

Caracterização do cariótipo de uma população de abelhas *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Meliponini), no município de Brejo Grande/Se

Karyotypic characterization of a population of *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Meliponini) from Brejo Grande, Sergipe

W. R. T. Silva¹; E. D. Araújo²; R. Scher³

¹Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Sergipe, 49100-000, São Cristóvão-Se, Brasil

²Laboratório de Genética e Conservação de Recursos Naturais, Universidade Federal de Sergipe, 49100-000, São Cristóvão-Se, Brasil

³Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal de Sergipe, 49100-000, São Cristóvão-Se, Brasil

wilsonufs@hotmail.com

As abelhas são as principais polinizadoras das plantas floríferas do planeta, sendo responsáveis pela manutenção da biodiversidade de diversos ecossistemas, como também constituem um elemento indispensável à economia agrícola mundial. No Brasil destaca-se a tribo Meliponini, em especial o gênero *Melipona*, grupo composto por abelhas sem ferrão, facilmente domesticáveis. Dentre as melíponas destacam-se as abelhas mandaçaia, que incluem duas espécies: *Melipona mandacaia* e *Melipona quadrifasciata*. Esse grupo é responsável por grande parte da captação e transporte de pólen, sendo o principal polinizador dos grandes ecossistemas brasileiros. Este estudo objetivou identificar citogeneticamente uma população de *Melipona quadrifasciata* encontrada na foz do rio São Francisco, cujos espécimes apresentam características morfológicas que diferem do padrão da espécie. Os dados obtidos nesse estudo indicaram que a espécie investigada é *Melipona quadrifasciata*. Entretanto, ainda não se pode afirmar que ela seja da subespécie *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* como descrita até então ou quais as causas das alterações morfológicas.

Palavra chave: Abelhas sem ferrão; citogenética

Bees are the main pollinators of flowering plants on the planet and are responsible for maintaining the biodiversity of various ecosystems, but also constitute an essential element of the world agricultural economy. In Brazil there is the tribe Meliponini, especially the genus *Melipona*, group of stingless bees, easily domesticated. Among the meliponas stand out mandacaia bees, which include two species: *Melipona mandacaia* and *Melipona quadrifasciata*. This group is responsible for much of the uptake and transport of pollen, the main pollinator of the major Brazilian ecosystems. This study aimed to identify cytogenetically a population of *Melipona quadrifasciata* found at the mouth of the river San Francisco, whose specimens show morphological characteristics that differ from the standard of specie. The data obtained in this study indicated that the species is *Melipona quadrifasciata*. However, no one can claim that it is of the subspecies *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* as described so far, or what the causes of morphological changes.

Keywords: Stingless bees; Cytogenetics

1. INTRODUÇÃO

As abelhas somam cerca de 20.000 espécies, habitando os mais diferentes ecossistemas e possuindo uma diversidade muito rica de comportamentos, tamanhos e formas (6).

Segundo Kerr *et al.* (2001), as abelhas, de forma geral, são responsáveis pela polinização de 38% das plantas floríferas, sendo a escassez de polinização responsável por perdas agrícolas da ordem de 65 bilhões de dólares/ano. Desta forma, pode-se afirmar que as abelhas constituem um elemento indispensável à economia agrícola mundial, como também têm uma enorme

importância ecológica na preservação da diversidade floral dos diversos ecossistemas (2, 4, 8, 10, 12).

Porém, a importância das abelhas vai além da troca de pólen entre as plantas. O amplo raio de ação desse invertebrado contribui para a manutenção da diversidade genética e uma maior disponibilidade de alimentos, uma vez que permite o cruzamento entre plantas espacialmente distantes (13).

No Brasil, destacam-se as abelhas da tribo *Meliponini* devido à sua fácil domesticação, o que permite atrelar a produção de mel e captação de pólen à polinização das plantas floríferas (4). Além disso, as abelhas sem ferrão são o principal grupo polinizador da flora brasileira (13), destacando espécies da caatinga, pantanal, algumas manchas da Mata Atlântica e partes da Amazônia. Em algumas regiões a dependência dos meliponínios para a polinização e frutificação pode chegar a 90% de espécies de plantas (4).

Neves & Castro (2006) alertaram para a importância das Meliponas, em especial as conhecidas popularmente como “mandacaia”, que incluem as espécies *Melipona quadrifasciata* e *Melipona mandacaia*, na conservação da diversidade ecológica da caatinga nordestina visto que este é o único bioma exclusivamente brasileiro, abrigando um patrimônio biológico único.

Há relatos da ocorrência de abelhas mandacaia no estado de Sergipe (1, 5; 14), estando distribuídas principalmente pela extensão do rio São Francisco. Entre tais relatos, destaca-se o de Souza *et al.* (2006), que descrevem a presença de *M. quadrifasciata* no município de Brejo Grande, nas imediações da foz do rio São Francisco. Nesta mesma região verificou-se a presença de uma população de *Melipona quadrifasciata*, cujos padrões de bandas terciais (faixas amarelas localizadas no abdome) não correspondem totalmente ao esperado para esta espécie (Figura 1), o que nos levou a crer que essa população pudesse ser um híbrido entre *M. quadrifasciata* e *M. mandacaia* (ARAÚJO, comunicação pessoal).

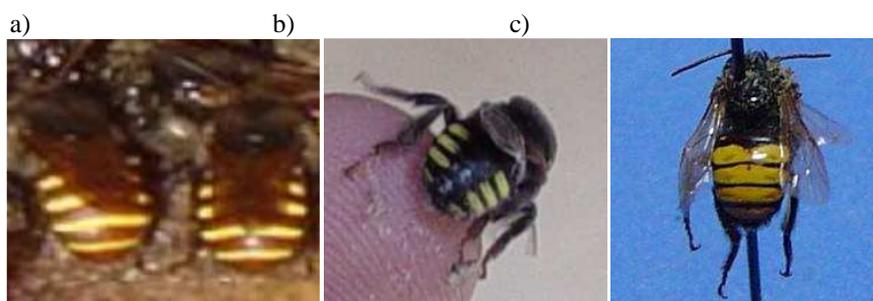


Figura 1: “a” *Melipona quadrifasciata quadrifasciata*, “b” *Melipona quadrifasciata antidioides* e “c” espécime encontrado em brejo grande/Se. Fonte: “a” e “b” <http://www.meliponario.com.br/modules/mydownloads/visit.php?cid=2&lid=17>; “c” Foto cedida por Lorena Andrade Nunes, Pós-Graduação em Entomologia, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz - ESALQ – USP.

Diante da importância econômica e, principalmente ecológica das abelhas, em especial do gênero *Melipona* no nordeste brasileiro, torna-se importante a correta caracterização taxonômica da população em questão, tendo em vista principalmente aspectos como manejo e conservação.

2. MATERIAIS E METODOS

2.1 Obtenção e manutenção dos ninhos

Os espécimes utilizados neste estudo foram retirados de uma colmeia oriunda da região de Brejo Grande, situada a 134 km ao norte de Aracaju (SE). O ninho foi mantido em uma caixa racional em uma área de sombra, arejada no Departamento de Biologia da Universidade Federal de Sergipe. Como suprimento alimentar, foi administrado um xarope composto de 50% de açúcar e 50% de água, durante dois meses, com trocas periódicas a cada dois dias.

As larvas foram retiradas do favo e transportadas até o Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Departamento de Morfologia da UFS onde foram mantidas em estufa a 27° C até atingirem o estágio pós-defecante.

2.2 Obtenção de cromossomos metafásicos

Foi utilizada, para a obtenção dos cromossomos metafásicos, a metodologia de Imai *et al.* (1988) com modificações de Scher (1996).

As larvas das abelhas estudadas foram coletadas quando alcançaram o estágio de pré-pupa (ou larvas pós-defecantes), sendo dissecadas sob estereomicroscópio. Na dissecação foram retirados os gânglios cerebrais e mantidos em um recipiente com solução de colchicina hipotônica a 0,005% (0,5mL de colchicina a 0,1% diluídos em 9,5mL de solução de citrato de sódio 1%) por 2 horas.

Com o término das duas horas, os gânglios foram transferidos, com uma pipeta Pasteur, para uma lâmina de microscópio devidamente limpa e seca. A lâmina foi inclinada a 10° ou 20° para drenar o máximo da solução de colchicina. A lâmina foi mantida na mesma inclinação e procedeu-se sua lavagem por gotejamento do Fixador I (ácido acético: etanol 100%: água destilada, nas proporções 3:3:4) sobre os gânglios cerebrais. A Lâmina foi posicionada sob o estereomicroscópio, recebendo, logo após, 2 gotas do Fixador I sobre o material celular, o qual foi macerado rapidamente com o auxílio de agulha de dissecação para espalhar as células das massas celulares.

Antes que ocorresse a retração do material celular (esta retração se dá em virtude do Fixador I), foram adicionadas 2 gotas do Fixador II (ácido acético: etanol 100%, nas proporções 1:1); com isso o Fixador I migrou para as margens da lâmina de onde foi retirado com papel filtro. Quando o Fixador II ocupou toda a superfície da lâmina foram adicionadas 2 gotas de fixador III (ácido acético 100%), retirando-se o excesso de Fixador II com papel filtro. Por fim, a lâmina foi mantida à temperatura ambiente durante 24 horas, para secagem e, em seguida, coloração.

2.3 Coloração convencional

Após 24 horas da fixação do material, a lâmina foi corada em solução 1:30 de Giensa em tampão Sörensen a 0,06M (4,75g de Na₂HPO₄; 4,5g de KH₂PO₄; e 1000mL de água destilada; Ph 6,8) durante 25 minutos, à temperatura ambiente. Na sequência as lâminas foram lavadas em água corrente, para retirar o excesso do corante.

2.4 Análise do material

As metáfases foram analisadas em um microscópio sob objetiva de imersão. Para identificar os cromossomos quanto à sua morfologia, fez-se uso de desenhos esquemáticos e as melhores metáfases foram fotografadas.

As fotomicrografias foram feitas sob objetiva de imersão, utilizando-se uma câmera digital acoplada ao microscópio. As fotografias foram ampliadas e as imagens recortadas e dispostas em forma de cariograma, utilizando-se o programa Adobe Photoshop CS3[®] (versão 10.0).

A descrição da morfologia dos cromossomos seguiu o sistema de classificação padrão (metacêntrico, submetacêntrico e acrocêntrico) baseado na proporção dos dois braços de cada cromossomo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho foi utilizada uma colmeia de *Melipona quadrifasciata* mantida em caixa de madeira para meliponicultura. A colmeia foi coletada no município de Brejo Grande e transportada até a Universidade Federal de Sergipe (campus de São Cristóvão) no primeiro semestre do ano de 2009. Foram preparadas 10 (dez) lâminas no intervalo de setembro a

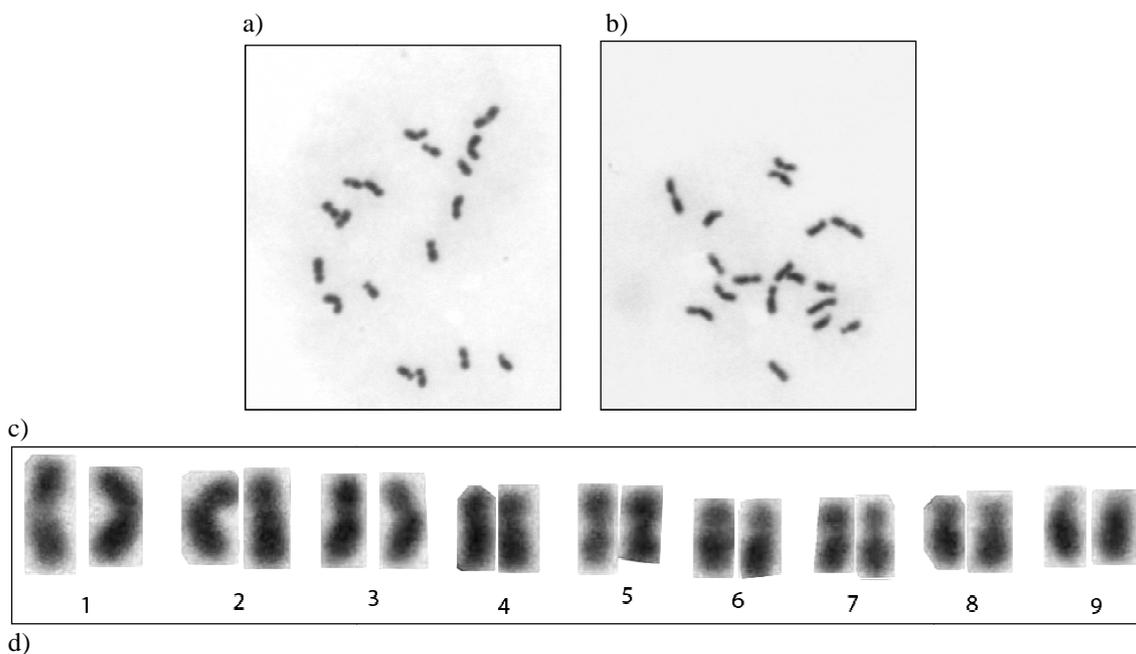
outubro de 2009 e a análise das mesmas foi realizada no decorrer de novembro e dezembro do mesmo ano.

Das 10 lâminas obtidas, apenas 05 apresentaram-se adequadas para análise citogenética, contabilizando-se pelo menos 20 metáfases em cada uma. Todas as metáfases encontradas apresentaram complemento cromossômico diplóide e, como mostra a Tabela 1, metade das metáfases analisadas apresentou $2n=18$. Este valor está de acordo com o descrito por Rocha & Pompolo (1998) e Rocha *et al.* (2007) para a espécie. A observação de metáfases com menos de 18 cromossomos pode ser explicada pelo extravio de alguns representantes durante o espalhamento do material na lâmina. Já o aparecimento de metáfases com mais de 18 cromossomos pode ter se dado pela união de duas ou mais metáfases ou até mesmo de cromossomos “perdidos” durante o espalhamento.

Tabela 1: Distribuição do número cromossômico por lâmina observada

Lâmina observada	Número de cromossomos encontrados												Número de metáfases consideradas
	7	8	9	10	11	13	14	15	16	17	18	>18	
3		1	2				1	1	3	2	7	3	20
5	1	1	3	1	2			1	1	1	9	2	22
6			1	3		1	2	1	1	1	2	8	20
7	1									1	1	19	23
8								1	2	3	3	10	20
Total	2	3	8	1	3	2	3	5	9	9	53	7	105

A partir das metáfases analisadas com $2n=18$ cromossomos, foram montados os kariogramas cuja avaliação revelou a seguinte distribuição morfológica dos cromossomos: 2 pares metacêntricos, 6 submetacêntricos e 1 acrocêntrico, como demonstrado na Figura 2. A fórmula cariotípica $2K=2M+6SM+1A$ está em consonância com a descrita por Rocha & Pompolo (1998) para *Melipona quadrifasciata* (Figura 3b), diferenciando-se, portanto, de *Melipona mandacaiá*, cuja fórmula cariotípica é $2K=1M+7SM+1A$, como demonstrado na Figura 3a.



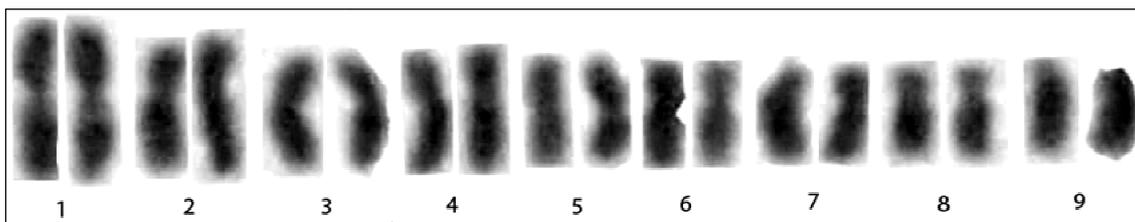


Figura 2: Cromossomos metafásicos e cariogramas de espécimes de *Melipona quadrifasciata* coletados na região de Brejo Grande (Se).

(a) e (b): fotomicrografias de células metafásicas; (c): cariograma obtido a partir da metáfase “a”; (d): cariograma obtido a partir da metáfase “b”.

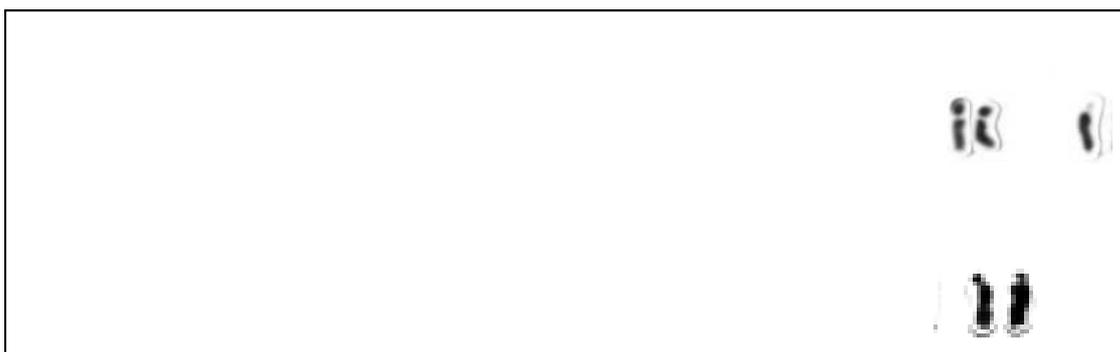


Figura 3: Cariótipos de meliponas previamente descritos.

a) Cariótipo de *Melipona mandacaiá*. Fonte: Rocha *et. al.* (2003); b) Cariótipo de *Melipona quadrifasciata*. Fonte: Rocha & Pompolo (1998). Os asteriscos indicam os pares metacêntricos.

A organização do cariótipo foi feita com base no tamanho dos cromossomos, sendo estes distribuídos em ordem decrescente de tamanho. Deste modo, ao se montar o cariótipo das lâminas analisadas pôde-se perceber que os cromossomos dos espécimes estudados apresentam a mesma distribuição do cariótipo de *Melipona quadrifasciata* construído por Rocha & Pompolo (1998), o qual se encontra apresentado na Figura 3b.

Comparando a fórmula cariotípica das duas espécies de *Melipona*, observamos que, apesar de ambas apresentarem o mesmo número diplóide de cromossomos ($2n=18$), *Melipona mandacaiá* apresenta apenas um par de cromossomos metacêntricos (par 4), ao passo que *M. quadrifasciata* apresenta dois pares com essa morfologia, representando os pares 1 e 5. Ao se comparar a distribuição dos nove pares de cromossomos no cariótipo dos espécimes aqui analisados com os cariótipos descritos por Rocha & Pompolo (1998) e Rocha *et. al.* (2003), notou-se que os pares metacêntricos encaixam-se nas mesmas localizações de *M. quadrifasciata*.

Assim, as informações geradas com a análise citogenética destes cinco indivíduos, sugerem que a população de abelhas em estudo pertence à espécie *M. quadrifasciata*. Deste modo, as diferenças morfológicas observadas nos indivíduos desta população, ao contrário do que propunha inicialmente nosso trabalho, parecem não se tratar da ocorrência de hibridação entre *M. quadrifasciata* e *M. mandacaiá*.

Uma vez que o cariótipo da população em estudo não diferiu daquele anteriormente proposto para *M. quadrifasciata* (Rocha & Pompolo, 1998), uma explicação para o surgimento de indivíduos com padrão diferente de listras terciais pode ser a ocorrência de rearranjos cromossômicos. Tais modificações nem sempre alteram a morfologia cromossômica e neste caso não podem ser detectadas com análises de coloração convencional. Assim, a utilização de técnicas que permitam a diferenciação longitudinal dos cromossomos, como bandeamento, digestão por enzimas de restrição e mesmo FISH podem vir a esclarecer esta questão.

4. CONCLUSÕES

Os dados obtidos durante o presente estudo indicaram que a população estudada pertence à espécie *Melipona quadrifasciata*, ainda que não se possa afirmar que a mesma seja da subespécie *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* como descrita até então ou quais as causas que possam ter provocado as alterações morfológicas observadas nas bandas terçais.

Para tanto, torna-se necessário a realização de estudos mais detalhados que indiquem alterações cromossômicas ou moleculares que possam explicar mudanças expressivas no fenótipo desta população.

Por fim, é importante salientar que a citogenética demonstrou-se eficaz e de fácil aplicabilidade para investigar o problema aqui relatado.

-
1. ALVES, R. M. O; SOUZA, B. A; CARVALHO, C. A. L. Notas Sobre a Bionomia de *Melipona mandacaia* (APIDAE: MELIPONINA). *Magistra*, v. 19, n. 3, p. 204-212, 2007.
 2. BATALHA-FILHO, H. Distribuição geográfica e história evolutiva da abelha sem ferrão *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae). *Dissertação de Mestrado em Genética e Melhoramento*; Universidade Federal de Viçosa (MG), 2008.
 3. IMAI, H.T.; TAYLOR, R.W.; CROSLAND, M.W.J.; CROZIER, R.H. Modes of spontaneous chromosomal mutation and karyotype evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis. *Jpn J Genet.* v. 63, p. 159–185, 1988.
 4. KERR, W. E; CARVALHO, G. A; SILVA, A. C; ASSIS, M. G. P. Biodiversidade, Pesquisa e Desenvolvimento na Amazônia: aspectos pouco mencionados da biodiversidade amazônica. *Parcerias Estratégicas*. n. 12, p. 20-41, 2001.
 5. NEVES, E. L; CASTRO, M. S. Mandaçaia: uma abelha-chave para a conservação da caatinga. *Candombá – Revista Virtual*, v. 2, n. 1, 2006. Disponível em <http://www.fja.edu.br/candomba/2006-v2n1/pdfs/Abelha_Boletim_Informativo.pdf> acessado as 11:29 de 16/10/2009.
 6. PRONÍ, E. A. Biodiversidade de abelhas indígenas sem ferrão (Hymenoptera: Apidae: meliponinae) na bacia do Rio Tinagi, Estado do Paraná, Brasil. *Arq. Ciên. Vet. Zool.*, v. 3, n. 2, p. 145-150, 2000.
 7. ROCHA, M. P; POMPOLO, S. G. Karyotypes and heterochromatin variation (C-bands) in *Melipona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Genet. Mol. Biol.* v. 21, n. 1, p. 41-45, 1998.
 8. ROCHA, M. P. Análise citogenética em abelhas do gênero *Melipona* (Hymenoptera: Meliponinae). Tese de Doutorado em Biologia Celular e Estrutural; Universidade Federal de Viçosa (MG), 2002.
 9. ROCHA, M. P.; CRUZ, M. P; FERNANDES, A.; WALDSCHMIDT, A. M.; SILVA-JUNIOR, J. C.; POMPOLO, S. G. Longitudinal differentiation in *Melipona mandacaia* (Hymenoptera, Meliponini) chromosomes. *Hereditas*. v. 138, n. 2, p. 133–137, 2003.
 10. ROCHA, M. P.; POMPOLO, S. G; FERNANDES, A.; CAMPOS, Lucio Antonio de Oliveira. *Melipona – SEIS DÉCADAS DE CITOGENÉTICA*. *Biosci. J.* v. 23, Supplement 1, p. 111-117, 2007.
 11. SCHER, R. Diversidade Cariotípica em uma população de *Trypoxylon (Trypargilum) nitidum* (Hymenoptera, Sphecidae) do Parque Florestal Estadual do Rio Doce (MG). *Dissertação de Mestrado em Genética e Melhoramento*; Universidade Federal de Viçosa (MG), 1996.
 12. SILVA, J. B.; BRITO, R. O.; MIRANDA, E. A.; SILVA JÚNIOR, J. C. Caracterização Citogenética da Abelha Sem Ferrão *Melipona flavolineata* como Ferramenta para a Preservação da Espécie. *Anais do VIII congresso de ecologia do Brasil, Caxambu – MG, 23 a 28 de setembro de 2007*.
 13. SILVA, R. B. Variabilidade genética de *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponina) no estado de Minas Gerais - Brasil. *Dissertação de Mestrado em Biologia Celular e Estrutural*; Universidade Federal de Viçosa (MG), 2007.
 14. SOUZA, C. B.; SANTOS, D. M.; ARAÚJO, E. D. Nidificação de Mandaçaia (*Melipona quadrifasciata quadrifasciata*) em coqueiros da região da foz do rio São Francisco. *Anais do XVI Congresso Brasileiro de Apicultura*. Aracaju, 2006.