UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ – UESC

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA – PPGZOO

JÉSSICA FERNANDES PADRE

CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE ESPÉCIES DE FORMIGAS CULTIVADORAS DE FUNGO (FORMICIDAE: MYRMICINAE: ATTINI: ATTINA)

ILHÉUS - BAHIA

2019

JÉSSICA FERNANDES PADRE

CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE ESPÉCIES DE FORMIGAS CULTIVADORAS DE FUNGO (FORMICIDAE: MYRMICINAE: ATTINI: ATTINA)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zoologia, da Universidade Estadual de Santa Cruz como requisito para obtenção do título de mestre em Zoologia

Orientadora: Profª. Drª Janisete Gomes da Silva Miller

Coorientadora: Profª. Drª. Cléa dos Santos Ferreira Mariano

ILHÉUS - BAHIA

2019

JÉSSICA FERNANDES PADRE

CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE ESPÉCIES DE FORMIGAS CULTIVADORAS DE FUNGO (FORMICIDAE: MYRMICINAE: ATTINI: ATTINA)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zoologia, da Universidade Estadual de Santa Cruz como requisito para obtenção do título de mestre em Zoologia

Orientadora: Profª. Drª Janisete Gomes da Silva Miller

Coorientadora: Profª. Drª. Cléa dos Santos Ferreira Mariano

Ilhéus – BA, ___ /___ / 2019.

Profª. Drª. Janisete Gomes da Silva Miller – Doutora em Ciências Biológicas (Biologia genética)
UESC/DCB
(Orientadora)

Prof. Dr Jacques Hubert Charles Delabie – Pós-doutor em Entomologia
UESC/ DCAA

Prof. Dr Igor Silva dos Santos – Doutor em Genética e Biologia Molecular
IF BAIANO

Agradecimentos

Agradeço à Deus por todas as oportunidades, desafios e bênçãos

Agradeço à CAPES pela concessão da bolsa

À UESC e ao Programa de Pós-graduação em Zoologia Aplicada pela oportunidade

Às professoras Janisete e Cléa por todo o auxílio, incentivo, apoio e paciência

Aos colegas do laboratório de Zoologia de invertebrados da UESC do laboratório de Mirmecologia da CEPLAC por todos os momentos compartilhados. À Lais Bomfim e Vinicius Miranda por todo o auxílio nas coletas e pela amizade construída ao longo desses dois anos

Ao Professor Jacques Delabie pela identificação das formigas e pelas dicas que foram dadas nesse período

Ao Professor Igor dos Santos por todo o auxílio nos procedimentos e pela paciência

Aos amigos queridos de minha cidade natal por todo o amor e motivação

À minha família, especialmente ao meu Pai (Osvaldo) e a minha irmã (Jacqueline) por todo amor, suporte e motivação.

CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE ESPÉCIES DE FORMIGAS CULTIVADORAS DE FUNGO (FORMICIDAE: MYRMICINAE: ATTINI: ATTINA)

RESUMO

As formigas cultivadoras de fungo, reunidas na subtribo Attina, são endêmicas do Novo mundo e incluem 286 espécies válidas distribuídas em 10 gêneros. Esse estudo teve como objetivo caracterizar citogeneticamente cinco espécies de formigas cultivadoras de fungo com a finalidade de contribuir com o conhecimento a respeito da evolução cromossômica desse grupo. Para isso, foram coletadas colônias completas de cinco espécies no município de Ilhéus – Bahia. A técnica de coloração convencional proporcionou informações relacionadas ao número e morfologia cromossômica de: *Mycocepurus goeldii* Forel, 1893 (2n=7); *Sericomyrmex bondari* (2n= 44); *Sericomyrmex saussurei* (2n=36); *Sericomyrmex mayri* (2n=50) e *Trachymyrmex bugnioni* (2n=16), apresentando uma variação de 2n=7 a 2n=50. A coloração sequencial com fluorocromos mostrou uma tendência do grupo em ter a heterocromatina rica em GC (CMA+). A técnica de NOR permitiu a visualização de regiões organizadoras de nucléolo. A partir da análise comparativa do cariótipo das espécies presentes nesse estudo com os dados citogenéticos na literatura, foi possível constatar a ocorrência de polimorfismo intraespecífico e interespecífico nos gêneros *Mycocepurus, Sericomyrmex* e *Trachymyrmex*. Foi observada também uma variação intraespecifica na espécie *M. goeldii.* Foi realizada uma análise da variação cromossômica da subtribo Attina com base nos dados citogenéticos disponíveis na literatura. A partir desses dados, foi verificada uma variação de 2n=7 a 2n=54 nesse grupo. Os gêneros *Atta* e *Acromyrmex* são os únicos dessa subtribo que apresentam cariótipo uniforme ou com poucas variações morfológicas, os demais gêneros são bem mais variáveis. A diversidade cariotípica nos gêneros ancestrais é mais significativa. Foi analisada também a direção da evolução cariotípica da subtribo Attina e o cariógrafo indicou que os cromossomos sofreram ciclos sucessivos de rearranjos do tipo fissão cêntrica com adição de heterocromatina e inversão AM com alguns eventos de redução do número cromossômico por meio de fusões cêntricas. Nossos ilustram a diversidade cariotípica da subtribo Attina e contribuem para o conhecimento acerca da evolução cromossômica desse grupo.

CITOGENETIC CHARACTERIZATION IN SPECIES OF FUNGUS-GROWING ANTS (FORMICIDAE: MYRMICINAE: ATTINI: ATTINA)

ABSTRACT

Fungus-growing ants, all in the subtribe Attina, are endemic to the New World and include 286 valid species distributed in 16 genera. This study aimed to characterize cytogenetically five species of fungus-growing ants in order to contribute to the knowledge on chromosome evolution of this group. Complete colonies of five species were collected in Ilhéus, Brazil. The conventional staining technique provided information related to chromosome number and morphology of: *Mycocepurus goeldii* Forel, 1893 (2n = 7); *Sericomyrmex bondari* (2n = 44); *Sericomyrmex saussurei* (2n = 36); *Sericomyrmex mayri* (2n = 50) and *Trachymyrmex bugnioni* (2n = 16), showing a variation of 2n = 7 to 2n = 50. Sequential staining with fluorochromes showed a tendency of the group to have GC-rich heterochromatin (CMA+). The NOR technique allowed the visualization of nucleolar organizing regions. The comparative analysis of the karyotype of the species in this study with literature allowed to confirm the occurrence of intraspecific and interspecific polymorphism in the genera *Mycocepurus, Sericomyrmex* and *Trachymyrmex*. Intraspecific variation in *M. goeldii* was also observed. An analysis of the chromosomal variation of the subtribe Attina was carried out based on the cytogenetic data available in the literature and a variation of 2n = 7 to 2n = 64 in this group was observed. The genera *Atta* and *Acromyrmex* are the only ones of this subtribe that show an uniform karyotype or with few morphological variations, the other genera are much more variable. Karyotypic diversity in ancestral genera is more significant. We also analyzed the direction of karyotype evolution of the subtribe Attina and the kariograph indicated that the chromosomes underwent successive cycles of centric fission with the addition of heterochromatin and AM inversions and events of centric fusions that caused reduction in chromosome number. Our results illustrate the karyotype diversity of the subtribe Attina and contribute to the knowledge on chromosome evolution of this group.

Lista de figuras

Figura 1 - Filogenia e sistemas de agricultura da subtribo Attina (Adaptado de SCHULTZ; BRADY, 2008; BRANSTETTER, 2017) 18

Figura 2 - Cariográfico adaptado de IMAI *et al.* 1994. Borda A: Limite superior para o número de cromossomos acrocêntricos em células diplóides. Borda M: Limite inferior para o número de cromossomos metacêntricos em células diplóides. C Fis = Fissão cêntrica, C Fus = Fusão Cêntrica, P Fis = Fissão Pericêntrica, P Fus = Fusão Pericêntrica, AM inv = Inversão Acrocêntrico – Metacêntrico, MA inv= Inversão Metacêntrico-Acrocêntrico. Fonte: Mariano *et al*., 2012 21

Figura 3 - Cariótipos de: a) *Mycocepurus goeldii;* b) *Sericomyrmex bondari*; c) *Sericomyrmex saussurei*; d) *Sericomyrmex mayri* e e) *Trachymyrmex bugnioni,* Ilhéus – BA, Brasil. 29

Figura 4 - Metáfases com os fluorocromos CMA3 (lado esquerdo) e DAPI (lado direito) de: a) *Mycocepurus goeldii;* b) *Sericomyrmex saussurei;* c) *Sericomyrmex bondari*; d) *Sericomyrmex mayri* e e) *Trachymyrmex bugnioni*, Ilhéus – BA, Brasil. .30

Figura 5 - Cromossomos metafásicos submetidos a dupla-coloração de CMA3/DAPI: a) *Mycocepurus goeldii*; b) *Sericomyrmex saussurei*; c) *Sericomyrmex bondari*; d) *Sericomyrmex mayri* e e) *Trachymyrmex bugnioni,* Ilhéus – BA, Brasil. .31

Figura 6 - Cromossomos metafásicos submetidos ao tratamento de banda NOR de: a) *Mycocepurus goeldii;* b) *Sericomyrmex saussurei*; c) *Sericomyrmex bondari*; d) *Sericomyrmex mayri* e e) *Trachymyrmex bugnioni*, Ilhéus – BA, Brasil. 32

Figura 7 - Frequência do número diplóide de cromossomos das espécies da subtribo Attina 43

Figura 8 - Cariógrafo de espécies da subtribo Attina 45

Figura 9 - Cariógrafo elaborado a partir dos dados citogenéticos de: a) *Acromyrmex;* b) *Apterostigma*; c) *Cyphomyrmex*; d) *Mycetarotes*; e) *Mycetophylax*; f) *Sericomyrmex* e g) *Trachymyrmex*.....65

Lista de tabelas

Tabela 1 - Citogenética de Myrmicinae ..... **Erro! Indicador não definido.**59

Tabela 2 - Referencias de estudos citogenéticos realizados com as formigas cultivadoras de fungo 61

Tabela 3 - Espécies estudadas, local de coleta, tamanho da amostra (número de colônias), material analisado (Número de individuos/número de metáfases), número cromossômico diplóide (2n), fórmula cariotípica (2K).....28

Tabela 4 – dados citogenéticos utilizados para a montagem do cariógrafo 63

Sumário

1. Introdução geral 10
1.1 Citogenética 11
1.1.1 Análise citogenética 13
1.1.2 Técnicas de bandeamento cromossômico 14
1.2 Origem e evolução no cultivo do fungo 17
1.3 História natural das formigas cultivadoras de fungo 18
1.4 Estudos Citogenéticos em Formicidae 20

Capítulo 1 24
Introdução 26
Metodologia 27
Resultados e discussão 28

Capítulo 2 39
Introdução 41
Metodologia 42
Resultados e discussão 42

Conclusão geral 47

Referências bibliográficas 49

Anexos 59

1. Introdução geral

A citogenética inclui os estudos relacionados aos cromossomos no que diz respeito à sua morfologia, organização, função e evolução (GUERRA, 1988). A análise citogenética não é utilizada somente para determinação do número e morfologia de cromossomos em formigas, mas também como uma ferramenta bastante salutar para comparar espécies (BARROS *et al*., 2016), diferenciar espécies crípticas (CORREIA *et al*., 2016), estabelecer relações entre as espécies e sua evolução (IMAI, 1971; PALOMEQUE *et al*., 1988; PALOMEQUE, 1993; CARDOSO *et al.,* 2014), caracterizar novas espécies (IMAI *et al.,* 1994) e, ainda, fornece subsídios para estudos de evolução cromossômica (CARDOSO *et al.,* 2014, BARROS *et al.,* 2012; BARROS *et al.,* 2016).

A família Formicidae é composta por 17 subfamílias, com aproximadamente 40 tribos e 334 gêneros distribuídos em mais de 13.000 espécies descritas e é considerada um grupo monofilético com origem no Cretáceo (BOLTON, 2019; 2003; GRIMALDI *et al.,* 1997). As formigas colonizaram quase todos os habitats devido à sua organização social, a sua capacidade de modificar o ambiente, a exploração dos recursos naturais e aos seus mecanismos de defesa (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). Dentre os formicídeos, são conhecidos os cariótipos de cerca de 800 morfoespécies com representantes das diferentes subfamílias (LORITE; PALOMEQUE, 2010; MARIANO *et al.,* 2011).

A subfamília Myrmicinae destaca-se entre as demais subfamílias pela sua diversidade taxonômica: abrange seis tribos contendo 143 gêneros e mais de 6000 espécies descritas, possuem ampla distribuição geográfica e englobam uma gama de estilos de vida incluindo generalistas, especialistas, onívoros e herbívoros (BOLTON, 2019; BROWN, 2000). Além disso, devido à coevolução com outros organismos, essas formigas desenvolveram relações interespecíficas tais como comensalismo, parasitismo social e mutualismo (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990).

As formigas reunidas na subtribo Attina destacam-se entre os gêneros da subfamília Myrmicinae pela sua relação mutualística com fungo basidiomicetos (WEBER, 1972). São endêmicas do Novo Mundo, distribuídas desde o Texas (EUA) até o norte da Argentina e são consideradas um grupo monofilético (BRANDÃO; MAYHÉ-NUNES, 2007; SCHULTZ; BRADY, 2008). Os 16 gêneros representantes desta subtribo são: *Acromyrmex* Mayr, 1865*; Apterostigma* Mayr, 1865; *Atta*

Fabricius,1804; *Cyatta* Sosa-Calvo *et al*., 2013; *Cyphomyrmex* Mayr, 1862*; Kalathomyrmex* Klingenberg; Brandão*,* 2009; *Mycetagroicus* Brandão; Mayhé-Nunes, 2001; *Mycetarotes* Emery, 1913; *Mycetophylax* Emery, 1913; *Mycetosoritis* Wheeler, 1907; *Mycocepurus* Forel, 1893; *Myrmicocrypta* Smith, 1860; *Paramycetophylax* Kusnezov, 1956; *Pseudoatta* Gallardo, 1916; *Sericomyrmex* Mayr, 1865; *Xerolitor* Sosa-Calvo *et al*., 2018 e *Trachymyrmex* Forel*,* 1893 com aproximadamente 286 espécies descritas (BRANSTETTER, 2017; BOLTON, 2019).

O conhecimento citogenético dessas formigas é escasso pois só abrange cerca de 18% das espécies válidas. São conhecidos os cariótipos de apenas uma espécie dos gêneros *Mycocepurus* e *Myrmicocripta* e outros gêneros como *Cyatta, Kalathomyrmex, Mycetagroicus, Mycetosoritis, Paramycetophylax, Pseudoatta* e *Xerolitor* não possuem nenhuma informação citogenética disponível. Assim, a realização de mais estudos citogenéticos com essas formigas são importantes tanto para o conhecimento da diversidade cariotípica quanto para a compreensão da evolução cromossômica do grupo.

Dez gêneros das formigas cultivadoras de fungo (*Acromyrmex, Apterostigma, Atta, Cyphomyrmex, Mycetarotes, Mycetophylax, Mycocepurus, Myrmicocrypta, Sericomyrmex* e *Trachymyrmex)* são encontrados no município de Ilhéus (Bahia), de acordo com dados da coleção do Laboratório de Mirmecologia do Centro de Pesquisas do Cacau (CEPLAC/CEPEC) acrônimo “CPDC” (DELABIE *et al.*, 1998). No entanto, poucas informações acerca das características biológicas dessas espécies estão disponíveis, o que resulta em uma lacuna no conhecimento não só da diversidade desse grupo como também na compreensão da sua evolução e diversificação.

1.1 Citogenética

Os primeiros estudos relacionados aos cromossomos foram realizados no final do século XIX a partir da descrição do processo de mitose e do envolvimento de um “material cromático nuclear” em plantas e animais por Strasburger (1875) e Flemming (1879). As primeiras ilustrações dos cromossomos mitóticos nos animais foram publicadas em 1882 por Flemming contudo o termo “cromossomos” foi introduzido apenas em 1888 por Waldeyer baseado nas palavras gregas “Corpo

colorido” (SUMNER, 2003; MALUF; RIEGEL, 2009). Após o desenvolvimento da Teoria Cromossômica da Herança proposta por Sutton (1903) e Boveri (1904) baseada nas leis mendelianas, as disciplinas de Citologia e Genética foram combinadas para o estudo dos cromossomos dando origem à Citogenética (GUERRA, 1988).

Atualmente a citogenética compreende os estudos relativos aos cromossomos no que diz respeito à sua morfologia, organização, variação e evolução (GUERRA, 1988). Cada espécie possui um número e morfologia de cromossomos específicos que tendem a ser preservados entre os indivíduos da mesma espécie (LORITE; PALOMEQUE, 2010). No entanto, alterações cromossômicas são observadas tanto em nível intraespecífico quanto em nível interespecífico devido a mudanças na estrutura dos cromossomos, chamadas de rearranjos cromossômicos, que, geralmente, desempenham um papel importante na evolução do grupo (SUMNER, 2003; GUERRA, 1988). Dentre os rearranjos estão a Fusão e a Fissão cêntrica, Inversões e Translocações.

Na Fusão cêntrica dois cromossomos acrocêntricos ou telocêntricos se fundem, originando um cromossomo metacêntrico ou submetacêntrico; esse tipo de rearranjo é considerado o mais comum e foi relatado em diversos grupos de animais (SUMNER, 2003). Na fissão cêntrica ocorre a quebra do cromossomo metacêntrico na altura do centrômero, resultando em dois cromossomos telocêntricos; esse evento é descrito com menor frequência, mas isso pode estar relacionado com o fato de nem sempre ser possível determinar a ocorrência desse tipo de rearranjo cromossômico (SUMNER, 2003). Os eventos de Fissão e Fusão cêntrica resultam em alterações no número de cromossomos sem que haja variação na quantidade de DNA: A fusão cêntrica reduz o número de cromossomos enquanto a fissão cêntrica aumenta esse número (IMAI; MARUYAMA,1978; GUERRA, 1988; IMAI *et al*., 1977).

As Inversões são formadas por duas quebras no mesmo cromossomo e esse segmento reorganiza-se de forma invertida antes de se fundir no cromossomo. Se nesse segmento contiver o centrômero, essa inversão é dita pericêntrica, se o centrômero não estiver presente no segmento a inversão é paracêntrica (GUERRA, 1988). Em geral, na Inversão pericêntrica, um cromossomo acrocêntrico é rompido e origina um cromossomo metacêntrico (Inversão AM), o processo inverso origina cromossomos acrocêntricos (Inversão MA) (SUMNER, 2003; IMAI;

MARUYAMA,1978). Nesse rearranjo, não há variação do número de cromossomos somente do número de braços cromossômicos (IMAI; MARUYAMA,1978). Em relação à ocorrência, as inversões do tipo AM são mais comuns (IMAI; MARUYAMA,1978).

A Translocação consiste na transferência de um segmento cromossômico para outro cromossomo homólogo ou não, com redistribuição do material genético entre os cromossomos (GUERRA, 1988; MCGREGOR, 1993). Esse tipo de rearranjo pode resultar na duplicação ou na deleção cromossômica e esse evento é raramente observado no cariótipo dos animais (IMAI *et al*., 1977).

A análise comparativa dos cariótipos entre espécies do mesmo gênero permite a detecção de rearranjos cromossômicos e, além disso, possibilita a observação das alterações cariotípicas que ocorreram ao longo do processo evolutivo do grupo (IMAI *et al*., 1984).

O papel dos rearranjos cromossômicos na especiação tem sido investigado por diversos autores que sugerem que tais alterações podem favorecer a origem de barreiras reprodutivas quando causam problemas na meiose de heterozigotos levando à redução da infertilidade ou à supressão da recombinação (FARIA; NAVARRO, 2010, KIRKPATRICK; BARTON, 2006; MERICO, 2013, XAVIER, 2018; JORON, 2011 LUKHTANOV *et al*., 2011; POTTER *et al*., 2017).

1.1.1 Análise citogenética

A partir das técnicas citogenéticas são obtidas informações relacionadas a estrutura, organização molecular e comportamento dos cromossomos permitindo a caracterização intraespecífica de uma espécie (KASAHARA, 2009). Com base nisso, podem ser observadas variações intraespecíficas e/ou interespecíficas relacionadas ao número e morfologia cromossômica, quantidade de DNA, conteúdo da heterocromatina e número e posição das bandas (GUERRA, 1988).

Além disso, através da análise comparativa dos cariótipos de um grupo, é possível estabelecer relações de parentesco entre espécies relacionadas e, ainda, propor hipóteses relacionadas à evolução cariotípica (GUERRA, 1988; LORITE; PALOMEQUE, 2010; MARIANO *et al*., 2019). Isso justifica o uso da citogenética como uma ferramenta adicional em estudos taxonômicos, sistemáticos e evolutivos em diversos grupos de animais tais como mamíferos (MAHMOUDI *et al.*, 2018),

peixes (DUARTE *et al*., 2018); e insetos nas ordens Hemiptera (CALLEROS *et al*., 2010), Mecoptera (MIAO; HUA, 2017), e em formigas (MARIANO *et al*., 2003; MARIANO *et al*., 2012; CARDOSO *et al*., 2014; MARIANO *et al*., 2019).

Até a década de 1970, os cromossomos eram somente evidenciados por corantes que tinham afinidade com a cromatina como, por exemplo, o Giemsa que consiste em uma mistura de azur-eosina-azul de metileno (MALUF; RIEGEL, 2009; KASAHARA, 2009). Através da técnica de colocação convencional são obtidas informações relacionadas ao número e morfologia dos cromossomos.

Levan e colaboradores (1964) propuseram um sistema uniforme para a classificação morfológica dos cromossomos que é utilizado até os dias atuais. Tal sistema baseia-se, morfologicamente, na posição do centrômero e, numericamente, na razão entre o comprimento do braço longo em relação ao comprimento do braço curto. Assim, os cromossomos podem ser classificados em quatro grupos: Metacêntrico (M) quando o centrômero está localizado na região central e a razão é igual a 1; Submetacêntrico (SM) quando o centrômero está posicionado fora da área central e a razão entre os braços varia de 1 a 3; Subtelocêntrico (ST) quando o centrômero é encontrado na região subterminal e a razão entre os braços tem valor entre 7 e 3; Acrocêntrico (A) quando o centrômero é detectado próximo da extremidade. (LEVAN *et al.*, 1964; MALUF; RIEGEL, 2009).

A coloração convencional permite, também, a observação de algumas particularidades tais como constrições secundarias em um ou mais cromossomos, presença de fragmentos satélites, quebras eventuais, ocorrência de cromossomos B, alterações numéricas e também certos tipos de rearranjos estruturais (KASAHARA, 2009). No entanto, esse tipo de coloração apresentava limitações uma vez que não permite a identificação de cada elemento do par cromossômico (MALUF; RIEGEL, 2009) Nesse sentido, o aprimoramento das técnicas de bandeamento cromossômico é de fundamental importância para expansão da citogenética como disciplina, já que promove o aparecimento das marcações ao longo do cromossomo facilitando a identificação individual e, consequentemente, fornecendo informações mais detalhadas a respeito da morfologia dos cromossomos (GUERRA,1988).

1.1.2 Técnicas de bandeamento cromossômico

As técnicas citogenéticas podem ser divididas em duas categorias: a primeira consiste na produção de bandas ao longo de toda a extensão dos cromossomos (Bandas Q,G e R) e aquelas que marcam regiões especificas de alguns ou de todos os cromossomos (Banda C, NOR, DAPI/DA) (MALUF; RIEGEL, 2009). A seguir serão exploradas as técnicas relacionadas à coloração diferencial dos cromossomos.

1.1.2.1 Banda C

O bandeamento C cora especificamente a heterocromatina constitutiva que fica localizada preferencialmente ao redor dos centrômeros. Essas regiões possuem DNA repetitivo de replicação tardia, sendo formado principalmente por DNA satélite (MALUF & RIEGEL, 2011). Nessa técnica, o DNA é desnaturado por hidróxido de bário e a renaturação (na presença de soluções salinas mornas) da dupla fita no local em que o DNA é repetitivo ocorre mais rapidamente. Disso resulta que as regiões heterocromáticas são coradas de forma mais intensa originando as bandas C (GUERRA, 1988; MALUF; RIEGEL, 2009). Através dessa técnica são obtidas informações relacionadas a localização e quantidade das regiões heterocromáticas tornando possível observar variação no padrão de banda C entre organismos relacionados (KASAHARA, 2009).

O padrão da banca C já foi utilizado como parâmetro para identificação e caracterização dos blocos heterocromáticos em grupos como Hemiptera (BARDELLA *et al*., 2016; PAPESCHI, 1991), Orthoptera (CAMACHO *et al.,* 1981), e abelhas (ROCHA; POMPOLO, 1998). Foi utilizado na diferenciação de espécies em coleópteros (AMORIM *et al*., 2018) e himenópteros (SANTOS *et al*., 2018) e pode auxiliar no entendimento de possíveis mecanismos relacionados à evolução cromossômica como foi observado por Imai e colaboradores (1977;1991) em formigas do gênero *Myrmecia* e em Diptera (CHIRINO *et al.,* 2015; MICHAILOVA *et al.*, 2015).

1.1.2.2 Bandeamento NOR

O bandeamento NOR cora particularmente as regiões organizadoras de nucléolo que estão localizadas na constrição secundária dos cromossomos onde contêm sítios de DNA moderadamente repetitivo, com sequências de genes

ribossômicos (MALUF; RIEGEL, 2009). As proteínas existentes nessa região que estavam em atividade no ciclo celular anterior tem afinidade por prata. Assim, um dos protocolos é submeter as lâminas a um tratamento com nitrato de prata. Essa técnica permite o estudo dos genes ribossomais e, através de comparações interespecíficas, podem ser observadas diferenças na quantidade e localizações de NOR em espécies relacionadas e esses padrões discrepantes são importantes para a citotaxonomia (KASAHARA, 2009).

Essa técnica é utilizada para identificação de cromossomos marcadores e na detecção de rearranjos cromossômicos (GROSS *et al.,* 2010; SOTO *et al.,* 2018) e para comparar a quantidade e a variação das regiões organizadoras de nucléolo em diversos grupos de organismos, como por exemplo, primatas (BAICHAROEN *et al*., 2016), peixes (MANTOVANI *et al.,* 2000; TAKAI, 2016) e formigas (LORITE *et al*., 1997).

1.1.2.3 Coloração com fluorocromos

Fluorocromos são corantes fluorescentes que possuem afinidades por regiões do DNA ricas em bases AT ou em bases GC produzindo um padrão fluorescente característico. Os principais fluorocromos utilizados são 4,6 – Diamino-2-Phenole-Indole (DAPI), o qual apresenta afinidade por bases AT e Cromomicina A_3 (CMA_3) que apresenta afinidade por GC (GUERRA,1988, MALUF; RIEGEL, 2009).

Geralmente são utilizadas nessa técnica a combinação desses dois corantes para a obtenção de padrões distintos de bandas cromossômicas visando uma análise mais detalhada do conjunto cromossômico (SCHWEIZER, 1981). A coloração sequencial com fluorocromos base-especificos permite a caracterização da constituição molecular das regiões heterocromáticas e permite a identificação de diferentes tipos de heterocromatina (SCHWEIZER, 1981). Essa técnica tem sido utilizada para identificação de rearranjos cromossômicos como foi observado em formigas (CARDOSO *et al*., 2014; AGUIAR *et al.,* 2017; KUMAR *et al.,* 2017) e na diferenciação de espécies, como por exemplo em *Drosophila* (MICHAILOVA *et al*., 2015) e em coleópteros (DA SILVA *et al*., 2015).

1.2 Origem e evolução no cultivo do fungo

Estudos filogenéticos estimam que a origem da subtribo Attina ocorreu há cerca de 66 milhões de anos com divergência posterior entre duas linhagens há 49 e 50 milhões de anos que se diversificaram e formaram dois clados principais: Paleoattina e Neoattina (BRANSTETTER, 2017). Estima-se que a agricultura na forma de fungicultura teve uma única origem há 50 milhões de anos (BRANSTETTER, 2017, SCHULTZ & BRADY, 2008).

Estudos filogenéticos apontam que as formigas cultivadoras de fungo são divididas em cinco sistemas de agricultura distintos, cada um representando uma transição na evolução da agricultura dessas formigas. Esses sistemas são: Agricultura Basal (Lower Agriculture), Agricultura do Fungo Coral (Coral Fungus Agriculture), Agricultura de Levedura (Yeast Agriculture), Agricultura superior (Generalized Higher Agriculture) e a Agricultura das formigas cortadeiras (Leaf-Cutter Agriculture) (SCHULTZ; BRADY, 2008; BRANSTETTER, 2017; MEHDIABADI & SCHULTZ, 2010).

A maioria dos gêneros praticam a agricultura basal juntamente com algumas espécies de *Apterostigma e Cyphomyrmex* (Figura 1). O gênero *Apterostigma* é dividido em dois clados irmãos, um contendo as espécies que realizam a agricultura basal e outro com as espécies que cultivam um fungo coral. O gênero *Cyphomyrmex* é dividido em dois grupos de espécies: *C. wheeleri* e *C. rimosus*. Desses grupos, o primeiro pratica agricultura basal e o segundo grupo pratica agricultura de levedura. Os gêneros *Trachymyrmex, Xerolitor e Sericomyrmex* praticam a agricultura superior e são considerados intermediários devido ao fato de ocasionalmente utilizarem material vegetal fresco como substrato para o cultivo do fungo. As espécies dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* são consideradas as verdadeiras formigas-cortadeiras por cultivarem fungos sobre substrato vegetal vivo e, portanto, cortarem folhas frescas (SCHULTZ; BRADY, 2008; BRANSTETTER, 2017, MEHDIABADI; SCHULTZ, 2010; DELLA LUCIA, 2011).

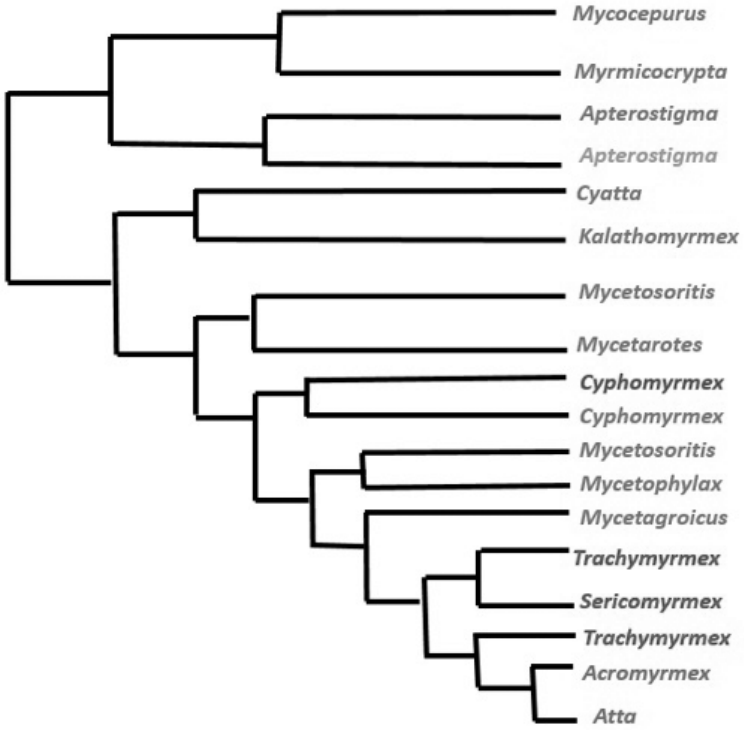

Figura 1 - Filogenia e sistemas de agricultura da subtribo Attina (Adaptado de SCHULTZ; BRADY, 2008; BRANSTETTER, 2017)

As espécies dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* têm sido amplamente estudadas devido ao fato de serem apontadas como as principais pragas de plantios florestais, agricultura e pecuária (VARON *et al*., 2007; HERNANDEZ; JAFFÉ, 1995; ZANETTI *et al.,* 2003; PEREZ *et al.,* 2011). Poucos estudos têm sido realizados com os gêneros que praticam os outros tipos de sistema de agricultura (CRISTIANO *et al*., 2013; BARROS *et al*., 2011; BARROS *et al*., 2014*).*

1.3 História natural das formigas cultivadoras de fungo

As formigas da subtribo Attina desenvolveram uma relação única de mutualismo com o fungo basidiomicetos com o intuito de utilizar a suas hifas como recurso alimentar para todos os indivíduos da colônia. O fungo, por sua vez, recebe substrato de boa qualidade para o seu crescimento, adquire proteção e, ainda, é dispersado pelas rainhas fundadoras de novos ninhos (DELLA LUCIA, 2011). Essas formigas são extremamente variadas em relação à estrutura da colônia, ao forrageamento, ao padrão de organização social e ao sistema de agricultura.

O comportamento de nidificação mais comum dessas formigas é a construção de ninhos subterrâneos a partir da escavação de câmaras no solo que podem variar desde uma única câmara, em gêneros basais, até centenas, em gêneros derivados. Pode-se, ainda, encontrar ninhos construídos em troncos em decomposição ou serapilheira, dependendo do gênero (MEHDIABADI; SCHULTZ, 2010).

Uma ou mais câmaras do ninho são exclusivamente utilizadas para o cultivo do fungo que consiste no fungo junto com o substrato que é trazido regularmente pelas formigas (WEBER 1958). Dentro do ninho, as operárias depositam enzimas digestivas no substrato para facilitar a penetração no fungo, fazendo-o crescer (ERTHAL, 2004). Os gêneros basais utilizam como substrato carcaça de insetos, sementes e partes de flores e frutas em decomposição. Os gêneros intermediários além de utilizarem tais recursos, ocasionalmente utilizam folhas frescas. Já os gêneros mais derivados só utilizam material vegetal fresco (MEHDIABADI & SCHULTZ, 2010).

Os gêneros basais vivem em colônias que variam desde pequenas populações de dezenas de operárias que apresentam pouca variação morfológica entre as castas e os gêneros mais derivados possuem colônias grandes e altamente populosas com centenas de operarias polimórficas (MEHDIABADI & SCHULTZ, 2010).

Todas as espécies cultivadoras de fungo compartilham hábitos relacionados à fundação de uma nova colônia. A fêmea virgem alada armazena o micélio do fungo do jardim da colônia da mãe em sua bolsa infra-bucal, um local de filtragem localizado abaixo de seus apêndices bucais (MEHDIABADI; SCHULTZ, 2010). Em seguida ocorre o voo nupcial, o momento em que machos e fêmeas de diferentes colônias realizam seus voos de reprodução simultaneamente em grandes áreas o que diminui as chances de endogamia. A fundação da colônia na maioria das vezes é do tipo claustral e a distribuição dos novos formigueiros é aleatória (DELABIE *et al*., 2002).

A futura rainha então cuida da primeira prole e fornece substrato para o crescimento do fungo até o crescimento dessa prole que irá forragear, cuidar da futura prole e escavar mais câmaras, enquanto a rainha permanece na cavidade inicial colocando ovos (MEHDIABADI; SCHULTZ, 2010).

1.4 Estudos Citogenéticos em Formicidae

Estudos citogenéticos realizados em cerca de 800 morfoespécies de formigas mostram uma variação no número haploide de cromossomos de n=1 em *Myrmecia croslandi* (CROSLAND; CROZIER 1986) a n=60 em *Dinoponera lucida* (MARIANO *et al,* 2008) tornando-o um dos grupos que apresentam maior variação em relação ao número de cromossomos entre os eucariotos (LORITE; PALOMEQUE, 2010).

Considerando a importância dos dados citogenéticos para a análise da biodiversidade e da variabilidade genética para a investigação da evolução cariotípica, um banco de dados foi recentemente criado trazendo informações citogenéticas da família Formicidae chamado Ant Chromosome database – ACdb (www.ants.ufop.br) com o intuito de facilitar o acesso a tais informações (CARDOSO *et al*., 2018).

A análise citogenética não é utilizada somente para determinação do número e morfologia de cromossomos em formigas, mas também como uma ferramenta bastante salutar para comparar espécies (BARROS *et al*., 2016), diferenciar espécies crípticas (CORREIA *et al*., 2016), discutir relações evolutivas entre as espécies (IMAI, 1971; PALOMEQUE *et al*., 1988; PALOMEQUE, 1993; CARDOSO *et al.,* 2014), fornecer subsídios para estudos de evolução cromossômica (CARDOSO *et al.,* 2014, BARROS *et al.,* 2012; BARROS *et al.,* 2016) e na caracterização de novas espécies (IMAI *et al.,* 1994).

De acordo com Imai *et al.* (1986, 1988, 1994), no que diz respeito à evolução dos cromossomos dos eucariotos, existe uma tendência ao aumento do número de cromossomos causados, geralmente, por fissões cêntricas seguido de uma adição de heterocromatina constitutiva, provavelmente devido à instabilidade dos telômeros. Dessa forma, ao longo da evolução, ocorre o aumento no número de cromossomos, mas o seu tamanho é reduzido. Essa teoria é conhecida como a Teoria da Interação Mínima (Imai *et al.*1986). Ela explica a distribuição assimétrica do tamanho dos cromossomos e os possíveis mecanismos que governam a evolução cariotípica das formigas (LORITE; PALOMEQUE, 2010).

Para análise da evolução de cromossomos em diversos grupos zoológicos Imai e colaboradores (1994) propuseram a utilização de um método estatístico considerando a frequência dos tipos de cromossomos e as tendências das alterações cromossômicas para traçar a direção da evolução cromossômica do

táxon baseado na Teoria da Interação Mínima. Nesse método, chamado cariógrafo, são plotados o número de braços cromossômicos em função do número de cromossomos e a direção da evolução é indicada pela distribuição dos pontos (Figura 2)

Esse método foi utilizado para análise da evolução cariotípica nos mamíferos (IMAI; CROZIER,1980) e em formigas nos gêneros *Myrmecia* (IMAI *et al., 1994) Camponotus* (MARIANO *et al.,* 2003), *Pachycondyla* (MARIANO *et al.,* 2003), no grupo de formigas "Poneromorfas" (MARIANO *et al.,* 2015) e na subfamília Formicidae (MARIANO*,* 2004).

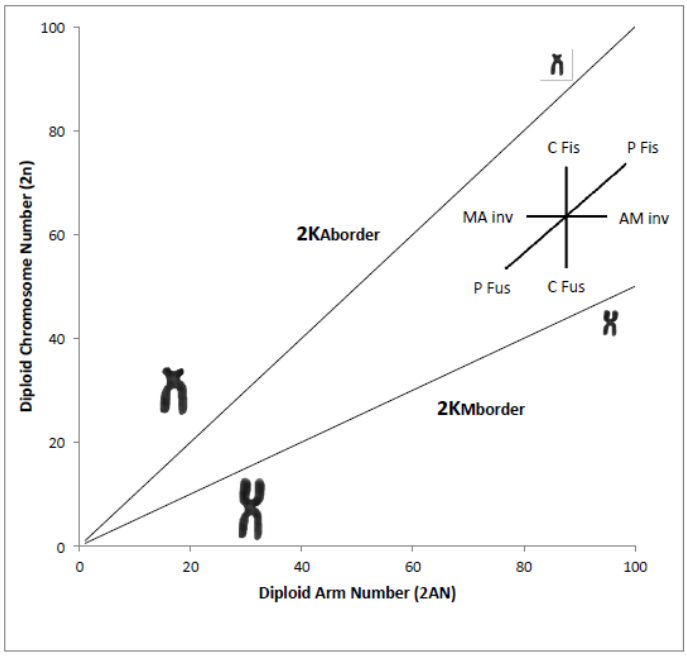

Figura 2 - Cariográfico adaptado de IMAI *et al*. 1994. Borda A: Limite superior para o número de cromossomos acrocêntricos em células diplóides. Borda M: Limite inferior para o número de cromossomos metacêntricos em células diplóides. C Fis = Fissão cêntrica, C Fus = Fusão Cêntrica, P Fis = Fissão Pericêntrica, P Fus = Fusão Pericêntrica, AM inv = Inversão Acrocêntrico – Metacêntrico, MA inv= Inversão Metacêntrico-Acrocêntrico. Fonte: Mariano *et al.*, 2012

Lorite e Palomeque (2010) observaram que as alterações cariotípicas estão diretamente relacionadas à diferenciação dos gêneros e das espécies em Formicidae e os possíveis mecanismos que governam a sua evolução cariotípica são a Fissão e Fusão cêntrica uma vez que, dentre os rearranjos cromossômicos, estes são os mais frequentemente observados.

A subfamília Myrmicinae foi a mais estudada do ponto de vista citogenético abrangendo 441 morfoespécies e 59 gêneros exibindo uma variação no número haploide de cromossomos de n=4 no gênero *Stenamma (*HAUSCHTECK,1962) a n=35 no gênero *Erromyrma* (IMAI *et al.*, 1984) (Tabela 1). O gênero *Pheidole* apresenta o maior número de morfoespécies com dados citogenéticos de 78 espécies. A evolução do cariótipo desse grupo foi analisada por Mariano (2004) através de um cariógrafo que indicou que os cromossomos, ao longo do processo evolutivo, sofreram ciclos de rearranjos fissão seguida de Inversão AM.

Os dados citogenéticos disponíveis na literatura das formigas cultivadoras de fungo mostram uma variação do número diplóide de cromossomos de 2n=8 em *Mycocepurus goeldii* (BARROS *et al*., 2010) a 2n=64 em *Mycetophylax lectus* (MARIANO *et al*., 2019) exibindo uma diversidade cariotípica significativa.

A análise comparativa desses cariótipos fornece subsídios para investigação a respeito da evolução cromossômica da subtribo. Para a subtribo Attina existem informações citogenéticas relativas a 46 morfoespécies e 10 gêneros apresentados na Tabela 2 em anexo. A análise dos dados citogenéticos desse grupo mostra padrões distintos de cariótipos e a ocorrência de variação em relação ao número e morfologia dos cromossomos e na composição cromossômica. Podemos observar que os gêneros mais basais apresentam um grau maior de diversidade cariotípica quando comparado com os gêneros mais derivados.

Tendo em vista que a citogenética é uma ferramenta imprescindível para o estudo da evolução cromossômica dos organismos, o presente estudo tem como objetivo caracterizar citogeneticamente espécies de formigas cultivadoras de fungo com a finalidade de contribuir com o conhecimento a respeito da evolução cromossômica do grupo.

Dentre os objetivos específicos estão:

- Descrever o cariótipo de algumas formigas cultivadoras de fungo por meio do estudo do número e morfologia dos cromossomos;
- Analisar a diversidade cariotípica entre as espécies estudadas;
- Comparar os cariótipos das espécies presentes no trabalho com aqueles já publicados;
- Estudar a localização e composição da heterocromatina por meio de técnicas de bandeamento cromossômico –Fluorocromos CMA3 e DAPI, para

contribuição no conhecimento a respeito da evolução cromossômica do grupo;

- Realizar uma análise evolutiva da subtribo Attina baseada nos dados citogenéticos disponíveis na literatura.

O presente estudo é dividido em dois capítulos:

Capitulo I: Estudos citogenéticos em gêneros da subtribo Attina (FORMICIDAE: MYRMICINAE: ATTINI: ATTINA)

Capitulo II: Evolução cariotípica da subtribo Attina (FORMICIDAE: MYRMICINAE: ATTINI: ATTINA)

Capítulo 1

Estudos citogenéticos em gêneros da subtribo Attina (FORMICIDAE: MYRMICINAE: ATTINI)

Estudos citogenéticos em gêneros da subtribo Attina (FORMICIDAE: MYRMICINAE: ATTINI)

RESUMO

A subtribo Attina é um grupo monofilético de formigas caracterizados pela relação simbiótica com fungos ou leveduras que são utilizados para a sua alimentação. São endêmicas do Novo mundo e incluem 286 espécies agrupadas em 16 gêneros. Os dados citogenéticos disponíveis na literatura sobre as formigas cultivadoras de fungo mostram uma variação do número diplóide de cromossomos de 2n=8 em Mycocepurus goeldii (BARROS et al., 2010) a 2n=64 em Mycetophylax lectus (MARIANO et al., 2019) exibindo uma diversidade cariotípica significativa considerando que apenas 52 morfoespécies têm seus números cromossômicos conhecidos. Com base nessas informações, o objetivo desse estudo foi caracterizar o cariótipo de algumas espécies pertencentes a subtribo Attina com o intuito de contribuir para a compreensão da evolução cromossômica do grupo. Foram coletadas colônias de cinco espécies no município de Ilhéus – Bahia. A técnica de coloração convencional permitiu a caracterização dos cariótipos de quatro espécies: *Mycocepurus goeldii* (2n=7); *Sericomyrmex bondari* (2n= 44); *Sericomyrmex saussurei* (2n=36); *Sericomyrmex mayri* (2n=50) e *Trachymyrmex bugnioni* (2n=16). A análise comparativa dos dados presentes nesse estudo com os dados citogenéticos disponíveis na literatura permitiu a verificação da ocorrência de polimorfismo intraespecífico e interespecíficos nesses gêneros. Foi observada também a ocorrência de uma variação intrapopulacional na espécie *M. goeldii*. Com relação a composição cromossômica, a heterocromatina rica em GC (CMA+) foi observada de forma predominante nos diferentes gêneros. Os resultados obtidos nesse estudo ilustram a diversidade cariotípica da subtribo Attina e fornece subsídios para o entendimento das alterações cariotípicas ocorridas ao longo da evolução desse grupo.

Introdução

As formigas reunidas na subtribo Attina destacam-se entre os gêneros da subfamília Myrmicinae pela relação mutualística com fungos basidiomicetos ou leveduras que são utilizados como alimento para todos os indivíduos da colônia (WEBER, 1972). São endêmicas do Novo mundo e formam um grupo monofilético que abrange 16 gêneros e cerca de 286 espécies (BRANDÃO; MAYHÉ-NUNES, 2007; BOLTON, 2019).

Essas formigas vivem em ninhos subterrâneos construídos a partir da escavação de câmaras no solo, são extremamente variadas em relação à estrutura da colônia, ao sistema de cultivo do fungo e ao padrão morfológico (MEHDIABADI & SCHULTZ, 2010). Diversos estudos foram realizados com os gêneros *Atta* e *Acromyrmex* principalmente devido ao fato de serem apontados como praga em plantios florestais (DELLA LUCIA, 2011; HERNANDEZ; JAFFÉ, 1995). Pouco se conhece acerca de diversos aspectos dos demais gêneros da subtribo, o que resulta em uma lacuna no conhecimento não só da diversidade desse grupo, como também na compreensão da sua evolução e diversificação (BARROS *et al.,* 2010; BARROS *et al.,* 2014).

A família Formicidae destaca-se entre os eucariotos como um dos grupos que apresenta maior variação em relação ao número cromossômico uma vez que estudos citogenéticos realizados em cerca de 800 morfoespécies mostram uma variação no número haploide de cromossomos de n=1 em *Myrmecia croslandi* (CROSLAND; CROZIER 1986) a n=60 em *Dinoponera lucida* (MARIANO *et al,* 2008). Os dados citogenéticos disponíveis na literatura sobre as formigas cultivadoras de fungo mostram uma variação do número diplóide de cromossomos de 2n=8 em *Mycocepurus goeldii* (BARROS *et al*., 2010) a 2n=64 em *Mycetophylax lectus* (MARIANO *et al*., 2019) exibindo uma diversidade cariotípica significativa considerando que apenas 52 morfoespécies têm seus números cromossômicos conhecidos.

Tendo em vista que a importância dos dados citogenéticos para a análise da biodiversidade e da variabilidade genética para a investigação da evolução cariotípica, o presente estudo tem como objetivo caracterizar o cariótipo de algumas espécies pertencentes à subtribo Attina e a composição dos cromossomos com o intuito de contribuir para a compreensão da evolução cromossômica do grupo.

Metodologia

2.1 Material biológico

Colônias completas de cinco espécies de formigas pertencentes à subtribo Attina foram coletadas no município de Ilhéus (Tabela 2). As larvas foram mantidas vivas até o momento das preparações citológicas e os espécimes adultos foram montados em alfinete entomológico e depositados na coleção CPDC. A identificação das espécies foi realizada pelo Dr. Jacques H. C. Delabie.

2.2 Preparações citológicas

Para as preparações cromossômicas foram extraídos gânglios cerebrais de imaturos em fase de pré-pupa de cada ninho para a obtenção de cromossomos mitóticos metafásicos segundo o protocolo de Imai *et al.* (1988). Em seguida foram aplicadas as técnicas de bandeamento Nor e coloração sequencial com fluorocromos, de acordo com as metodologias de Howel e Black (1980) e Schweizer (1980).

2.3 Análise do material

Para determinação do número e morfologia dos cromossomos foram analisadas cerca de 10 metáfases de cada espécie. Os cromossomos foram classificados baseados na nomenclatura de Levan *et al.* (1964). As preparações citogenéticas foram observadas e fotografadas, usando-se um microscópio Olympus BX 60 com objetivas de 100X, acoplado a um sistema de captura de imagens Q-capture 7.0. O programa utilizado para a montagem dos cariótipos foi o Adobe Photoshop CS2.

Resultados e discussão

Foram analisadas cinco espécies pertencentes a três gêneros da subtribo Attina. A partir da análise da coloração convencional, foi observada uma variação em relação ao número cromossômico entre 2n=7 e 2n=50 em *Mycocepurus goeldii* e *Sericomyrmex mayri* respectivamente (Tabela 5).

Tabela 1 - Espécies estudadas, local de coleta, tamanho da amostra (número de colônias), material analisado (Número de individuos/número de metáfases), número cromossômico diplóide (2n), fórmula cariotípica (2K)

Espécie	Local de coleta	Col.	Lam./ met.	2n	2k
Mycocepurus goeldii Forel, 1893	CEPEC/CEPLAC – Ilhéus, Bahia	2	5/44	7	1M+2ST+4A
Sericomyrmex bondari Borgmeier, 1937	CEPEC/CEPLAC – Ilhéus, Bahia	3	17/25	44	12M+4ST+28A
	Lagoa Encantada – Ilhéus, Bahia	1			
Sericomyrmex saussurei Emery, 1894	CEPEC/CEPLAC – Ilhéus, Bahia	3	5/17	36	10M+6ST+20A
Sericomyrmex mayri Forel, 1912	Lagoa Encantada – Ilhéus, Bahia	1	5/20	50	20M+4ST+26A
Trachymyrmex bugnioni Forel, 1912	CEPEC/CEPLAC – Ilhéus, Bahia	3	10/35	16	14M+2ST

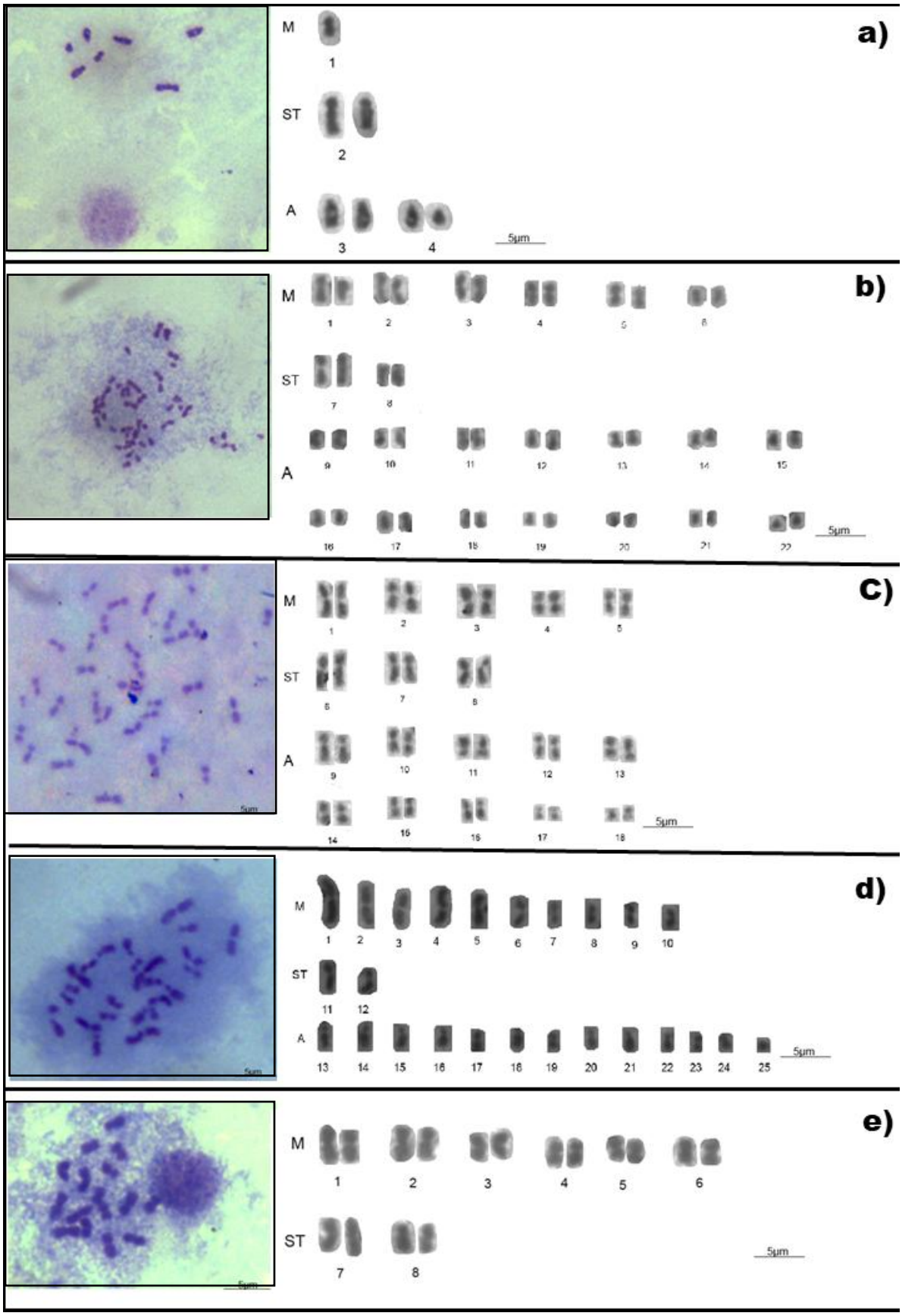

Figura 3 - Cariótipos de: a) *Mycocepurus goeldii*; b) *Sericomyrmex bondari*; c) *Sericomyrmex saussurei*; d) *Sericomyrmex mayri* e e) *Trachymyrmex bugnioni*, Ilhéus – BA, Brasil.

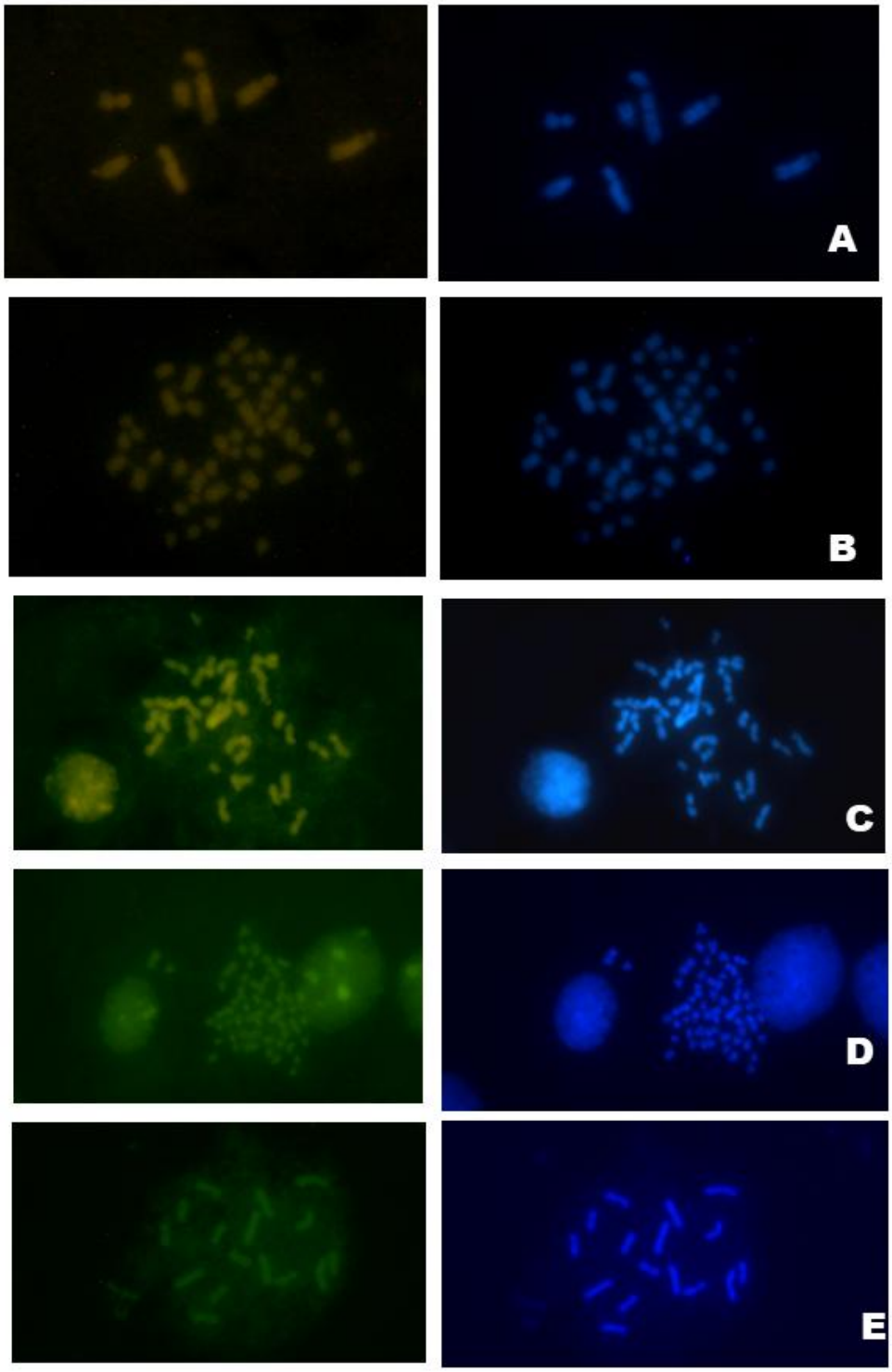

Figura 4 - Metáfases com os fluorocromos CMA3 (lado esquerdo) e DAPI (lado direito) de: a) *Mycocepurus goeldii*; b) *Sericomyrmex saussurei*; c) *Sericomyrmex bondari*; d) *Sericomyrmex mayri* e e*) Trachymyrmex bugnioni*, Ilhéus – BA, Brasil.

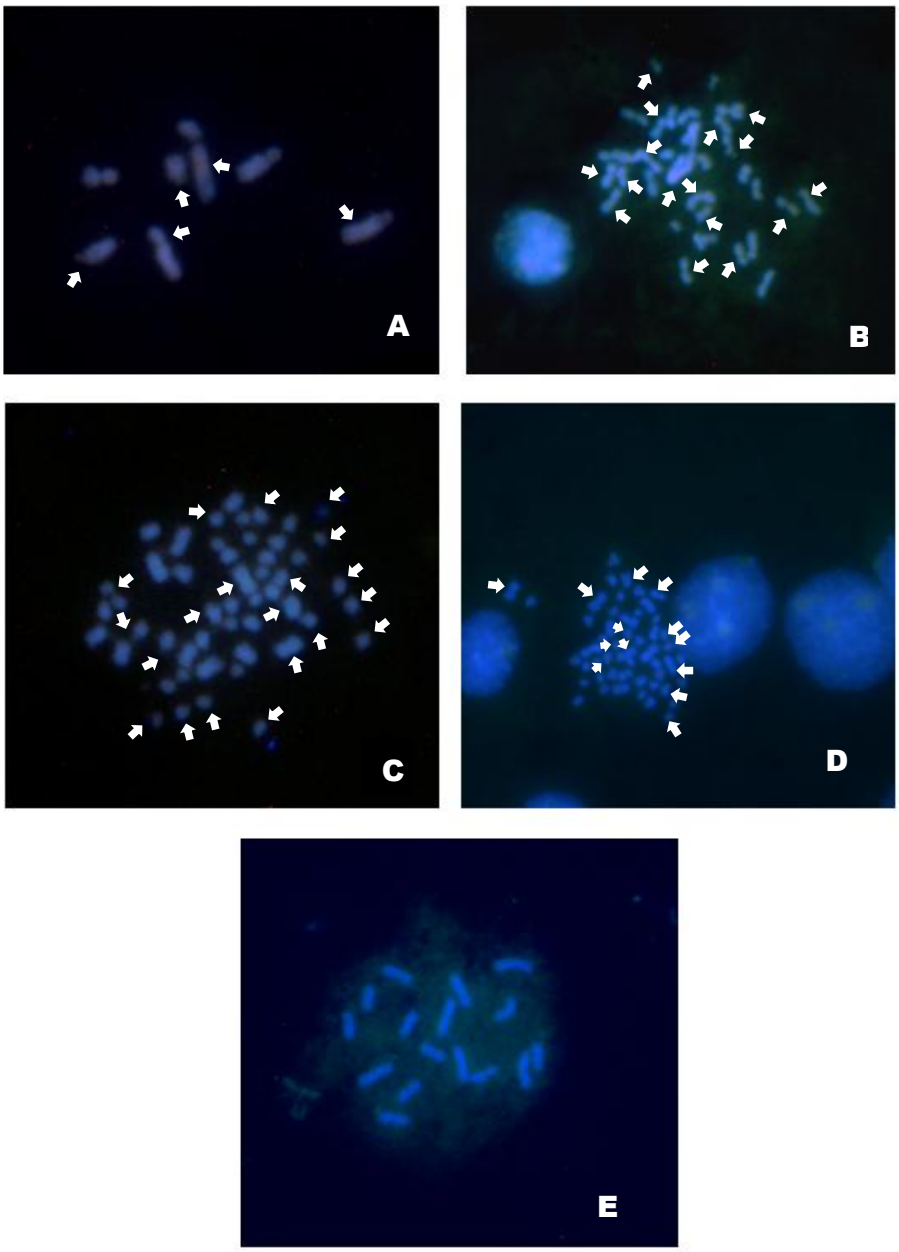

Figura 5 - Cromossomos metafásicos submetidos a dupla-coloração de CMA3/DAPI: a) *Mycocepurus goeldii*; b) *Sericomyrmex saussurei*; c) *Sericomyrmex bondari*; d) *Sericomyrmex mayri* e e) *Trachymyrmex bugnioni*, Ilhéus – BA, Brasil.

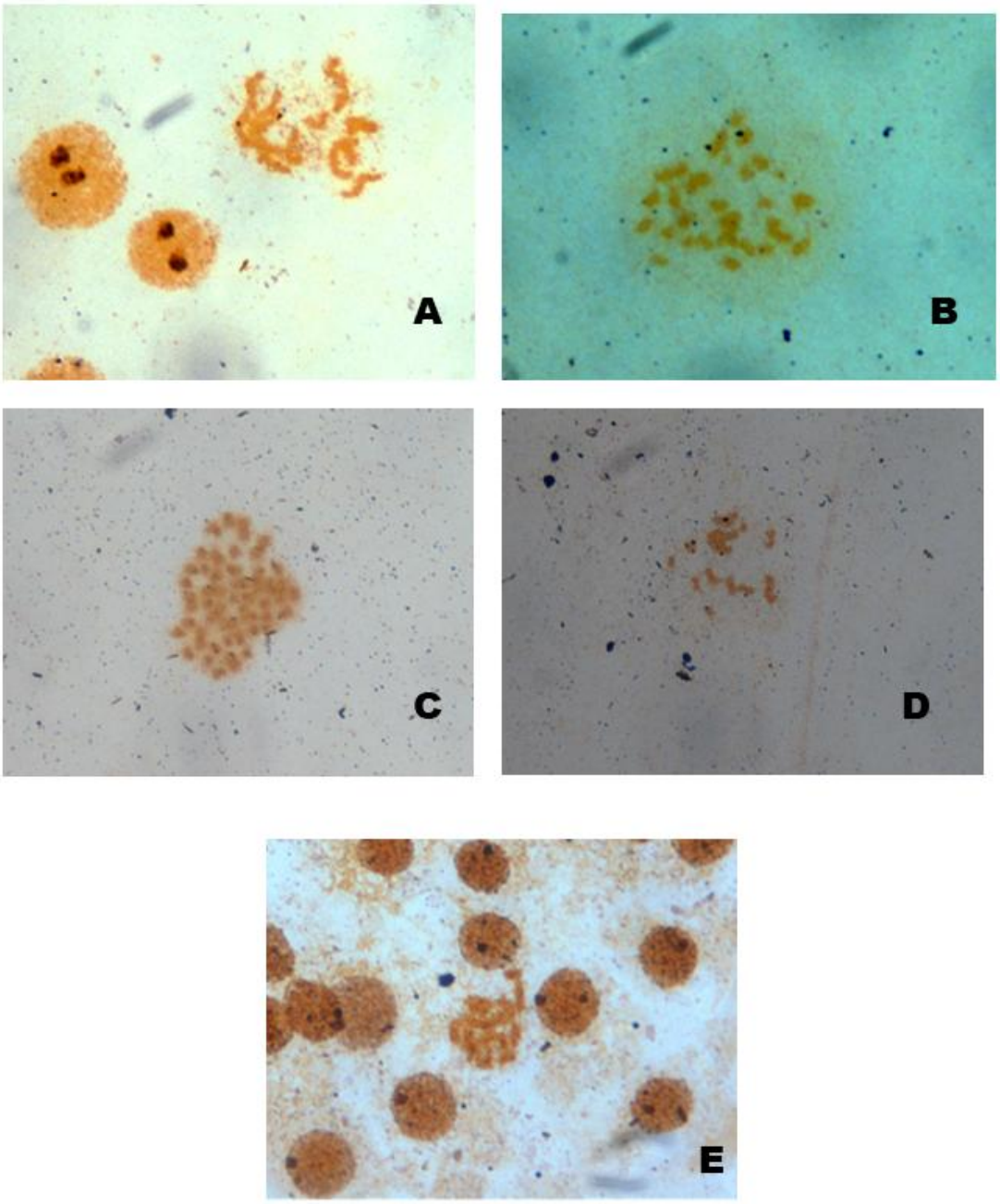

Figura 6 - Cromossomos metafásicos submetidos ao tratamento de banda NOR de: a) *Mycocepurus goeldii*; b) *Sericomyrmex saussure*i; c) *Sericomyrmex bondari*; d) *Sericomyrmex mayri* e e) *Trachymyrmex bugnioni*, Ilhéus – BA, Brasil.

Gênero *Mycocepurus* Forel, 1893

Foram obtidos 20 indivíduos de duas colônias de *M. goeldii* e o número de cromossomos observado foi de 2n=7 em 44 metáfases analisadas. Apenas uma lâmina com três metáfases apresentou o valor de 2n=14, o que pode ser resultado de metáfases poliploides. Essa afirmação deve-se ao fato de não ter sido observado a presença de testículos em nenhuma das pré-pupas utilizadas para as preparações cromossômicas. Com base nessas informações, concluímos que *M. goeldii* possui um conjunto cromossômico diplóide de 2n=7 com dois cromossomos maiores ST, quatro cromossomos A e um cromossomo M pequeno sem par cromossômico (Tabela 1; Figura 3a). Foi observada também a presença de uma constrição secundária próxima à região do centrômero no braço longo em um dos cromossomos ST.

O cariótipo dessa espécie foi estudado anteriormente por Barros e colaboradores (2010) em Viçosa, MG e apresentou o número cromossômico diplóide de 2n=8 com a presença de cromossomos M e SM diferindo em relação ao número e morfologia dos cromossomos apresentados aqui. Foi apontado por esses autores a presença de uma constrição secundária próxima à região do centrômero no braço longo em um cromossomo M.

A coloração com fluorocromos base-específicos revelou blocos ricos em GC (CMA+) em diferentes regiões dos cromossomos: na região pericentromérica do cromossomo ST e na região centromérica do seu par homólogo, na região centromérica, no braço curto e no braço longo de diferentes cromossomos A (Figura 4 e 5 a). Foram observadas marcações negativas de DAPI correlacionadas com essas regiões de CMA+ indicando que essas regiões são ricas em base GC e desprovidas de bases AT.

Barros e colaboradores (2010) apontaram blocos ricos em GC (CMA+) na região centromérica de dois pares de cromossomos M e na região pericentromérica de dois pares de cromossomos SM (Figura 5 a). Essas regiões foram correspondentes ao DAPI negativo indicando complementariedade ao CMA. A partir dessas informações, podemos observar diferenças nos padrões de bandas tanto em relação à localização quanto em relação a quantidade de marcações, o que permite a diferenciação entre as populações.

Regiões ricas em GC geralmente correspondem a NOR e a marcação obtida com a técnica de Ag-NOR coincidiu com essas regiões permitindo concluir a existência de uma NOR em *Mycocepurus goeldii* (Figura 6 a) indicando a presença de genes ribossomais ativos nesse par de cromossomos. A presença de uma NOR em apenas um par de cromossomos já foi relatado em estudos anteriores com essa espécie (BARROS *et al*., 2012) e em outros gêneros dessa subtribo, tais como *Atta* (BARROS *et al.,* 2015) e *Acromyrmex* (BARROS *et al*., 2016).

A ocorrência da variação intraespecífica entre as populações de *M. goeldii* pode estar relacionada com a distância geográfica uma vez que cerca de 1000 km separam essas populações já estudadas do ponto de vista citogenético. Polimorfismos cromossômicos entre populações em Formicidae foram relatados em diversas espécies nos gêneros *Aphaenogaster, Camponotus, Formica, Lasius, Monomorium, Myrmecia, Pachycondyla, Pheidole, Ponera e Rhytidoponera* (MARIANO, 2004).

Uma segunda hipótese que explica essa variação considera que esses cariótipos podem pertencer a espécies distintas uma vez que as revisões taxonômicas mais recentes desse gênero abrangem apenas seis espécies conhecidas até o momento (MAYHÉ-NUNES; MENEGUETE, 2000; MACKAY *et al*., 2004; CANTONE, 2017). Para isso seriam necessários estudos mais detalhados a respeito da biologia e da ecologia dessa espécie.

O cariótipo de *M. goeldii* estudado por Barros e colaboradores (2010) apresentou 2K= 4M + 4SB, com um par de cromossomos M grandes e um par de cromossomos M pequenos. Em contrapartida, a população presente nesse estudo apresentou uma formula cariotípica de 2K= 1M+ 2ST+ 4A indicando uma variação tanto em relação ao número quanto em relação a morfologia cromossômica sugerindo a ocorrência de rearranjos cromossômicos. Sugerimos que as alterações no cariótipo são resultado de dois eventos: 1) Os dois pares de cromossomos A são resultados de inversões MA uma vez que ocorre a redução do número de braços cromossômicos e 2) O cromossomo ST com tamanho desproporcional ao seu homologo é resultado de um evento de fusão entre um cromossomo SM com um cromossomo M o que resultou na redução do número de cromossomos.

A ocorrência de números cromossômicos diplóides ímpares causados por rearranjos cromossômicos foi relatada anteriormente nos gêneros *Monomorium*

(IMAI *et al*., 1984), *Tetramorium* (IMAI *et al*., 1984)*, Myrmecia* (IMAI *et al*., 1988) e *Ponera (*IMAI; KUBOTA, 1972; CROZIER, 1975; IMAI *et al., 1988)*.

Foi possível verificar também a ocorrência de polimorfismo interespecífico em *Mycocepurus*. Além dos dados citogenéticos citados, a morfoespécie *Mycocepurus* sp. foi estudada por Murakami e colaboradores (1998) em Barro Colorado, Panamá e apresentou o conjunto diplóide de cromossomos de 2n=8, com predominância de cromossomos metacêntricos.

Os resultados apresentados aqui revelam a existência de variabilidade cariotípica nesse gênero que era considerado homogêneo em relação ao número cromossômico e contribui para o entendimento da evolução cromossômica

Gênero *Sericomyrmex* Mayr, 1865

Nesse estudo foram analisados os cariótipos de três espécies do gênero *Sericomyrmex: S. bondari* com 2n=44; *S. saussurei* com 2n=36 e *S. mayri* com 2n=50 (Figura 3 b, c e d, respectivamente). Esses resultados mostram a variação cariotípica dentro desse gênero, que era considerado homogêneo em relação ao número de cromossomos a partir dos dados de duas morfoespécies/espécies: *Sericomyrmex* sp. (BARROS *et al*., 2013) em Viçosa, MG e *S. amabilis* Wheeler, 1925 (MURAKAMI *et al*., 1998) em Barro Colorado, Panamá ambas com número diplóide de cromossomos de 2n=50 com predominância de cromossomos M, caso pouco frequente em cariótipos de Formicidae com essa quantidade de cromossomos.

A coloração sequencial com fluorocromos evidenciou diferentes padrões de bandas nas três espécies analisadas. Em *S. saussurei* foram evidenciados blocos ricos em GC (CMA+) na região centromérica de dois pares de cromossomos M, dois pares de cromossomos ST e dois pares de cromossomos A (Figura 5 b). Essas regiões coincidiram com marcações negativas do DAPI indicando que essas regiões são ricas em pares de bases GC e desprovidas de bases AT. Foram evidenciados também marcações positivas de CMA no braço curto de um par de cromossomos A, em um par de cromossomos ST e no braço curto e na região centromérica em um par de cromossomos ST, sendo essa marcação mais acentuada em um dos homólogos.

Em *S. bondari*, foram observados blocos ricos de GC na região centromérica de um par de cromossomos M, em dois pares de cromossomos ST e em um par de cromossomos A (Figura 5 c). Essas regiões apresentaram marcações negativas com o DAPI indicando a complementariedade dos fluorocromos. Foram observados também padrões distintos de marcação no braço curto dos cromossomos: Dois pares de cromossomos A foram evidenciados na coloração com CMA e essas regiões eram correlacionadas com a marcação negativa da coloração com DAPI. Este resultado sugere que essas regiões são ricas em pares de bases GC e desprovidas de bases AT. Além disso, dois pares de cromossomos A, de forma oposta, foram evidenciados com a coloração DAPI e essas regiões são correlacionadas com a marcação negativa com o CMA. Foi observada também a presença de um cromossomo inteiramente rico em bases AT, o que indica a diferenciação cariotípica entre as espécies.

Na população de *S. mayri,* foram observadas marcações positivas com o fluorocromo CMA na região centromérica de pares de cromossomos A e em dois pares de cromossomos M (Figura 5 d). Da mesma forma que nas outras espécies já citadas, essas regiões eram correlacionadas com a marcação negativa com o Fluorocromo DAPI.

Não existem informações na literatura relacionadas à coloração dupla com fluorocromos nesse gênero tornando as informações presentes nesse estudo inéditas. Esses resultados mostram que os blocos heterocromáticos se distribuem preferencialmente na região centromérica e no braço curto de alguns cromossomos. A presença de blocos ricos em pares de bases GC no braço curto indica a ocorrência de eventos de fissão cêntrica seguida do crescimento de heterocromatina constitutiva (IMAI *et al.,* 2001). Foi possível observar também a presença de dois tipos de heterocromatina no genoma das espécies e essa diferenciação da heterocromatina pode estar relacionada com a diferenciação das espécies (WHITE, 1981).

Foram observadas quantidades diferentes de marcações com a técnica de NOR nas espécies: *S. saussurei* apresentou duas marcações (Figura 6 b) e as espécies *S. bondari* e *S. mayri* apresentaram quatro marcações.

A variabilidade cromossômica presente nesse gênero pode ser resultado da ocorrência de eventos de rearranjos cromossômicos ao longo do processo evolutivo

do grupo. Estudos filogenéticos apontam *S. saussurei* como a mais basal seguida por *S. amabilis, S. bondari* e *S. mayri* e, considerando os resultados apresentados aqui, o mecanismo responsável pelas alterações cariotípicas é a fissão cêntrica devido à tendência do número cromossômico em aumentar (SCHULTZ; BRADY, 2008; BRANSTETTER, 2017).

Tendo em vista a similaridade morfologia que existente entre as espécies do gênero *Sericomyrmex,* os resultados presentes nesse estudo contribuem para a caracterização, identificação e diferenciação de *S. bondari, S. mayri* e *S. saussurei* principalmente quando associado com outras características biológicas.

Gênero *Trachymyrmex* Forel*,* 1893

Trachymyrmex bugnioni apresentou um conjunto cromossômico diplóide de 2n=16, com a presença de cromossomos metacêntricos e subtelocêntricos (Figura 3 e). Dentre as 48 espécies descritas do gênero *Trachymyrmex,* apenas cinco espécies/morfoespécies foram estudadas do ponto de vista citogenético: Murakami e colaboradores (1998) descreveram o cariótipo de três morfoespécies: *Trachymyrmex* sp.1, com 2n=12; *Trachymyrmex* sp. 2 com 2n=18 e *T. septentrionalis* com 2n=20. Barros e colaboradores (2013, 2014, 2018) analisaram os cariótipos de *T. relictus* com 2n=20; *Trachymyrmex* sp. 2n=22*; T. fuscus* com 2n=18 e *T. holmgreni* com 2n=20. Com base nessas informações, observamos a diversidade cariotípica desse gênero.

Na coloração sequencial com fluorocromo com a espécie desse estudo não foi observado um padrão de marcação específica em nenhum dos fluorocromos utilizados, algo pouco frequente nas demais espécies desse gênero (Figura 5 e). A heterocromatina rica em GC (CMA+) foi observada no cariótipo de *T. fuscus* e *T. holmgreni* estudado por Barros e colaboradores (2014; 2018) na região centromérica e pericentromérica de todos os cromossomos. Essas regiões coincidiram com o DAPI negativo indicando complementariedade com o fluorocromo CMA. Marcações especificas de DAPI não foram detectadas em nenhuma das espécies citadas.

Esses dados mostram que não há homogeneidade tanto em relação ao número e morfologia dos cromossomos quanto em relação ao padrão de bandas nesse gênero. O polimorfismo interespecífico pode estar relacionado não só com a

ocorrência de polimorfismos cromossômicos, mas também com a polifilia desse gênero (SCHULTZ; BRADY, 2008; BRANSTETTER, 2017)

Nossos dados mostram a diversidade cariotípica dos gêneros *Mycocepurus, Sericomyrmex* e *Trachymyrmex.* A análise comparativa do cariótipo das espécies presentes nesse estudo com os dados da literatura permitiu a verificação da ocorrência de polimorfismo intraespecífico e interespecífico nos gêneros o que contribui com o conhecimento acerca da evolução cromossômica nesse grupo.

Capítulo 2

Evolução cariotípica na subtribo Attina (FORMICIDAE: MYRMICINAE: ATTINI)

Evolução cariotípica na subtribo Attina (FORMICIDAE: MYRMICINAE: ATTINI: ATTINA)

RESUMO

A subtribo Attina reúne um grupo monofilético de formigas que possuem uma relação mutualística com um fungo ou leveduras. Essas formigas são endêmicas da região do Novo mundo e abrangem 16 gêneros. A citogenética tem sido largamente utilizada em estudos evolutivos e sistemáticos em formigas pois contribui na identificação e diferenciação das espécies. O objetivo desse estudo foi realizar uma análise evolutiva da subtribo Attina baseada nos dados citogenéticos disponíveis na literatura. Para isso foram coletados e organizados os dados citogenéticos de 10 gêneros dessa subtribo e foi realizada uma análise de regressão para avaliar a evolução cariotípica da subtribo e uma análise de distribuição de frequências para avaliar a variação cromossômica do grupo. Os dados citogenéticos disponíveis na literatura de cinquenta espécies das formigas cultivadoras de fungo mostram que há gêneros com espécies com cariótipos uniformes e outros altamente diversificados. Em relação a evolução cariotípica, o cariógrafo indica que os cromossomos sofreram ciclos sucessivos de rearranjos do tipo fissão cêntrica com adição de heterocromatina e inversão AM com alguns eventos de redução do número cromossômico por meio de fusões cêntricas. Os resultados obtidos nesse estudo ilustram a diversidade cariotípica da subtribo Attina e contribuem para o conhecimento acerca da evolução cromossômica desse grupo.

Introdução

A análise citogenética não é utilizada somente para determinação do número e morfologia de cromossomos de formigas, mas também como uma ferramenta bastante prática para estabelecer relações de parentesco entre espécies relacionadas, diferenciar espécies e, ainda, propor hipóteses relacionadas à evolução cariotípica (LORITE; PALOMEQUE, 2010; GUERRA, 1988). Por isso, os dados citogenéticos tem sido largamente utilizados em estudos sistemáticos e evolutivos em formigas (MARIANO *et al*., 2003; LORITE; PALOMEQUE, 2010; MARIANO *et al*., 2012; MARIANO *et al*., 2019; CARDOSO *et al*., 2014).

As formigas reunidas na subtribo Attina destacam-se entre os gêneros da subfamília Myrmicinae pela relação mutualística com fungos basidiomicetos e leveduras (WEBER, 1972; CRAVEN *et al*., 1970). São endêmicas da região do Novo mundo, incluem 16 gêneros e cerca de 286 espécies (BOLTON, 2019). Os dados citogenéticos disponíveis na literatura a respeito dessas formigas abrangem 52 espécies/morfoespécies distribuídas em 10 gêneros e mostram uma variação do conjunto cromossômico diplóide de 2n=7 em *Mycocepurus goeldii* (Capitulo 1) a 2n=64 em *Mycetophylax lectus* (MARIANO *et al.,* 2019). Além disso, foram observados polimorfismos cromossômicos intraespecífico e interespecífico nos diferentes gêneros, a presença de um polimorfismo estrutural na espécie *Trachymyrmex fuscus* (BARROS *et al.,* 2014); variação cariotípica intrapopulacional em *Mycetophylax morschi (*CARDOSO *et al*., 2014) e uma variação interpopulacional do tamanho do cariótipo em *Trachymyrmex holmgreni* (CARDOSO *et al.,* 2018). Esses dados ilustram a diversidade cariotípica dessa subtribo e a análise dessas informações contribuirá não só para a descrição dos mecanismos envolvidos nas alterações cariotípicas que ocorreram ao longo do processo evolutivo do grupo, mas também para a investigação sobre a diferenciação das espécies.

Com base nessas informações, o objetivo desse estudo é realizar uma análise evolutiva da subtribo Attina baseada nos dados citogenéticos disponíveis na literatura.

Metodologia

Para avaliar a variação cromossômica na tribo Attina foi realizada uma análise da distribuição de frequência a partir das informações citogenéticas de 50 morfoespécies compilados na tabela 2 (em anexo).

Esses dados também foram utilizados para o estudo da variação do número haploide de cromossomos em função do número de braços cromossômicos por meio do cariógrafo. Nesse método é plotado o número de braços cromossômicos (AN, se os números forem haploides e 2AN se os números forem diplóides) em função do número de cromossomos (n para conjuntos cromossômicos haploides e 2n para conjuntos cromossômicos diplóides). Para isso, os cromossomos foram classificados em acrocêntricos e metacêntricos baseados na nomenclatura proposta por Imai *et al.,* (1991). Para calcular o número de braços cromossômicos utilizamos a soma de cromossomos acrocêntricos (a) mais o dobro de cromossomos metacêntricos (m), representado pela fórmula: AN= a+2m ou 2AN= 2(a+2m).

São apresentadas também hipóteses para possíveis direções da evolução nos diferentes gêneros da subtribo Attina cujas informações citogenéticas estão disponíveis

Resultados e discussão

Existem dados citogenéticos disponíveis na literatura de 52 espécies das formigas cultivadoras de fungo, representando 18% das espécies descritas (Tabela 2, em anexo). Na figura 6 podemos observar que a variação cromossômica entre as espécies desse grupo é de 2n=7 a 2n=64 e há uma maior concentração dos conjuntos cromossômicos diplóides no intervalo 2n= 14-38 (Figura 7).

O gênero *Mycocepurus* apresenta um número cromossômico baixo (n>11, IMAI *et al*., 1977) dentro da subtribo, o que pode ser resultado de uma retenção de caracteres e essa informação é corroborada pelos estudos filogenéticos mais recentes que apontam *M. goeldii* como a espécie mais basal dentro da subtribo Attina (BARROS *et al*., 2011; SCHULTZ; BRADY, 2008; BRANSTETTER, 2017).

Os gêneros *Atta* (2n=22) e *Acromyrmex* (2n=38) apresentaram o maior número de espécies estudadas do ponto de vista citogenético com 23 espécies analisadas. Essas espécies possuem o cariótipo uniforme ou com poucas variações

cromossômicas, o que indica uma origem mais recente do gênero (POMPOLO; MARIANO, 2003). O gênero *Atta* apresenta um cariótipo uniforme em relação ao número e morfologia cromossômica a partir dos dados citogenéticos relativos a seis espécies, o que sugere uma origem mais recente do gênero (BARROS *et al.,* 2014; 2015). Estudos citogenéticos em *A. striatus* (2n=22) e *A. ameliae* (2n=36) indicaram diferenças em relação ao número cromossômico quando comparados as demais espécies (BARROS *et al*., 2010). *Acromyrmex striatus* (2n=22) possui o número e morfologia de cromossomos semelhante à *Atta* e por isso é sugerido que esse cariótipo seja plesiomórfico (BARROS *et al*., 2010; CRISTIANO *et al.,* 2013). Os dados citogenéticos associados aos dados moleculares apontam que *A. striatus* é grupo irmão das formigas cortadeiras e se diferenciou antes da divergência entre *Acromyrmex* e *Atta* (CRISTIANO *et al.,* 2013). Já o cariótipo de *A. ameliae* (2n=36) seria resultado de rearranjo do tipo fusão cêntrica (CRISTIANO *et al.,* 2013). Nesse gênero foi observado também diferenças morfológicas relacionadas à quantidade de heterocromatina nos braços curtos dos cromossomos, o que permite a diferenciação das espécies (BARROS *et al*., 2010; 2016; TEIXEIRA *et al*., 2017).

O pico representado por 2n=20 abrange espécies dos gêneros *Apterostigma, Cyphomyrmex* e *Trachymyrmex* o que evidencia a heterogeneidade dos cariótipos da subtribo Attina. A distribuição dos números cromossômicos é desigual uma vez que alguns gêneros são representados por apenas uma espécie como pode ser observado nos picos 2n=7, 8, 12, 23, 26, 54 e 64.

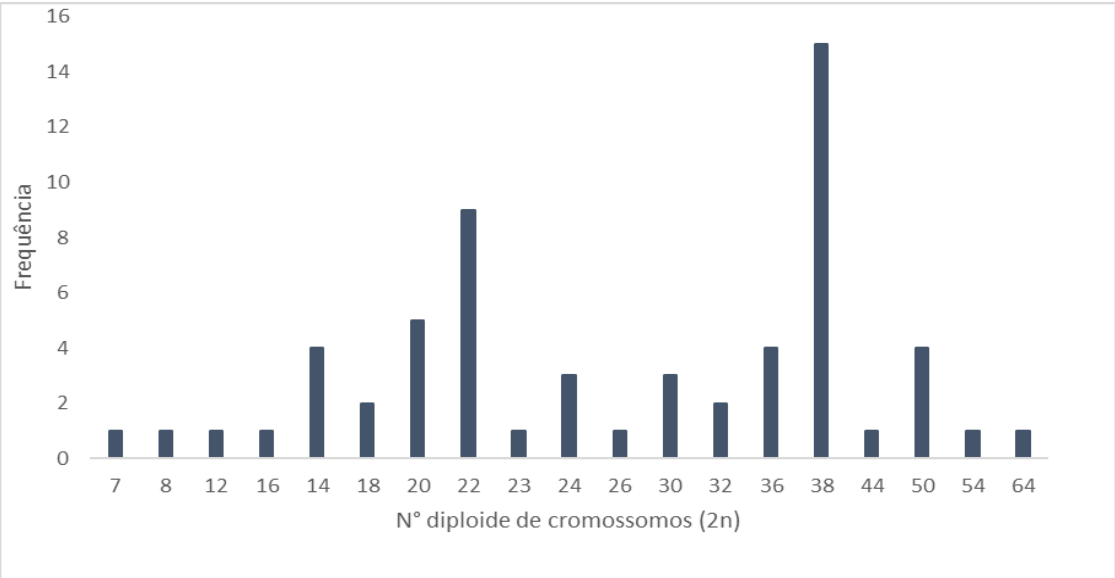

Figura 7 - Frequência do número diplóide de cromossomos das espécies da subtribo Attina

A variação no número cromossômico entre as espécies dos gêneros *Apterostigma* (2n= 20, 22, 24, 32, 46), *Cyphomyrmex* (2n = 20, 22, 32) e *Sericomyrmex* (2n=36, 44, 50), tem sido relacionada com eventos de fissão cêntrica, o que explicaria a tendência do aumento do número cromossômico nesses gêneros (BARROS *et al.,* 2013; 2011; Ver capítulo 1).

O gênero *Mycetarotes* possui a variação mais alta encontrada na subtribo Attina de 2n=14-54, considerando o número baixo de espécies estudadas. *M. carinatus* (2n=14) possui um cariótipo composto majoritariamente por cromossomos grandes metacêntricos e submetacêntricos enquanto *M. parallelus* possui uma quantidade maior de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, mas de tamanho menor, o que indica a ocorrência de rearranjos cromossômicos do tipo fissão cêntrica (BARROS *et al.,* 2011).

O gênero *Mycetophylax* apresenta uma variação cromossômica significativa de 2n=26 – 64. Estudos citogenéticos realizados por Cardoso e colaboradores (2014) com colônias da espécie *Mycetophylax morschi* Emery, 1888 mostrou a presença de dois cariótipos distintos de 2n= 26 e 2n=30, resultando em uma variação cariotípica intrapopulacional (CARDOSO *et al*., 2014). Os autores concluíram que essa variação pode estar relacionada com a existência de espécies crípticas e que esse polimorfismo pode ser resultado de fusão cêntrica (CARDOSO *et al*., 2014). O cariótipo de *Mycetophylax lectus* (2n=64) é composto por cromossomos metacêntricos e acrocêntricos e, por isso, pode ser resultado de eventos de fissão cêntrica.

Com relação a evolução do cariótipo da subtribo Attina, Barros e colaboradores (2011) sugerem que o principal mecanismo é a Fissão Cêntrica visto que há uma tendência dos gêneros mais basais possuírem um número cromossômico menor em relação aos gêneros mais derivados.

O cariógrafo aponta uma tendência tanto do aumento do número cromossômico quanto do número de braços cromossômicos na subtribo Attina (Figura 8). Nessa subtribo, existem alguns cariótipos compostos exclusivamente por cromossomos M e por isso há uma concentração dos pontos ao longo da borda M. Apesar do número baixo de espécies amostradas, é possível observar que a distribuição dos pontos é similar ao padrão encontrado na subfamília Myrmicinae (MARIANO, 2004).

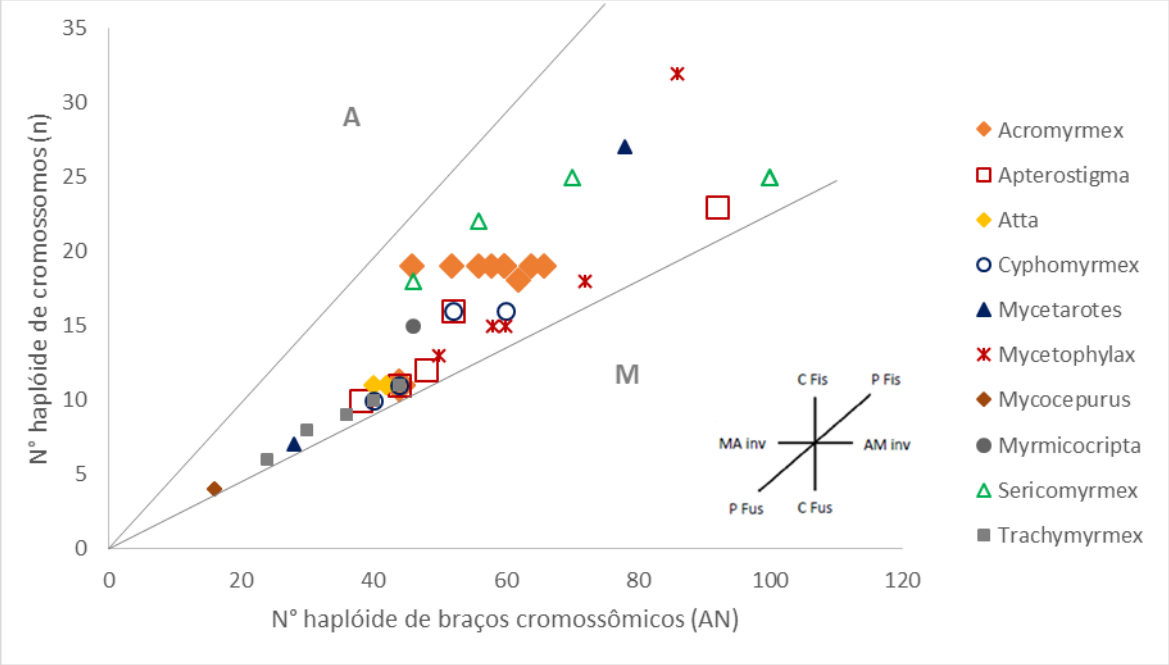

Figura 8 - Cariógrafo de espécies da subtribo Attina

Com relação a evolução do cariótipo, os principais mecanismos relacionados as alterações cariotípicas da subtribo Attina são ciclos sucessivos de rearranjos do tipo fissão cêntrica e inversão AM com adição de heterocromatina e alguns eventos de redução do número cromossômico por fusões cêntricas. Esses ciclos de rearranjos explicam a existência de cariótipos com elevado número cromossômico (n>11, em IMAI *et al.,* 1977) compostos exclusivamente por cromossomos M e a ausência de cariótipos composto exclusivamente por cromossomos A. Esses eventos explicam também a tendência em cariótipos de números cromossômicos mais elevados possuírem cromossomos A.

A distribuição dos pontos no cariográfo mostra de forma evidente a ocorrência de inversão entre as espécies dos gêneros *Cyphomyrmex, Mycetophylax, Acromyrmex* e *Atta*. Em todos os casos as espécies dos respectivos gêneros apresentaram o mesmo número cromossômico e variaram em relação ao número de braços cromossômicos indicando a ocorrência de inversões AM que são consideradas comuns de ocorrerem (IMAI; MARUYAMA, 1978)

A ocorrência de fusões cêntrica teria originado os cariótipos compostos predominantemente por cromossomos M nos gêneros *Mycetarotes*, *Mycetophylax*, *Trachymyrmex*, *Acromyrmex* e *Atta* sugerindo uma origem mais recente. No entanto, de acordo com os estudos filogenéticos, os gêneros *Acromyrmex* e *Atta* são os

gêneros mais derivados da subtribo, assim o evento relacionado as alterações cariotípicas que originaram os demais gêneros provavelmente estão relacionados com o fato de que fusões cêntricas podem ocorrer em grupos de espécies que já sofreram diversos ciclos de rearranjos cromossômicos (MARIANO, 2004; IMAI *et al.,* 1994)

Em relação ao gênero *Acromyrmex,* o cariógrafo indica que o cariótipo da espécie *A. striatus* é resultado de eventos de fusão cêntrica, o que teria ocasionado um cariótipo composto predominantemente por cromossomos M. A distribuição dos pontos sugere uma tendência ao aumento do número cromossômico por meio de fissões cêntricas nas espécies desse gênero exceto no cariótipo da espécie *A. ameliae* seria resultado de um evento de fusão cêntrica, como foi sugerido por Cristiano e colaboradores (2013).

Foram analisadas hipóteses para possíveis direções da evolução nos diferentes gêneros da subtribo Attina em que as informações estão disponíveis (Figura 8). O cariógrafo indica que os cariótipos dos gêneros *Apterostigma, Cyphomyrmex* e *Trachymyrmex* tendem ao aumento do número cromossômico devido aos ciclos de rearranjo do tipo inversão AM-fissão. Já os gêneros *Mycetarotes, Mycetophylax* e sofreram ciclos de rearranjo cromossômico do tipo Fissão-Inversão.

Nos gêneros *Acromyrmex* e *Sericomyrmex* os cariótipos sofreram ciclos sucessivos de rearranjos com tendência ao aumento do número cromossômico por meio de fissão cêntrica com alguns eventos de redução do número cromossômico por meio de fusão cêntrica. A distribuição dos pontos do gênero *Trachymyrmex* sugere a predominância de fissões cêntricas.

Conclusão geral

No presente estudo foi realizada a caracterização citogenética de cinco espécies de formigas cultivadoras de fungo que apresentaram números cromossômicos variáveis entre 2n=7 – 50.

O menor número cromossômico presente nesse estudo pertence a *Mycocepurus goeldii* (2n=7). Três espécies de *Sericomyrmex* apresentaram polimorfismo cromossômico*: S. bondari* (2n= 44); *S. saussurei* (2n=36); *S. mayri* (2n=50) e *Trachymyrmex bugnioni* apresentou um cariótipo diplóide 2n=16. Esses resultados ilustram a diversidade cariotípica da subtribo Attina considerando o número baixo de espécies estudadas.

A coloração sequencial com fluorocromos mostrou que a heterocromatina dos gêneros presentes nesse estudo é rica em GC (CMA3+), exceto em *S. bondari* que apresentou um cromossomo inteiro formado por heterocromatina rica em AT. Essas informações são importantes para a determinação dos padrões característicos de cada espécie além de fornecer informações a respeito da composição da heterocromatina constitutiva.

A análise comparativa desses dados somados aos da literatura mostram a ocorrência de polimorfismos intraespecíficos e interespecíficos nos gêneros *Mycocepurus, Sericomyrmex* e *Trachymyrmex*. Em *M. goeldii,* foi observada uma variação intraespecífica do número diploide de 2n=7-8. Essas informações demonstram a importância da caracterização citogenética e fornecem subsídios para o entendimento das alterações cariotípicas que ocorreram ao longo do processo evolutivo desse grupo uma vez que as diferenças cariotípicas observadas podem ser resultado de rearranjos cromossômicos sucessivos.

A variação cromossômica observada na subtribo Attina é de 2n=7 a 2n=64. Os cariótipos dos gêneros basais são mais variáveis quando comparados com os cariótipos dos gêneros derivados.

O cariógrafo indica que a diferenciação cariotípica na subtribo Attina foi resultado de ciclos de rearranjos do tipo inversão AM e fissão cêntrica com adição de heterocromatina com alguns eventos de redução do número cromossômico por fusões cêntricas.

Os resultados obtidos nesse estudo contribuem para o aumento de 57 espécies de formigas cultivadoras de fungo estudadas do ponto de vista citogenético.

A utilização das técnicas de citogenética molecular em *M. goeldii,* como por exemplo o *FISH*, são importantes para suportar a hipótese de fusão cêntrica que foi observada na espécie presente nesse estudo.

Com os resultados obtidos nesse estudo aumentam para 57 espécies de formigas cultivadoras de fungo estudadas do ponto de vista citogenético. Estudos citogenéticos de mais espécies são necessários tanto para o conhecimento da diversidade cariotípica quanto para a compreensão da evolução cromossômica do grupo, incluindo os gêneros que não possuem dados citogeneticos disponíveis tais como *Cyatta, Kalathomyrmex, Mycetagroicus, Mycetosoritis, Paramycetophylax, Pseudoatta* e *Xerolitor.*

A caracterização citogenética de mais espécies dos gêneros *Mycocepurus, Sericomyrmex* e *Trachymyrmex* é importante para avaliar a variação cromossômica desses grupos e realizar inferências a respeito das alterações cariotípicas ocorridas nesses gêneros.

Além disso, aumentar a área de estudo será importante para avaliar a diversidade das formigas cultivadoras de fungo presentes no município de Ilhéus, o que contribuirá com o entendimento da evolução e diversificação desse grupo.

Referências bibliográficas

AMORIM, I. C.; COSTA, R.G.C.; XAVIER, C.; MOURA, R.D.C.D. Characterization and chromosomal mapping of the DgmarMITE transposon in populations of *Dichotomius* (*Luederwaldtinia*) *sericeus* species complex (Coleoptera: Scarabaeidae). **Genetics and molecular biology**, n. AHEAD, p. 0-0, 2018.

BAICHAROEN, S.; HIRAI, Y.; SRIKULNATH, K.; KONGPROM, U.; HIRAI, H. Hypervariability of Nucleolus Organizer Regions in Bengal Slow Lorises, *Nycticebus bengalensis* (Primates, Lorisidae). **Cytogenetic and genome research**, v. 149, n. 4, p. 267-273, 2016.

BARDELLA, V. B.; PITA, S.; VANZELA, A.L.L.; GALVÃO, C.; PANZERA, F. Heterochromatin base pair composition and diversification in holocentric chromosomes of kissing bugs (Hemiptera, Reduviidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 111(10), 614-624. 2016.

BARROS L.A.C; MARIANO C.S.F.; HORA R.R.; DELLA-LUCIA T.M.C.; DELABIE J.H.C.; POMPOLO S.G. Abordagem citogenética do processo de especiação da parasita social *Acromyrmex ameliae* e das suas hospedeiras *A. subterraneus subterraneus* e *A. subterraneus brunneus* (Formicidae: Attini). In: **54º Congresso Brasileiro de Genética**, Salvador-BA (Brasil): 351. 2008.

BARROS, L.A.C.; DE AGUIAR, H.J.A.C.; MARIANO, C.D.S.F.; DELABIE, J.H.C.; POMPOLO, S.D.G. Cytogenetic characterization of the lower-Attine *Mycocepurus goeldii* (Formicidae: Myrmicinae: Attini). **Sociobiology,** *56*(1), 57-66. 2010.

BARROS, L.A.C.; MARIANO, C.S.F.; POMPOLO, S.G.; DELABIE, J.H.C. Citogenética de Attini. In: Della-Lucia TMC (Ed) **Formigas cortadeiras: da bioecologia ao manejo.** 1st ed. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, Brazil, pp 68-79. 2011.

BARROS, L.A.C.; DE AGUIAR, H.J.A.C.; ANDRADE-SOUZA, V.; MARIANO, C. D.S.F.; DELABIE, J.H.C.; POMPOLO, S.D.G. Occurrence of pre-nucleolar bodies and 45S rDNA location on the chromosomes of the ant *Mycocepurus goeldii*, Forel 1893 (Formicidae, Myrmicinae, Attini). **Hereditas**, 149(1), 50-54. 2012.

BARROS, L.A.C.; DE AGUIAR; H.J.A.C.; MARIANO, C.D.S.F.; DELABIE, J.H.C.; POMPOLO, S.D.G. Cytogenetic characterization of the ant *Trachymyrmex fuscus* Emery, 1934 (Formicidae: Myrmicinae: Attini) with the description of a chromosomal polymorphism. In **Annales de la Société entomologique de France** *(NS)* (Vol. 49, No. 4, pp. 367-373). Taylor & Francis. 2013.

BARROS, L.A.C.; MARIANO, C.D.S.F.; POMPOLO S.D.G. Cytogenetic studies of five taxa of the tribe Attini (Formicidae: Myrmicinae). ***Caryologia*,** *66*(1), 59-64. 2013.

BARROS, L.A.C.; TEIXEIRA, G.A.; DE AGUIAR, H.J.A.C.; MARIANO, C.D.S.F.; DELABIE, J.H.C.; POMPOLO, S.D.G. Banding patterns of three leafcutter ant species of the genus *Atta* (Formicidae: Myrmicinae) and chromosomal inferences. **Florida entomologist**, *97*(4), 1694-1701. 2014.

BARROS, L.A.C.; DE AGUIAR, H.J.A.C.; TEIXEIRA, G.A.; MARIANO, C.D.S.F.; TEIXEIRA, M.D.C.; DELABIE, J.H.C.; POMPOLO, S.D.G. Cytogenetic data on the threatened leafcutter ant *Atta robusta Borgmeier*, 1939 (Formicidae: Myrmicinae: Attini). **Comptes rendus biologies**, *338*(10), 660-665. 2015.

BARROS, L. A. C.; DE AGUIAR, H. J. A. C.; MARIANO, C. D. S. F.; ANDRADE-SOUZA, V.; COSTA, M. A.; DELABIE, J. H. C.; POMPOLO, S.D.G. Cytogenetic data on six leafcutter ants of the genus *Acromyrmex* Mayr, 1865 (Hymenoptera, Formicidae, Myrmicinae): insights into chromosome evolution and taxonomic implications. **Comparative cytogenetics**, 10(2), 229. 2016.

BARROS, L. A. C.; TEIXEIRA, G. A.; DE AGUIAR, H.J.A.C.; LOPES, D.M.; POMPOLO, S.D.G. Cytogenetic studies in *Trachymyrmex holmgreni* Wheeler, 1925 (Formicidae: Myrmicinae) by conventional and molecular methods. **Sociobiology**, 65(2), 185-190. 2018.

BOLTON, B. **An online catalog of the ants of the world**. Disponível em: <http://antcat.org>. Acesso em: 13/04/2019.

BOLTON, B. 2003. **Synopsis and classification of Formicidae**. American Entomological Institute, 2003.

BRANDÃO, C.R.F.; MAYHÉ-NUNES, A.J. A phylogenetic hypothesis for the *Trachymyrmex* species groups, and the transition from fungus-growing to leaf-cutting in the Attini. Advances in ant systematics (Hymenoptera: Formicidae): **homage to EO Wilson**, 50, 72-88. 2007.

BRANSTETTER, M.G.; JEŠOVNIK, A.; SOSA-CALVO, J.; LLOYD, M. W.; FAIRCLOTH, B. C.; BRADY, S. G.; SCHULTZ, T.R. Dry habitats were crucibles of domestication in the evolution of agriculture in ants. **Proc. R. Soc. B**, 284(1852), 20170095. 2017.

BROWN, W.L. Diversity of ants. Ants. Standard Methods for Measuring and Monitoring Biodiversity (ed. by D. Agosti, J.D. Majer, L.E. Alonso and T.R. Schultz), pp. 45–79. **Smithsonian Institution Press**, Washington, DC. 2000.

CAMACHO, J.P.M.; CABRERO, J.; VISERAS, E. C-heterochromatin variation in the genus *Eumigus* (Orthoptera: Pamphagoidea). **Genetica**, v. 56, n. 3, p. 185-188, 1981.

CARDOSO, D.C.; POMPOLO, S.D.G.; CRISTIANO, M.P.; TAVARES, M.G. The role of fusion in ant chromosome evolution: insights from cytogenetic analysis using a molecular phylogenetic approach in the genus *Mycetophylax.* **Plos One**, *9*(1), e87473. 2014.

CARDOSO, D.C.; PEREIRA, T.T.P.; CORDEIRO, A.L.; CRISTIANO, M.P. Cytogenetic data on the agro-predatory ant *Megalomyrmex incisus* Smith, 1947 and its host, *Mycetophylax conformis* (Mayr, 1884) (Hymenoptera, Formicidae). **Comparative cytogenetics**, 11(1), 45. 2017.

CARDOSO, D.C.; SANTOS, H.G.; CRISTIANO, M.P. The Ant Chromosome database–ACdb: an online resource for ant (Hymenoptera: Formicidae) chromosome researchers. **Myrmecological News** 27: 87-91. 2018.

CALLEROS, L.; PANZERA, F.; BARGUES, M.D.; MONTEIRO, F.A.; KLISIOWICZ, D.R.; ZURIAGA, M.A.; PÉREZ, R. Systematics of *Mepraia* (Hemiptera-Reduviidae): cytogenetic and molecular variation. **Infection**, **Genetics and Evolution**, 10(2), 221-228. 2010.

CHIRINO, M.G.; ROSSI, L. F.; BRESSA, M. J.; LUACES, J. P.; MERANI, M. S. Comparative study of mitotic chromosomes in two blowflies, *Lucilia sericata* and *L. cluvia* (Diptera, Calliphoridae), by C-and G-like banding patterns and rRNA loci, and implications for karyotype evolution. **Comparative cytogenetics**, v. 9, n. 1, p. 103, 2015.

CORREIA, J.P.S.O.; MARIANO, C.S.F; DELABIE, J.H.C.; LACAU, S.; COSTA, M.A. Cytogenetic analysis of *Pseudoponera stigma* and *Pseudoponera gilberti* (Hymenoptera: Formicidae: Ponerinae): a taxonomic approach. **Florida Entomologist**, 718-721. 2016

CRISTIANO, M.P.; DANON, C.C.; FERNANDES-SALOMÃO, T.M..Cytogenetic and molecular analyses reveal a divergence between *Acromyrmex striatus* (Roger, 1863) and other congeneric species: taxonomic implications. **Plos One** 8.3 e59784. 2013.

CRAVEN, S.E.; DIX, M. W.; MICHAELS, G.E. Attine fungus gardens contain yeasts. **Science**, 169(3941), 184-186. 1970.

CROZIER, R.H. Hymenoptera. In: JOHN, B. (Ed.): Animal Cytogenetics, vol. 3. Insecta 7. – Gebrüder Borntraeger-Berlin, Stuttgart, 95 pp. 1975

CROSLAND, M.W.J.; CROZIER, R.H.: *Myrmecia pilosula*, an ant with only one pair of chromosomes. – **Science** 231: 1278. 1986.

DA SILVA, A.A., BRAGA, L. S., GUEDES, R.N.C.; TAVARES, M.G. Cytogenetic analyses using C-banding and DAPI/CMA3 staining of four populations of the maize weevil *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1855 (Coleoptera, Curculionidae). **Comparative cytogenetics**, v. 9, n. 1, p. 89, 2015.

DE AGUIAR, H.J.A.C.; BARROS, L.A.C.; ALVES, D.R.; MARIANO, C.D.S.F., DELABIE, J. H. C.; POMPOLO, S.D.G. Cytogenetic studies on populations of *Camponotus rufipes* (Fabricius, 1775) and Camponotus renggeri Emery, 1894 (Formicidae: Formicinae). **Plos one,** *12*(5), e0177702. 2017.

DELABIE, J.H.C.; FOWLER, H.G.; SCHLINDWEIN, M. N. Ocorrência do parasita social *Pseudoatta* sp. nova em ninhos de *Acromyrmex rugosus* em Ilhéus, Bahia: primeiro registro para os trópicos. In: **Fourth International Symposium on Pest Ants/XI Encontro de Mirmecologia**. 1993.

DELABIE, J. H. C.; NASCIMENTO, I. C.; MARIANO, C. S. F. Estratégias de reprodução e dispersão em formigas attines, com exemplos do sul da Bahia. In: **XIX Congresso Brasileiro de Entomologia**. p. 16-21. 2002.

DELABIE, J.H.C.; FEITOSA, R.M.; SERRÃO, J.E.; MARIANO, C.D.S.F.; MAJER, J.D. **As formigas poneromorfas do Brasil.** SciELO-Editus-Editora da UESC. 2015.

DELABIE, J.H.C.; MARIANO, C.S.F.; NASCIMENTO, I.C. As formigas do Município de Ilhéus (Insecta: Hymenoptera: Formicidae). **Especiaria**, 1(2): 133-152. 1998.

DELLA-LUCIA, T.M.C. **Formigas cortadeiras: da bioecologia ao manejo**. UFV, 2011.

DUARTE, M.A.; GIUGLIANO, L.G.; DE AQUINO, P.D.P.U.; GRISOLIA, C.K.; MILHOMEM-PAIXÃO, S.S.R. Cytogenetic studies in Hasemania crenuchoides (Characiformes: Characidae) and molecular investigations into kinship relationships of the genus. **Caryologia**, 71(4), 446-452. 2018.

ERTHAL Jr., M.; SILVA, C.P.; SAMUELS, R.I. Digestive enzymes of the leafcutting ants, *Acromyrmex subterraneus* (Hymenoptera: Formicidae: Attini): distribuition in the gut of adult workers and partial characterization. **J. Insect Physiol**., 50(10): 881-891, 2004.

FADINI, M.A.M; POMPOLO, S.G. Cytogenetics of some ant species of the tribe Attini (Hymenoptera, Formicidae) from the region of Viçosa, MG. **Rev Bras Genet** 19: 53-55. 1996.

FADINI, M.A.M; MAYÉ-NUNES, A.J.; POMPOLO, S.G. Citogenética de duas espécies do gênero *Mycetarotes* (Hymenoptera: Formicidae). XLII **Congresso Nacional de Genética**, Caxambu, MG (Brasil): 126. 1996.

FARIA, R.; NAVARRO, A. Chromosomal speciation revisited: rearranging theory with pieces of evidence. **Trends in Ecology & Evolution**, 25(11), 660-669. 2010.

GOÑI, G; ZOLESSI, L.C.; IMAI, H.T. Karyotype of thirteen ant species from Uruguay (Hymenoptera - Formicidae). **Caryologia** 36: 363-371. 1983.

GRIMALDI, D.A.; AGOSTI, D.; CARPENTER, J.M. New and rediscovered primitive ants (Hymenoptera, Formicidae) in Cretaceous amber from New Jersey, and their phylogenetic relationships. **American Museum novitates**; no. 3208. 1997.

GROSS, M.C.; SCHNEIDER, C.H.; VALENTE, G.T.; MARTINS, C.; FELDBERG, E. Variability of 18S rDNA locus among Symphysodon fishes: chromosomal rearrangements. **Journal of Fish Biology**, *76*(5), 1117-1127. 2010.

GUERRA, M.D.S. **Introdução à citogenética geral**. Guanabara Koogan, 1988.

HAUSCHTECK, E. Die Chromosomen einiger in der Schweiz vorkommender Ameisenarten. **Vierteljahrsschrift der Naturforschenden Gesellschaft in Zürich**, v. 107, p. 213-220, 1962.

HERNÁNDEZ, J.V.; JAFFÉ, K. Dano econômico causado por populações de formigas *Atta laevigata* (F. SMITH) em plantações de pinus caribaea mor. e elementos para o manejo da praga. **Anais da sociedade entomológica do Brasil**, v. 24, n. 2, p. 287-298, 1995.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E.O. **The ants**. Harvard University Press, 1990.

HOWELL, W.M.T.; BLACK, D.A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Cellular and Molecular Life Sciences** 36.8: 1014-1015. 1980.

IMAI, H.T. Karyological studies of Japanese ants. II. Species differentiation in Aphaenogaster; with special regard to their morphology, distribution and chromosomes. – **Mushi** 44: 137-151. 1971.

IMAI, H.T.; KUBOTA, M. Karyological studies of Japanese ants (Hymenoptera: Formicidae). III. Karyotypes of nine species in Ponerinae, Formicinae, and Myrmicinae. – **Chromosoma** 37: 193-200. 1972.

IMAI, H.T.; CROZIER, R.H.; TAYLOR, R.W. Karyotype evolution in Australian ants. **Chromosoma**, v. 59, n. 4, p. 341-393, 1977.

IMAI, H. T.; MARUYAMA, T. Karyotype evolution by pericentric inversion as a stochastic process. **Journal of theoretical biology**, 70(3), 253-261. 1978.

IMAI, H.T.; BARONI, C.U.; KUBOTA, M.; SHARMA, G.P.; NARASIMHANNA, M.H.; DAS, B.C., SHARMA, A.K.; SHARMA, A.; DEODIKAR, G.B.; VAIDYA, V.G.; RAJASEKARASETTY, M.R. Karyological survey of Indian ants. **Japanese Journal of Genetics** 59: 1–32. 1984.

IMAI, H.T.; MARUYAMA, T.; GOJOBORI, T.; INOUE, Y.; CROZIER, R.H. Theoretical bases for karyotype evolution. The Minimum Interaction Hypothesis. **The American Naturalist** 128: 900-920. 1986.

IMAI, H; TAYLOR R.W.; CROSLAND M.W.; CROZIER, R.H. Modes of spontaneous chromossomal mutation and karyotype evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis. **Japan J Genet** 63: 159-185. 1988.

IMAI H.T. Mutability of constitutive heterochromatin (C-bands) during eukaryotic chromosomal evolution and their cytological meaning. **Japan J Genet** 66:635-661. 1991.

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

IMAI, H.T.; SATTA, Y.; TAKAHATA, N. Integrative study on chromosome evolution of mammals, ants and wasps based on the Minimum Interaction Theory. – **Journal of Theoretical Biology** 210: 475-497. 2001

IMPERADOR, C.H.L.; MOREIRA, F.F.F., ROSA, J.A.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V.; ALEVI, K.C.C. Cytotaxonomy of the Maculata subcomplex (Hemiptera, Triatominae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 77, n. 4, p. 887-889, 2017.

JORON, M.; FREZAL, L.; JONES, R.T.; CHAMBERLAIN, N.L.; LEE, S.F.; HAAG, C. R.; WILKINSON, P.A. Chromosomal rearrangements maintain a polymorphic supergene controlling butterfly mimicry. **Nature**, v. 477, n. 7363, p. 203, 2011.

KING, M. Karyotypic evolution in *Gehyra* (Gekkonidae: Reptilia) IV. Chromosome change and speciation. **Genetica**, v. 64, n. 2, p. 101-114, 1984.

KING, M. Chromosomal rearrangements, speciation and the theoretical approach. **Heredity**, v. 59, n. 1, p. 1, 1987.

KING, M. **Species evolution: the role of chromosome change**. Cambridge University Press, 1995.

KIRKPATRICK, M.; BARTON, N.. Chromosome inversions, local adaptation and speciation. **Genetics**, v. 173, n. 1, p. 419-434, 2006.

KUMAR, R.; BAISVAR, V. S.; KUSHWAHA, B.; WAIKHOM, G.; NAGPURE, N. S. Cytogenetic investigation of *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758) using giemsa, silver nitrate, CMA 3 staining and fluorescence in situ hybridization. ***The Nucleus***, *60*(1), 1-8. 2017.

LEVAN A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas** 52: 201-220. 1964.

LOPES, A. T.; FERNANDES, F. R.; SCHNEIDER, M. C. Chromosome mapping of 28S ribosomal genes in 11 species of Cassidinae (Coleoptera: Chrysomelidae). **European Journal of Entomology**, v. 114, p. 546-553, 2017.

LORITE, P., ARÁNEGA, A. E., LUQUE, F., & PALOMEQUE, T. Analysis of the nucleolar organizing regions in the ant *Tapinoma nigerrimum* (Hymenoptera, Formicidae). **Heredity,** *78*(6), 578. 1997

LORITE, P.; PALOMEQUE, T. Karyotype evolution in ants (Hymenoptera: Formicidae), with a review of the known ant chromosome numbers. **Myrmecological News**, v. 13, n. 1, p. 89-102, 2010.

LUKHTANOV, V.A.; DINCĂ, V.; TALAVERA, G.; VILA, R. Unprecedented within-species chromosome number cline in the Wood White butterfly *Leptidea sinapis* and its significance for karyotype evolution and speciation. **BMC evolutionary biology**, 11(1), 109. 2011.

MACKAY, W.P.; Maes, J. M., Fernández, P.R.; Luna, G. The ants of north and central America: the genus Mycocepurus (Hymenoptera: Formicidae). Journal of Insect Science, v. 4, n. 1, p. 27, 2004.

MACGREGOR, H.C. **Introduction to animal cytogenetics**. Springer Science & Business Media. 1993.

MAHMOUDI, A.; ZIMA, J.; KRYŠTUFEK, B.; DARVISH, J.; ALIABADIAN, M.; ARSLAN, A. Systematic relationships within the *Microtus arvalis* (Rodentia: Cricetidae) group in Iran, inferred from cytogenetic analyses. **Zoology in the Middle Eas**t, 64(1), 1-8. 2018.

MALUF, S. W.; RIEGEL, M. **Citogenética humana**. Artmed Editora, 2009.

MANTOVANI, M.; ABEL, L.D.D.S.; MESTRINER, C. A.; MOREIRA-FILHO, O. Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): tools for understanding karyotypic evolution. **Genetica,** *109*(3), 161. 2000.

MARIANO, C.S.F.; DELABIE, J.H.C.; CAMPOS, L.A.O.; POMPOLO, S.G. Trends in karyotype evolution in the ant genus *Camponotus* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology,** *42*(3), 831-840. 2003.

MARIANO, C.S.F. **Evolução cariotípica em diferentes grupos de Formicidae**. Tese. (Doutorado em Entomologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Brasil 205 pp. 2004.

MARIANO, C.S.F.; POMPOLO, S.G.; BARROS, L.A.C.; MARIANO-NETO, E., CAMPIOLO, S.; DELABIE, J.H.C. A biogeographical study of the threatened ant *Dinoponera lucida* Emery (Hymenoptera: Formicidae: Ponerinae) using a cytogenetic approach. **Insect Conservation and Diversity**, 1(3), 161-168. 2008.

MARIANO, C.S.F.; SANTOS, I.D.S.; GROC, S.; LEROY, C.; MALÉ, P.J., RUIZ-GONZÁLEZ, M.X.; DELABIE, J.H.C. The karyotypes of *Gigantiops destructor* (Fabricius) and other ants from French Guiana (Formicidae). **Annales de la Société Entomologique de France** Vol. 47, No. 1-2, pp. 140-146. 2011.

MARIANO, C.S.F.; POMPOLO, S.D.G., SILVA, J.G.; DELABIE, J.H.C. Contribution of cytogenetics to the debate on the paraphyly of **Pachycondyla** spp.(Hymenoptera, Formicidae, Ponerinae). **Psyche**: **A Journal of Entomology**, 2012.

MARIANO, C.S.F.; SANTOS, I.S.; SILVA, J.G.; COSTA, M.A.; POMPOLO, S.G. Citogenética e evolução do cariótipo em formigas poneromorfas. In: DELABIE, J. H. C. et al. **As formigas poneromorfas do Brasil**. Ilhéus: Editus. p. 103-125. 2015.

MARIANO, C.S.F.; BARROS, L.A.C.; MERA, Y.; GUIMARÃES, I.N.; POMPOLO, S.D.G.; DELABIE, J.H.C. Citogenética de las hormigas de la región neotropical. In: FERNÁNDEZ, F.; GUERRERO, R.J.; DELSINNE, T. **Hormigas de colombia**. 1st ed. Universidade Nacional de Colombia, Sede Bogotá. Facultad de Ciencias. Instituto de Ciencias Naturales, 2019.

MAYHÉ-NUNES, A.J.; MENEGUETE, P.S. Definição de termos para as projeções mesossomais das operarias de *Mycocepurus* Forel, 1893 (Hymenoptera, Formicidae). Contribuições Avulsas sobre a Historia Natural do Brasil. **Serie Zoologia** 27:1-7. 2000.

MAYHÉ-NUNES, A.J.; BRANDÃO, C.R.F. Revisionary studies on the attine ant genus *Trachymyrmex* Forel. Part 3: The *Jamaicensis* group (Hymenoptera: Formicidae). **Zootaxa**. 1444:1-21. 2007.

MEHDIABADI, N. J.; SCHULTZ, T. R. Natural history and phylogeny of the fungus-farming ants (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae: Attini). **Myrmecological News**, v. 13, p. 37-55, 2010.

MERICO, V.; GIMÉNEZ, M.D.; VASCO, C.; ZUCCOTTI, M.; SEARLE, J.B., HAUFFE, H.C.; GARAGNA, S. Chromosomal speciation in mice: a cytogenetic analysis of recombination. **Chromosome Research**, v. 21, n. 5, p. 523-533, 2013.

MIAO, Y.; HUA, B.Z. Cytogenetic comparison between Terrobittacus implicatus and *Bittacus planus* (Mecoptera: Bittacidae) with some phylogenetic implications. **Arthropod Syst. Phylogeny**, 75, 175-183. 2017.

MICHAILOVA, P. Genomic changes in speciation of the family Chironomidae, Diptera. **Journal of BioScience & Biotechnology**, v. 4, n. 1, 2015.

MURAKAMI, T.; FUJIWARA, A.; YOSHIDA, M.C. Cytogenetics of ten ant species of the tribe Attini (Hymenoptera, Formicidae) in Barro Colorado Island, Panama. **Chromosome Sci** 2: 135-139. 1998.

NAVARRO, A.; BARTON, N.H. Chromosomal speciation and molecular divergence--accelerated evolution in rearranged chromosomes. **Science**, v. 300, n. 5617, p. 321-324, 2003.

PALOMEQUE, T.; CHICA, E.; DE LA GUARDIA, R. D. Karyotype evolution and chromosomal relationships between several species of the genus *Aphaenogaster* (Hymenoptera, Formicidae). **Caryologia,** 46(1), 25-40. 1993

PALOMEQUE, T.; CHICA, E.; CANO, M.A.; DÍAZ DE LA GUARDIA, R. Karyotypes, C-banding, and chromosomal location of active nucleolar organizing regions in *Tapinoma* (Hymenoptera, Formicidae). **–** **Genome** 30: 277-280. 1988

PÉREZ, S. P.P.; CARLOS CORLEY, J.; FARJI-BRENER, A. G. Potential impact of the leaf-cutting ant *Acromyrmex lobicornis* on conifer plantations in northern Patagonia, Argentina. **Agricultural and Forest Entomology**, v. 13, n. 2, p. 191-196, 2011.

PAPESCHI, A.G. DNA content and heterochromatin variation in species of *Belostoma* (Heteroptera, Belostomatidae). **Hereditas**, v. 115, n. 2, p. 109-114, 1991.

POMPOLO, S.G.; TAKAHASHI, C.S. Chromosome numbers and C bands in two wasp species of the genus *Polistes* (Hymenoptera, Vespidae, Polistinae). **Insectes Soc** 37: 251-257. 1990.

POTTER, S.; BRAGG, J.G.; BLOM, M.P.; DEAKIN, J.E.; KIRKPATRICK, M.; ELDRIDGE, M.D.; MORITZ, C. Chromosomal speciation in the genomics era: Disentangling phylogenetic evolution of rock-wallabies. **Frontiers in genetics**, v. 8, p. 10, 2017.

ROCHA, M. P.; POMPOLO, S.D.G. Karyotypes and heterochromatin variation (C-bands) in *Melipona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Genetics and Molecular Biology,** 21(1). 1998.

SANTOS, J.M. Heterochromatin distribution and chromosomal mapping of microsatellite repeats in the genome of *Frieseomelitta* stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). **Florida Entomologist**, v. 101, n. 1, p. 33-39, 2018.

SANTOS-COLARES, M.C.; VIÉGAS, J; MARTINO, M.G.R.; LOECK, A.E. Preparation of mitotic chromosomes of leaf-cutting ants from the genera *Atta* and *Acromyrmex*. **Braz J Genet** 20: 25-27. 1997.

SCHULTZ, T.R.; BRADY, S.G. Major evolutionary transitions in ant agriculture. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 14, p. 5435-5440, 2008.

SCHWEIZER, D. Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA-DAPI bands) in human chromosomes. **Cytogenetic and Genome Research** 27.2-3: 190-193. 1980.

SCHWEZER, D. Counterstain-enhanced chromosome banding. **Human genetics**, v. 57, n. 1, p. 1-14, 1981.

SOTO, M.Á.; CASTRO, J.P.; WALKER, L.I.; MALABARBA, L.R.; SANTOS, M.H.; ALMEIDA, M.C.; ARTONI, R.F. Evolution of transAndean endemic fishes of the genus *Cheirodon* (Teleostei: Characidae) are associated with chromosomal rearrangements. ***Revista chilena de historia natural***, *91*(1), 8. 2018.

SUMNER, A.T.A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Exp Cell Res** 83: 438-442. 1972.

SUMNER, A.T. **Chromosomes: organization and function**. John Wiley & Sons, 2003.

TAKAI, A. Karyotypes and Nucleolar Organizer Regions in Two Abudefduf Fishes (Pomacentridae, Perciformes). **Memoirs of Osaka-ShinAi College**, v. 50, p. A1, 2016.

TEIXEIRA, G.A.; BARROS, L.A.C.; DE AGUIAR, H.J.A.C.; POMPOLO, S.D.G. Comparative physical mapping of 18S rDNA in the karyotypes of six leafcutter ant species of the genera *Atta* and *Acromyrmex* (Formicidae: Myrmicinae). **Genetica**, 145(4-5), 351-357. 2017.

VARON, E.H.; EIGENBRODE, S.D.; BOSQUE-PEREZ, N.A.; HILJE, L. Effect of farm diversity on harvesting of coffee leaves by the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*.**Agricultural and Forest Entomology** 9:47–55. 2007.

WEBER, N.A. Evolution in fungus-growing ants. **Proceedings 10th Int. Congress of Entomology**, 2: 459-473. 1956.

WEBER, N.A. Gardening ants: The Attines. **American Philosophical Society**, Philadelphia, v. 92, p. 146, 1972.

WEBER, N.A. Evolution in fungus-growing ants. In: **Proceedings of the Tenth International Congress of Entomology**. p. 459-473. 1958.

WEBER, N. A. Fungus-growing ants. **Science**, v. 153, n. 3736, p. 587-604, 1966.

WILSON, E.O. **The insect societies**. Belknap Press, Cambridge, USA. 548 p. 1971

WILSON, E.O.; HÖLLDOBLER, B. Eusociality: origin and consequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences of America**, 102 (38): 1336713371, 2005.

WHITE, M. J. D. Evolution and Speciation: Essays in Honor of MJD White. Cambridge University Press. 1981

XAVIER, C.; SOARES, R.V.S.; AMORIM, I.C.; CABRAL-DE-MELLO, D.C.; DE MOURA, R.D.C. Insights into the karyotype evolution and speciation of the beetle *Euchroma gigantea* (Coleoptera: Buprestidae). **Chromosome Research**, p. 1-16, 2018.

ZANETTI, R.; ZANUNCIO, J. C.; VILELA, E. F.; LEITE, H. G.; JAFFE, K.; OLIVEIRA, A.C. Level of economic damage for leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae) in *Eucalyptus plantations* in Brazil. **Sociobiology**, *42*(2), 433-442. 2003.

Anexos

Tabela 1 - Citogenética de Myrmicinae

Gênero	N° de espécie	Variação 2n
Acanthomyrmex	3	2n= 22, 24
Acromyrmex	17	2n= 22, 38
Aphaenogaster	23	2n=22, 30,32, 34, 36, 38, 40, 41, 42, 44, 45, 46
Apterostigma	6	2n=20,22,23,24,32
Atta	6	2n=22
Basiceros	1	2n= 20
Cardiocondyla	4	2n=22, 28, 40, 44
Carebara	12	2n= 26, 32, 34, 36, 38, 42, 44,
Cephalotes	3	2n= 22, 32, 44
Colobostruma	3	2n=22, 28
Crematogaster	17	2n= 24, 26, 36, 40, 50, 56
Cyphomyrmex	3	2n=20,22,32
Dacetinops	1	2n=16
Epopostruma	2	2n=20
Erromyrma	1	2n= 70
Eurhopalothrix	1	2n=18
Formicoxenus	4	2n=22, 28, 30
Harpagoxenus	2	2n=36, 40
Kyidris	1	2n=56
Leptothorax	23	2n= 22, 24,26, 30, 32, 34, 36,42, 44, 46, 48, 50, 52, 56
Lophomyrmex	3	2n= 22, 38
Manica	1	2n= 44
Mayriella	1	2n=36
Megalomyrmex	1	2n=50
Meranoplus	6	2n= 18, 16, 20, 22
Messor	3	2n=41, 42, 44
Monomorium	23	2n= 20, 22, 24, 32, 34, 38, 42
Mycetarotes	2	2n=14,54
Mycetophylax	3	2n=26,30,36
Mycocepurus	2	2n=8
Myrmecina	7	2n= 28, 66, 68
Myrmica	8	2n=44, 46,48, 56
Myrmicaria	6	2n= 44, 46
Myrmicocripta	1	2n=30
Myrmoxenus	2	2n=20
Oligomyrmex	10	2n= 26, 32, 34, 36, 38, 44
Orectognathus	3	2n= 22, 30
Pheidole	78	2n= 12, 16, 18, 20, 21, 22, 24, 28, 30, 32, 34, 36, 37, 38,39, 40, 42
Pheidologeton	1	2n=42
Podomyrma	3	2n= 49, 50, 51
Pogonomyrmex	18	2n= 32, 36, 49, 50, 51, 58, 60, 61, 62
Pristomyrmex	3	2n= 22, 24, 28
Proatta	1	32
Pyramica	2	2n=38
Recurvidris	1	2n= 24

Sericomyrmex	2	2n=50
Solenopsis	10	2n= 22, 32, 38
Stenamma	2	2n= 8, 40
Strongylognathus	1	2n=28
Strumigenys	8	2n= 16, 22 24, 26, 36, 38,40
Temnothorax	54	2n=12, 18, 16,20, 22, 24, 26, 27, 28, 34, 36, 42, 44, 46, 48, 50,
Tetramorium	31	2n= 4, 14, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 35, 36,
Trachymyrmex	7	2n=12,18,20,22,
Trichomyrmex	1	2n=38
Triglyphothrix	2	2n= 14
Trigonogaster	1	2n=24
Veromessor	1	2n=40
Vollenhovia	8	2n= 33, 34,36, 40, 49, 50,
Wasmannia	1	2n=32

Tabela 2 – Referencias de estudos citogenéticos realizados com as formigas cultivadoras de fungo

Gênero	Espécies	2n	cariótipo	Referencia
Acromyrmex	*Acromyrmex ambiguus*	38	2M+6SM+16ST+14A	Goñi *et al.* (1983)
	A. hispidus	38	2M+6SM+16ST+14A	Goñi *et al.* (1983)
	A. heyeri	38	2M+6SM+16ST+14A	Goñi *et al.* (1983)
	A. heyeri	38	2M+6SM+16ST+14A	Santos-Colares *et al.* (1997)
	A. crassipinus	38	2M+6SM+16ST+14A	Fadini & Pompolo (1996)
	A. subterraneus molestans	38	2M+6SM+16ST+14A	Fadini & Pompolo (1996)
	A. subterraneus	38	2M+6SM+16ST+14A	Fadini & Pompolo (1996); Barros *et al* (2008); Teixeira et al (2017)
	A. subterraneus brunneus	38		Barros *et al* (2008)
	A. ameliae	36		Barros et al (2008)
	A. striatus	22	20M+2SM	Cristiano et al (2013)
	A. balzani	38	12M+10SM+14ST+2A	Barros et al (2016)
	A. coronatus	38	12M+8SM+16ST+2A	Barros et al (2016)
	A. disciger	38	10M+12SM+14ST+2A	Barros et al (2016)
	A. niger	38	12M+14SM+10ST+2A	Barros et al (2016)
	A. rugosus	38	16M+12SM+8ST+2A	Barros *et al* (2016)
	A. echinatior	38	8M+6SM+14ST+10A	Barros et al (2016)
	A. aspersus	38	8M+10SM+16ST+4A	Teixeira et al (2017)
Apterostigma	*Apterostigma mayri*	24	24M	Murakami *et al*. (1998)
	Apterostigma sp.	24	24M	Murakami *et al*. (1998)
	Apterostigma sp.	20	6M+12SM+2A	Fadini & Pompolo (1996)
	Apterostigma steigeri	22	20M+2SM	Barros *et al* (2013)
	Apterostigma madidiense	23	7m + 10sm + 5st + 1a	Barros *et al* (2013)
	Apterostigma sp.	32	14M+6SM+10ST+2T	Mariano *et a*l (2011)
Atta	*Atta bisphaerica*	22	12M+6SM+4A	Fadini & Pompolo (1996)
	A. colombica	22	12M+6SM+4A	Murakami *et al*. (1998)
	A.laevigata	22	12M+6SM+4A	Fadini & Pompolo (1996)
	A. sexdens	22	12M+6SM+4A	Fadini & Pompolo (1996);
	A. sexdens	22	12M+6SM+4A	Santos-Colares et al. (1997)
	A. robusta	22	18M+2SM+2ST	Barros et al (2015)
Cyphomyrmex	*Cyphomyrmex rimosus*	32	28M+4A	Murakami *et al*. (1998)
	C. costatus	20	20M	Murakami *et al*. (1998)
	C. cornutus	22	10M+12SM	Mariano *et a*l (2011)
	Cyphomyrmex sp.	32	20M+12A	Mariano *et al*., 2019
Mycetarotes	*Mycetarotes carinatus*	14	8M+6SM	Fadini *et al. (1996)*
	M. parallelus	54	13M+8SM+6A	Fadini *et al. (1996)*
Mycetophylax	*Mycetophylax morshi*	30	18M+10SM+2A	Cardoso *et al* (2014)
	Mycetophylax morshi	26	18M+6SM+2A	Cardoso et al (2014)
	M. conformis	30	22M+8SM	Cardoso *et al* (2014); Cardoso et al (2017)
	M. simplex	36	20M+16SM	Cardoso *et al* (2014)
	M. lectus	64	22M+42A	Mariano *et al.,* 2019

Mycocepurus	*Mycocepurus* sp.	8	8M	Murakami *et al*. (1998)
	M. goeldii	8	8M	Barros *et al* (2010)
	M. goeldii	7	1M+2ST+4A	Presente estudo
Myrmicocripta	*Myrmicocrypta* sp.	30	6M+10SM+14A	Mariano et al (2011)
Sericomyrmex	*s. amabilis*	50	50M	Murakami *et al*. (1998)
	Sericomyrmex sp.	50	44M+6SM	Barros *et al* (2013)
	S. bondari	44	12M+4ST+28A	Presente estudo
	S. mayri	50	20M+4ST+26A	Presente estudo
	S. saussurei	36	10M+6ST+20A	Presente estudo
Trachymyrmex	*Trachymyrmex* sp. 1	12	12M	Murakami *et al*. (1998)
	Trachymyrmex sp. 2	18	18M	Murakami *et al*. (1998)
	T. septentrionalis	20	20M	Murakami *et al*. (1998)
	Trachymyrmex relictus	20	20M	Barros *et al* (2013)
	Trachymyrmex sp	22	18M+4SM	Barros *et al* (2013)
	T. fuscus	18	16M+2SM	Barros *et al* (2014)
	Trachymyrmex holmgreni	20	20M	Barros *et al* (2018)
	T. bugnioni	16	14M+2ST	Presente estudo

Tabela 2 – dados citogenéticos utilizados para a montagem do cariógrafo

Gênero	Espécies	n° de A	n° de M	2AN	2n
Acromyrmex	*Acromyrmex ambiguus*	30	8	46	19
	A. hispidus	30	8	46	19
	A. heyeri	30	8	46	19
	A. heyeri	30	8	46	19
	A. crassipinus	30	8	46	19
	A. subterraneus molestans	30	8	46	19
	A. subterraneus	30	8	46	19
	A. subterraneus brunneus	30	8	46	19
	A. ameliae	10	26	62	18
	A. striatus	0	22	44	11
	A. balzani	16	22	60	19
	A. coronatus	18	20	58	19
	A. disciger	16	22	60	19
	A. niger	12	26	64	19
	A. rugosus	10	28	66	19
	A. echinatior	24	14	52	19
	A. aspersus	20	18	44	11
Apterostigma	*Apterostigma mayri*	0	24	56	19
	Apterostigma sp.	0	24	48	12
	Apterostigma sp.	2	18	48	12
	Apterostigma steigeri	0	22	38	10
	Apterostigma madidiense	6	17	44	11
	Apterostigma sp.	12	20	92	23
Atta	*Atta bisphaerica*	4	18	52	16
	A. colombica	4	18	40	11
	A.laevigata	4	18	40	11
	A. sexdens	4	18	40	11

	A. sexdens	4	18	40	11
	A. robusta	2	20	40	11
Cyphomyrmex	*Cyphomyrmex rimosus*	4	28	42	11
	C. costatus	0	20	60	16
	C. cornutus	0	22	40	10
	Cyphomyrmex sp.	12	20	52	16
Mycetarotes	*Mycetarotes carinatus*	0	14	44	11
	M. parallelus	30	24	28	7
Mycetophylax	*Mycetophylax morshi*	2	28	78	27
	Mycetophylax morshi	2	24	58	15
	M. conformis	0	30	50	13
	M. simplex	0	36	60	15
	M. lectus	42	22	86	32
Mycocepurus	*Mycocepurus* sp.	0	8	72	18
	M. goeldii	0	8	16	4
	M. goeldii	6	1	16	4
Myrmicocripta	*Myrmicocrypta* sp.	14	16		
Sericomyrmex	*s. amabilis*	0	50	46	15
	Sericomyrmex sp.	0	50	100	25
	S. bondari	32	12	56	22
	S. mayri	26	10	70	25
	S. saussurei	30	20	46	18
Trachymyrmex	*Trachymyrmex* sp. 1	0	12	100	25
	Trachymyrmex sp. 2	0	18	24	6
	T. septentrionalis	0	20	36	9
	Trachymyrmex relictus	0	20	40	10
	Trachymyrmex sp	0	22	40	10
	T. fuscus	0	18	44	11
	Trachymyrmex holmgreni	2	14	36	9
	T. bugnioni	0	20	30	8

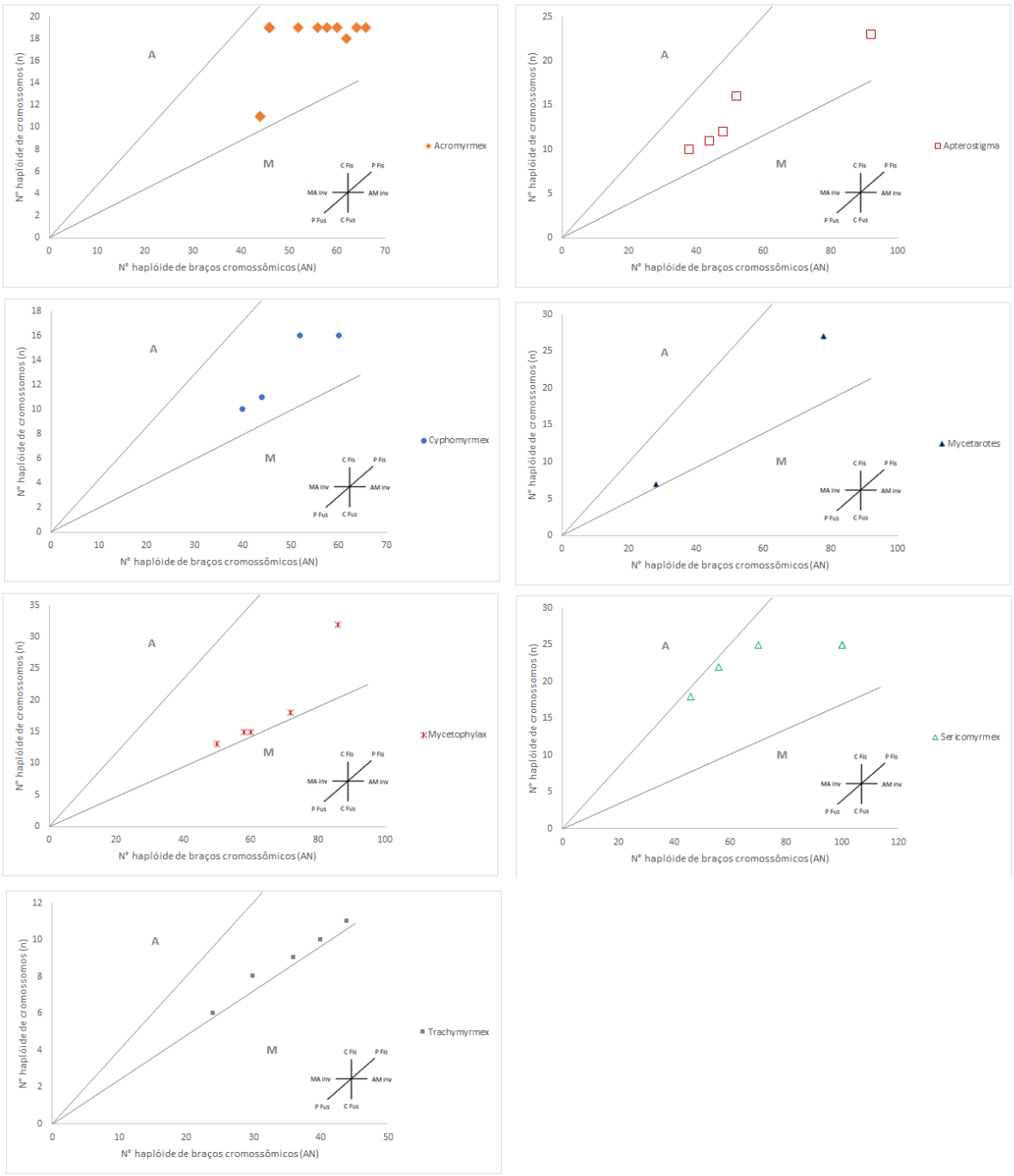

Figura 9 - Cariógrafo elaborado a partir dos dados citogenéticos de: *a) Acromyrmex*; b) *Apterostigma*; c) *Cyphomyrmex;* d) *Mycetarotes*; e) *Mycetophylax*; f) *Sericomyrmex* e *g) Trachymyrmex.*