provavelmente agem simultaneamente, tornando difícil avaliar a importância relativa de cada um deles, mesmo após análises intensas (Camacho *et al.*, 2000).

A origem dos cromossomos B é uma questão que desperta grande curiosidade, embora pouco se saiba sobre ela. A visão usualmente aceita é de que são derivados dos cromossomos A, como um produto secundário da evolução do cariótipo normal, ou então são gerados em resposta a hibridações interespecíficas, podendo ter origem diferente em cada espécie. Como exemplo de cromossomo supranumerário com origem interespecífica é possível citar o PSR de *Nasonia*, em que evidências sugerem que esse elemento foi transferido de uma espécie do gênero *Trichomalopsis* (McAllister & Werren 1997). Embora alguns exemplos de origem interespecífica possam ser citados, a origem intraespecífica de cromossomos B parece ser mais comum. Evidências foram dadas, por exemplo, no gafanhoto *Eyprepocnemis plorans*, em que o cromossomo B2 provavelmente é derivado de um cromossomo sexual (López-León *et al.*, 1994), no gafanhoto *Locusta migratoria* (Teruel *et al.*, 2009), na planta *Crepis capillaris* (Jamilena *et al.*, 1995) e no centeio (*Secale cereale*) (Houben *et al.*, 1996), onde os cromossomos B provavelmente tiveram origem a partir de autossomos das espécies.

No momento da origem, é esperado que os cromossomos B compartilhem homologias com o cromossomo parental, mas a evolução independente subsequente requer isolamento genético de qualquer elemento do núcleo. Os cromossomos B são constituídos em grande parte por sequências repetitivas, que podem ser específicas de Bs ou apresentam similaridades com outras repetições. Em alguns casos, a quantidade de sequências repetitivas é maior do que no complemento A, sugerindo uma amplificação massiva de *motifs* de repetição em uma

escala de tempo relativamente pequena (Camacho *et al.*, 2000). Outro tipo de sequência que pode estar presente é o DNA organelar. Cromossomos B de centeio, por exemplo, apresentam uma grande quantidade de Nupts (*nuclear plastid DNA*) e Numts (*nuclear mitochondrial DNA*) com relação aos cromossomos A, e nos Bs essas sequências apresentam alta frequência de mutações (Martis *et al.*, 2012). Além destas, podem estar presentes sequências de genes que representam cópias dos cromossomos A (Martis *et al.*, 2012).

Com base na composição dos cromossomos B de centeio, Martis *et al.* (2012) propuseram um modelo para a evolução dos cromossomos B em vários passos (Figura 1). Inicialmente, um proto cromossomo B é formado pela duplicação de segmentos do genoma, seguida pela recombinação com vários cromossomos A e, devido aos rearranjos com vários cromossomos diferentes, o emparelhamento com qualquer cromossomo regular passa a ser restrito. A partir de então, ocorre o início da evolução independente do cromossomo B nascente. A presença de sequências repetitivas de rápida evolução, juntamente com a redução da pressão seletiva sobre a integridade gênica, predispõe um cromossomo B nascente a sofrer novas modificações estruturais rápidas. A expressão de genes parálogos presentes no B é inicialmente suprimida por mecanismos epigenéticos e, posteriormente, os genes são degenerados devido a mutações e inserção de sequências derivadas de outras regiões de cromossomos A e de genomas organelares. Uma exceção ocorre em sequências que proporcionam qualquer vantagem para a manutenção dos Bs na população. Estes dados sugerem que os cromossomos B abrigam genes e sequências que não apresentam um benefício seletivo imediato e podem ter um papel fundamental na evolução dos genomas (Houben *et al.*, 2014).

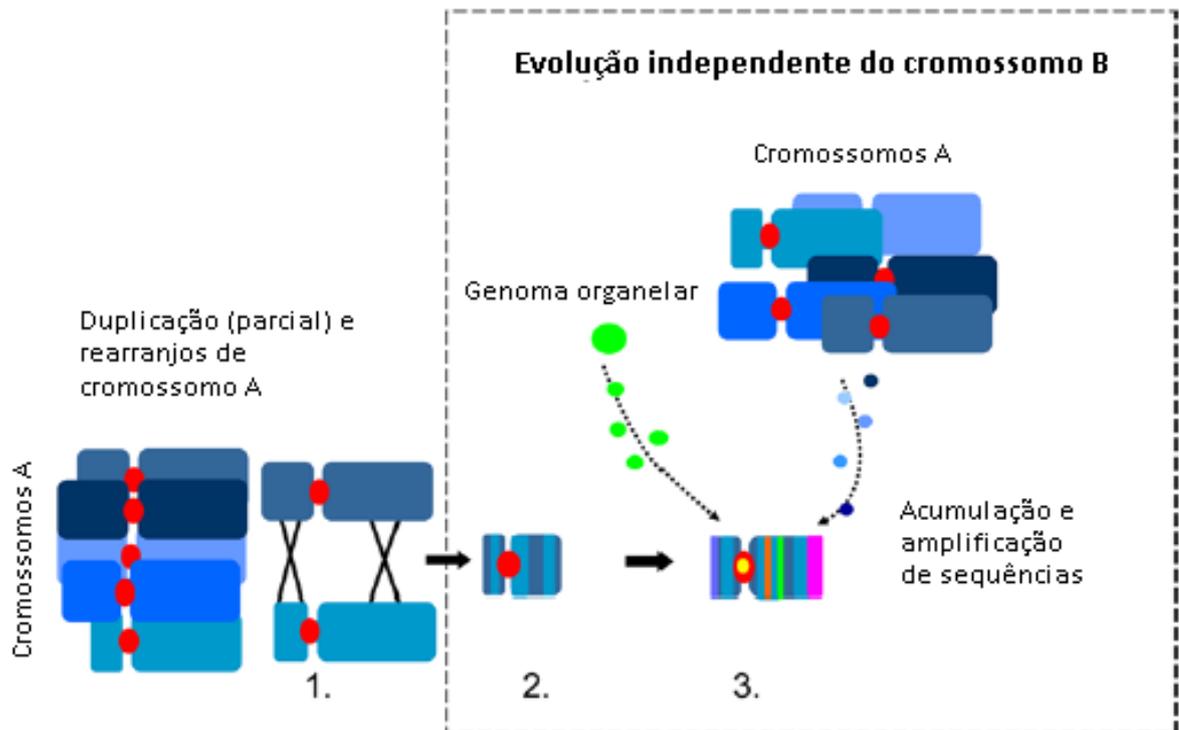


Figura 1. Diagrama mostrando o modelo de evolução de cromossomos B proposto por Martis *et al.* (2012). Neste modelo, a evolução do cromossomo B ocorre nos seguintes passos: 1-Duplicação e rearranjos de fragmentos de cromossomos A; 2- Ausência de pareamento com qualquer cromossomo do complemento A, iniciando a evolução independente; 3- Acumulação de seqüências organelares e fragmentos de cromossomos A, amplificação de seqüências repetitivas específicas do B, inativação dos genes derivados do complemento A. (Imagem: Houben *et al.*, 2014)

Após sua origem, a manutenção de cromossomos B ao longo das gerações nas espécies portadoras pode ser explicada por duas hipóteses principais: o modelo heterótico e o modelo parasita ou egoísta. Ambos os modelos assumem a existência de forças antagônicas que acarretam um equilíbrio na frequência dos Bs nas populações. O modelo heterótico assume que os cromossomos B apresentam um efeito positivo no *fitness* quando estão em baixo número, aumentando a frequência na população, e um efeito negativo quando presentes em números elevados, o que reduz a frequência desses cromossomos. No modelo parasita, o equilíbrio é resultado da redução na frequência de cromossomos B por efeitos deletérios no

fitness do hospedeiro em oposição ao modo de herança não usual devido a um comportamento meiótico e mitótico irregular, que gera taxas de transmissão acima do esperado para cromossomos normais, causando acumulação (Camacho *et al.*, 2000).

Uma variedade de mecanismos pode estar envolvida na acumulação (*drive*), podendo ocorrer antes, durante ou depois da meiose (Jones 1991). Segundo este autor, um mecanismo pré-meiótico pode ser ocasionado por instabilidades mitóticas durante o crescimento e desenvolvimento do indivíduo, que gera um número desigual de cromossomos B nos tecidos ou órgãos. A acumulação (*drive*) ocorre porque as células germinativas apresentam preferencialmente um maior número de Bs. O mecanismo meiótico é gerado pela disposição do cromossomo B preferencialmente no pólo germinativo que, conseqüentemente, é incorporado no gameta funcional. Já a acumulação pós-meiótica é mais frequente em plantas, onde a formação de grãos de pólen envolve duas divisões mitóticas pós-meióticas que dão origem aos núcleos generativos e vegetativos; a não-disjunção do cromossomo B nesta mitose e a migração preferencial dos mesmos para o núcleo generativo são responsáveis pelo acúmulo destes cromossomos. Um caso excepcional de acumulação (*drive*) ocorre no cromossomo B de *Nasonia*, chamado *Paternal Sex Ratio* (PSR), que provoca a condensação e perda dos cromossomos paternos que o acompanham, transformando o zigoto diplóide (feminino) em machos haplóides carregando o cromossomo B (Werren, 1991).

Existem também casos de Bs que não têm um mecanismo de acumulação, com uma transmissão usual (Camacho *et al.*, 1997a; Oliveira *et al.*, 1997) . Subseqüente à sua origem, os cromossomos supranumerários precisam ter um mecanismo de acumulação, pois a falta de sinapse e comportamento meiótico irregular se oporia à habilidade de se tornar fixado por deriva genética. Devido a isto, cromossomos B que não apresentam acumulação em populações atuais provavelmente tiveram algum mecanismo no passado que os permitiram se

estabelecer nas populações e, por isto, são presumidamente derivados de Bs parasitas que perderam o desvio meiótico ou de cromossomos B que já tiveram efeito benéfico no *fitness*, proporcionando seu estabelecimento na população (Camacho *et al.*, 2000). Em muitos casos, a supressão da acumulação dos Bs pode ser desempenhada por fatores genéticos localizados nos cromossomos A, como já foi demonstrado em várias espécies (revisado por Camacho *et al.*, 2000). Isso ocorre porque cromossomos B parasitas impõem uma carga genética no hospedeiro e favorecem a evolução de qualquer variante genética que reduza essa carga, tanto eliminando a acumulação do cromossomo B, quanto tamponando qualquer efeito deletério.

O estudo dos cromossomos B desperta grande curiosidade em muitos aspectos, pois esses cromossomos podem ter um papel fundamental na evolução de genomas e o através do estudo destes cromossomo podemos adquirir conhecimentos úteis sobre o funcionamento e evolução dos genomas, especialmente com relação a elementos egoístas (Jones *et al.*, 2008; Houben *et al.*, 2014). Ademais, questões como o mecanismo de estabelecimento dos Bs nas populações naturais através da acumulação, os efeitos desses cromossomos e a origem e evolução vêm sendo alvo de estudos, e apesar de alguns avanços, muito ainda se tem a descobrir sobre todas essas questões. Os cromossomos B presentes nos diferentes organismos apresentam uma origem e evolução diferente, e cada cromossomo B estudado pode nos fornecer novas idéias sobre os mecanismos de evolução destes cromossomos.

Na ordem Hymenoptera, cromossomos B já foram descritos, por exemplo, em diversas espécies de formigas (Imai, 1974; Imai *et al.*, 1977; Palomeque *et al.*, 1990) e vespas, a exemplo de *Trypoxylon albitarse* (Araujo, 2002), além do caso bem reportado do PSR do gênero *Nasonia*. Em abelhas, cromossomos B foram descritos nas espécies *Melipona quinquefasciata* (Rocha, 2002), *Melipona rufiventris* (Lopes *et al.*, 2008), *Tetragonisca fiebrigi* (Barth *et al.*, 2011) e em espécies do gênero *Partamona*. Os cromossomos

supranumerários de *Partamona* vêm sendo estudados desde 1991 quando foram descobertos na espécie *Partamona helleri* (Costa *et al.*, 1992), tendo sido encontrados, posteriormente, em outras espécies do gênero. Apesar do avanço em alguns pontos básicos do conhecimento sobre os cromossomos B de *Partamona*, muitas questões ainda não foram esclarecidas.

A presença de cromossomos B em várias espécies, com provável origem comum, é uma característica vantajosa para os estudos sobre cromossomos supranumerários, já que esse fator facilita traçar mais satisfatoriamente a história evolutiva dos cromossomos B, com a comparação de polimorfismos entre as espécies que os apresentam. Além disso, apesar da existência de lacunas no conhecimento sobre esses cromossomos em *Partamona*, já foram realizados estudos que trataram da presença, morfologia e origem, além de estudos que resultaram na obtenção de um marcador SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*) específico para os cromossomos B do gênero.

Com relação a aspectos biológicos, vale ressaltar algumas características vantajosas ao se estudar os cromossomos B em *Partamona*. Estas abelhas apresentam uma forma de reprodução bastante peculiar, a partenogênese arrenótoca, em que as fêmeas são originadas de ovos fertilizados e são diplóides e os machos, de ovos não fertilizados sendo, portanto, haplóides. Para estudos genéticos isto é uma vantagem já que o genótipo do macho é idêntico aos gametas produzidos, sendo possível identificar na prole qual parte do genótipo foi herdada de cada um dos genótipos parentais. A eussocialidade, a monandria e a monoginia do gênero facilitam o estudo de famílias, já que todas as operárias presentes em uma colônia são filhas de um único pai e uma única mãe; assim, em estudos sobre transmissão, por exemplo, não seria necessário realizar cruzamentos. Além disso, por serem organismos que vivem em colônias e, em alguns casos, com distribuição em áreas urbanas, a coleta de material para estudos é facilitada. O conhecimento prévio da presença de cromossomos B em, pelo menos,

seis espécies, bem como algumas características relacionadas à biologia do gênero são características que tornam *Partamona* um bom modelo para estudos com cromossomos supranumerários.

Organismo Modelo

O gênero *Partamona* está incluído na tribo Meliponini, que agrupa as abelhas conhecidas como “abelhas sem ferrão” (Figura 2). As abelhas desse gênero são exclusivamente neotropicais, com ampla distribuição, ocorrendo do México ao sul do Brasil (Camargo & Pedro, 2003). A nidificação ocorre em uma ampla variedade de substratos, sendo que a maioria é termitófila obrigatória, nidificando em termiteiros ativos ou inativos. É comum também a construção de ninhos em raízes de epífitas, ocos de árvores, ninhos abandonados de aves e em locais alterados pela ação humana, onde nidificam em buracos em paredes, beirais e cumeeiras de casas ou sob aparelhos de ar condicionado, por exemplo (Camargo & Pedro, 2003). Os ninhos das espécies do gênero são elaborados, ornamentados e com formas bastante variadas, especialmente com relação à estrutura de entrada (Figura 3), sendo inclusive informativos para a identificação e das relações filogenéticas das espécies.

Atualmente, o gênero compreende 33 espécies divididas em cinco clados monofiléticos com base em caracteres biogeográficos, morfológicos e de nidificação: bilineata/epiphytophila, formado por espécies não termitófilas e os clados cupira, testacea, nigrior e pearsoni, todos formados por espécies que nidificam em termiteiros (Pedro & Camargo, 2003; Camargo & Pedro, 2003). A espécie *P. helleri* tem uma posição incerta na filogenia do gênero. Embora a distribuição geográfica desta espécie seja congruente com a distribuição do clado cupira, a nidificação não é realizada em termiteiros e, segundo os autores, a espécie pode constituir um ramo basal em relação aos clados formados por espécies

termitófilas (*testacea*, *nigrior*, *pearsoni* e *cupira*) ou constituir um clado relacionado ao clado *cupira* (Camargo & Pedro, 2003).



Figura 2. Espécimes de operárias do gênero *Partamona*. A) Visão lateral de *Partamona ailyae*, B) Visão lateral de *Partamona seridoensis*, C) Visão lateral de *Partamona vicina* e D) Visão frontal de *Partamona mourei*. (escalas correspondem a 1mm)

Os estudos envolvendo esse gênero vão desde estudos de ecologia de nidificação (Barreto & Castro 2007), taxonomia e biogeografia (Pedro & Camargo 2003; Camargo & Pedro 2003), entre outros, a estudos genéticos. Entre alguns exemplos de estudos moleculares envolvendo o gênero *Partamona* destacam-se estudos filogenéticos das abelhas sem ferrão (Costa *et al.*, 2003; Rasmussen & Cameron, 2010), de colonização (Ferreira 2011) e estudos populacionais (Brito & Arias, 2010; Borges *et al.*, 2010; Fernandes *et al.*, 2011). Tratando de estudos citogenéticos, apenas dez das 33 espécies foram caracterizadas: *P. pearsoni* (Tarelho, 1973), *P. helleri* (Costa *et al.*, 1992), *P. seridoensis* (mencionada como *P. aff. nigrior*) (Brito, 1998), *P. mulata*, *P. ailyae*, *P. vicina*, *P. nhambiquara* (mencionada como *Partamona sp.*)

(Brito-Ribon *et al.*, 1999), *P. peckolti* (Brito *et al.*, 2003), *P. cupira* (Marthe *et al.*, 2010) e *P. rustica* (Tosta *et al.*, 2014). Todas as espécies mostraram um número cromossômico $2n = 34$ para fêmeas e $n=17$ para machos, com exceção de *P. helleri*, *P. cupira* e *P. rustica* em que os estudos citogenéticos revelaram a presença de cromossomos supranumerários.

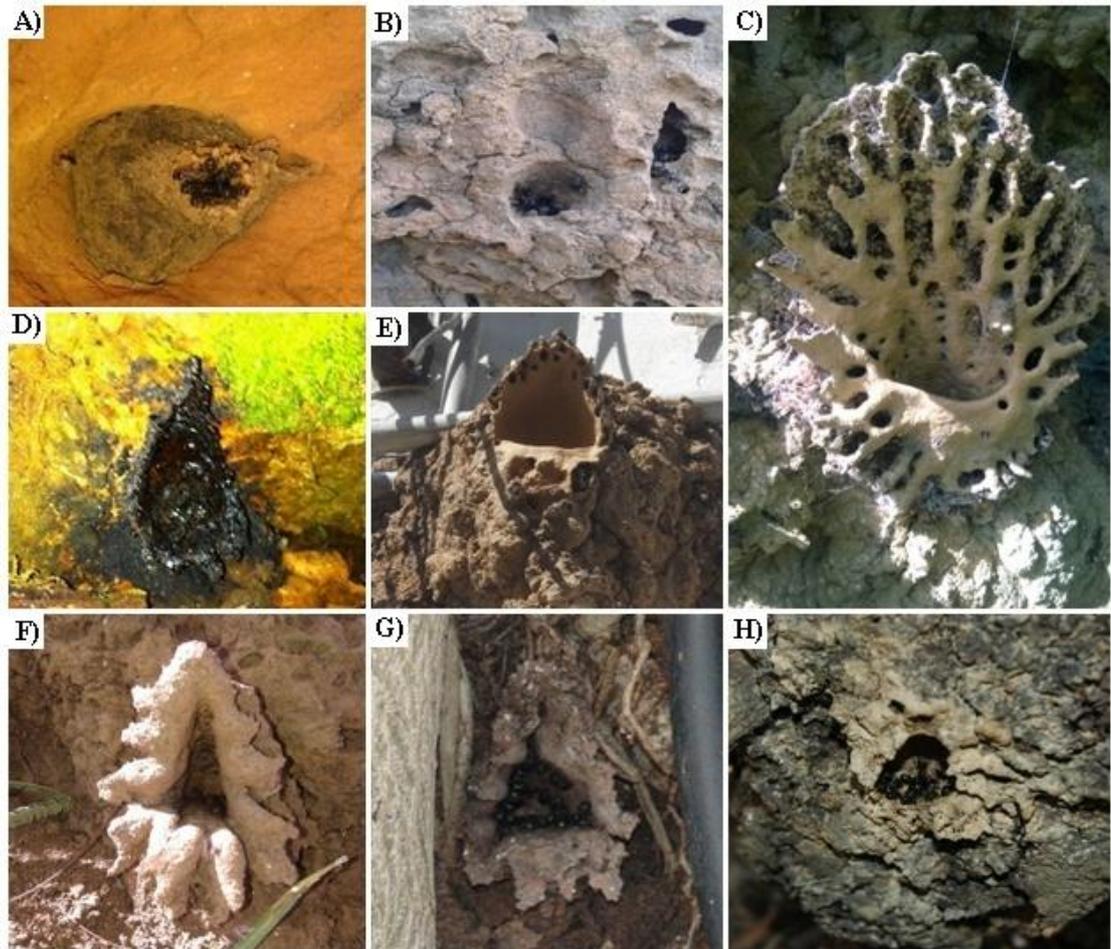


Figura 3. Variedade de formas das estruturas de entrada construídas por espécies do gênero *Partamona*. A) *P. cupira*, B) *P. rustica*, C) *P. gregaria*, D) *P. criptica*, E) *P. helleri*, F) *P. ailyae*, G) *P. mulata* e H) *P. seridoensis*. (Fotos “a” e “f” cedidas por P. F. M. Cardoso e fotos “b”, “c”, “g” e “h” cedidas por E. A. Miranda)

A primeira verificação de cromossomos B no gênero se deu em *P. helleri* por Costa *et al.*, (1992) em populações de Minas Gerais. O número de cromossomos supranumerários nesta espécie variou entre colônias e entre indivíduos da mesma colônia, podendo ocorrer de zero a três Bs de dois tipos diferentes, sendo um submetacêntrico, chamado B1 e um acrocêntrico menor, chamado B2 (Brito *et al.*, 1997). Análises posteriores de outras populações de *P. helleri* revelaram uma maior diversidade, com a caracterização de 14 tipos de cromossomos B morfologicamente distintos (Vignatti 2012; Martins *et al.*, 2009; Martins *et al.*, 2014) e maior variação na quantidade de cromossomos B por indivíduo, podendo chegar até sete (Martins *et al.*, 2014). A diversidade encontrada para estes cromossomos apresentou variação geográfica, com maior número de Bs por indivíduo e mais tipos de cromossomos supranumerários na região norte da distribuição da espécie.

Após tratamento do DNA genômico com a enzima de restrição EcoRI e hibridização com sonda de rDNA 18S de milho por *southern blot*, os indivíduos com cromossomos B apresentaram bandas que não estavam presentes em indivíduos que não têm esses cromossomos, podendo ser demonstrada assim, a presença de sequências específicas nos cromossomos B desta espécie (Brito *et al.*, 2005).

Usando técnicas moleculares, Tosta *et al.* (2004) identificaram um marcador RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) associado aos cromossomos B de *P. helleri*. Este marcador foi clonado, sequenciado e, em seguida, um marcador SCAR foi obtido (Tosta *et al.*, 2007). A obtenção de um marcador molecular específico para os cromossomos B nesta espécie possibilitou a identificação desses cromossomos também em adultos, facilitando o estudo destes cromossomos no gênero, já que técnicas citogenéticas em abelhas são feitas somente em larvas e a coleta de indivíduos nesta fase requer a abertura e manipulação dos ninhos, constituindo-se em método muito invasivo (Tosta *et al.*, 2004; Tosta *et al.*, 2007).

Este marcador foi encontrado também em alguns indivíduos das espécies *P. criptica*, *P. rustica* e *P. cupira*, sendo que em *P. cupira* e *P. rustica* foi confirmada a associação entre o marcador SCAR e a presença de cromossomos B demonstrada por citogenética (Marthe, 2008; Tosta *et al.*, 2014). O sequenciamento da região SCAR destas três espécies, além de *P. helleri*, revelou que esta sequência é muito conservada, apresentando poucas diferenças interespecíficas, o que sugere que os cromossomos B presentes nas espécies do gênero *Partamona* apresentem uma origem única.

Ainda utilizando este marcador, Correia *et al.* (2014) analisou quinze espécies do gênero e confirmou a presença de bandas obtidas com o mesmo em *P. helleri*, *P. rustica* e *P. cupira* e demonstrou também a presença deste marcador em *P. seridoensis* e *P. aff. helleri*. Todas estas espécies fazem parte de um clado monofilético do gênero *Partamona*, o clado cupira, exceto *P. helleri*, que apresenta posição incerta na filogenia, mas possivelmente é relacionada a esse clado.

A presença de cromossomos B somente em espécies intimamente relacionadas levou a uma concentração dos estudos sobre os cromossomos B de *Partamona* no clado cupira, especialmente na espécie *P. helleri*. Além de ter sido a primeira em que cromossomos supranumerários foram encontrados, esta espécie apresenta uma facilidade adicional, pois uma vez que ocorre em quase toda a Mata Atlântica brasileira e nidifica em áreas urbanas, a coleta desta espécie se torna extremamente fácil. Enquanto em *P. helleri* foram realizados estudos sobre a morfologia e origem desses cromossomos, para as outras espécies estudos sobre cromossomos supranumerários abordaram somente a presença ou ausência dos mesmos.

Pouco se sabe sobre a origem dos cromossomos B no gênero, mas a principal hipótese é que tenha ocorrido recentemente e a transmissão desses cromossomos entre espécies do gênero tenha se dado por hibridação interespecífica (Tosta *et al.*, 2014). No entanto, esta é

uma questão ainda pouco esclarecida, porque não foram apresentadas evidências empíricas que sustentem a hipótese. Segundo Tosta (2005), o processo que resultou na origem dos cromossomos B no gênero *Partamona* ocorreu dentro de um clado monofilético desse gênero que agrupa *P. helleri*, *P. criptica*, *P. cupira* e *P. rustica*, entre outras espécies. Este autor propõe ainda que essa origem possivelmente ocorreu por processos de hibridização intraespecífica. Entre as espécies em que os cromossomos B ocorrem, *P. helleri* apresentou maior frequência e diversidade de cromossomos B e estudos relacionados à origem de cromossomos B no gênero vêm focando principalmente esta espécie.

Em *P. helleri*, Brito *et al.* (1997) observaram uma diferença de tamanho entre os braços longos do segundo par de cromossomos, caracterizando um polimorfismo no cariótipo normal de algumas colônias e propuseram que esse polimorfismo poderia estar relacionado à origem dos cromossomos supranumerários nessa espécie. Brito *et al.* (2005) usando diferentes técnicas citogenéticas demonstraram similaridades entre o cromossomo B1 e pequenos segmentos dos pares 2, 9, 10 e 15 do complemento cromossômico normal. Estes dados poderiam sugerir uma origem intraespecífica para o cromossomo B1 de *P. helleri*. A fim de investigar se a origem do cromossomo B1 de *P. helleri* ocorreu a partir dos cromossomos regulares da própria espécie, Martins *et al.* (2012) realizaram um estudo de microdissecção e pintura cromossômica e a sonda gerada a partir do cromossomo B1 hibridizou somente com este cromossomo, sugerindo que a origem deste cromossomo ocorreu independentemente do cariótipo regular ou que este cromossomo se diferenciou fortemente ao longo de sua evolução independente.

A origem dos cromossomos B é um aspecto que desperta grande curiosidade, sendo o foco de muitos estudos relacionados a estes cromossomos. Outro aspecto interessante e de grande relevância para se entender a dinâmica dos cromossomos B em uma espécie é o

mecanismo de transmissão. Apesar de *Partamona* ser um bom modelo para estudos de transmissão, em nenhum dos trabalhos já produzidos nesse gênero a relevante questão sobre o mecanismo de transmissão desses cromossomos foi discutida.

Este cenário mostra que existem muitas lacunas no conhecimento sobre cromossomos B no gênero *Partamona*. Poucas espécies do gênero foram estudadas citogeneticamente, possibilitando a identificação de cromossomos B. Embora um estudo tenha sido realizado utilizando o marcador SCAR em 15 espécies do gênero (Correia *et al.*, 2014), ainda não foram realizados estudos que englobassem um grande número de colônias de espécies ao longo de toda a sua distribuição. Devido à distribuição desigual dos cromossomos B nas espécies, estudos baseados em poucos sítios alvo podem limitar o conhecimento sobre os mesmos. Neste trabalho, analisamos 894 colônias de treze espécies do gênero, incluindo espécies que não fazem parte do clado cupira, utilizando o marcador SCAR associado a cromossomos B de *Partamona* para investigar a ocorrência, o modo de transmissão e a origem destes cromossomos no gênero.

2. OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo ampliar o conhecimento sobre os cromossomos B no gênero *Partamona* em três aspectos: ocorrência, transmissão e origem.

Este objetivo foi alcançado cumprindo-se os seguintes passos:

- i) Verificar a presença de bandas obtidas com marcador SCAR associado a cromossomos B em espécies do gênero *Partamona*, identificando as espécies que apresentam estes cromossomos e como eles se distribuem ao longo da área de ocorrência de cada espécie e verificar se existe variação de frequência associada à altitude, latitude ou longitude em espécies que apresentarem cromossomos supranumerários;
- ii) Verificar se a frequência de cromossomos B encontrada para *P. helleri* é coerente com a variação geográfica encontrada a partir de técnicas citogenéticas, testando a hipótese de maior frequência no norte da distribuição e diminuição em direção ao sul;
- iii) Testar a hipótese de transmissão usual para os cromossomos B de *Partamona*, em que rainhas com um cromossomo B têm 50% de chance de transmiti-lo para a prole;
- iv) Verificar a relação entre as sequências obtidas com os *primers* SCAR das espécies que apresentarem esse marcador, descrevendo a variação intra e interespecífica para essa região;
- v) Testar a hipótese de origem dos cromossomos B no gênero *Partamona* a partir da espécie *P. helleri* e posterior transmissão para as outras espécies do gênero que apresentam esses cromossomos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

Neste estudo, analisamos operárias adultas de 894 colônias provenientes de 128 localidades de treze espécies do gênero *Partamona*. Do clado cupira, analisamos as espécies *P. ailyae*, *P. criptica*, *P. cupira*, *P. mulata*, *P. rustica* e *P. seridoensis*, além de *P. aff. helleri* e *P. helleri*, possivelmente relacionadas a esse clado (Camargo & Pedro, 2003). Analisamos também espécies de outros clados, sendo *P. chapadicola*, *P. gregaria* e *P. nhambiquara* do clado pearsoni e *P. mourei* e *P. vicina* do clado testacea (Figura 4).

As coletas foram realizadas utilizando tubo plástico ou puçá posicionado diretamente na entrada da colônia para a captura dos adultos. Cerca de 15 operárias por colônia foram coletadas e armazenadas em tubos de vidro contendo álcool absoluto para as análises genéticas. As amostras foram estocadas em freezer no Laboratório de Genética Evolutiva de Himenópteros (LGEH), na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Pelo menos um indivíduo de cada colônia foi coletado a seco e, posteriormente, montado em alfinete e encaminhado para identificação taxonômica por especialista. Para as espécies do clado cupira e espécies relacionadas, analisamos cinco indivíduos por colônia, de um total de 724 colônias. Para as demais espécies, analisamos apenas um indivíduo por colônia de um total de 170 colônias. A diferença no número de indivíduos analisados por colônia entre as espécies ocorreu porque para as espécies do clado cupira, em que a presença de cromossomos B já havia sido constatada, procuramos estabelecer a variação na frequência desses cromossomos ao longo da distribuição das espécies. Já para as espécies de outros grupos, a amostragem não foi suficiente para que pudéssemos estabelecer a frequência desses cromossomos, sendo possível afirmar somente sobre a presença do marcador SCAR.

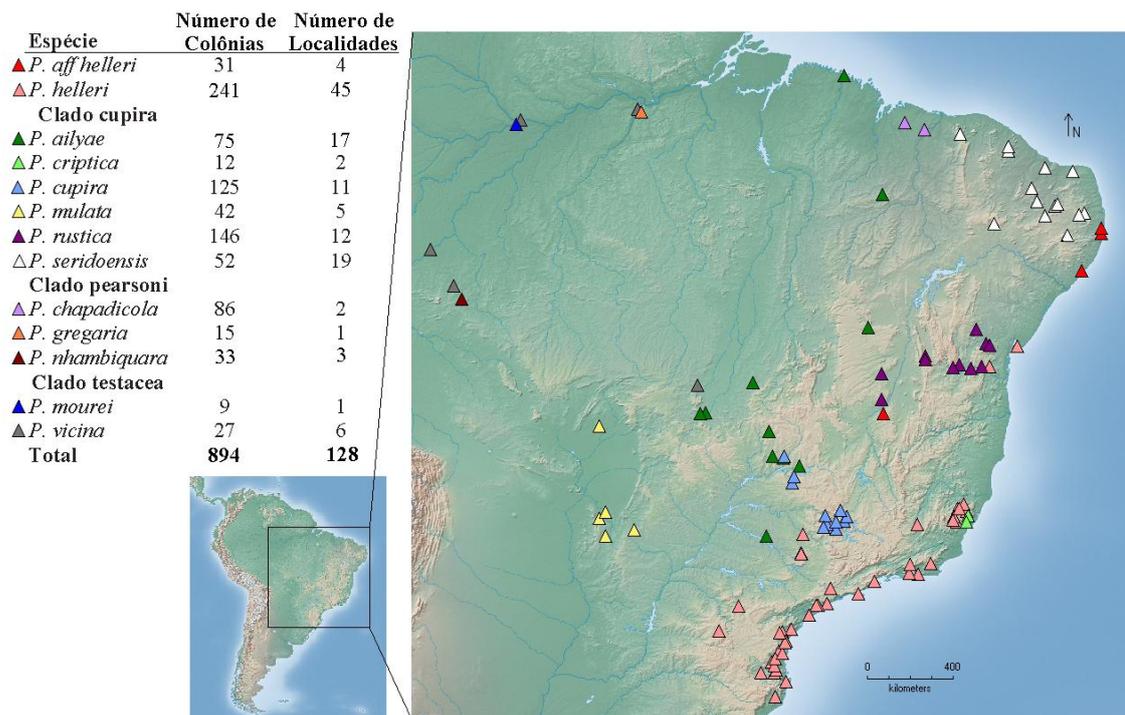


Figura 4. Representação da amostragem utilizada. Número de colônias, número de localidades onde as amostras foram coletadas e pontos onde as amostras foram coletadas, inseridos no mapa. As cores dos triângulos no mapa representam as espécies, conforme legenda ao lado.

Extração, Amplificação e Sequenciamento

O DNA das operárias foi extraído a partir das pernas pelo método de Chelex 100 (Walsh *et al.*, 1991) ou a partir do tórax pelo método de fenol-clorofórmio (Sheppard & McPherson, 1991).

Para a amplificação, utilizamos o par de *primers* SCAR descrito por Tosta *et al.* (2007), OPK-14 A (CCCGCTACACATATAATTA) e OPK-14 B (CCCGCTACACCCTAAAATAT), específico para cromossomos supranumerários de *Partamona* (Tosta *et al.*, 2007; Marthe *et al.*, 2010; Tosta *et al.*, 2014) para verificar a presença ou ausência deste marcador nas treze espécies do gênero (Figura 5). A reação de amplificação foi realizada em um volume de 10µL contendo tampão 10x, 2,5mM de MgCl₂,

250 μ M de cada dNTP, 1 μ M de cada *primer*, 1U de *Invitrogen Platinum™ DNA Polymerase* e 2 μ L do DNA extraído. As ampliações consistiram em um passo inicial de 94°C por 3 minutos e 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 1 minuto, e 72°C por 1 minuto. Após os 40 ciclos, um passo final a 72°C por 7 minutos foi realizado.

Para verificar a presença ou ausência do marcador SCAR, os fragmentos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% corado com *Gel Red™*. A corrida foi realizada utilizando-se 100V e 50mA. Após a corrida, o gel foi submetido à luz ultra-violeta e os resultados fotodocumentados (Figura 5).

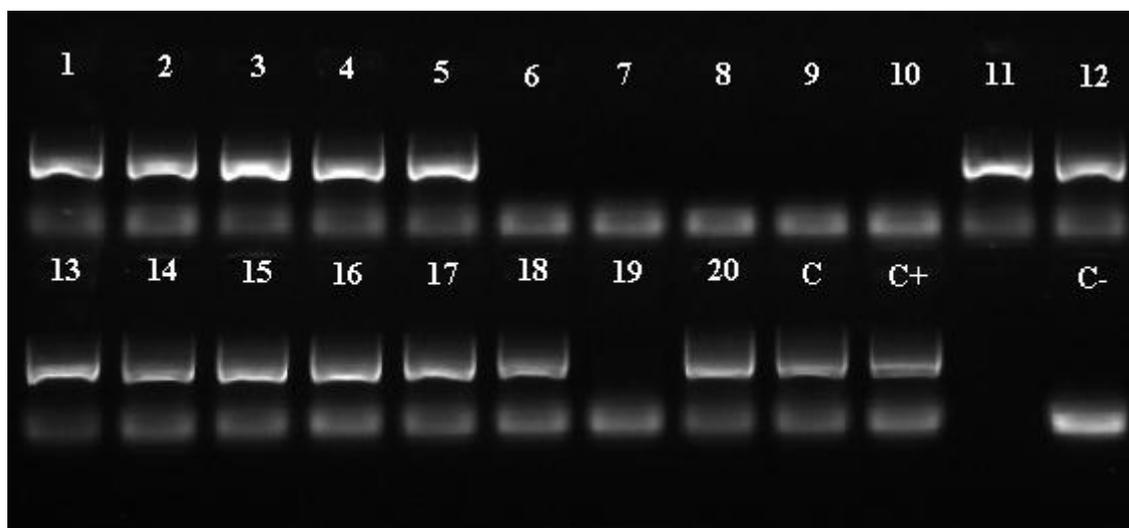


Figura 5. Método empregado para a visualização de fragmentos obtidos com os *primers* SCAR, específicos para cromossomos B de *Partamona*. A presença ou ausência do marcador SCAR é detectada a partir de eletroforese, onde indivíduos que apresentam banda apresentam o marcador SCAR (1 a 5, 11 a 18 e 20) e os indivíduos que não apresentam bandas não apresentam esse marcador (6 a 7 e 19). Na eletroforese é colocado um controle para o gel (C), ou seja, uma amostra amplificada em outra reação e que apresenta um padrão eletroforético conhecido. É feito, também, um controle positivo da reação (C+), ou seja, a amplificação de uma amostra em que a presença do marcador já era conhecida e um controle negativo da reação (C-), onde, na amplificação, o DNA é substituído por água.

Devido ao grande tamanho do fragmento amplificado com os *primers* SCAR (1482 pares de bases), desenhamos dois *primers* internos a partir da sequência descrita por Tosta *et al.*, (2007) a fim de amplificar e sequenciar toda a região SCAR com melhor qualidade e acurácia. A primeira região, de 789 pb, foi amplificada utilizando o *primer forward* OPK-14 A e o *primer reverse* desenhado em nosso laboratório CrB1 R (5'-CTTCTCGAAACACCTATACAGCC - 3'). A segunda região, de 794 pb, foi amplificada utilizando um novo *primer forward* desenhado em nosso laboratório, CrB1 F (5'-CTGCGCTTACAGATATTCTCAA - 3') e o *primer reverse* original OPK-14 B. Os dois fragmentos apresentam 101 pares de bases de sobreposição.

A purificação dos fragmentos amplificados foi feita a partir de 5µL do produto amplificado e 2µL de *Illustra™ ExoProStar™ 1-Step*, sendo realizada em um passo inicial de 37°C por 40 minutos, seguido por 80°C por 15 minutos e 20°C por 5 minutos. A reação de sequenciamento foi realizada em nosso laboratório utilizando 1µL do produto da reação anterior (purificação), 3µL de tampão de sequenciamento (*Save Money 2,5 X*), 1µL de *Big Dye v3.1 (Applied Biosystems)*, 1µM de *primer* em reação de volume final igual a 10µL. A reação foi realizada em um passo inicial de 96°C por 1 minuto e 40 ciclos de 96°C por 15 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Ao fim das reações, foram adicionados 80µL de isopropanol 75%. Após 15 minutos à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 3040g. Após precipitação do DNA, o sobrenadante foi descartado e foram realizadas duas lavagens adicionando 200µL de etanol 70% gelado, seguido por centrifugação de 10 minutos a 3040g e 4°C e descarte do sobrenadante.

Todas as espécies para as quais encontramos cromossomos B tiveram exemplares sequenciados para a região SCAR. No total, sequenciamos 50 amostras de cinco espécies

provenientes de 32 localidades, incluindo amostras de toda a área de distribuição de cada uma das espécies (Tabela 1).

As sequências *forward* e *reverse* foram obtidas após corrida das amostras em sequenciador automático ABI 3700 (*Applied Biosystems*) no Laboratório de Biotecnologia da FCAV – UNESP de Jaboticabal, SP. A edição das sequências foi realizada com o auxílio do programa *Codon Code* versão 3.7.1. (*Codon Code, Dedham, Massachusetts, United States*) e alinhadas por meio do programa BioEdit (Hall, 1999) usando a ferramenta CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994).

Tabela 1. Número de amostras sequenciadas para a região SCAR, incluindo todas as espécies que apresentaram este marcador.

Espécie	Sequências	Locais
<i>P. rustica</i>	22	8
<i>P. helleri</i>	14	12
<i>P. cupira</i>	9	9
<i>P. aff helleri</i>	2	1
<i>P. gregaria</i>	2	1
<i>P. chapadicola</i>	1	1
Total	50	32

Frequência

A frequência de cromossomos B foi estimada para cada espécie de duas formas: frequência de colônias que apresentaram pelo menos um indivíduo com estes cromossomos com relação ao total de colônias analisadas e frequência de indivíduos com cromossomo supranumerário com relação ao número total de indivíduos. Realizamos também uma análise de correlação entre frequência de cromossomos supranumerários e latitude, longitude e altitude, a fim de verificar se a presença de cromossomos B em cada espécie estava associada a alguns destes fatores. Para tanto, foi utilizado o programa BioEstat 5.0 (Ayres *et al.*, 2007).

Transmissão

Para verificar as taxas de transmissão de cromossomos B no gênero *Partamona* utilizamos os dados obtidos em *P. helleri*, *P. cupira* e *P. rustica*, espécies que apresentaram esses cromossomos em altas frequências. Se essas espécies não apresentam desvios na transmissão desses cromossomos, a taxa de transmissão esperada é de 50% (transmissão usual).

Como cada colônia é resultado de um cruzamento entre uma única rainha e um único zangão, as operárias de uma colônia serão provenientes de um único cruzamento. Para testar a transmissão de cromossomos B selecionamos somente as colônias em que entre os cinco indivíduos analisados, foram encontrados indivíduos com e sem cromossomos B. Estas colônias, presumidamente, representam um cruzamento entre uma rainha com cromossomo B e um macho sem esse cromossomo, e, portanto, teria ocorrido segregação dos cromossomos B durante a formação dos gametas da rainha. Colônias em que todos os cinco indivíduos analisados apresentaram cromossomos supranumerários ou que nenhum dos cinco apresentou estes cromossomos não foram utilizadas. Isso porque colônias em que todas as operárias não apresentaram cromossomos B podem ser resultantes de um cruzamento entre uma rainha e um zangão que não apresentam cromossomos supranumerários. Já colônias em que todas as operárias apresentaram cromossomos B presumidamente são resultantes de um cruzamento envolvendo um zangão haplóide que apresenta, pelo menos, um cromossomo B e formou apenas gametas em que esses cromossomos estavam presentes.

Um teste de χ^2 foi realizado para testar a razão de transmissão dos cromossomos B em cada uma das três espécies. Como hipótese nula, consideramos que os cromossomos B de *Partamona* têm um comportamento meiótico regular, e assim, metade da prole total produzida por cruzamentos envolvendo uma rainha com um cromossomo B e zangão sem esse cromossomo apresentaria cromossomos supranumerários (transmissão de 50%).

Adicionalmente, um segundo teste foi realizado. Como foram analisados cinco indivíduos por colônia, era esperado encontrar colônias com 0, 1, 2, 3, 4 ou 5 indivíduos com cromossomo B. Porém, como utilizamos apenas colônias que apresentaram indivíduos com e sem cromossomos B, as classes 0 e 5 foram excluídas das análises, pois se confundiriam com os resultados esperados para colônias em que ambos os pais não apresentam cromossomos B ou o zangão apresenta esse cromossomo e o transmite para toda a prole. Dessa forma, um teste de χ^2 foi realizado tendo como hipótese nula que, se os cromossomos B de *Partamona* apresentam uma transmissão regular, os tipos de famílias observadas (com um, dois, três ou quatro indivíduos com cromossomos B) devem ocorrer segundo uma distribuição binomial.

Para a espécie *P. helleri*, os dois testes foram realizados utilizando a população total, mas também separando a população total em dois grupos: o grupo de populações encontradas ao sul da distribuição e o grupo de populações do norte. Essa divisão ocorreu porque, nessa espécie, já foi relatada a presença de mais de um cromossomo B por indivíduo, particularmente em populações do Norte, o que poderia comprometer a análise de transmissão realizada aqui para essas populações, gerando um resultado que poderia apontar para uma razão de transmissão maior do que a real para essa espécie.

Em adição aos testes realizados, analisamos dados citogenéticos extraídos da literatura. Ao todo, analisamos os dados de 33 colônias, extraídos do trabalho de Costa (1991) e de Vignatti (2012). A partir destes dados, realizamos um teste de χ^2 para cada colônia, testando a hipótese de transmissão usual. Para isso, inicialmente inferimos os genótipos parentais a partir dos cariótipos dos indivíduos da colônia e posteriormente realizamos o teste para aquelas colônias em que houve segregação na transmissão dos cromossomos B de rainhas para a prole.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ocorrência e Frequência

Das treze espécies analisadas, sete apresentaram o marcador SCAR, sendo duas do clado cupira (*P. rustica* e *P. cupira*), duas possivelmente relacionadas ao clado cupira (*P. helleri*, *P. aff. helleri*) e, pela primeira vez, esse marcador foi encontrado em três espécies do clado pearsoni (*P. gregaria*, *P. chapadicola* e *P. nhambiquara*). As colônias analisadas das espécies *P. criptica*, *P. ailyae*, *P. mulata* e *P. seridoensis* (clado cupira), *P. mourei* e *P. vicina* (clado testacea) não apresentaram esse marcador.

Até o momento, das 33 espécies descritas do gênero *Partamona* apenas dez foram caracterizadas citogeneticamente, 15 espécies foram analisadas para o marcador SCAR (Correia *et al.*, 2014) e a presença de cromossomos B nesse gênero havia sido constatada em *P. rustica*, *P. seridoensis*, *P. cupira*, *P. criptica*, *P. helleri* e *P. aff. helleri* (Costa *et al.*, 1992; Marthe 2008; Correia *et al.*, 2014; Tosta *et al.*, 2014). Nestes estudos, para a maioria das espécies, menos de cinco ninhos foram analisados. No presente estudo, utilizamos uma amostragem maior e detectamos o marcador SCAR nas mesmas espécies em que este já havia sido identificado, com exceção de *P. criptica* e *P. seridoensis*, embora tenhamos analisado um número de maior de colônias. Para *P. criptica*, analisamos 12 colônias, enquanto Tosta *et al.* (2014) analisaram apenas uma colônia, proveniente da mesma localidade (Domingos Martins – Espírito Santo) e encontraram o marcador SCAR. Correia *et al.* (2014) analisaram colônias provenientes de outras localidades e também não constataram a presença do marcador nesta espécie. Para *P. seridoensis*, das 52 colônias analisadas aqui, nenhuma apresentou o marcador SCAR, enquanto a análise de cinco colônias realizada por Correia *et al.* (2014) revelou a presença do marcador em uma delas. Devido ao maior número de colônias analisadas seria esperado encontrar a presença do marcador SCAR em nossas análises, porém, como os

cromossomos B podem estar presentes somente em alguns indivíduos de algumas populações esse tipo de resultado pode ser observado.

Além das espécies em que os cromossomos B já haviam sido identificados, demonstramos aqui a presença do marcador SCAR em espécies do clado *pearsoni*. A presença de cromossomos B em espécies deste clado aponta para um novo cenário sobre a ocorrência destes cromossomos no gênero *Partamona*. Enquanto o clado *cupira* tem distribuição predominantemente na Mata Atlântica, Caatinga e Cerrado, o clado *pearsoni* tem distribuição predominantemente Amazônica, sugerindo a possibilidade da presença de cromossomos supranumerários em outras espécies do gênero, mais basais na filogenia de *Partamona*, não analisadas nesse estudo. Isso pode sugerir uma origem mais antiga para os cromossomos B no gênero.

A frequência de colônias que apresentaram cromossomos supranumerários foi 0,47 em *P. helleri*, 0,46 em *P. cupira*, 0,28 em *P. rustica* e 0,06 em *P. aff helleri*. Já a frequência de indivíduos com cromossomos supranumerários foi de 0,35 em *P. helleri*, 0,28 em *P. cupira*, 0,18 em *P. rustica* e 0,04 em *P. aff helleri* (Tabela 2). Nas espécies do clado *pearsoni*, o marcador SCAR foi encontrado em quatro dos 15 indivíduos analisados de *P. gregaria* e em apenas um dos 86 indivíduos de *P. chapadicola* (Tabela 2). Uma vez que estas espécies só tiveram um indivíduo analisado por colônia e um pequeno número de localidades (uma para *P. gregaria* e duas para *P. chapadicola*), a frequência não pode ser estimada, já que a análise de apenas um indivíduo por colônia pode fornecer uma estimativa incorreta para a frequência de cromossomos B na população. Um resultado intrigante foi encontrado em *P. nhambiquara*, pois todos os indivíduos apresentaram bandas obtidas com os *primers* SCAR. Apesar disso, não foi possível obter boas sequências para esta espécie, não sendo possível concluir sobre a

presença de cromossomos B ou se a banda constitui uma banda inespecífica, sendo necessária a realização de outro tipo de análise para confirmar a presença de cromossomos B na espécie.

A frequência de *P. aff helleri* foi baixa comparada a frequência de *P. helleri*, *P. rustica* e *P. cupira*, apresentando cromossomos B em apenas uma das localidades amostradas (Lontra – MG). Esta baixa frequência pode ser sugerida também para *P. criptica* e *P. seridoensis*, em que o marcador SCAR foi encontrado em apenas uma colônia analisada em outros trabalhos (Tosta *et al.*, 2014; Correia *et al.*, 2014) e em nenhuma das colônias analisadas aqui, mesmo com a análise de um grande número de colônias.

A ocorrência de cromossomos B se deu em amostras provenientes de toda a área de ocorrência de *P. cupira* e *P. rustica*. Comparando com o estudo realizado por Correia *et al.* (2014), a frequência de colônias com cromossomos supranumerários de *P. rustica* foi similar (frequência=0,21; N=14), porém foi diferente para *P. cupira* (frequência=0,08 ; N=25). No entanto, aqueles autores analisaram um menor número de populações e, assim, o maior número de colônias e sítios amostrais analisados aqui traça um cenário mais robusto sobre a frequência de colônias com cromossomos B nas espécies. As frequências de cromossomos supranumerários encontradas para estas duas espécies foram altas comparadas a *P. helleri*, que até então pareceu apresentar maior frequência e diversidade do que as outras espécies do gênero.

Em *P. helleri* os cromossomos supranumerários também ocorreram em toda a área amostrada, que corresponde a toda a distribuição da espécie. Correia *et al.* (2014) analisaram 40 colônias provenientes de cinco estados brasileiros e a frequência de cromossomos B encontrada foi de 50%, valor muito próximo ao encontrado no presente estudo (47%). Vignatti (2012) analisou 20 colônias provenientes do Espírito Santo e encontrou uma frequência de colônias com cromossomos B de 77% utilizando análise citogenética e 80%

para o marcador SCAR, sendo estas frequências diferentes da frequência total encontrada aqui; porém, quando analisamos apenas as amostras provenientes do Espírito Santo, a frequência encontrada foi 89% (N = 59) (Figura 6). Para as populações de Minas Gerais, Costa *et al.* (1992) encontraram cromossomos B em 50% das colônias analisadas, enquanto neste estudo estes cromossomos ocorreram em 45% das colônias (Figura 6). Apesar dos trabalhos supracitados terem utilizado um menor número de colônias, as frequências apresentadas foram congruentes às encontradas aqui.

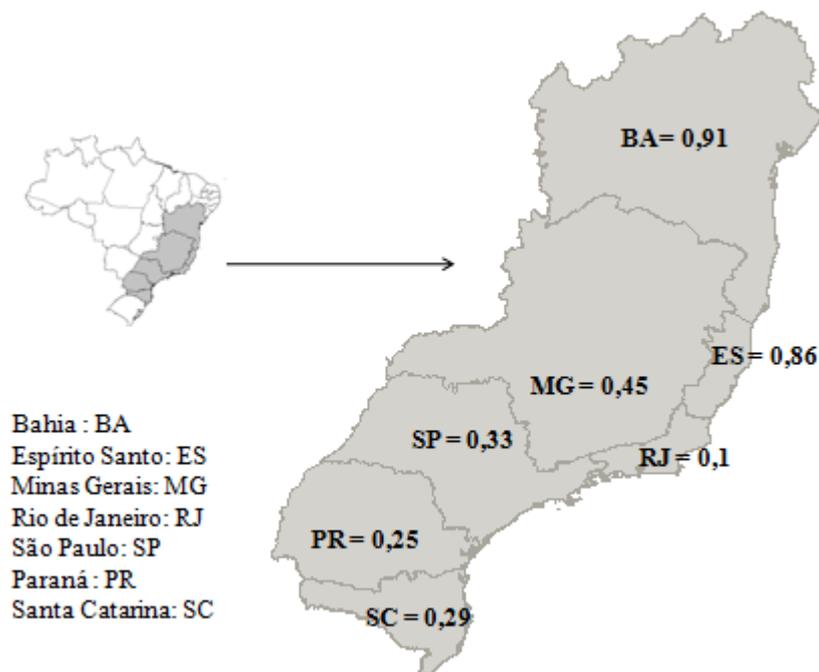


Figura 6. Mapa mostrando a frequência de colônias com cromossomos supranumerários em cada estado onde ocorre a espécie *P. helleri*.

Embora a frequência de colônias com cromossomos supranumerários em *P. helleri* e *P. cupira* tenha sido muito similar (0,46 e 0,47 respectivamente), a frequência de indivíduos com cromossomos supranumerários em *P. helleri* foi mais alta (0,35 em *P. helleri* e 0,28 em *P. cupira*). Isso pode ser explicado pela presença de um maior número de cromossomos B por

indivíduo em *P. helleri*, fato já relatado principalmente para populações da Bahia e Espírito Santo (Vignatti 2012, Martins *et al.*, 2014). Devido a isto, apesar do número de colônias com cromossomos B ser similar, as colônias que apresentam cromossomos supranumerários em *P. helleri* apresentam uma maior proporção de indivíduos com cromossomos B do que as outras espécies, já que a formação das colônias pode envolver cruzamentos entre indivíduos que apresentam mais de um cromossomo B, sendo transmitidos para uma maior proporção de indivíduos na prole.

Já que a presença de um maior número de cromossomos B por indivíduo foi observado principalmente em populações do Espírito Santo e Bahia, calculamos também as frequências de *P. helleri* separando as populações da espécie em norte (N), que inclui as populações da Bahia e Espírito Santo e sul (S), composto pelas populações dos demais estados. A frequência de colônias e indivíduos com cromossomos B em populações do norte foi muito maior do que em populações do sul, e mais alta que todas as outras espécies (Tabela 2).

Tabela 2. Frequência de colônias (col) e de indivíduos (ind) com o marcador SCAR nas espécies que apresentaram este marcador. Para a espécie *P. helleri* a análise foi feita utilizando a população total (t), a população proveniente do norte (n) e do sul (s).

Espécie	Colônias		Frequência (col)	Indivíduos		Frequência (ind)
	com B	sem B		com B	sem B	
<i>P. aff.helleri</i>	2	29	0,06	6	149	0,04
<i>P. helleri</i> (t)	113	128	0,47	424	781	0,35
<i>P. helleri</i> (n)	60	9	0,87	240	105	0,7
<i>P. helleri</i> (s)	53	119	0,31	184	676	0,21
<i>P. cupira</i>	58	67	0,46	176	449	0,28
<i>P. rustica</i>	41	105	0,28	133	597	0,18
<i>P. gregaria</i>	4	11	-	4	11	-
<i>P. chapadicola</i>	1	85	-	1	85	-

Uma análise de correlação entre a latitude e a frequência de cromossomos supranumerários em *P. helleri* revelou uma correlação positiva significativa entre estes dois fatores ($r = 0,82$; $P = 0,002$), sendo possível observar um gradiente em que a frequência de cromossomos B é maior ao norte da distribuição e diminui em direção ao sul (Figura 6; Figura 7). Em nenhuma das outras espécies foi encontrada uma associação entre a frequência de cromossomos supranumerários e fatores geográficos.

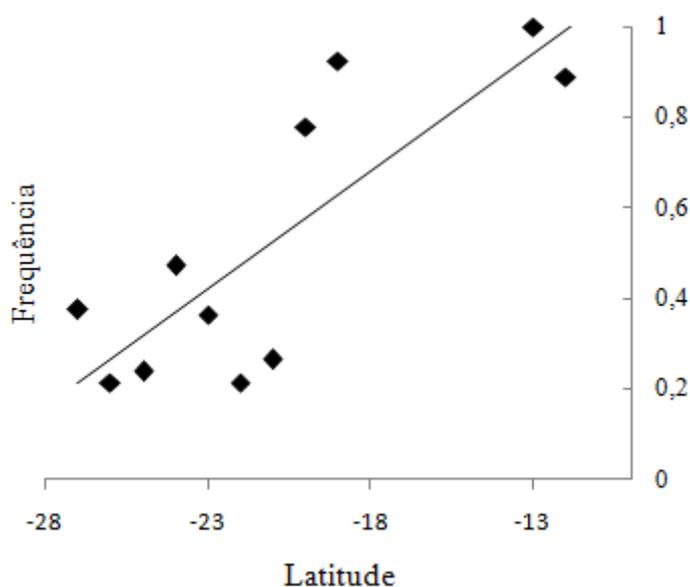


Figura 7. Relação entre latitude e frequência de colônias com cromossomo B em *P. helleri*.

Indicações de variação geográfica nos cromossomos B nessa espécie já haviam sido obtidas por técnicas citogenéticas. Em populações de Minas Gerais, mesmo com um maior número de estudos citogenéticos, somente os tipos B1 e B2 foram encontrados (Costa *et al.*, 1992; Tosta *et al.*, 2004; Brito *et al.*, 2005). Um cenário diferente foi caracterizado em populações da Bahia, ao norte da distribuição da espécie, já que nestas populações, além dos dois tipos supracitados, foram encontrados mais dez tipos de cromossomos B, inclusive cromossomos grandes de tamanho similar aos cromossomos do complemento padrão (Martins

et al., 2009; 2014). No Espírito Santo, região geográfica intermediária às duas anteriores, um padrão similar ao de Minas Gerais foi encontrado em populações do sul, com apenas os mesmos dois tipos de cromossomos B; mas, ao norte deste estado, sete tipos de cromossomos B foram encontrados, incluindo cromossomos B grandes, sendo dois deles endêmicos dessa região (Vignatti, 2012).

Assim como a diversidade de cromossomos B, a quantidade desses cromossomos por indivíduo também foi maior em populações da Bahia, podendo ser encontrados até sete desses cromossomos em um mesmo indivíduo (Martins *et al.*, 2014). Todas as outras populações analisadas até o momento apresentaram um número máximo de quatro cromossomos B por indivíduo. Todos esses dados apontam para uma maior diversidade e frequência de cromossomos B em populações do norte da distribuição da espécie, com redução em direção ao sul.

Fatores seletivos podem gerar diferenças na frequência de cromossomos B entre populações como a encontrada em *P. helleri*. É esperado que cromossomos B sejam mais frequentes em locais onde as condições ambientais são mais favoráveis à espécie, porque os Bs são mais tolerados nessas regiões. Portanto, se o norte da distribuição representa o ambiente ótimo para as populações de *P. helleri*, é esperado que sejam mais frequentes nessa região devido a uma maior tolerância à presença desses cromossomos.

Casos em que os cromossomos B são mais frequentes no ambiente ótimo das espécies já foram reportados. Um exemplo é o caso do peixe *Astyanax scabripinnis* em que cromossomos B são mais frequentes em altitudes elevadas, que constitui o ambiente mais apropriado para o desenvolvimento da espécie, com redução da frequência em altitudes intermediárias e ausência em baixas altitudes (Néo *et al.*, 2000). Um resultado similar foi obtido na planta *Crepis capillaris*. A análise da distribuição de cromossomos supranumerários

em populações britânicas desta espécie demonstrou que a maior frequência ocorre em altitudes médias, havendo uma redução tanto em altitudes mais baixas quanto nas mais elevadas, indicando que os cromossomos B dessa espécie apresentam frequências mais baixas em populações crescendo em condições sub-ótimas (Parker *et al.*, 1991). Além disso, um estudo temporal em uma população dessa espécie demonstrou que a frequência permaneceu constante após várias gerações, mesmo com um mecanismo de acumulação acentuado, sugerindo que a seleção opera contra indivíduos com cromossomos B, mantendo a frequência estável (Parker *et al.*, 1991).

Cromossomos B que conferem algum valor adaptativo positivo para a espécie hospedeira também podem ter a distribuição afetada por fatores seletivos, como é o caso do roedor *Apodemus flavicolis*. Nesta espécie, existem indicações de que a frequência de cromossomos supranumerários nessa espécie é maior em elevadas altitudes, onde as condições de frio são mais extremas (Zima & Machólan 1995). Uma correlação entre a presença de cromossomos B e aumento na massa corporal foi encontrada, e devido a isso, foi sugerido que indivíduos portadores de cromossomos B são mais bem adaptados ao frio que os não portadores (Zima *et al.*, 2003). Da mesma forma, se os cromossomos B de *Partamona* apresentam alguma vantagem seletiva para as populações do norte da distribuição é esperado que sejam mais frequentes nesta região.

Uma vez que existem diferenças entre populações nos tipos de cromossomos B apresentados, a diferença na frequência pode ser influenciada também, por diferenças nos efeitos de cada tipo cromossômico. A região norte da distribuição de *P. helleri* apresenta uma grande quantidade de Bs aparentemente endêmicos dessa região, incluindo cromossomos B grandes (tamanho similar aos cromossomos do complemento regular). Se essas variantes apresentam um menor efeito negativo no *fitness* quando estão presentes em maiores

quantidades, permitindo um acúmulo de cromossomos B em indivíduos, a frequência de cromossomos supranumerários tende a aumentar nas populações que as apresentam.

Até o momento, nenhuma indicação de efeito fenotípico dos cromossomos B foi obtida em *Partamona*. Tosta (2005) avaliou o efeito dos cromossomos B em *P. helleri* através de medida de assimetria flutuante de asas anteriores e constatou que indivíduos que possuem cromossomos B não são mais assimétricos do que indivíduos que não apresentam esses cromossomos. Porém, este trabalho levou em consideração apenas a presença de cromossomos B, utilizando o marcador SCAR, não levando em conta a quantidade de cromossomos supranumerários presente nos indivíduos, nem os efeitos de diferentes tipos cromossômicos presentes na espécie. Uma análise consistente dos efeitos dos cromossomos B na espécie *P. helleri* levando em conta os fatores citados poderia auxiliar a entender a distribuição dos cromossomos B na espécie.

Além de fatores seletivos, as diferenças na frequência de cromossomos B podem ter outras causas, tais como, por exemplo, o número de gerações desde a origem dos cromossomos B em determinada população. Quanto mais tempo estão presentes em uma população, mais tempo teriam para aumentar de frequência. Por esta razão, é provável que na área em que a origem tenha ocorrido, estes cromossomos estejam em maior frequência e diversidade, se ainda não transcorreu tempo suficiente para se espalhar por toda a área de distribuição da espécie.

Um exemplo de diferenças interpopulacionais na frequência dos Bs moldadas por fatores não seletivos ocorre no gafanhoto *Eyprepocnemis plorans*. A presença de cromossomos B nesta espécie encerra abruptamente em uma região onde existe uma barreira geográfica para a espécie. A partir desta barreira, só ocorrem gafanhotos em que os cromossomos B estão ausentes, o que sugere que os cromossomos supranumerários dessa

espécie surgiram depois da colonização das duas regiões, e por isso, atualmente só estão presentes na região onde se originaram (Cabrero *et al.*, 1997).

No caso de *P. helleri*, se a espécie tem origem na região norte da distribuição, ou os cromossomos B surgiram nessa região, é esperado encontrar frequências maiores na região norte, reduzindo gradualmente em direção à região sul, como foi encontrado. Um estudo filogeográfico dessa espécie se faz necessário para auxiliar a responder a esta questão.

Em resumo, quatro hipóteses principais podem ser levantadas para explicar a diminuição gradual na frequência observada em *P. helleri*: i) os cromossomos estão mais frequentes no norte da distribuição porque esta área representa um ambiente mais favorável para a espécie, onde carregar estes elementos parasitas seria mais tolerado; ii) cromossomos B apresentam uma vantagem seletiva para as populações do norte da distribuição; iii) os diferentes tipos de cromossomos B presentes na espécie apresentam diferentes efeitos, sendo que os cromossomos B grandes, presentes nas populações do norte, apresentam menor efeito negativo cumulativo, podendo estar presentes em maior quantidade por indivíduo gerando um aumento na frequência de cromossomos B na população; ou iv) os cromossomos B de *P. helleri* surgiram no norte da distribuição e, por esta razão, estão presentes há mais tempo nas populações dessa região e, portanto, em maior frequência. Camacho *et al.* (2000) apontaram que diferenciar os fatores que moldaram a frequência dos cromossomos B em populações de uma espécie é uma tarefa extremamente difícil e, na maioria dos casos, esses fatores estão associados. A diferença gradual na frequência de cromossomos B em *P. helleri* pode estar relacionada a qualquer um dos fatores citados, ou mesmo ao conjunto desses fatores e, por isso, identificar a razão ou razões para as diferenças populacionais encontradas nos cromossomos B nessa espécie é uma tarefa complexa.

Transmissão

Nas colônias que apresentaram indivíduos com e sem cromossomos B, a porcentagem de indivíduos em que estes cromossomos estavam presentes foi 55% para *P. helleri*, 52% para *P. rustica* e 43% para *P. cupira*. O teste de χ^2 revelou que a transmissão em *P. helleri* e *P. rustica* está de acordo com o esperado para uma taxa de transmissão cromossômica de 50%. Em colônias de *P. cupira*, a taxa de transmissão encontrada foi abaixo do esperado para uma transmissão usual. Todavia, o teste utilizando os tipos de famílias encontrados na população, um teste estatístico mais robusto, revelou um padrão de transmissão usual para as três espécies (Tabela 3).

Na espécie *P. helleri*, em estudos realizados em populações do sudeste foram encontrados até quatro cromossomos B por indivíduo. Porém, foi mais comum encontrar indivíduos com zero ou um cromossomo B. Números maiores de cromossomos supranumerários em um mesmo indivíduo foram progressivamente mais raros de serem encontrados (Costa *et al.*, 1992, Brito *et al.*, 2005; Tosta *et al.*, 2004). Em populações da Bahia, das poucas colônias analisadas, todas apresentaram indivíduos com elevados números de cromossomos B, indicando que nessa região é mais comum encontrar um maior número de Bs por indivíduo (Martins *et al.*, 2014). Mesmo incluindo estas populações uma taxa de transmissão usual foi encontrada para a espécie. Uma terceira análise, separando as populações do norte (nas quais é comum encontrar indivíduos com mais de um cromossomo B por indivíduo) das populações do sul da distribuição revelou, como esperado, menor valor do χ^2 para as populações mais ao sul (Tabela 3).

Tabela 3. Resultados dos testes de χ^2 considerando como hipótese nula que os cromossomos B de *P. rustica*, *P. cupira* e para a população total (t), norte (n) e sul(s) de *P. helleri* apresentam uma transmissão usual. A tabela apresenta os resultados para número de indivíduos analisados para cada espécie (N ind); valores de χ^2 (e valor P), considerando a hipótese de que cromossomos B tem 50% de chance de serem transmitidos, e portanto, metade dos indivíduos da população apresentariam estes cromossomos. Para o segundo teste, usando o tipo de famílias encontradas: número de colônias (N col.); Valores de χ^2 (e valor P) considerando a hipótese de que a frequência de cromossomos B em grupos familiares segue um padrão de distribuição binomial.

Espécie	N (ind)	χ^2	P	N (col)	χ^2	P
<i>P. rustica</i>	150	0,24	0,62	30	4	0,26
<i>P. cupira</i>	200	3,92	0,04	40	6,5	0,09
<i>P. helleri</i> (t)	285	1,86	0,17	57	6,42	0,09
<i>P. helleri</i> (s)	140	0	1	28	2,75	0,43
<i>P. helleri</i> (n)	145	3,65	0,06	29	7	0,07

Dados obtidos a partir de técnicas citogenéticas estão de acordo com esses achados. Utilizando os dados obtidos por Costa (1991) e Vignatti (2012) em 33 colônias de *Partamona helleri*, testamos a hipótese de transmissão usual a partir de dados citogenéticos (Tabela 4). Para isso, inicialmente, foram inferidos os genótipos parentais de cada uma das 33 colônias analisadas. As colônias em que nenhum indivíduo da prole apresenta cromossomos B ($2n = 34$ e $n=17$) são, presumidamente, derivadas de um cruzamento entre uma rainha e um zangão que não carregam esses cromossomos. Das 33 colônias, 12 foram derivadas deste tipo de cruzamento (Tabela 4 – A).

Seis das colônias analisadas apresentaram indivíduos com zero ou um cromossomo B (operárias: $2n = 34$ e $2n = 35$; machos: $n = 17$ e $n = 18$), o que indica um cruzamento entre um zangão sem cromossomos B (0B), já que se o zangão fosse portador de cromossomos supranumerários transmitiria para toda a prole, e rainha com um cromossomo B (1B). Se a

transmissão dos Bs da rainha para a prole for usual, é esperado que metade da prole apresente um cromossomo supranumerário, enquanto a outra metade não apresente. Um teste de χ^2 foi realizado para cada colônia e o resultado destes testes revelou que todas elas apresentaram a proporção esperada para uma taxa de transmissão usual de rainhas para a prole (Tabela 4 – B).

Seis colônias apresentaram indivíduos com zero, um ou três cromossomos supranumerários (operárias: $2n=34$, $2n = 35$ e $2n 36$). O cruzamento em que se espera que esse tipo de prole seja produzida seria entre um zangão sem cromossomo B (0B) e uma rainha com dois destes cromossomos (2B). Nesse caso, se a transmissão dos cromossomos supranumerários é usual, é esperado que a prole produzida seja composta por 25% dos indivíduos com nenhum B, 50% com um B e os 25% restantes com dois Bs. Os testes de χ^2 realizados para cada uma das colônias revelou um resultado congruente com esta hipótese (Tabela 4 – C).

Três colônias apresentaram operárias com zero, um, dois ou três cromossomos extras (operárias: $2n = 34$, $2n = 35$, $2n = 36$ e $2n =37$), sendo assim uma prole gerada por um cruzamento entre um zangão 0B e uma rainha 3B, que produz, portanto, quatro tipos de gametas. Devido à existência de quatro classes, o número de indivíduos analisados para essas colônias é pequeno para que o teste de χ^2 tenha alguma consistência e, portanto, o teste não foi realizado neste caso (Tabela 4 – D).

Em seis das colônias analisadas, todos os indivíduos apresentaram cromossomos supranumerários, indicando um cruzamento envolvendo um zangão com, pelo menos, um cromossomo B, que é transmitido para toda a prole. Em três destas colônias, todas as operárias analisadas apresentaram um cromossomo B ($2n = 35$), indicando um cruzamento entre uma rainha que não apresenta esses cromossomos (0B) e um zangão com um B (1B). Destas colônias, a colônia PI teve a análise de machos, além das operárias, e todos os machos

analisados não apresentaram cromossomos supranumerários ($n=17$), corroborando o tipo de cruzamento presumido (Tabela 4 – E). Nas três colônias restantes, em que todos os indivíduos eram portadores de Bs, houve variação na quantidade destes cromossomos, variando entre 1 e 3 em duas colônias (operárias: $2n = 35$, $2n = 36$ e $2n = 37$), indicando um cruzamento entre rainha com dois Bs (2B) e zangão com um B (1B) (Tabela 4 – F), e entre 2 e 4 em uma colônia ($2n = 36$, $2n = 37$ e $2n = 38$) indicando um cruzamento entre rainha com dois Bs (2B) e zangão com dois Bs (2B) (Tabela 4 – G). Nessas colônias, o teste de χ^2 foi realizado considerando apenas a proporção de cromossomos B que foi transmitida pela rainha. Se a transmissão for usual, é esperado que uma rainha com dois cromossomos produza gametas com 0, 1 e 2 Bs na proporção 1:2:1. Os resultados dos testes de χ^2 realizados foram coerentes com essa hipótese .

Portanto, em todas as colônias de *P. helleri* analisadas citogeneticamente, envolvendo diferentes tipos de cruzamento, a transmissão de cromossomos B de rainha para a prole foi de acordo com o esperado para uma transmissão usual. A análise de transmissão utilizando o marcador SCAR, apesar de indicar um resultado consistente, apresenta uma limitação já que este marcador revela apenas se os cromossomos B estão presentes ou ausentes, mas não o número de cromossomos B que um indivíduo carrega. A associação de dados citogenéticos com um resultado concordante com o obtido com o marcador SCAR sugere fortemente que a transmissão dos cromossomos B pelas rainhas do gênero *Partamona* segue um padrão de segregação cromossômica usual, em que rainhas com um cromossomo B têm 50% de chance de transmiti-lo para a prole, não havendo dessa forma um desvio na taxa de transmissão dos cromossomos B pelas rainhas.

Tabela 4. Análise de transmissão dos cromossomos B a partir de dados citogenéticos extraídos de outros trabalhos. Na tabela, é mostrado o número de indivíduos com 0, 1, 2, 3 ou 4 cromossomos B por colônia analisada, o número total de indivíduos analisados (N) e, nos casos em que foi possível, o

valor de χ^2 (e valor de P) para o teste de hipótese de transmissão usual. As colônias foram divididas pelo provável cruzamento parental que resultou na colônia em questão.

A- Cruzamento: ♀0B ♂0B

Colônia	Número de cromossomos B				Referência
	0	1	2	3	
PD	14				Costa 1991
PE	7				Costa 1991
PE ♂	1				Costa 1991
PF	9				Costa 1991
PF ♂	4				Costa 1991
PG	13				Costa 1991
PH	7				Costa 1991
PH ♂	13				Costa 1991
PJ	6				Costa 1991
PK	10				Costa 1991
PP	7				Costa 1991
AC-04	10				Vignatti 2012
VN-03	10				Vignatti 2012
VN-04	7				Vignatti 2012
VN-05	10				Vignatti 2012

B- Cruzamento: ♀1B ♂0B

Colônia	Número de cromossomos B				χ^2	P	Referência
	0	1	2	3			
PB	7	7			0	1	Costa 1991
PC	8	13			1,19	0,27	Costa 1991
PL	11	7			0,89	0,35	Costa 1991
PL ♂	12	8			0,8	0,37	Costa 1991
GL-08	6	4			0,4	0,53	Vignatti 2012
AC-03	5	2			1,29	0,25	Vignatti 2012
VN-01	4	6			0,4	0,53	Vignatti 2012

C- Cruzamento: ♀2B ♂0B

Colônia	Número de cromossomos B				χ^2	P	Referência
	0	1	2	3			
GL-04	3	4	3		0,4	0,82	Vignatti 2012
GL-09	3	6	1		1,2	0,55	Vignatti 2012
JAG-02	3	5	2		0,2	0,9	Vignatti 2012
JAG-04	2	6	2		0,4	0,82	Vignatti 2012
JAG-05	3	4	3		0,4	0,82	Vignatti 2012
AC-02	2	7	1		1,8	0,4	Vignatti 2012

D- Cruzamento: ♀3B ♂0B

Colônia	Número de cromossomos B				χ^2	P	Referência
	0	1	2	3			

GL-01	1	6	2	1	*	*	Vignatti 2012
GL-07	1	3	5	1	*	*	Vignatti 2012
JAG-03	2	3	2	1	*	*	Vignatti 2012
E- Cruzamento: ♀0B ♂1B							
Colônia	Número de cromossomos B						Referência
	0	1	2	3			
PI		30					Costa 1991
PI ♂	9						Costa 1991
PN		20					Costa 1991
AC-07		7					Vignatti 2012
F- Cruzamento: ♀2B ♂1B							
Colônia	Número de cromossomos B				χ^2	P	Referência
	0	1	2	3			
PA		10	19	16	2,69	0,26	Costa 1991
PO		5	12	3	1,2	0,55	Costa 1991
G- Cruzamento: ♀2B ♂2B							
Colônia	Número de cromossomos B				χ^2	P	Referência
	0	1	2	3			
GL-05			2	4	1,2	0,55	Vignatti 2012

O padrão de transmissão é uma característica extremamente importante para a manutenção dos cromossomos B nas populações, uma vez que, após sua origem, os cromossomos B só se estabelecem na população se apresentarem um mecanismo de acumulação, a não ser que seu aumento de frequência seja explicado por efeitos benéficos nos indivíduos que os carregam, já que a incapacidade de sinapse e comportamento meiótico irregular impediriam sua capacidade de tornar-se fixado por deriva genética (Camacho *et al.*, 2000). Em muitos casos, foram observados cromossomos B com taxa de transmissão acima do esperado para uma transmissão usual (Jones 1991). Um exemplo ocorre na espécie *Rattus rattus*, na qual um padrão de transmissão mendeliano foi encontrado para machos, enquanto para fêmeas foi encontrado um mecanismo de acumulação (Stitou *et al.*, 2004).

Casos de cromossomos B que apresentam uma transmissão usual também já foram reportados, como é o caso de *Prochilodus lineatus*. Nesta espécie, para dois tipos de

cromossomos B, foi observada uma herança usual, enquanto que para um terceiro tipo cromossômico a taxa de transmissão encontrada foi menor do que 50%. Os autores sugeriram que este último poderia encontrar-se em processo de extinção (Penitente *et al.*, 2013).

O que explica a ausência de acumulação (*drive*) dos cromossomos B em algumas espécies? Cromossomos B podem se perpetuar na população não só através da acumulação, mas também se apresentam algum efeito benéfico. Cromossomos B que não apresentam desvio na transmissão nem efeito benéfico no *fitness* são presumivelmente derivados de um cromossomo B parasita que perdeu o mecanismo de acumulação (Camacho *et al.*, 2000). À medida que os cromossomos B são difundidos nas populações através da acumulação (*drive*) podem ser neutralizados pelo genoma do hospedeiro. Uma evidência de neutralização foi demonstrada no gafanhoto *Eyprepocnemis plorans*. Os cromossomos B dessa espécie não apresentam acumulação; porém, quando fêmeas com cromossomos B são cruzadas com machos de uma população que não apresentam esses cromossomos foi verificada uma transmissão acima do usual na prole produzida. Este resultado sugeriu que a ausência de acumulação dos Bs nas populações que os apresentam é devida a uma supressão pelo genoma do hospedeiro, não havendo a existência de elementos supressores nas populações que não apresentam cromossomos B (Herrera *et al.*, 1996). Estes resultados sugerem que os cromossomos B são inicialmente sujeitos à acumulação (*drive*) em populações em que não existiam anteriormente e que os genes que suprimem esta acumulação são então selecionados. Uma vez que estes cromossomos se tornem neutros, tendem a desaparecer lentamente, a não ser que novas variantes parasitas substituam o B neutralizado (Camacho *et al.*, 1997b).

Em *Partamona*, outra hipótese pode ser levantada devido a características da biologia do gênero. As abelhas do gênero *Partamona* são organismos haplodiplóides, em que zangões são haplóides e rainhas e operárias são diplóides. Presumidamente, um macho haplóide forma

um único tipo de gameta, geneticamente igual ao próprio indivíduo e, assim, machos que apresentam esses cromossomos, o transmitiriam para 100% da prole feminina (coeficiente de transmissão = 1). Mesmo que instabilidades mitóticas durante a transmissão pudessem acontecer, reduzindo a taxa de transmissão, ainda assim, seria esperado que a transmissão pelos machos de espécies haplodiplóides fosse maior do que o esperado para espécies que não apresentam haplodiploidia.

Essas características fazem com que *Partamona* seja um caso excepcional quando se trata da transmissão de cromossomos supranumerários. Uma vez que cromossomos B se originem, o estabelecimento desses cromossomos na população pode ser facilitado. Dessa forma, a taxa de transmissão encontrada (de rainhas para a prole) está de acordo com o esperado para a transmissão em *Partamona*, já que o próprio sistema de acasalamento faz com que haja acumulação (*drive*) de cromossomos B na população.

No momento do surgimento, a alta taxa de transmissão encontrada na espécie pode fazer com que a presença de cromossomos B rapidamente se estabeleça na população, aumentando a frequência de indivíduos portadores destes cromossomos. À medida que aumenta a quantidade de indivíduos portadores, a taxa de aumento de frequência passa a ser menor, enquanto a frequência de indivíduos com mais de um cromossomo B na população aumenta. Se o número de cromossomos B por indivíduos puder ser ilimitado, a tendência é que a frequência de cromossomos B e o número de cromossomos B por indivíduo aumente cada vez mais, como é o caso observado em populações de *P. helleri* da Bahia e Espírito (frequência = 0,9 e 0,89, respectivamente) (Figura 6).

Apesar disso, sabe-se que um número alto de cromossomos B por indivíduos pode levar a efeitos deletérios no *fitness* (Jones *et al.*, 2003; Camacho *et al.*, 2000), limitando o aumento não só da quantidade de cromossomos extras por indivíduo, mas também a

frequência de indivíduos portando esses cromossomos na população, que atinge então um equilíbrio dinâmico devido a esses dois fatores antagônicos. Entender como ocorre a transmissão de cromossomos B em uma espécie é o passo inicial para entender a dinâmica desses cromossomos, porém determinar os possíveis efeitos que esses cromossomos apresentam sobre o *fitness* dos indivíduos e também o tempo em que estão presentes na população é fundamental para o esclarecimento desta questão.

Origem

Para responder questões sobre a origem dos cromossomos supranumerários em *Partamona* utilizamos, além dos dados de ocorrência, dados de sequências da região SCAR. Foram obtidas 50 sequências de amostras provenientes de 32 localidades de seis das espécies que apresentaram o marcador SCAR (*P. rustica*, *P. helleri*, *P. aff helleri*, *P. cupira*, *P. gregaria* e *P. chapadicola*). Todas as sequências resultaram de eletroferogramas de excelente qualidade (Figura 8). As sequências obtidas com o par de *primers* OPK A e Crb1 R apresentaram 789 pares de bases (pb), enquanto as obtidas com os *primers* Crb1 F e OPK B apresentaram 794 pb. Quando concatenadas, as duas apresentaram 101pb de sobreposição, resultando na obtenção do fragmento SCAR completo, que apresentou 1482pb. O conteúdo G+C da sequência SCAR foi 0,346.

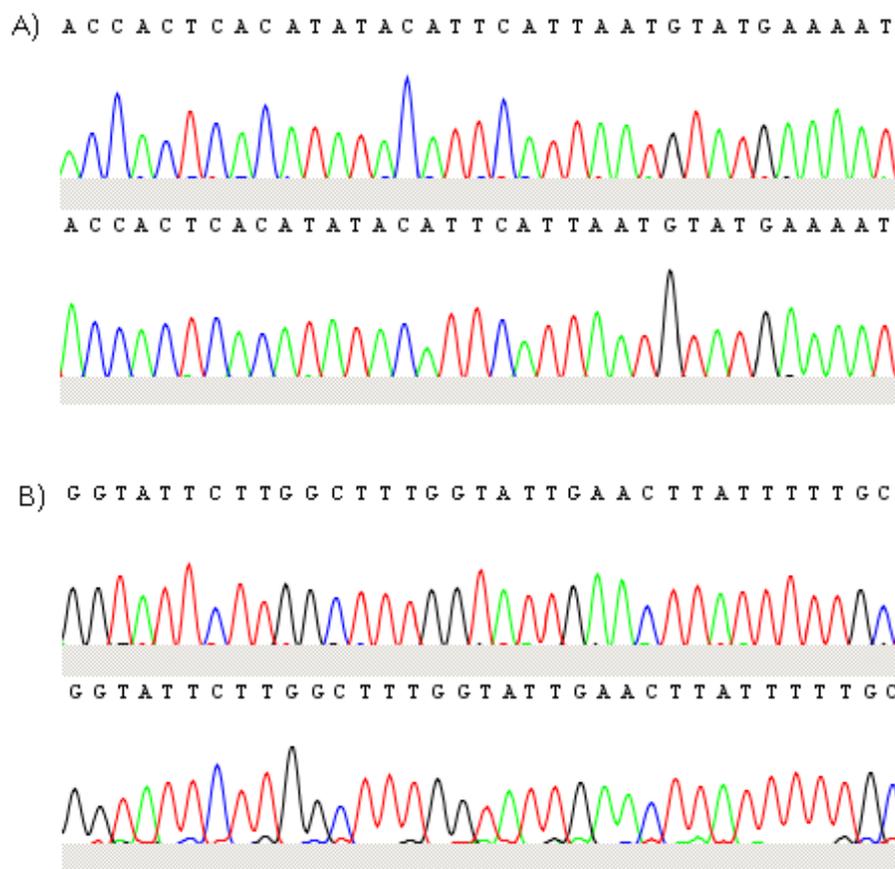


Figura 8. Eletroferogramas das sequências SCAR parciais obtidas com o par de *primers* OPK14A + Crb1R (A) e o par de *primers* Crb1F + OPK14B (B), respectivamente.

A comparação entre as sequências das diferentes espécies revelou a existência de dois haplótipos devidos a um sítio polimórfico na posição 652, representado por uma transversão entre G e T (Figura 9). Um dos haplótipos foi encontrado em todas as amostras de *P. cupira*, *P. rustica* e *P. gregaria* sequenciadas; o segundo haplótipo foi caracterizado em todas as amostras de *P. helleri*, *P. aff. helleri* e *P. chapadicola*, não se observando variação intraespecífica para o marcador SCAR nessas espécies. Para a espécie *P. nhambiquara* o resultado do sequenciamento foi inconsistente.

Haplótipo 1

```
CCCGCTACACATATAAATTAACGTTAACGGTTTCTAATAGATCTCTTTCCACCAAAAAGTAATTGAAGAGTAACAGAATTGTAGAAGAAAAATAATT  
TGGAGTACTGAATAAATTTGAGCTGCCAGTGTGAAAGATAGGATTGAATCCAATCATATATGAAATCACAGTGAAGGAGAGAGAAAAAGAGACCGAT  
CCTATATGATATAGATGATATAGATGATATAGATAATCAAAATTAACAATTAACCAATTAACGAATCGATTGAATCAGCTAGCAGAAGCTGAATAAT  
TAAATGAAAGGGCAAGATACGAGCAGACAGAACAAACGATGACTACAGTCGAGCAAGTCAAATACAGTTGAATATTTTATCTGAGTCACTCATT  
GTCATTC AATCTTCTAACTGCTGTTTATTACCACTCACATATACATTCATTAATGTATGAAAAATTTGTAAGATATCCAGACCGTCTGGAAAAAGTAT  
GATCATGGAAGGTACATAAGTACTGGCCATACCACAAATCTGACAAGTAGGTTGCTCGTATACATATCCGTCGGTTATGTACATGTGATTTAATTTAA  
TTTTTTTCGTTTCAGAAAATATACCAATCCTGTGCACTCAATCTTTTTAACCATTTGATTTTCTCTCTGTTACAGCAACTCTCTATATTTAAATTCAGTT  
AAAACTGCGCTTACAGATATTCTCAA TGTAATATCGGTTTATATTGCGACCGTTAAAGACAACAAGTACCGCTGCATAGATGGCTGTATAGGTGTT  
CGAGAAAGTTGGAATGTCGTTGATGTACAATATGAAGAGAAGCGGAGCAAGTATGGATCCTTCTAGTACCTCTGTTATAAGGTTTCTTTATGATTGAT  
GTGTGACTATTTAGAATATCTCGTGCAGACCTAGAATTTCTGTTTTAACTGATGATTTTATTGATGTATGTAGGCGGTATATTTATTTACCCAATTT  
AGTTAGAAAGACATTTGTCGACAGCTAGGTTTTTTTATAGGTTCAAGGAAGATGAGATGTGTTAGTCAGATCTGTTATTTTTATTACAGTGCCTTCT  
GTGAAACTTTATAATTGCTGAGTGCATGAGTTTAGATCTGAATTTGCGGAGACTATTATCTGGAGTTACTTGTGATGAGAAAGTGAACGTTGG  
ATGATTTTAACTACTTTTCTAGGATGCTAGTAGGCTAATTGATTGTAAATGGAAACAGATATGGTATTGGACTTATGGGTATCTTGGCTTTGGT  
ATTGAACTTATTTTTGCTCTTTCCAAGCTGCGGAAAGTATGAAAGTTTCAGATGGGTTTTGAATATGTATAAAAATTTGCACAATGGGTTCCGGATGG  
AAGCATTTTAACTGTGGCTGTGATTTGTCCACGTGCTTAATGAAGAGATTCTTGATTATGTCTCTTATCATTTATGGAGTGCAGTTGGGATATTTT  
AGGGTGTAGCGGG
```

Haplótipo 2

```
CCCGCTACACATATAAATTAACGTTAACGGTTTCTAATAGATCTCTTTCCACCAAAAAGTAATTGAAGAGTAACAGAATTGTAGAAGAAAAATAATT  
TGGAGTACTGAATAAATTTGAGCTGCCAGTGTGAAAGATAGGATTGAATCCAATCATATATGAAATCACAGTGAAGGAGAGAGAAAAAGAGACCGAT  
CCTATATGATATAGATGATATAGATGATATAGATAATCAAAATTAACAATTAACCAATTAACGAATCGATTGAATCAGCTAGCAGAAGCTGAATAAT  
TAAATGAAAGGGCAAGATACGAGCAGACAGAACAAACGATGACTACAGTCGAGCAAGTCAAATACAGTTGAATATTTTATCTGAGTCACTCATT  
GTCATTC AATCTTCTAACTGCTGTTTATTACCACTCACATATACATTCATTAATGTATGAAAAATTTGTAAGATATCCAGACCGTCTGGAAAAAGTAT  
GATCATGGAAGGTACATAAGTACTGGCCATACCACAAATCTGACAAGTAGGTTGCTCGTATACATATCCGTCGGTTATGTACATGTGATTTAATTTAA  
TTTTTTTCGTTTCAGAAAATATACCAATCCTGTGCACTCAATCTTTTTAACCATTTGATTTTCTCTCTGTTACAGCAACTCTCTATATTTAAATTCAGTTA  
AAACTGCGCTTACAGATATTCTCAA TGTAATATCGGTTTATATTGCGACCGTTAAAGACAACAAGTACCGCTGCATAGATGGCTGTATAGGTGTTT  
GAGAAAGTTGGAATGTCGTTGATGTACAATATGAAGAGAAGCGGAGCAAGTATGGATCCTTCTAGTACCTCTGTTATAAGGTTTCTTTATGATTGATG  
TGTGACTATTTAGAATATCTCGTGCAGACCTAGAATTTCTGTTTTAACTGATGATTTTATTGATGTATGTAGGCGGTATATTTATTTACCCAATTTA  
GTTAGAAAGACATTTGTCGACAGCTAGGTTTTTTTATAGGTTCAAGGAAGATGAGATGTGTTAGTCAGATCTGTTATTTTTTATTACAGTGCCTTCTG  
TGAACTTTATAATTGCTGAGTGCATGAGTTTAGATCTGAATTTGCGGAGACTATTATCTGGAGTTACTTAGTTGGATGAGAAAGTGAACGTTGG  
TGATTTTAACTACTTTTCTAGGATGTCTAGTAGGCTAATTGATTTGTAATTGGAAACAGATATGGTATTGACTTATGGGTATTCTTTGGCTTTGGTA  
TTGAACCTATTTTTGCTCTTTCCAAGCTGCGGAAAGTATGAAAGTTTCAGATGGGTTTTGAATATGTATAAAAATTTGCACAATGGGTTCCGGATGGA  
AGCATTTTAACTGTGGCTGTGATTTGTCCACGTGCTTAATGAAGAGATTCTTGATTATGTCTCTTATCATTTATGGAGTGCAGTTGGGATATTTT  
GGGTGTAGCGGG
```

Figura 9. Haplótipos obtidos em nosso laboratório para região SCAR. A região marcada em azul representa a região de anelamento do par de *primers* OPK14A e CrB1R. A região marcada em vermelho representa a região de anelamento do par de *primers* CrB1F e OPK14A. O sítio marcado em amarelo representa o único polimorfismo entre as duas sequências, na posição 652. Ambos os haplótipos apresentam 1482pb.

As sequências obtidas aqui diferem das reportadas na literatura para o mesmo fragmento e espécie, e, em alguns casos, para as mesmas localidades (Figura 10). Enquanto as obtidas em outros trabalhos e que se encontram depositadas em banco de dados apresentaram 1.485 pares de bases, neste estudo foram encontradas sequências com 1.482

pares de bases. Esta diferença pode ser explicada pela ausência em nossas sequências dos sítios indefinidos apresentados como “n” nas sequências depositadas no GenBank. Além disso, alguns sítios polimórficos presentes nas sequências de outros trabalhos não ocorreram em nossas sequências. Vale ressaltar ainda que o único polimorfismo observado em nossas sequências também ocorre nas sequências depositadas no banco de dados (Figura 10).

Em nosso laboratório, das seis espécies que apresentaram cromossomos B, sequenciamos amostras de todas as regiões em que as espécies foram coletadas (Tabela 1). Para nenhuma espécie houve variação na sequência, mesmo em amostras provenientes de regiões geograficamente distantes. Devido à grande quantidade de amostras sequenciadas, de diferentes espécies e diferentes localidades que apresentaram as mesmas duas sequências, diferentes por apenas um sítio polimórfico, o nosso sequenciamento provavelmente reflete mais adequadamente a sequência SCAR. Esses resultados sugerem a maior acurácia do uso dos *primers* internos, obtidos neste trabalho, para o sequenciamento dessa região.

A presença de uma sequência específica para os cromossomos supranumerários presentes em, pelo menos, oito espécies do gênero sugere uma origem única para os cromossomos B do gênero *Partamona*. Apesar disso, é difícil afirmar como se deu a aquisição desses cromossomos pelas espécies que os apresentam. Duas hipóteses poderiam explicar a presença de cromossomos B nas espécies do gênero: a origem dos Bs em *Partamona* ocorreu recentemente e a transmissão da espécie em que se originou para as demais espécies se deu por eventos de hibridação interespecífica; ou a origem dos cromossomos B de *Partamona* ocorreu em um ancestral comum às espécies que os apresentam.

que, por serem elementos dispensáveis, estão livres de pressão seletiva e, portanto, seria esperado encontrar um grande número de mutações em sequências presentes nesses cromossomos; iii) a sequência SCAR não ser detectável no genoma A de *P. helleri* (Martins *et al.*, 2012) e, iv) possível evidência de hibridação entre *P. helleri* e *P. chapadicola* (Miranda, 2012).

Esta hipótese sugere, portanto, que a origem dos cromossomos supranumerários se deu em uma população de uma única espécie e posterior transmissão às outras espécies por hibridação interespecífica. Por muito tempo, a espécie *P. helleri* pareceu ser a chave para estudos sobre a origem dos cromossomos B de *Partamona*. Partindo do pressuposto de que quanto mais tempo os cromossomos B estivessem em uma população, mais tempo teriam para se diversificar, a espécie em que esses cromossomos se originaram apresentaria uma maior diversidade e frequência de cromossomos B com relação às outras espécies. Portanto, a maior diversidade e abundância de cromossomos B em *P. helleri* poderiam sugerir que a origem desses cromossomos no gênero deva ter ocorrido nessa espécie. A observação de uma variação na diversidade desses cromossomos em *P. helleri* sugeriu ainda que a origem dos cromossomos B possa ter ocorrido nas populações do norte da distribuição, onde são mais frequentes.

Os resultados obtidos aqui vão em oposição a essa hipótese. A sequência do marcador SCAR diferente em *P. helleri* da maioria das outras espécies sugere que a aquisição de cromossomos B, pelo menos pelas espécies do clado cupira, não tenha sido a partir de *P. helleri*. Além disso, a frequência estimada de cromossomos B encontrada para duas outras espécies (*P. cupira* e *P. rustica*) é tão alta quanto em *P. helleri*, o que sugere que a alta diversidade e abundância de cromossomos B encontrada em *P. helleri* provavelmente é um reflexo do número de estudos, uma vez que os cromossomos B foram identificados

primeiramente nesta espécie e a distribuição na mata atlântica, onde nidifica em áreas urbanas facilitando a coleta. Estes achados mostram que, apesar de *P. helleri* ter sido postulada como a chave para estudos sobre origem desses cromossomos, devido à suposta maior diversidade e abundância de cromossomos B, estudos devem focar também outras espécies.

A idéia de que cromossomos B possam ter se originado dos cromossomos A de espécies relacionadas foi originalmente proposta por Bataglia (1964), sendo posteriormente sustentada por alguns estudos. Sapre & Deshpande (1987) demonstraram a origem espontânea de cromossomos B em cruzamentos interespecíficos entre *Coix aquaticus* e *C. gigantea*. Uma evidência experimental para origem interespecífica foi dada em cruzamentos entre *Nasonia giraulti* e *N. vitripennis*, onde após cruzamentos, um proto-cromossomo B foi gerado espontaneamente (Perfectti & Werren 2001). Um cromossomo supranumerário que parece ter origem interespecífica é o PSR de *Nasonia*, onde uma análise filogenética de elementos retrotransponíveis revelou que cópias presentes no PSR são mais próximas a sequências presentes no gênero *Trichomalopsis* (McAllister & Werren 1997). Nesses casos, evidências apontam para origem de cromossomos B a partir do complemento A de espécies relacionadas. Apesar do elevado número de evidências sobre origem interespecífica de cromossomos B, não há estudos relatando a origem de cromossomos B a partir de cromossomos B de espécie relacionada, como é o caso sugerido para *Partamona*.

De fato, eventos de hibridação podem ser comuns em *Partamona*. Além da evidência de um evento de hibridação mostrada por Miranda (2012), dados obtidos em nosso laboratório sugerem um evento de hibridação entre *P. helleri* e *P. gregaria*. Outro fato que suporta a idéia de origem recente é o modo de transmissão em *Partamona*, em que machos transmitem os cromossomos B para toda a prole feminina, e devido a isso, é esperado que a frequência de cromossomos supranumerários atinja números elevados em um rápido período de tempo.

Portanto, se a origem for antiga, altas frequências são esperadas em todas as espécies que os apresentam. Entretanto, se esses cromossomos apresentam um efeito negativo, é esperado que a frequência seja limitada pelo efeito negativo sobre o fitness.

A alta similaridade encontrada para o marcador SCAR intra e interespecificamente também pode sugerir uma origem recente para os cromossomos B no gênero *Partamona*, pois dada a natureza não essencial dos cromossomos B, é esperado encontrar uma grande variação morfológica e nas sequências presentes nesses cromossomos. Em alguns casos, porém, os Bs podem apresentar uma estrutura conservada. Um marcador SCAR desenvolvido para a espécie *E. plorans* apresentou alta similaridade, mesmo em cromossomos B de amostras de regiões geográficas distantes, e os autores sugeriram uma origem recente para os cromossomos B da espécie (Moñoz-Pajares *et al.*, 2011). Em centeio (*Secale cereale*), por exemplo, a mesma estrutura citológica e molecular é observada mesmo a nível de subespécie (Banaei-Moghaddam *et al.*, 2013). Neste caso, a origem do cromossomo B foi datada, aproximadamente, em 1,1 a 1,3 milhões de anos, próximo à origem do gênero *Secale* (1,7 milhões de anos), uma origem relativamente recente (Martis *et al.*, 2012). Segundo Rasmussen & Cameron (2010), a diversificação do gênero *Partamona* teria ocorrido a, aproximadamente, cinco milhões de anos. A origem no ancestral de um grupo de espécies portadoras de cromossomos supranumerários não exclui a possibilidade dos cromossomos B no gênero ter sido recente do ponto de vista evolutivo. Sequências conservadas podem sugerir tanto uma origem recente, quanto alguma funcionalidade para a sequência, que limita o acúmulo de mutações. Se a sequência do marcador SCAR apresenta alguma função, é esperado que seja conservada.

Dessa forma, a alta similaridade encontrada na sequência SCAR não implica, necessariamente, que os cromossomos B no gênero tenham surgido depois da divergência das

espécies. Embora a hipótese de origem em uma espécie com posterior transmissão para as outras espécies por eventos de hibridação seja plausível e não possa ser descartada, a segunda hipótese parece ser mais parcimoniosa.

Os dados obtidos aqui apontam para uma origem mais antiga dos cromossomos B do gênero do que se supunha anteriormente. Até o momento, a presença desses cromossomos só havia sido verificada no clado cupira, um ramo mais apical na filogenia de *Partamona*. Neste estudo, foram encontrados cromossomos B em espécies do clado pearsoni, mais basal na filogenia do gênero e com distribuição amazônica, resultado este que, além de ampliar o número de espécies que apresentam esses cromossomos, mostram que a presença dos mesmos não ocorre somente em espécies intimamente relacionadas. Uma vez que os cromossomos B estão presentes em, pelo menos, oito espécies de *Partamona* seriam necessários diversos eventos de hibridação, inclusive entre espécies não relacionadas e com distribuição não sobreposta, para que a primeira hipótese apresentada fosse válida.

Caso a origem tenha ocorrido em um ancestral comum, um questionamento pode ser feito: Por que os cromossomos B estão presentes em algumas espécies do gênero, mas não em outras? A ausência desses cromossomos em uma área pode ser explicada pela colonização por indivíduos que não apresentavam esses cromossomos, já que cromossomos B aparecem como polimorfismos nas espécies que os apresentam. Além disso, a dinâmica dos cromossomos B pode ser diferente em cada espécie, podendo ocorrer diferenças interespecíficas na frequência dos cromossomos B, bem como a extinção ou aumento de frequência em determinada espécie. No gênero de peixe *Prochilodus*, cromossomos B estão presentes em *P. lineatus* e *P. nigricans* e ausentes em outras espécies do gênero, sugerindo-se então que a origem desses cromossomos é comum e ocorreu em um ancestral, permanecendo em algumas espécies e sendo perdidos durante a evolução das demais espécies do gênero (Voltolin *et al.*, 2013).

Outro questionamento relevante relacionado à hipótese de origem ancestral é: em que grupo os cromossomos B teriam surgido? A hipótese de origem ancestral não implica, necessariamente, em uma origem no ancestral de *Partamona*, mas sim em um grupo que inclui as espécies portadoras de B. A filogenia proposta por Camargo & Pedro (2003) para *Partamona*, com base em caracteres morfológicos e de nidificação, é importante para auxiliar nos estudos evolutivos do gênero, mas não é completamente informativa sobre as relações entre as espécies, devido a alta similaridade morfológica entre as espécies do grupo. Um estudo filogenético complementar, utilizando informações genéticas, é essencial para auxiliar a responder à questão levantada. Uma filogenia consistente, juntamente com a ampliação do número de espécies estudadas para a presença de Bs, pode auxiliar o conhecimento sobre o momento de origem dos cromossomos supranumerários no gênero.

Vale ressaltar que as duas hipóteses discutidas aqui tratam da forma de aquisição dos cromossomos B pelas espécies do gênero que os apresentam, mas nenhuma das duas explica como se deu a origem do cromossomo B ancestral que originou os cromossomos B presentes atualmente, podendo ser intraespecífica, a partir do próprio cariótipo da espécie em que o cromossomo B se originou, ou interespecífica, a partir do cruzamento entre espécies relacionadas. Entender como se deu a origem do primeiro cromossomo B presente no grupo é uma questão que ainda está longe de ser respondida com os dados obtidos até o momento. Novas técnicas disponíveis podem auxiliar o conhecimento, tanto sobre o momento, quanto sobre o modo como os cromossomos B de *Partamona* se originaram.

5. PERSPECTIVAS

A verificação da ocorrência de cromossomos supranumerários em espécies do clado pearsoni abre novas perspectivas para o conhecimento sobre a origem dos cromossomos B em *Partamona*. Até o momento, estudos baseados exclusivamente no clado cupira pareciam ser a chave para responder as questões sobre a origem e evolução dos cromossomos B no gênero, já que as evidências sugeriam que eles estavam presentes apenas neste grupo de espécies. Este trabalho mostra que a evolução dos cromossomos supranumerários no gênero *Partamona* deve ser mais complexa, exigindo um estudo mais amplo, englobando inclusive espécies mais basais. Esclarecer a ocorrência dos cromossomos B em *Partamona*, em conjunto com dados filogenéticos para o grupo, é um passo importante para os estudos sobre a origem, pois o conhecimento das relações evolutivas entre as espécies que apresentam tais cromossomos pode fornecer subsídios para o entendimento sobre a história evolutiva dos cromossomos B no grupo.

Com o avanço das técnicas moleculares, progressos no estudo sobre cromossomos supranumerários puderam ser alcançados. Utilizando técnicas de sequenciamento de todo o genoma, trabalhos recentes apresentaram a composição de cromossomos supranumerários, comparando-a com a composição do genoma A das espécies estudadas, possibilitando interpretações sobre a origem e evolução de cromossomos B com a apresentação de novas idéias sobre essas questões (Martis *et al.*, 2012; Valente *et al.*, 2014). Estes estudos mostraram que cromossomos B abrigam sequências provenientes de diferentes regiões que não apresentam nenhum efeito seletivo imediato, mas que, sujeitas a uma maior taxa de mutação devido aos cromossomos B estarem livres de pressão seletiva, podem gerar sequências deletérias, benéficas ou, na maioria dos casos, “lixo genômico”. Com a sugestão da transferência de sequências do genoma A para o B, é possível que a transferência inversa

também ocorra (Houben *et al.*, 2014). Os cromossomos B, portanto, podem desempenhar um importante papel na evolução de genomas. Assim, entender o modo de evolução dos cromossomos B pode ser importante para o conhecimento da evolução dos genomas como um todo. Devido a cada cromossomo B poder ter uma origem e evolução diferente, estudar espécies distintas pode fornecer outras idéias sobre aspectos relacionados a esses cromossomos. No gênero *Partamona*, várias espécies apresentam B, o que é importante para traçar a história evolutiva dos cromossomos supranumerários no gênero, e contribuir para o conhecimento sobre a evolução desses elementos; além disso, características peculiares do gênero como a haplodiploidia podem mostrar a evolução de cromossomos B em um organismo com características distintas daqueles em que esse tipo de estudo já foi realizado, assim, *Partamona* pode ser um organismo modelo para o estudo destes cromossomos e os avanços trazidos neste estudo sobre os cromossomos B no gênero são fundamentais para que estudos futuros, utilizando-se inclusive técnicas mais avançadas, possam esclarecer aspectos evolutivos sobre os cromossomos B de *Partamona*.

Utilizando a técnica de sequenciamento de nova geração (*Next Generation Sequencing*), o sequenciamento de todo o genoma pode fornecer um conhecimento sobre conteúdo gênico, origem e padrão de evolução, informações estas que podem fornecer cenários diferentes dos elaborados até o momento. Utilizando essa técnica é possível sequenciar todo o genoma ou sequenciar somente o B, após a microdissecção deste cromossomo. A partir de dados obtidos por este tipo de sequenciamento, é possível realizar a detecção de regiões específicas de B que podem ser utilizadas no estudo desses cromossomos, com o conhecimento de novos marcadores específicos de cromossomos B; é possível também identificar sequências presentes nos Bs que também estão presentes no genoma A, o que pode ser útil para traçar a história evolutiva dos cromossomos supranumerários nas diferentes

espécies que os apresentam ou até mesmo datar a origem dos cromossomos B no gênero a partir de análises comparativas utilizando estas sequências. A partir dos dados obtidos com essa técnica, é possível realizar ainda uma análise comparativa de espécies do gênero que apresentam esses cromossomos com espécies que não os apresentam, possibilitando identificar se existe uma associação entre a presença de sequências no genoma A e a presença de cromossomo B na espécie.

Outra técnica que pode ser aplicada ao estudo dos cromossomos B é o RNAseq (*RNA-sequencing*), em que a técnica de sequenciamento de nova geração é utilizada para indicar a presença e a quantidade das diferentes moléculas de RNAm. Aliado ao sequenciamento do cromossomo B, será possível demonstrar se sequências presentes no cromossomo B são transcritas, comparando o transcriptoma com sequências específicas desses cromossomos.

A técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) em tempo real também pode ser importante para os estudos de cromossomos B em *Partamona*. Uma limitação associada ao uso do marcador SCAR é que este marcador permite identificar a presença e a ausência de cromossomos supranumerários em um indivíduo, mas não a quantidade desses cromossomos. A técnica de PCR em tempo real pode ser utilizada para identificar o número de cromossomos B mediante sua quantificação. A identificação do número de Bs a partir de técnica molecular poderia auxiliar a entender melhor a ocorrência de cromossomos B nas espécies, podendo-se identificar não só a frequência de colônias com estes cromossomos, mas também o número de cromossomos B presentes em um indivíduo em uma dada população. Outra linha de estudo seria investigar possíveis efeitos dos cromossomos B, com a comparação da frequência de larvas e adultos que carregam um ou mais cromossomos B na mesma colônia, além de realizar estudos sobre efeito fenotípico que levem em conta não só a presença, mas também o número de cromossomos B presentes nos indivíduos analisados.

A princípio, pudemos demonstrar resultados que auxiliam o entendimento de aspectos básicos sobre os cromossomos B no gênero. Os principais pontos para se entender a evolução e dinâmica dos cromossomos supranumerários são os efeitos destes cromossomos, o mecanismo de transmissão, além de sua origem. Neste estudo, demonstramos a existência de uma variação geográfica nos cromossomos B de *P. helleri*, que aponta que essa espécie pode ser um modelo para os estudos sobre a dinâmica dos cromossomos supranumerários no gênero, testando-se as hipóteses propostas. Com relação à transmissão de cromossomos B, demos um avanço importante ao demonstrarmos pela primeira vez o modo de transmissão em três espécies do gênero, um aspecto chave para entender a evolução de cromossomos B. E, por fim, com a demonstração da presença de cromossomos B em um grupo diferente do que eram encontrados anteriormente e a alta frequência encontrada para algumas espécies, sugerimos que, para ser possível esclarecer aspectos evolutivos dos cromossomos B do grupo, deve-se olhar para um grupo maior de espécies, incluindo espécies mais basais na filogenia. Com os resultados obtidos neste trabalho, demos um passo à frente no conhecimento sobre aspectos chave para se entender estes cromossomos. Com isso, propomos uma história evolutiva mais complexa do que se presumia anteriormente e, portanto, sugerimos que os estudos subsequentes tratando sobre cromossomos B no gênero devam envolver a abordagem mais ampla acima sugerida.

6. REFERÊNCIAS

- Araujo, A. F. (2002). Contribuição à citogenética de *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse*, Fabricius 1804 (Hymenoptera, Sphecidae): I. Dinâmica dos cromossomos B, II. Estudos da NOR e nucléolos. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, 102p.
- Ayres, M., Ayres Jr, M., Ayres, D. L. & Santos, A. S. (2007). BioEstat 5.0. *Sociedade Civil Mamirauá*.
- Banaei-Moghaddam, A. M., Meier, K., Karimi-Ashtiyani, R. & Houben, A. (2013). Formation and expression of pseudogenes on the B chromosome of rye. *The Plant Cell*, 25, 2536-2544.
- Barreto, L. S. & Castro, M. S. D. (2007). Ecology of nesting of bees of the genus *Partamona* in caatinga, Milagres, Bahia. *Biota Neotropica*, 7, 87-92.
- Barth, A., Fernandes, A., Pompolo, S. G. & Costa, M. A. (2011). Occurrence of B chromosomes in *Tetragonisca Latreille*, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): A new contribution to the cytotaxonomy of the genus. *Genetics and Molecular Biology*, 34, 77-79.
- Bataglia, E. (1964). Cytogenetics of B-Chromosomes. *International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics*, 17, 245-299.
- Beukeboom, L. W. (1994). Bewildering Bs: an impression of the 1st B-Chromosome Conference. *Heredity*, 73, 328-336.
- Borges, A. A., Campos, L. A. O., Salomão, T. M. F. & Tavares, M. G. (2010). Genetic variability in five populations of *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae) from Minas Gerais State, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, 33, 774-780.
- Brito, R. M. & Arias, M. C. (2010). Genetic structure of *Partamona helleri* (Apidae, Meliponini) from Neotropical Atlantic rainforest. *Insectes Sociaux*, 57, 413-419.
- Brito, R. M., Caixeiro, A. P. A., Pompolo, S. G. & Azevedo, G. G. (2003). Cytogenetic data of *Partamona peckolti* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) by C banding and

fluorochrome staining with DA/CMA3 and DA/DAPI. *Genetics and Molecular Biology*, 26, 53-57.

Brito, R. M. (1998). Caracterização citogenética de duas espécies do gênero *Partamona* Schwarz, 1939 (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, 97p.

Brito, R. M., Costa, M. A. & Pompolo, S. G. (1997). Characterization and distribution of supernumerary chromosomes in 23 colonies of *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Brazilian Journal of Genetics*, 20, 185-188.

Brito, R. M., das Graças Pompolo, S., Magalhães, M. F. M., de Barros, E. G. & Sakamoto-Hojo, E. T. (2005). Cytogenetic Characterization of Two *Partamona* Species (Hymenoptera, Apinae, Meliponini) by Fluorochrome Staining and Localization of 18S rDNA Clusters by FISH. *Cytologia*, 70, 373-380.

Brito-Ribon, R. M., Miyazawa, C. S. & Pompolo, S. G. (1999). First karyotype characterization of four species of *Partamona* (Friese, 1980) (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) in Mato Grosso State, Brazil. *Cytobios*, 100, 19-26.

Cabrero, J., Lo, M. D., Go, R., Castro, A. J., Marti, A. & Camacho, J. P. M. (1997). Geographical distribution of B chromosomes in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*, along a river basin, is mainly shaped by non-selective historical events. *Chromosome Research*, 5, 194-198.

Camacho, J. P. M., López-León, M. D., Pardo, M. C., Cabrero, J. & Shaw, M. W. (1997a). Population Dynamics of A Selfish B Chromosome Neutralized by the Standard Genome in the Grasshopper *Eyprepocnemis Plorans*. *The American Naturalist*, 149, 1030-1050.

Camacho, J. P. M., Cabrero, J., López-León, M. D. & Shaw, M. W. (1997b). Evolution of a near-neutral B chromosome. *Chromosomes Today*, 12, 301-318.

Camacho, J. P. M., Sharbel, T. F. & Beukeboom, L. W. (2000). B-chromosome evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 355, 163-178.

- Camargo, J. M. & Pedro, S. R. (2003). Meliponini Neotropicais: o gênero *Partamona* Schwarz, 1939 (Hymenoptera, Apidae, Apinae) – binomia e biogeografia. *Revista Brasileira de Entomologia*, 47, 311-372.
- Correia, A. M., Fernandes, A., Campos, L. & Lopes, D. (2014). Análise da presença do marcador SCAR associado ao cromossomo B em espécies de abelha sem ferrão do gênero *Partamona*. *Revista Brasileira de Biociências*, 12, 196-200.
- Costa, M. A. (1991) Cromossomos Supranumerários em *Partamona cupira* (Hymenoptera, Meliponinae). Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Viçosa, 35p.
- Costa, M. A., Del Lama, M. A., Melo, G. A. & Sheppard, W. S. (2003). Molecular phylogeny of the stingless bees (Apidae, Apinae, Meliponini) inferred from mitochondrial 16S rDNA sequences. *Apidologie*, 34, 73-84.
- Costa, M. A., Pompolo, S. G. & Campos, L. A. (1992). Supernumerary chromosomes in *Partamona cupira* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Revista Brasileira de Genética*, 15, 801-801.
- Fernandes, C. R. M., Martins, C. F., Ferreira, K. M. & Del Lama, M. A. (2011). Gene Variation, Population Differentiation, and Sociogenetic Structure of Nests of *Partamona seridoensis* (Hymenoptera: Apidae, Meliponini). *Biochemical Genetics*, 50, 325-335.
- Ferreira, K. M. (2011). A colonização de uma área por espécies de abelhas sem ferrão. Um Estudo de Caso: *Partamona helleri* (Friese, 1900) (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos, 99p.
- Hall, T. A. (1999, January). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series 41*, 95-98.
- Herrera, J. A., López-León, M. D., Cabrero, J., Shaw, M. W. & Camacho, J. P. M. (1996). Evidence for B chromosome drive suppression in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Heredity*, 76, 633-639.

- Houben, A., Banaei-Moghaddam, A. M., Klemme, S. & Timmis, J. N. (2014). Evolution and biology of supernumerary B chromosomes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *71*, 467-478.
- Houben, A., Kynast, R. G., Heim, U., Hermann, H., Jones, R. N. & Forster, J. W. (1996). Molecular cytogenetic characterisation of the terminal heterochromatic segment of the B-chromosome of rye (*Secale cereale*). *Chromosoma*, *105*, 97-103.
- Imai, H. T., Crozier, R. H. & Taylor, R. W. (1977). Karyotype Evolution in Australian Ants. *Chromosoma*, *59*, 341-393.
- Imai, H. T. (1974). B-chromosomes in the myrmecine ant *Leptothorax spinosior*. *Chromosoma*, *36*, 431-444.
- Jamilena, M., Garrido-Ramos, M., Rejon, M. R., Rejon, C. R. & Parker, J. S. (1995). Characterisation of repeated sequences from microdissected B chromosomes of *Crepis capillaris*. *Chromosoma*, *104*, 113-120.
- Jones, R. N. (1991). B-chromosome drive. *American Naturalist*, *137*, 430-442.
- Jones, N., & Houben, A. (2003). B chromosomes in plants: escapees from the A chromosome genome?. *Trends in Plant Science*, *8*, 417-423.
- Jones, R. N., Viegas, W., & Houben, A. (2008). A century of B chromosomes in plants: so what?. *Annals of Botany*, *101*, 767-775.
- Lopes, D. M., Pompolo, S. D. G., Campos, L. A. D. O. & Tavares, M. G. (2008). Cytogenetic characterization of *Melipona rufiventris* Lepeletier 1836 and *Melipona mondury* Smith 1863 (Hymenoptera, Apidae) by C banding and fluorochromes staining. *Genetics and Molecular Biology*, *31*, 49-52.
- López-León, M. D., Neves, N., Schwarzacher, T., Heslop-Harrison, J. P., Hewitt, G. M. & Camacho, J. P. M. (1994). Possible origin of a B chromosome deduced from its DNA composition using double FISH technique. *Chromosome Research*, *2*, 87-92.

- Marthe, J. D. B. (2008). Análises citogenéticas e de sequências específicas de cromossomos B em *Partamona cupira* (Hymenoptera: Apidae). Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa, 30p.
- Marthe, J. D. B., Pompolo, S. D. G., Campos, L. A. D. O., Salomão, T. M. F. & Tavares, M. G. (2010). Cytogenetic characterization of *Partamona cupira* (Hymenoptera, Apidae) by fluorochromes. *Genetics and Molecular Biology*, 33, 253-255.
- Martins, C. C. C., Diniz, D., Sobrinho-Scudeler, P. E., Foresti, F., Campos, L. A. O. & Costa, M. A. (2012). Investigation of *Partamona helleri* (Apidae, Meliponini) B chromosome origin. An approach by microdissection and whole chromosome painting. *Apidologie*, 44, 75-81.
- Martins, C. C. C., Duarte, O. M. P., Waldschmidt, A. M., Alves, R. M. D. O. & Costa, M. A. (2009). New occurrence of B chromosomes in *Partamona helleri* (Friese, 1900) (Hymenoptera, Meliponini). *Genetics and Molecular Biology*, 32, 782-785.
- Martins, C. C. C., Waldschmidt, A. M. & Costa, M. A. (2014). Unprecedented record of ten novel B chromosomes in the stingless bee *Partamona helleri* (Apidae, Meliponini). *Apidologie*, 45, 431-439.
- Martis, M. M., Klemme, S., Banaei-Moghaddam, A. M., Blattner, F. R., Macas, J., Schmutzer, T., ... & Novák, P. (2012). Selfish supernumerary chromosome reveals its origin as a mosaic of host genome and organellar sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, 13343-13346.
- McAllister, B. F. & Werren, J. H. (1997). Hybrid origin of a B chromosome (PSR) in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. *Chromosoma*, 106, 243-253.
- Miranda, A. F. (2012). Estudos citogenéticos e moleculares do gênero *Partamona*: Filogenia e Cromossomo B. Tese de doutorado, Universidade Federal de Viçosa, 60p.
- Munoz-Pajares, A. J., Martínez-Rodríguez, L., Teruel, M., Cabrero, J., Camacho, J. P. M. & Perfectti, F. (2011). A single, recent origin of the accessory B chromosome of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Genetics*, 187, 853-863.

- Néo, D. M., Moreira Filho, O. & Camacho, J. P. M. (2000). Altitudinal variation for B chromosome frequency in the characid fish *Astyanax scabripinnis*. *Heredity*, 85, 136-141.
- Oliveira, C., Saboya, S. M. R., Foresti, F., Senhorini, J. A. & Bernardino, G. (1997). Increased B chromosome frequency and absence of drive in the fish *Prochilodus lineatus*. *Heredity*, 79, 437-441.
- Palomeque, T., Chica, E. & Guardia, R. D. D. L. (1990). Karyotype, C-banding, chromosomal location of active nucleolar organizing regions, and B-chromosomes in *Lasius niger* (Hymenoptera, Formicidae). *Genome*, 33, 267-272.
- Parker, J. S., Jones, G. H., Edgar, L. A. & Whitehouse, C. (1991). The population cytogenetics of *Crepis capillaris* IV. The distribution of B-chromosomes in British populations. *Heredity*, 66, 1-218.
- Pedro, S. R., & Camargo, J. M. (2003). Meliponini neotropicais: o gênero *Partamona* Schwarz, 1939 (Hymenoptera, Apidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, 47, 1-117.
- Penitente, M., Voltolin, T. A., Senhorini, J. A., Bortolozzi, J., Foresti, F. & Porto-Foresti, F. (2013). Transmission rate variation among three B chromosome variants in the fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 85, 1371-1377.
- Perfectti, F. & Werren, J. H. (2001). The interspecific origin of B chromosomes: experimental evidence. *Evolution*, 55, 1069-1073.
- Rasmussen, C. & Cameron, S. A. (2010). Global stingless bee phylogeny supports ancient divergence, vicariance, and long distance dispersal. *Biological Journal of the Linnean Society*, 99, 206-232.
- Rocha, M. P. (2002). Análises citogenéticas de abelhas do gênero *Melipona* (Hymenoptera, Meliponinae). Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, 84p.
- Sapre, A. B. & Deshpande, D. S. (1987). Origin of B chromosomes in *Coix* L. through spontaneous interspecific hybridization. *Journal of Heredity*, 78, 191-196.

- Sheppard, W. S. & McPheron, B. A. (1991). Ribosomal DNA diversity in Apidae. In Smith D. R. (ed), *Diversity in the Genus Apis*. Boulder, Colorado: Westview, p. 89-102.
- Stitou, S., Zurita, F., Díaz de la Guardia, R., Jiménez, R. & Burgos, M. (2004). Transmission analysis of B chromosomes in *Rattus rattus* from Northern Africa. *Cytogenetic and Genome Research*, 106, 344-346.
- Tarelho, Z. V. S. (1973) Contribuição ao estudo citogenético dos Apoidea (Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, 75p.
- Teruel, M., Cabrero, J., Montiel, E. E., Acosta, M. J., Sánchez, A. & Camacho, J. P. M. (2009). Microdissection and chromosome painting of X and B chromosomes in *Locusta migratoria*. *Chromosome Research*, 17, 11-18.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*, 22, 4673-4680.
- Tosta, V. C. (2005). Análise da origem molecular dos cromossomos B, e de seus possíveis efeitos fenotípicos em *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae). Tese de doutorado, Universidade Federal de Viçosa, 79p.
- Tosta, V. C., Fernandes-Salomão, T. M., Tavares, M. G., Pompolo, S. G., Barros, E. G. & Campos, L. A. O. (2004). A RAPD marker associated with B chromosomes in *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae). *Cytogenetic and Genome Research*, 106, 279-283.
- Tosta, V. C., Marthe, J. B., Tavares, M. G., Fernandes-Salomão, T. M., Pompolo, S. G., Recco-Pimentel, S. M., Perfectti, F., Campos, L. A. O. & Camacho, J. P. M. (2014). Possible Introgression of B Chromosomes between Bee Species (Genus *Partamona*). *Cytogenetic and Genome Research*, 144, 217-223.
- Tosta, V. C., Tavares, M. G., Fernandes-Salomão, T. M., Barros, E. G., Campos, L. A. O. & Camacho, J. P. M. (2007). Development of a SCAR marker for the analysis of B

- chromosome presence in *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae). *Cytogenetic and Genome Research*, 116, 127-129.
- Valente, G. T., Conte, M. A., Fantinatti, B. E., Cabral-de-Mello, D. C., Carvalho, R. F., Vicari, M. R. Cocher, T. D. & Martins, C. (2014). Origin and Evolution of B Chromosomes in the Cichlid Fish *Astatotilapia latifasciata* Based on Integrated Genomic Analyses. *Molecular Biology and Evolution*, 31, 2061 - 2072
- Vignatti, Z. B. M. (2012). Avaliação cariotípica e molecular de cromossomos B em populações de *Partamona helleri* (Hymenoptera, Apidae) do estado do Espírito Santo. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Espírito Santo, 88p.
- Voltolin, T. A., Pansonato Alves, J. C., Senhorini, J. A., Foresti, F., Camacho, J. P. M. & Porto-Foresti, F. (2013). Common Descent of B Chromosomes in Two Species of the Fish Genus *Prochilodus* (Characiformes, Prochilodontidae). *Cytogenetic and Genome Research*, 141, 206-211.
- Walsh, P. S., Metzger, D. A. & Higuchi, R. (1991). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*, 10, 506-513.
- Werren, J. H. (1991). The paternal-sex-ratio chromosome of *Nasonia*. *The American Naturalist*, 137, 392 – 402.
- Zima, J., & Macholán, M. (1995). B chromosomes in the wood mice (genus *Apodemus*). *Acta Theriologica*, 40, 75-86.
- Zima, J., Piálek, J. & Macholán, M. (2003). Possible heterotic effects of B chromosomes on body mass in a population of *Apodemus flavicollis*. *Canadian Journal of Zoology*, 81, 1312-1317.