

**LUÍSA ANTÔNIA CAMPOS BARROS**

**CITOGENÉTICA DE ESPÉCIES DE ATTINI (FORMICIDAE:  
MYRMICINAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2010**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

B277c  
2010

Barros, Luísa Antônia Campos, 1982-  
Citogenética de espécies de Attini (Formicidae :  
Myrmicinae) / Luísa Antônia Campos Barros. – Viçosa,  
MG, 2010.  
xi, 75f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Sílvia das Graças Pompolo.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Formiga. 2. Citogenética. 3. Bandamento cromossô-  
mico. 4. Attini. 5. Formiga - Evolução. I. Universidade  
Federal de Viçosa. II. Título.

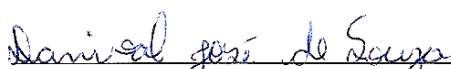
CDD 22. ed. 595.796

**LUÍSA ANTÔNIA CAMPOS BARROS**

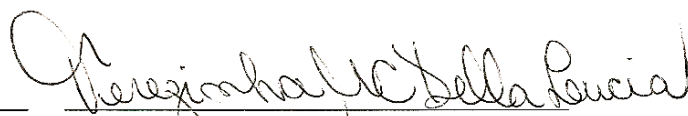
**CITOGENÉTICA DE ESPÉCIES DE ATTINI (FORMICIDAE:  
MYRMICINAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

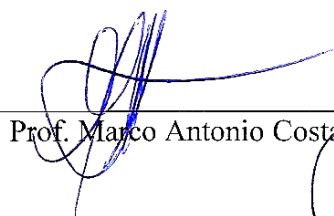
APROVADA: 19 de julho de 2010.



Dr. Danival José de Souza  
(Coorientador)



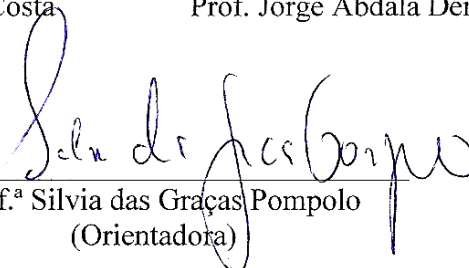
Prof.ª Terezinha M.ª C. Della Lucia  
(Coorientadora)



Prof. Marco Antonio Costa



Prof. Jorge Abdala Dergam dos Santos



Prof.ª Silvia das Graças Pompolo  
(Orientadora)

À minha mãe e à memória do meu pai.

“O Senhor vai acendendo as lâmpadas diante de nós à medida que caminhamos e precisamos delas. Não as acende todas de uma vez, mas a envia sempre no momento oportuno”.

Tiago Alberione

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela conclusão de mais uma etapa em minha vida, por me dar força, coragem e persistência para superar tantos obstáculos, por me ajudar a crescer a cada dia e por colocar tantas pessoas (“lâmpadas”!) em minha vida.

À minha mãe, por me apoiar e estar sempre comigo em todos os momentos da minha vida, mesmo sem entender direito o que eu faço.

Ao meu pai, *in memoriam*, que, infelizmente, não pôde estar aqui para ver a conclusão desta etapa da minha vida.

À minha orientadora Silvia das Graças Pompolo, pela orientação ao longo da graduação e do mestrado, pela confiança em mim, pelo apoio, amizade, preocupação comigo e pelo exemplo de ética e seriedade.

À minha irmã Cláudia, por estar comigo, por se preocupar comigo e por torcer por mim sempre.

Ao Hilton, pelo carinho, amizade, companheirismo, por estar comigo em todos os momentos alegres e tristes e por ter tanta paciência comigo.

À professora Cléa dos Santos Ferreira Mariano, por me ajudar desde que cheguei ao laboratório e que mesmo distante fisicamente sempre acompanhou de perto meu trabalho. Agradeço também por me receber em sua casa e pela amizade.

Ao Danival José de Souza, pela grande ajuda nas coletas, artigos, conversas ao longo do mestrado, pela boa vontade e por aceitar ser meu co-orientador.

À professora Terezinha Della Lucia, por fornecer material para citogenética de espécies de *Acromyrmex* e por aceitar ser minha co-orientadora.

Ao professor Jacques Hubert Charles Delabie, pela valiosa ajuda, sugestões e por me receber em sua casa.

À Vanderly de Souza Andrade, pela ajuda na realização da técnica de FISH, pela paciência, boa vontade, mesmo tão atarefada com o final de seu doutorado.

Ao professor Marco Antônio Costa, por me receber em seu laboratório de Citogenética na UESC/BA e por aceitar fazer parte da banca.

Ao professor Jorge Dergam pelas sugestões no trabalho de *Mycocepurus* e por aceitar fazer parte da banca.

Ao professores Pedro Crescêncio e ao Kenner, pela ajuda nos testes estatísticos.

Aos professores que contribuíram de forma positiva para minha formação.

Ao Sr. Manoel, pelo grande auxílio nas coletas.

Aos parentes que torcem por mim.

Aos amigos, novos e antigos, que torcem por mim, em especial ao Danon e Maykon, pela grande ajuda e incentivo nos últimos tempos, e também à Luiza e Cristiana.

Aos amigos de laboratório Jeffão e Silvia Meneses, pela boa convivência no laboratório.

Aos estagiários do Insetário da UFV, pela ajuda na obtenção de material para citogenética.

Aos estagiários do Beagle, pela ajuda nos experimentos e boas conversas.

Aos estagiários do Laboratório de Citogenética – UESC, pela ajuda durante o período em que estive nesta instituição.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Biologia Geral e ao programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, pelo apoio.

Às secretárias da Pós-graduação do Curso Genética e Melhoramento, Edna e Rita e também à ex-secretária Rose, pela valiosa ajuda.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

À V & M Florestal do Brasil S.A., pelo suporte técnico para a coleta de formigas em Paraopeba – MG.

Enfim, agradeço a todos os amigos, parentes, professores e funcionários desta universidade que me ajudaram a alcançar mais essa etapa da minha vida. Muito obrigada!

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
Introdução Geral.....	1
Objetivos .....	8
Referências Bibliográficas.....	10
Capítulo 1 – Estudos citogenéticos na tribo Attini (Formicidae: Myrmicinae) com a descrição de um polimorfismo cromossômico para <i>Trachymyrmex fuscus</i> .....	17
Resumo.....	18
Introdução.....	19
Material e Métodos.....	20
Resultados e Discussão.....	22
Referências Bibliográficas.....	29
Tabelas e Figuras.....	35
Capítulo 2 – Caracterização citogenética de seis espécies do gênero <i>Acromyrmex</i> (Formicidae: Myrmicinae).....	43
Resumo.....	44
Introdução.....	45
Material e Métodos.....	46
Resultados.....	47
Discussão.....	48
Referências Bibliográficas.....	53
Tabela e Figuras.....	58
Capítulo 3 – Cytogenetic characterization of the lower-Attini <i>Mycocepurus goeldii</i> (Formicidae: Mirmicinae: Attini).....	63
Abstract.....	64
Introduction.....	64
Materials and Methods.....	67

Results and Discussion .....	67
References.....	70
Anexo – Figuras do Capítulo 3.....	74
Conclusões Gerais.....	75

## RESUMO

BARROS, Luísa Antônia Campos. M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2010. **Citogenética de espécies de Attini (Formicidae: Myrmicinae)**. Orientadora: Silvia das Graças Pompolo. Coorientadores: Danival José de Souza e Terezinha Maria Castro Della Lucia.

A tribo Attini é um grupo monofilético que inclui mais de 230 espécies agrupadas em 14 gêneros. Nesta tribo estão incluídas as formigas cortadeiras (*Atta* e *Acromyrmex*), consideradas importantes pragas agrícolas. A utilização da citogenética na família Formicidae tem mostrado importante contribuição nas mais de 750 espécies de formigas estudadas. Os dados citogenéticos são reportados para 10% das espécies da tribo Attini. O presente trabalho teve como objetivo o estudo citogenético de seis espécies do gênero *Acromyrmex* e de sete espécies de Attini distribuídas em quatro gêneros: *Apterostigma*, *Mycocepurus*, *Sericomyrmex* e *Trachymyrmex*. Parte das espécies foi submetida a técnicas de bandamentos cromossômicos. Os cariótipos observados foram: *Apterostigma madidiense* Weber ( $n=23$ ,  $7m + 10sm + 5st + 1a$ ), *A. steigeri* Santschi ( $2n=22$ ,  $20m + 2sm$ ), *Mycocepurus goeldii* (Forel) ( $2n=8$ ,  $4m + 4sm$ ), *Sericomyrmex* sp. ( $2n=50$ ,  $44m + 6sm$ ;  $n=25$ ,  $22m + 3sm$ ), *Trachymyrmex fuscus* Emery ( $2n=18$ ,  $16m + 2sm$ ;  $n=9$ ,  $8m + 1sm$ ), *T. relictus* Borgmeier ( $2n=20m$ ,  $n=10m$ ) e *Trachymyrmex* sp. ( $2n=22$ ,  $18m + 4sm$ ). *Trachymyrmex fuscus* apresentou polimorfismo de tamanho no braço curto do par submetacêntrico. As possíveis causas da duplicação do segmento cromossômico são discutidas. As seis espécies do gênero *Acromyrmex* apresentaram  $2n=38$  cromossomos. Cada espécie mostrou um cariótipo diferente em relação à morfologia (*A. balzani*:  $12m + 10sm + 14st + 2a$ ; *A. coronatus*:  $12m + 12sm + 12st + 2a$ ; *A. disciger*:  $10m + 12sm + 14st + 2a$ ; *A. niger*:  $12m + 18sm + 6st + 2a$ ; *A. rugosus*:  $16m + 12sm + 8st + 2a$ ; *A. echinator*:  $8m + 6sm + 14st + 10a$ ) e variações na distribuição de heterocromatina (banda C) e regiões ricas em GC ( $CMA_3$ ). Em três espécies (*A. coronatus*, *A. disciger*, *A. niger*) o par subtelocêntrico de maior tamanho foi o portador de genes ribossomais. As espécies do gênero *Acromyrmex* apresentaram estabilidade no número cromossômico com diferenças no cariótipo. Isto sugere que rearranjos do tipo translocações, crescimento de heterocromatina e inversão devem

ter ocorrido durante a evolução das espécies deste gênero, levando a modificações nos cariótipos das diferentes espécies.

## ABSTRACT

BARROS, Luísa Antônia Campos. M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2010. **Cytogenetic of Attini species (Formicidae: Myrmicinae)**. Advisor: Silvia das Graças Pompolo. Co-advisers: Danival José de Souza and Terezinha Maria Castro Della Lucia.

The tribe Attini consists of a monophyletic group that includes about 230 species in 14 genera. Different biological substrate are utilized by these ants for cultivation of the symbiotic fungus on which they feed and are necessarily dependent. This tribe includes the leaf-cutting ants (*Atta* Fabricius and *Acromyrmex* Mayr) that are known as important agricultural pests. The usage of cytogenetics in the family Formicidae has made significant contributions in the study of more than 750 ant species. Only 10% of Attini's species have some sort of cytogenetic data available. This work aimed at cytogenetically studying six *Acromyrmex* species and seven species of the tribe Attini divided into four genera: *Apterostigma* Mayr, *Mycocepurus* Forel, *Sericomyrmex* Mayr and *Trachymyrmex* Forel. Some of the species were also submitted to banding techniques. The karyotypes observed were: *Apterostigma madidiense* Weber ( $n=23$ ,  $7m + 10sm + 5st + 1a$ ), *Apterostigma steigeri* Santschi ( $2n=22$ ,  $20m + 2sm$ ), *Mycocepurus goeldii* ( $2n=8$ ,  $4m + 4sm$ ), *Sericomyrmex* sp. ( $2n=50$ ,  $44m + 6 sm$ ;  $n=25$ ,  $22m + 3 sm$ ), *Trachymyrmex fuscus* Emery ( $2n=18$ ,  $16m + 2sm$ ;  $n=9$ ,  $8m + 1sm$ ), *Trachymyrmex relictus* Borgmeier ( $2n=20m$ ,  $n=10m$ ) and *Trachymyrmex* sp. ( $2n=22$ ,  $18m + 4sm$ ). A size polymorphism on a short arm of a submetacentric pair from *Trachymyrmex fuscus* was also pointed out. The possible causes of chromosomal segment duplication were discussed. All studied species of the genus *Acromyrmex* presented  $2n=38$ . Each species showed a different karyotype in relation to morphology (*A. balzani*:  $12m + 10sm + 14st + 2a$ ; *A. coronatus*:  $12m + 12sm + 12st + 2a$ ; *A. disciger*:  $10m + 12sm + 14st + 2a$ ; *A. niger*:  $12m + 18sm + 6st + 2a$ ; *A. rugosus*:  $16m + 12sm + 8st + 2a$ ; *A. echinator*:  $8m + 6sm + 14st + 10a$ ), in the distribution of heterocromatin (C banding) and GC rich regions (CMA<sub>3</sub>). For three species (*A. coronatus*, *A. disciger*, *A. niger*) the first subtelocentric pair was the bearer of ribosomal genes. *Acromyrmex* species presented stability in the number of chromosome with differences in the karyotype. The results suggest that many chromosomal rearrangements such as

translocations, growth of heterochromatin and inversion may have occurred during their differentiation, contributing to the karyotype variability found.

## **Introdução Geral**

### **Família Formicidae**

As formigas ocupam posição chave na maior parte dos ambientes terrestres e correspondem de 15 a 20% da biomassa animal terrestre, mas em regiões tropicais esse valor pode ser ainda superior (Schultz, 2000). Na Floresta Amazônica brasileira, por exemplo, a biomassa animal de formigas é quatro vezes superior à biomassa de vertebrados terrestres (Wilson & Hölldobler, 2005). Devido à complexidade da organização das colônias, as formigas são consideradas organismos modelo para estudos referentes à ecologia de comportamento e sociobiologia, particularmente em estudos relacionados à dinâmica da seleção de parentesco, interesses de conflito dentro da colônia, diferenciação de castas e divisão de trabalho (Schultz, 2000). Existem mais de 12.500 espécies descritas de formigas (Agosti & Johnson, 2005), incluídas em uma única família: Formicidae. São encontradas em todos os ambientes terrestres com exceção dos polos (Hölldobler & Wilson, 1990). São organismos eusociais, por apresentarem sobreposição de gerações, cooperação no cuidado da prole e divisão de tarefas entre os indivíduos (Wilson, 1971). Seu sistema de determinação sexual é a haplodiploidia do tipo arrenótoca em que as fêmeas são diploides e os machos haploides (Kerr, 1967; Crozier, 1979; Suomalainen & Saura, 1993; Normark, 2003; Heimpel & Boer, 2008).

### **A tribo Attini**

A agricultura é uma forma especializada de simbiose, estando presente em algumas espécies de cupins, besouros, formigas e humanos (Hölldobler & Wilson, 1990; Mueller *et al.*, 2005). A agricultura na forma da fungicultura surgiu uma única vez na família Formicidae há cerca de 50 milhões de anos (Chapela *et al.*, 1994; Schultz & Meier, 1995; Schultz & Brady, 2008). As formigas da tribo Attini são exclusivas do Novo Mundo e são encontradas entre 40° de latitude norte e 44° de latitude sul (Weber, 1966), principalmente na região neotropical com cerca de 95% das espécies da tribo Attini da região neotropical e apenas 5% da região Neártica (Mayhé-Nunes & Jaffé, 1998). Existem atualmente mais de 230 espécies descritas na tribo Attini (Schultz & Brady, 2008), agrupadas em 14 gêneros (Klingenberg & Brandão, 2009): *Acromyrmex*, *Apterostigma*, *Atta*, *Cyphomyrmex*, *Kalathomyrmex*,

*Mycetagroicus*, *Mycetarotes*, *Mycetophylax*, *Mycetosoritis*, *Mycocephurus*, *Myrmicocrypta*, *Paramycetophylax*, *Sericomyrmex* e *Trachymyrmex*, considerando *Pseudoatta* sinonímia de *Acromyrmex* (Hölldobler & Wilson, 1990). Essas formigas utilizam diferentes substratos para o cultivo do fungo simbiote do qual se alimentam e são obrigatoriamente dependentes (Hölldobler & Wilson, 1990). As Attini são consideradas monofiléticas (Chapela, *et al.*, 1994; Schultz & Meier, 1995; Schultz & Brady, 2008), porém o fungo é considerado polifilético, uma vez que a maior parte das formigas desta tribo cultiva um fungo pertencente a dois gêneros da família Lepiotaceae, além de *Apterostigma* que cultiva um fungo da família Pterulaceae (Chapela *et al.*, 1994). As Attini inferiores incluem os gêneros *Apterostigma*, *Cyphomyrmex*, *Mycetagroicus*, *Mycetarotes*, *Mycetophylax*, *Mycetosoritis*, *Mycocephurus*, *Myrmicocrypta*, os quais apresentam colônias menores, com menor longevidade e formigas inconspícuas. As Attini superiores incluem os gêneros *Atta*, *Acromyrmex*, *Trachymyrmex* e *Sericomyrmex*, os quais apresentam indivíduos de maior tamanho e as maiores colônias.

As formigas cortadeiras, gêneros *Atta* e *Acromyrmex*, são consideradas herbívoras dominantes da região neotropical (Hölldobler & Wilson, 1990). São ainda consideradas pragas agrícolas por utilizarem fragmentos vegetais, flores e sementes de plantas cultivadas para o cultivo do fungo simbiote do qual se alimentam (Della Lucia & Fowler, 1993) e apresentam grande destaque entre as pragas agrícolas e florestais da região neotropical (Della Lucia, 2003).

Estudos recentes indicam que o aumento do desmatamento contribui de maneira significativa para o aumento da densidade dos formigueiros de algumas espécies de *Atta* devido ao aumento da oferta de alimento e da diminuição dos inimigos naturais (Leal, 2008). Em ecossistemas naturais, as formigas cortadeiras são importantes na dispersão de sementes (Teixeira *et al.*, 2008), em florestas secundárias podem favorecer o crescimento de plantas devido a mudanças na estrutura física e química do solo (Moutinho, 1994). Além disso, formigas do gênero *Atta* desempenham um papel importante no sequestro de carbono e por sua possível influência na diminuição do efeito estufa (Souza-Souto *et al.*, 2008).

Informações a respeito da biologia das Attine inferiores ainda são escassas (Mahyé-Nunes, 1995; Mayhé-Nunes & Jaffé, 1998; Leal & Oliveira, 2000; Solomon *et al.*, 2004; Schultz e Brady, 2008; Lacau *et al.*, 2008). O estudo destas formigas é importante para a elucidação dos eventos relacionados às primeiras etapas da

evolução do grupo (Rabeling *et al.*, 2007). Alguns estudos evidenciam a importância ecológica destas formigas como, por exemplo, *Mycocepurus goeldii*, a qual apresenta interação com o jatobá, *Hymenaea courbaril* L. (Fabaceae: Caesalpinioideae), promovendo a limpeza das sementes, o que reduz o ataque de fungos, além de facilitar a germinação (Oliveira *et al.* 1995); *Mycocepurus goeldii* e *M. smithii* acumulam nutrientes em solos profundos que podem ser utilizados por plantas superiores ao deixarem suas câmaras (Rabeling *et al.*, 2007), o que provavelmente também ocorre com os demais gêneros.

Portanto, estudos envolvendo Attini inferiores e também os gêneros *Sericomyrmex* e *Trachymyrmex* são informativos para a melhor compreensão da fungicultura bem como para a compreensão da evolução das formigas cortadeiras.

### **Citogenética**

De acordo com White (1970), os rearranjos cromossômicos podem desempenhar papel direto na especiação, portanto, a citogenética deve ocupar um lugar central nos estudos de mecanismos de especiação. Além disso, grande número de caracteres tem sido relacionado com polimorfismos de inversões cromossômicas, como o aumento da longevidade, aumento do tamanho corporal, habilidade de competição e tempo de desenvolvimento, indicando que rearranjos cromossômicos podem alterar o *fitness* dos indivíduos (Hoffmann & Rieseberg, 2008). As duplicações cromossômicas também podem ser vantajosas porque os genes duplicados podem produzir maiores quantidades do produto gênico (Imai *et al.*, 1977; Camacho *et al.*, 1986; Futuyma, 2003). Rearranjos cromossômicos são importantes para a evolução das espécies já que a expressão gênica é regulada, pelo menos de forma parcial, pela localização dos genes vizinhos e, assim, alterações cromossômicas podem levar a alterações fenotípicas (Ridley, 2006).

Vários tipos de rearranjos estruturais dos cromossomos alteram a posição dos genes em relação uns aos outros, ainda que não haja modificação no número de cópias e variedade dos genes. Dessa forma, a expressão do gene pode ser alterada se a sua posição for mudada e acredita-se que a maior parte dos efeitos de posição seja causada pelo efeito desativador da heterocromatina (Futuyma, 2003; Alberts *et al.*, 2008).

Embora cromossomos individuais ocupem posições distintas no núcleo conhecidas como territórios cromossômicos, evidências indicam que cromossomos são estruturas dinâmicas e que regiões individuais dos cromossomos podem ser reposicionadas e, dessa forma, contribuir para a regulação da expressão gênica (Lanctôt *et al.*, 2007).

Alterações cromossômicas podem atuar como um mecanismo de isolamento reprodutivo e ser muito importantes para a evolução das espécies, o que justifica a utilização da citogenética como uma ferramenta que pode auxiliar no entendimento do processo de especiação. Dessa forma, a citogenética pode ser utilizada como uma ferramenta adicional em estudos evolutivos, filogenéticos e taxonômicos (Mac Gregor, 1993; Mariano, 2004).

Estudos citogenéticos já foram realizados em mais de 750 espécies de formigas (Lorite & Palomeque, 2010) e mostram variação cromossômica de  $2n=2$  a  $2n=120$ , *Myrmecia croslandi* Taylor (Crosland & Crozier, 1986) e *Dinoponera lucida* Emery (Mariano *et al.*, 2008), respectivamente. A Teoria da Interação Mínima (TIM) foi formulada por Imai *et al.* (1986, 1988, 1994) para explicar a evolução dos cromossomos de eucariotos, baseada na ocorrência de rearranjos cromossômicos, apoiada principalmente na hipótese de fissão cêntrica, embora outros tipos de rearranjos cromossômicos tais como inversões e fusões também sejam encontrados. Tal teoria postula que existe uma tendência de diminuição no tamanho dos cromossomos e, conseqüentemente, aumento do número cromossômico por meio de fissões e posterior crescimento de heterocromatina. Como os cromossomos se encontram arranjados em seus respectivos territórios nucleares presos pelos seus telômeros à membrana nuclear, quanto maior o tamanho do cromossomo maior a chance de ocorrência de rearranjos como translocações recíprocas, consideradas deletérias. A TIM foi baseada no estudo de mais de 500 espécies de formigas (Imai *et al.*, 1988, 1994).

Essa teoria foi ainda mais reforçada em estudos citogenéticos de espécies de *Myrmecia* do complexo *pilosula* da Austrália, que tem uma grande variabilidade cariotípica com 192 cariótipos diploides diferentes, sendo o menor número de diploides observado  $2n=2$ , e o maior  $2n=32$  (Imai *et al.*, 1994).

Informações citogenéticas podem ser muito úteis para o reconhecimento de espécies crípticas. Estudos citogenéticos em populações envolvendo apenas o número e a morfologia dos cromossomos no complexo *Pachycondyla apicalis* já são

muito representativos por evidenciarem grande variação no número cromossômico em *P. apicalis* Morfoespécie I ( $2n=36, 40$  e  $68$ ), *P. verenae* Morfoespécie I ( $2n=42, 62$ ) e *P. verenae* Morfoespécie II ( $2n=58, 64$ ). A complexidade morfológica refere-se a um mosaico de espécies e não a uma clina biogeográfica. Nesse caso, a citogenética pode ser uma importante ferramenta para auxiliar a taxonomia (Mariano *et al.*, 2006; Delabie *et al.*, 2008).

Os estudos citogenéticos na tribo Attini assim como de outras áreas do conhecimento também são bem escassos, pois existem apenas 22 espécies (25 espécies e subespécies) com a descrição do cariótipo, o que corresponde a cerca de 10% do número de espécies descritas para a tribo (Goñi *et al.*, 1983; Fadini & Pompolo, 1996; Fadini *et al.*, 1996; Santos-Colares *et al.*, 1997; Murakami *et al.*, 1998; Barros *et al.*, 2008).

O gênero *Acromyrmex* possui seis espécies estudadas citogeneticamente: três no Brasil (Fadini & Pompolo, 1996; Santos-Colares *et al.*, 1997, Barros *et al.*, 2008) e três no Uruguai (Goñi *et al.*, 1983). Todas apresentaram o mesmo número cromossômico,  $2n=38$ , com exceção da parasita social *Acromyrmex ameliae*, que apresentou  $2n=36$  (Barros *et al.*, 2008). A diferença no número cromossômico pode ser consequência da fusão de cromossomos. Os gêneros *Atta* e *Apterostigma* possuem cada um três espécies estudadas; *Cyphomyrmex*, *Trachymyrmex* e *Mycetarotes* possuem duas espécies estudadas enquanto *Mycocepurus* e *Sericomyrmex* possuem cada um apenas uma espécie com cariótipos conhecidos. Os gêneros *Mycetosoritis*, *Mycetophylax*, *Mycetagroicus* e *Myrmicocrypta* não apresentam informações citogenéticas. A Tabela 1 apresenta dados citogenéticos da tribo Attini.

Tabela 01 – Espécies da tribo Attini estudadas citogeneticamente (segundo Pompolo & Mariano, 2003, modificado).

Gênero	Espécie	2n	Referência
<i>Mycocepurus</i>	<i>Mycocepurus sp.</i>	8	Murakami <i>et al.</i> (1998)
<i>Apterostigma</i>	<i>A. mayri</i>	24	Murakami <i>et al.</i> (1998)
	<i>Apterostigma sp.</i>	24	Murakami <i>et al.</i> (1998)
	<i>Apterostigma sp.</i>	20	Fadini & Pompolo (1996)
<i>Mycetarotes</i>	<i>M. carinatus</i>	14	Fadini <i>et al.</i> (1996)
	<i>M. parallelus</i>	54	Fadini <i>et al.</i> (1996)
<i>Cyphomyrmex</i>	<i>C. rimosus</i>	32	Murakami <i>et al.</i> (1998)
	<i>C. costatus</i>	20	Murakami <i>et al.</i> (1998)
<i>Sericomyrmex</i>	<i>S. amabilis</i>	50	Murakami <i>et al.</i> (1998)
<i>Trachymyrmex</i>	<i>Trachymyrmex sp. 1</i>	12	Murakami <i>et al.</i> (1998)
	<i>Trachymyrmex sp. 2</i>	18	Murakami <i>et al.</i> (1998)
	<i>T. septentrionalis</i>	20	Murakami <i>et al.</i> (1998)
<i>Acromyrmex</i>	<i>A. ambiguus</i>	38	Goñi <i>et al.</i> (1983)
	<i>A. hispidus</i>	38	Goñi <i>et al.</i> (1983)
	<i>A. (Moellerius) heyeri</i>	38	Goñi <i>et al.</i> (1983) Santos-Colares <i>et al.</i> (1997)
	<i>A. crassipinus</i>	38	Fadini & Pompolo (1996)
	<i>A. subterraneus</i>	38	Fadini & Pompolo (1996)
	<i>molestans</i>		
	<i>A. subterraneus</i>	38	Fadini & Pompolo (1996)
	<i>subterraneus</i>		Barros <i>et al.</i> (2008)
	<i>A. subterraneus</i>	38	Barros <i>et al.</i> (2008)
	<i>brunneus</i>		
<i>A. ameliae</i>	36	Barros <i>et al.</i> (2008)	
<i>Atta</i>	<i>A. bisphaerica</i>	22	Fadini & Pompolo (1996)
	<i>A. colombica</i>	22	Murakami <i>et al.</i> (1998)
	<i>A. laevigata</i>	22	Fadini & Pompolo (1996)
	<i>A. sexdens rubropilosa</i>	22	Fadini & Pompolo (1996)
	<i>A. sexdens piriventris</i>	22	Santos-Colares <i>et al.</i> (1997)

As técnicas de bandamento cromossômico são de fundamental importância por possibilitarem a localização específica de determinadas regiões cromossômicas, o que não seria possível utilizando-se apenas a coloração convencional (Sumner, 2003). Além disso, os bandamentos cromossômicos podem ser muito úteis na análise de espécies com cariótipos muito semelhantes quanto ao número e morfologia, pois podem revelar diferenças significativas que não seriam identificadas apenas com a coloração convencional com Giemsa.

A heterocromatina se caracteriza normalmente por apresentar pouca ou nenhuma atividade gênica, alta condensação e a maior parte dela conter grande concentração de DNA repetitivo. Esse DNA pode variar na sua composição, sendo rico em pares AT ou pares GC, e também em comprimento. A heterocromatina pode ser encontrada em qualquer parte dos cromossomos como em regiões intersticiais, mas ocorre principalmente em centrômeros, telômeros e NORs (Sumner, 2003).

A banda C é uma técnica empregada na identificação de heterocromatina constitutiva. Devido ao fato de esta ser uma região mais condensada da cromatina, ela não é facilmente removida quando submetida ao tratamento com BSG (Hidróxido de Bário/Solução Salina/Giemsa) mostrando-se mais corada em relação à eucromatina (Sumner, 1972). O estudo e a caracterização da heterocromatina têm grande importância nos estudos citogenéticos da família Formicidae devido à sua participação central na evolução cromossômica do grupo (Imai *et al.*, 1986, 1994).

Estudos envolvendo o bandamento C em espécies de Attini são restritos aos gêneros *Atta*, *Apterostigma*, *Cyphomyrmex*, *Sericomyrmex* e *Trachymyrmex*: *Atta colombica*, *Sericomyrmex amabilis* e *Trachymyrmex* sp. 1 apresentam heterocromatina centromérica e intersticial (Murakami *et al.*, 1998); *Cyphomyrmex costatus* e *Apterostigma mayri* apresentam heterocromatina centromérica (Murakami *et al.*, 1998); já a parasita social *Acromyrmex meliae* e suas hospedeiras *Acromyrmex subterraneus subterraneus* e *Acromyrmex subterraneus brunneus* apresentam heterocromatina nos braços curtos de alguns cromossomos, além de heterocromatina centromérica em alguns cromossomos metacêntricos (Barros *et al.*, 2008).

Os fluorocromos são corantes que fluorescem quando excitados por luz de um comprimento de onda específico. Estas substâncias se ligam ao DNA que são classificadas de acordo com a especificidade dos pares de bases separando-os em duas categorias: AT e GC específicos (Schweizer, 1980; Sumner, 1990, 2003). O

fluorocromo Chromomicina A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>) se liga a regiões ricas em pares GC, enquanto o 4'6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), a regiões ricas em pares AT. O CMA<sub>3</sub> já foi utilizado em cromossomos de algumas formigas como *Tapinoma nigerrimum* (Nylander) (Lorite *et al.*, 1997), *Dinoponera lucida* (Mariano *et al.*, 2008), *Wasmannia auropunctata* (Roger) (Souza, 2007), *Acromyrmex ameliae* e suas hospedeiras (Barros *et al.*, 2008), as quais apresentam marcação em apenas um par de cromossomos para o referido fluorocromo. *Tapinoma nigerrimum* (Lorite *et al.*, 1997) e *D. lucida* (Mariano *et al.*, 2008) apresentaram o padrão do fluorocromo CMA<sub>3</sub> coincidindo com a localização da NOR, assim como ocorre para a maioria dos eucariotos (Reed & Phillips, 1995). O fluorocromo DAPI não apresentou um padrão específico nos cromossomos de formigas, mas se mostra negativo nas regiões ricas em pares GC, mostrando a complementaridade dos dois fluorocromos. Em *W. auropunctata*, porém, foram observadas marcações na região centromérica da maioria dos cromossomos (Souza, 2007).

A técnica de FISH - hibridização *in situ* por fluorescência - constitui uma técnica de citogenética molecular usada para identificar regiões específicas do genoma dos organismos pela utilização de uma sonda previamente conhecida. Sondagens de rDNA são bastante empregadas em estudos citogenéticos de diferentes organismos (Guerra, 2004). No entanto, a técnica de FISH ainda não foi aplicada aos cromossomos de nenhuma espécie da tribo Attini.

## **2 – Objetivos**

### **Objetivo Geral**

Estudar citogeneticamente espécies do gênero *Acromyrmex* e de outros gêneros da tribo Attini com o intuito de enriquecer os conhecimentos sobre a evolução cromossômica da tribo e também sobre a diversidade de formigas Neotropicais.

### **Objetivos Específicos**

- Descrever os cariótipos de espécies da tribo Attini por meio do estudo do número e morfologia dos cromossomos;

- Comparar os cariótipos das espécies do presente trabalho com os das espécies já estudadas;
- Estudar a localização e composição da heterocromatina em espécies do gênero *Acromyrmex* por meio das técnicas de bandamento cromossômico - Banda C e os fluorocromos CMA<sub>3</sub> e DAPI, respectivamente – para melhor entendimento da evolução cromossômica deste grupo;
- Localizar sítios rDNA 45S pela técnica de FISH de espécies do gênero *Acromyrmex*.

## Referências Bibliográficas

- Agosti D and Johnson N F Editors. (2005) Antbase. World Wide Web electronic publication. antbase.org, version (05/2005). Acesso em 18 março de 2010.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Johnson A, Raff M, Roberts K, Walter P and Hopkin K (2008) Fundamentos de Biologia Celular. 2ª edição. Editora Artmed, Porto Alegre, RS, Brasil, 864 pp.
- Barros LAC, Mariano CSF, Delabie JHC and Pompolo SG 2009. Hsc-FA and NOR bandigs on chromosomes of the giant ant *Dinoponera lucida* Emery, 1901 (Hymenoptera: Formicidae). Comparative Cytogenetics 2:
- Barros LAC, Mariano CSF, Hora RR, Della-Lucia TMC, Delabie JHC and Pompolo SG (2008) 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, 2008, Salvador-BA (Brasil): 351.
- Camacho JPM, Navas-Castillo J and Cabrero J (1986) Extra nucleolar activity associated with presence of a supernumerary chromosome segment in the grasshopper *Oedipoda fuscocincta*. Heredity 56: 237-241.
- Chapela IH, Rehner SA, Schultz TR and Mueller UG (1994) Evolutionary history of the symbiosis between fungus-growing ants and their fungi. Science 226: 1691-1694.
- Crosland MWJ and Crozier RH (1986) *Myrmecia pilosula*, an ant with only one pair of chromosome. Science 231: 1278.
- Crozier RH (1979) Evolutionary genetics of the Hymenoptera. Annu Rev Entomol 22: 263-288.
- Delabie JHC, Mariano CSF, Mendes L F, Pompolo SG and Fresneau D (2008) Problemas apontados por estudos morfológicos, ecológicos e citogenéticos no gênero *Pachycondyla* na região neotropical: o caso do complexo apicalis. In: Santos IA, Vilela EF, Schoereder HH, Lino Neto J, Campos LAO and Serrão JE

- (eds) Insetos Sociais: da Biologia à Aplicação. 1ª edição. Editora UFV, Viçosa, MG, Brasil, pp 197-222.
- Della Lucia TMC and Fowler HG (1993) As formigas cortadeiras. In: Della Lucia TMC (ed) As formigas cortadeiras. Editora da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil, pp 1-3.
- Della Lucia TMC (2003) Hormigas de importancia económica en la región Neotropical. In: Fernández F (org) Introducción a las hormigas de la región Neotropical. 1ª edição. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Bogotá, pp 337-349.
- Fadini MAM and Pompolo SG (1996) Cytogenetics of some ant species of the tribe Attini (Hymenoptera, Formicidae) from the region of Viçosa, MG. Rev Bras Genet 19: 53-55.
- Fadini MAM, Mayé-Nunes AJ and Pompolo SG (1996) Citogenética de duas espécies do gênero *Mycetarotes* (Hymenoptera: Formicidae). XLII Congresso Nacional de Genética, Caxambu, MG (Brasil): 126.
- Futuyma DJ 2003. Biologia Evolutiva. 2ª edição. Sociedade Brasileira de Genética/CNPq, Ribeirão Preto, 631 pp.
- Goñi G, Zolessi LC and Imai HT (1983) Karyotype of thirteen ant species from Uruguay (Hymenoptera - Formicidae). Caryologia 36: 363-371
- Guerra M (2004) FISH: Conceitos e Aplicações na Citogenética. 3ª edição. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, Brasil, 184 pp.
- Heimpel GE and Boer JG (2008) Sex determination in the Hymenoptera. Annu Rev Entomol 53: 209–230.
- Hoffmann AA and Rieseberg LH (2008) Revisiting the impact of inversions in evolution: from population genetic markers to drivers of adaptive shifts and speciation? Annu Rev Ecol Evolution Syst 39: 21-42.
- Hölldobler B and Wilson EO (1990) The Ants. Harvard University Press, USA, 732 pp.

- Imai HT, Crozier RH and Taylor RW (1977) Karyotype evolution in Australian ants. *Chromosoma* 59: 341-393.
- Imai HT, Maruyama T, Gojobori T, Inoue Y and Crozier RH (1986) Theoretical bases for karyotype evolution. The minimum interaction hypothesis. *Am Nat* 128: 900-920.
- Imai H, Taylor RW, Crosland MW and Crozier RH (1988) Modes of spontaneous chromosomal mutation and karyotype evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis. *Japan J Genet* 63: 159-185.
- Imai HT, Taylor RW and Crozier RH (1994) 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.
- Kerr WE (1967) Genetic structure of the populations of Hymenoptera. *Cien Cult* 19: 39-44.
- Klingenberg K and Brandão CRF (2009) Revision of the fungus-growing ant genera *Mycetophylax* Emery and *Paramycetophylax* Kusnezov rev. stat., and description of *Kalathomyrmex* n. gen. (Formicidae: Myrmicinae: Attini). *Zootaxa* 2052: 1-31.
- Lacau LSR, Villemant C, Bueno OC, Delabie JHC and Lacau S (2008) Morphology of the eggs and larvae of *Cyphomyrmex transversus* Emery (Formicidae: Myrmicinae: Attini) and a note on the relationship with its symbiotic fungus. *Zootaxa* 1923: 37-54.
- Lanctôt C, Cheutin T, Cremer M and Cacalli G (2007) Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions. *Nat Rev Genet* 8: 104-115.
- Leal IR and Oliveira PS (2000) Foraging ecology of attine ants in a Neotropical savanna: seasonal use of fungal substrate in the cerrado vegetation of Brazil. *Insect Soc* 47: 376-382.

- Leal IR (2008) Menos florestas, mais formigas. *Cien Hoje* 43: 60-61.
- Lorite P, Aránega AE, Luque F, Palomeque T (1997) Analysis of the nucleolar organizing regions in the ant *Tapinoma nigerrimum* (Hymenoptera, Formicidae). *Heredity* 78: 578-582.
- Lorite P and Palomeque T (2010) Karyotype evolution in ants (Hymenoptera: Formicidae), with a review of the known ant chromosome numbers. *Myrmecol News* 13: 89-102.
- Mac Gregor HC (1993) Karyology and evolution In: An introduction to animal cytogenetics. 1st ed. London. Chapman & Hall, pp 13-28.
- Mayhé-Nunes AJ and Jaffé K (1998) On the Biogeography of Attini (Hymenoptera: Formicidae). *Ecotrópicos* 11: 45-54.
- Mayhé-Nunes AJ (1995) Sinopse do gênero *Mycetarotes* Emery (Hymenoptera, Formicidae), com a descrição de duas espécies novas. *Bol Entomol Venez* 10: 197-205.
- Mariano CSF (2004) Evolução cariotípica em diferentes grupos de Formicidae. Tese. (Doutorado em Entomologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Brasil 205 pp.
- Mariano CSF, Pompolo SG, Barros LAC, Mariano-Neto, E, Campiolo S, Delabie JHC (2008) A biogeographical study of the threatened ant *Dinoponera lucida* Emery (Hymenoptera: Formicidae: Ponerinae) using a cytogenetic approach. *Insect Conserv Diversity* 1: 161-168.
- Mariano CSF, Pompolo SG, Lacau S, Delabie JHC (2006) Questions sur la monophylie du taxon *Pachycondyla* Smith, 1858: approche cytogénétique sur le sous-genre *Pachycondyla* sensu Emery, 1901 (Hymenoptera: Formicidae: Ponerinae). *Bull Soc Ent Fr* 111: 299-304.
- Moutinho PRS (1995) Acabar com a saúva, mas nem tanto. *Cien Hoje* 18(106): 10-11.

- Mueller UG, Gerardo NM, Aanen DK, Six DL and Schultz TR (2005) The evolution of agriculture in insects. *Annu Rev Ecol Evolution Syst* 36: 563-595.
- Murakami T, Fujiwara A, Yoshida MC (1998) Cytogenetics of ten ant species of the tribe Attini (Hymenoptera, Formicidae) in Barro Colorado Island, Panama. *Chromosome Sci* 2: 135-139.
- Normark BB (2003) The evolution of the major genetic systems of insects. *Annu Rev Entomol* 48: 397-423.
- Oliveira PS, Pedroni F, Morellato LPC, Galetti M (1995) Seed cleaning by *Mycocepurus goeldii* ants (Attini) facilitates germination in *Hymenaceae courbaril* (Caesalpinaceae). *Biotropica* 27: 518-522.
- Pompolo SG and Mariano CSF (2003) Considerações citogenéticas sobre a condição derivada da tribo Attini (Formicidae: Myrmicinae). *Anais do XVI Simpósio de Mirmecologia*. Florianópolis, SC: 267-270.
- Rabeling C, Verhaagh M, Engels W (2007) Comparative study of nest architecture and colony structure of the fungus-growing ants, *Mycocepurus goeldii* and *M. smithii*. 13 pp. *J Insect Sci* 7: 40.
- Reed KM and Phillips RB Molecular cytogenetic analysis of the Double-CMA3 chromosome of lake trout, *Salvelinus namaycush*. *Cytogenetic Cell Genetic* 70: 104-107.
- Ridley M (2006) *Genética Molecular e Mendeliana*. In: *Evolução*. 3ª edição. Artmed, Porto Alegre, Brasil, pp 45-65.
- Santos-Colares MC, Viégas J, Martino MGR and Loeck AE (1997) Preparation of mitotic chromosomes of leaf-cutting ants from the genera *Atta* and *Acromyrmex*. *Braz J Genet* 20: 25-27.
- Schweizer D (1980) Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA/DAPI-bands) in human chromosomes. *Cytogenetics and Cell Genetics* 27: 190-193.
- Schultz TR (2000) In search of ant ancestors. *Commentary PNAS* 26: 14028-14029.

- Schultz TR and Brady SG (2008) Major evolutionary transitions in ant agriculture. PNAS 105: 5435–5440.
- Schultz TR and Meier R (1995) A phylogenetic analysis of the fungus-growing ants (Hymenoptera: Formicidae: Attini) based on morphological characters of the larvae. Systematic Entomol 20: 337-370.
- Solomon SE, Mueller UG, Schultz TR, Currie CR, Price SL, Silva-Pinhati ACO, Bacci M Jr, Vasconcelos HL (2004) Nesting biology of the fungus growing ants *Mycetarotes* Emery (Attini, Formicidae). Insect Soc 51: 333–338.
- Suomalainen E and Saura A (1993) Patterns of reproduction in insects. In: Wrensch DL and Ebbert MA (eds). Evolution and diversity of sex ratio in insects and mites. Chapman and Hall, Inc, NY, pp 100-117.
- Souza ALB (2007) Estudos genéticos e comportamentais em espécies de *Wasmannia* (Hymenoptera: Formicidae). Tese (Doutorado em Entomologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Brasil 61pp.
- Souza-Souto L, Schaefer CEGR, Schoereder JH and Lima ER (2008) Sequestro de carbono por saúvas e sua possível influência na diminuição do efeito estufa. In: Santos IA, Vilela EF, Schoereder HH, Lino Neto J, Campos LAO and Serrão JE (eds) Insetos Sociais: da Biologia à Aplicação. 1ª edição. Editora UFV, Viçosa, MG, Brasil, pp 359- 367.
- Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin Exp Cell Res 83: 438-442.
- Sumner AT (1990) Chromosome Banding. Uniwin Hyman, London, 434 pp.
- Sumner AT (2003) Chromosomes: Organization and Function. Blackwell Publishing. North Berwick, United Kingdom. 287 pp.
- Teixeira MC, Santos IA and Schoereder JH (2008) *Atta robusta*, endemismo, extinção ou ausência de estudos? In: Insetos Sociais: da Biologia à Aplicação. In: Santos IA, Vilela EF, Schoereder HH, Lino Neto J, Campos LAO and Serrão JE

(eds) *Insetos Sociais: da Biologia à Aplicação*. 1ª edição. Editora UFV, Viçosa, MG, Brasil, pp 359- 367.

Weber NA (1966) Fungus-growing ants. *Science* 153: 587-604.

Wilson EO (1971) *The insect societies*. Cambridge, Harvard Univ. Press. 548 pp.

Wilson EO and Hölldobler B (2005) The rise of the ants: A phylogenetic and ecological explanation. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 7411-7414.

White MJD (1970) Cytogenetics of speciation. *J Aust Entomol* 9: 1-6.

## Capítulo 1

---

**Estudos citogenéticos de seis espécies da tribo Attini (Formicidae: Myrmicinae) com a descrição de um polimorfismo cromossômico para *Trachymyrmex fuscus***

## **Estudos citogenéticos de seis espécies da tribo Attini (Formicidae: Myrmicinae) com a descrição de um polimorfismo cromossômico para *Trachymyrmex fuscus***

### **Resumo**

Estudos citogenéticos na família Formicidae já foram desenvolvidos em mais de 750 espécies de formigas e evidenciam a citogenética como importante ferramenta em estudos evolutivos e taxonômicos. Na tribo Attini, foram estudadas cerca de 10% das espécies descritas. O objetivo deste trabalho foi a descrição citogenética dos cromossomos de algumas espécies desta tribo, todas coletadas em Minas Gerais – Brasil. Os cariótipos observados foram: *Sericomyrmex* sp. ( $2n=50$ ,  $44m + 6sm$ ;  $n=25$ ,  $22m + 3sm$ ), *Trachymyrmex fuscus* Emery ( $2n=18$ ,  $16m + 2sm$ ;  $n=9$ ,  $8m + 1sm$ ), *Trachymyrmex relictus* Borgmeier ( $2n=20m$ ), *Trachymyrmex* sp. ( $2n=22$ ,  $18m + 4sm$ ), *Apterostigma madidiense* Weber ( $n=23$ ,  $7m + 10sm + 5st + 1a$ ) e *Apterostigma steigeri* Santschi ( $2n=22$ ,  $20m + 2sm$ ). A maior parte das espécies apresentou baixo número cromossômico ( $n \leq 12$ ), com exceção de *Sericomyrmex* sp. e *Apterostigma madidiense*. *Trachymyrmex fuscus* apresentou polimorfismo de tamanho no braço curto do par submetacêntrico. Foram observados indivíduos heterozigotos HB (com diferença de tamanho entre os braços curtos), padrão HH (braços curtos menores) e homozigotos BB (braços curtos maiores). A técnica de Banda C evidenciou que a diferença de tamanho observada foi na região eucromática do braço curto de um ou dos dois cromossomos homólogos. As possíveis causas da duplicação do segmento cromossômico são discutidas.

## Introdução

A tribo Attini é composta por um grupo monofilético de formigas que surgiu há cerca de 50 milhões de anos (Chapela *et al.*, 1994; Schultz & Meier, 1995; Mueller *et al.*, 1998; Schultz & Brady, 2008; Mehdiabadi & Schultz, 2009), tendo uma relação simbiótica com o fungo cultivado para sua alimentação (Weber, 1966). É exclusiva do Novo Mundo e encontrada principalmente na região neotropical (Mayhé-Nunes & Jaffé, 1998). Estas formigas estão agrupadas em 14 gêneros (Klingenberg & Brandão, 2009), havendo mais de 230 espécies descritas (Schultz & Brady, 2008, Mehdiabadi & Schultz, 2009).

A maior parte dos dados sobre história natural e ecologia é referente às Attini superiores (Mayhé-Nunes & Jaffé, 1998; Leal & Oliveira, 2000; Schultz & Brady, 2008; Mehdiabadi & Schultz, 2009), que incluem os gêneros *Atta*, *Acromyrmex*, *Trachymyrmex* e *Sericomyrmex*. A maior parte deles refere-se às formigas cortadeiras (*Acromyrmex* e *Atta*), em função dos prejuízos econômicos causados por estas formigas quando atacam plantas cultivadas, sendo que a maioria dos outros gêneros permanece na obscuridade (Lattke, 1999). A dificuldade de se estudar e, principalmente, de coletar ninhos das Attini inferiores (composto pelos demais 10 gêneros) se deve principalmente ao fato de os ninhos serem inconspícuos, pequenos e às vezes localizados em câmaras profundas no solo (Araújo *et al.*, 2002; Mackay *et al.*, 2004; Hernandez-Marín, *et al.*, 2005; Rabeling *et al.*, 2007; Rabeling *et al.*, 2009).

Os gêneros *Trachymyrmex* e *Sericomyrmex* podem apresentar colônias maiores com algumas milhares de operárias e aumento de tamanho dos indivíduos, diferentemente do observado nas Attini inferiores, que normalmente apresentam algumas dezenas de operárias. *Trachymyrmex* é provavelmente o mais derivado das Attini monomórficas, pois algumas espécies apresentam algum polimorfismo de tamanho entre as operárias. Portanto, é um grupo chave na compreensão das relações filogenéticas dos Attini superiores por ser considerado um dos mais próximos das formigas cortadeiras (Brandão & Mayhé-Nunes 2007; Schultz & Brady, 2008).

Estudos citogenéticos na família Formicidae já foram desenvolvidos em mais de 750 espécies de formigas (Lorite & Palomeque, 2010) e, assim como para outros organismos, evidenciam sua grande importância em estudos evolutivos e taxonômicos (Imai *et al.*, 1994; Mariano, 2004; Delabie *et al.*, 2008; Lorite &

Palomeque, 2010). Observa-se uma grande variação no número cromossômico das formigas, sendo que *Myrmecia croslandi* Taylor (Crosland & Crozier, 1986) e *Dinoponera lucida* Emery (Mariano *et al.*, 2008) apresentam os dois extremos dessa variação,  $2n=2$  e 120 cromossomos, respectivamente. *Dinoponera lucida* apresenta, inclusive, o maior número cromossômico da ordem Hymenoptera (Mariano *et al.*, 2004; Mariano *et al.*, 2008).

De acordo com a Teoria da Interação Mínima (Imai *et al.*, 1994), existe uma tendência à ocorrência de fissões cêtricas, havendo, dessa forma, aumento do número e, conseqüentemente, diminuição do tamanho dos cromossomos. Embora as fissões tenham um papel importante na evolução do cariótipo em formigas, vários rearranjos já foram relatados, tais como inversões, translocações, fusão de cromossomos e cromossomos supranumerários (revisado em Lorite & Palomeque, 2010).

Estudos citogenéticos na tribo Attini foram desenvolvidos até o momento em 23 espécies (26 espécies e subespécies), com informações de pelo menos o número e a morfologia dos cromossomos, o que corresponde a cerca de 10% do número total de espécies descritas (Goñi *et al.* 1983; Fadini & Pompolo 1996; Fadini *et al.*, 1996; Santos-Colares *et al.*, 1997; Murakami *et al.*, 1998; Pompolo & Mariano, 2003; Barros *et al.*, 2008; Barros *et al.*, no prelo). A variação no número cromossômico observada na tribo é de  $2n=8-50$  cromossomos em *Mycocepurus* sp. (Murakami *et al.* 1998) e *Mycocepurus goeldii* (Forel) (Barros *et al.*, no prelo); e em *Mycetarotes paralellus* Emery (Fadini *et al.*, 1996), respectivamente.

O estudo citogenético da tribo Attini contribuirá para a melhor compreensão da evolução cromossômica do grupo e, assim, é importante aumentar o número de espécies estudadas para fornecer subsídios para estudos comparativos posteriores. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi estudar citogeneticamente seis espécies da tribo Attini incluídas nos gêneros *Apterostigma*, *Trachymyrmex* e *Sericomyrmex*.

## **Material e Métodos**

Estudos citogenéticos foram realizados em *Sericomyrmex* sp., *Trachymyrmex relictus* Borgmeier, *Trachymyrmex* sp., *Trachymyrmex fuscus* Emery, *Apterostigma steigeri* Santschi e *Apterostigma madidiense* Weber, coletadas em Viçosa – MG

(20°41'20"S - 20°49'35"S; 42°49'36"W - 42°54'27"W) e Paraopeba – MG (19°17'S 44°29'W) (Tabela 1).

As formigas foram mantidas em câmara de incubação (B.O.D.) a 25°C no Laboratório de Citogenética de Insetos da Universidade Federal de Viçosa. As metáfases foram obtidas de acordo com o protocolo de Imai *et al.* (1988) utilizando-se gânglios cerebrais ou testículos de larvas pós defecantes. Os gânglios cerebrais foram mantidos em solução de citrato e colchicina por uma hora e trinta minutos, para acumular maior número de metáfases. Foram analisadas pelo menos 10 metáfases por indivíduo, as quais foram coradas com Giemsa 4%, observadas e fotografadas, usando-se um microscópio BX 60 com objetivas de 100X, acoplado a um sistema de captura de imagens Q Color 3 Olympus<sup>®</sup>. A técnica de banda C foi aplicada aos cromossomos de *T. fuscus* e *T. relictus* para localização de heterocromatina, de acordo com Sumner (1972), com adaptações propostas por Pompolo & Takahashi (1990). O cariótipo foi montado em ordem decrescente de tamanho alinhando-se os cromossomos na base do braço longo, seguindo-se a classificação de Levan *et al.* (1964) que considera a razão de braços dos cromossomos ( $r$ ). Dessa forma, os cromossomos foram classificados em metacêntricos ( $m$ ,  $r=1-1,7$ ), submetacêntricos ( $sm$ ,  $r=1,7-3$ ), subtelocêntricos ( $st$ ,  $r=3-7$ ) e acrocêntricos ( $a$ ,  $r >7$ ). Os programas utilizados foram o Corel Photopaint 9<sup>®</sup> para a montagem dos cariótipos e o Image Pro Plus<sup>®</sup> para a medição dos cromossomos.

Foi aplicado o teste  $t$  para testar uma possível diferença estatística de tamanho entre os braços do par de cromossomos submetacêntricos de *T. fuscus*. Foi usado um total de 20 indivíduos de duas colônias (uma com 16 e outra com quatro indivíduos, sendo um deles macho) e feitas as medidas em 10 metáfases por indivíduo no par submetacêntrico. Foi comparada a média dos braços curtos entre os homólogos assim como a média dos braços longos para identificar nos cromossomos o local da diferença.

Foi feita a análise de variância (ANOVA) usando-se as razões médias do par submetacêntrico (braço longo/braço curto) dos indivíduos que não apresentaram diferença de tamanho entre os braços curtos do par submetacêntrico, cujas médias foram comparadas pelo teste de Tukey. Foi aplicado o teste Dunnet para identificar os grupos de indivíduos discriminados pelo teste Tukey, que poderiam ser do tipo padrão (braços curtos menores) ou braços curtos maiores, através da comparação

com um parâmetro (indivíduo 1/Colônia 1), o qual era heterozigoto e, assim, apresentava os braços curtos dos homólogos com tamanhos diferentes. Foram usadas as razões dos braços do par submetacêntrico de 10 metáfases por indivíduo para os testes acima mencionados. O valor da significância nos testes estatísticos adotada foi de  $P \leq 0,05$ , e o programa utilizado foi o SigmaStat<sup>®</sup> 3.0 (Systat Software Inc.).

Para *T. fuscus*, o cromossomo metacêntrico padrão foi identificado pela letra H e o cromossomo que apresentou diferença de tamanho em relação ao padrão B, seguindo a nomenclatura adotada por Palomeque *et al.*, (1993). Portanto, os indivíduos podem ser: heterozigotos HB (com diferença de tamanho entre os braços curtos), padrão HH (braços curtos menores) e homozigotos BB (braços curtos maiores).

Espécimes adultos foram identificados pelo Dr. Jacques H. C. Delabie e depositados na coleção do Laboratório de Mirmecologia do Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC/Brasil) e tombados sob o número #5570. Adicionalmente, operárias de *Sericomyrmex* sp. e *Trachymyrmex* sp. foram depositadas no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo.

## Resultados e Discussão

A variação no número cromossômico observada para as diferentes espécies foi de  $2n=18-50$ , em *T. fuscus* e *Sericomyrmex* sp., respectivamente (Tabela 1). A maior parte das espécies apresentou baixo número cromossômico ( $n \leq 12$ , Imai *et al.* 1988) com exceção de *Sericomyrmex* sp. e *A. madiense*, que apresentaram  $2n=50$  e  $n=23$  cromossomos, respectivamente.

### Gênero *Sericomyrmex*

O número cromossômico observado para *Sericomyrmex* sp. foi  $2n=50$  (Figura 1a-b). O gênero *Sericomyrmex* possui 18 espécies descritas e apenas uma espécie estudada citogeneticamente: *Sericomyrmex amabilis* (Murakami *et al.*, 1998).

Embora não tenha sido identificada em nível de espécie, a referida população estudada corresponde certamente a uma espécie diferente de *S. amabilis*, (Delabie, comunicação pessoal).

*Sericomyrmex* sp. e *S. amabilis* estão separadas por mais de 5000 km de distância e apresentam o mesmo número cromossômico e morfologia semelhante. Embora Murakami *et al.* (1998) considerem todos os cromossomos de morfologia metacêntrica, os de menor tamanho estão pouco visíveis para caracterizá-los como tal, havendo, porém, semelhança entre os de maior tamanho.

Estudos citogenéticos são necessários para verificar se o número cromossômico ( $2n=50$  cromossomos) se mantém nas diferentes espécies ou em grupos de espécies do gênero *Sericomyrmex*.

#### Gênero *Trachymyrmex*

Foram estudadas as espécies *T. fuscus* (Figura 2), *T. relictus* (Figura 3a-c) e *Trachymyrmex* sp. (Figura 3d).

As três espécies estudadas apresentaram a maior parte dos cromossomos com morfologia metacêntrica e apenas alguns submetacêntricos: um e dois pares em *T. fuscus* e *Trachymyrmex* sp., respectivamente. *Trachymyrmex relictus* (Figura 3a) apresentou constrição secundária no quinto par de cromossomos nas fêmeas e nos machos (Figura 3b), o que sugeriu ser este par o portador da região organizadora de nucléolo (NOR). O resultado de banda C mostrou a presença de heterocromatina centromérica em todos os cromossomos de *T. fuscus* (Figura 2e) e também de *T. relictus* (Figura 3c).

O gênero *Trachymyrmex* possui 47 espécies descritas. Murakami *et al.* (1998) estudaram citogeneticamente três táxons: *Trachymyrmex* sp. 1 ( $2n=12$  cromossomos), *Trachymyrmex* sp. 2 ( $2n=18$  cromossomos) e *Trachymyrmex septentrionalis* ( $2n=20$  cromossomos), que apresentou um cariótipo semelhante ao de *T. relictus*, do presente trabalho.

Polimorfismo cromossômico é a existência de duas ou mais formas diferentes para o mesmo cromossomo. De acordo com White (1973), é possível encontrar polimorfismos cromossômicos em quase todas as populações naturais, podendo ou não ocorrer em diferentes populações. Os polimorfismos cromossômicos podem apresentar importante significado evolutivo.

Foi observada diferença de tamanho significativa entre os homólogos do par submetacêntrico em *T. fuscus* (Tabela 2), o que confirmou a presença de um polimorfismo de tamanho no braço curto deste par de cromossomos (Figura 2). Os

indivíduos heterozigotos foram denominados HB. Foi ainda constatada diferença significativa entre os indivíduos que apresentam os homólogos de mesmo tamanho, indicando que estes indivíduos não são todos iguais, havendo indivíduos HH e BB. Foi possível discriminar estes dois grupos cromossômicos - os da colônia 1 e os da colônia 2 (Tabelas 3 e 4). Nenhum dos indivíduos analisados na colônia 1 apresentou-se BB comparando-os com o indivíduo parâmetro (indivíduo 1 da colônia 1). Uma das fêmeas da colônia 2 e o macho apresentaram os homólogos maiores sendo, portanto, BB e B, respectivamente (Tabelas 5 e 6). Dessa forma, foi possível discriminar indivíduos heterozigotos HB (com diferença de tamanho entre os braços curtos) (Figura 2b), padrão HH (braços curtos menores) (Figura 2a), e também homozigotos BB (braços curtos maiores) (Figura 2c), confirmando as observações citológicas.

Cerca da metade dos indivíduos observados na colônia 1 (56,25%), apresentou o par heterozigoto (Tabela 2). Acredita-se que a rainha da colônia era heterozigota e o macho apresentava o cromossomo sem aumento de tamanho, uma vez que foram observados indivíduos normais e heterozigotos na colônia 1 (Tabelas 1-3). A probabilidade de se encontrar tal fenótipo é, pelo menos em teoria, de 50%, caso o polimorfismo não diminuía o *fitness* dos heterozigotos. Para a colônia 2 em que foram observados heterozigotos e homozigotos, além de um macho portador do cromossomo de maior tamanho (Figura 2d, Tabela 4), acredita-se que a rainha era heterozigota e o macho portador do cromossomo de maior tamanho (B). Estes resultados corroboram esta espécie como monogínica e monândrica (Villesen *et al.*, 2002; Mehdiabadi & Schultz, 2009).

A duplicação em *tandem* devido ao *crossing-over* desigual (Futuyma, 2003) pode ter originado este tipo de polimorfismo (Figura 2). Outra possibilidade que não pode ser descartada é o surgimento do polimorfismo por translocação entre cromossomos homólogos (Imai *et al.*, 1977), ou mesmo entre cromossomos não homólogos, o que em termos práticos resulta neste tipo de polimorfismo observado. As diferentes situações podem originar um cromossomo portador de uma duplicação em *tandem* para um ou mais locos e outro com deficiência.

As duplicações podem ser fixadas nas populações e até mesmo ser vantajosas porque os genes duplicados podem produzir maiores quantidades do produto gênico (Imai *et al.*, 1977; Camacho *et al.*, 1986; Futuyma, 2003). A espécie de gafanhoto *Oedipoda fuscocincta* apresentou uma maior atividade da região organizadora de

nucléolo devido à duplicação destes genes, em função de uma translocação entre cromossomos não homólogos (Camacho *et al.*, 1986).

Além disso, locos gênicos que estão presentes em duplicata podem acumular mutações independentes e adquirir novas funções sem perturbar a adaptabilidade do organismo, uma vez que os alelos não modificados poderiam realizar, sem prejuízo, a função original do loco (Bridges, 1935; Stebbins, 1970; Koszul & Fischer, 2009) e, eventualmente, contribuir para eventos de especiação (Bridges, 1935; Palomeque *et al.*, 1993).

Alterações cromossômicas estruturais nem sempre são fáceis de serem visualizadas ao microscópio óptico, sobretudo as que envolvem pequenas regiões cromossômicas, e às vezes até mesmo em materiais mais favoráveis como os cromossomos politênicos de glândulas salivares de *Drosophila* e outros dípteros (Dobzhansky, 1970; White, 1973). Porém, em cromossomos mitóticos ou meióticos, segmentos duplicados já foram observados em diferentes organismos como gafanhotos (Camacho *et al.*, 1984; Camacho *et al.*, 1986; Camacho & Cabrero, 1987; Rufas *et al.*, 1988) e peixes (Maistro *et al.*, 2001).

Duplicações cromossômicas foram identificadas em diferentes subfamílias de formigas (Dolichoderinae, Formicinae e Myrmicinae) (Imai *et al.*, 1977; Palomeque *et al.*, 1993). Este tipo de polimorfismo é provavelmente uma forma frequente de variação cromossômica em formigas, e o estudo das características e do comportamento dos polimorfismos nestes organismos assim como a comparação com outras espécies animais parecem um objeto de estudo citogenético bastante interessante (Palomeque *et al.*, 1993). A espécie estudada no presente trabalho, *T. fuscus*, representou o primeiro relato de polimorfismo cromossômico para a tribo Attini.

Imai *et al.* (1977) relatam a presença de polimorfismo cromossômico envolvendo duplicação de segmentos cromossômicos em *Monomorium* sp.1, *Crematogaster* sp.1 e *Monomorium rothsteini*. Nesta espécie, foram observadas duas colônias com ausência de duplicação dos cromossomos; uma colônia com indivíduos heterozigotos e homozigotos; e outra colônia com indivíduos homozigotos para o polimorfismo.

É pouco provável que em *T. fuscus* tenha ocorrido um processo inverso, ou seja, deleção de uma parte do braço curto, pois ela normalmente é deletéria e

apresenta pouca significância para a evolução dos organismos (Stebbins, 1970; Imai *et al.*, 1977; Futuyma, 2003).

O resultado de banda C indicou a presença de blocos de heterocromatina restritos à região centromérica em todos os cromossomos de *T. fuscus* (Figura 2e). Conseqüentemente, a diferença de tamanho observada no par submetacêntrico nos indivíduos HB e BB não correspondeu ao crescimento diferencial de heterocromatina, e sim à diferença na região eucromática do braço curto de um ou dos dois cromossomos homólogos, o que parece indicar a duplicação de uma região eucromática.

Os segmentos supranumerários são normalmente heterocromáticos, porém há relatos de espécies com duplicações de segmentos cromossômicos eucromáticos (Camacho *et al.*, 1984; Palomeque *et al.*, 1993), assim como foi observado em *T. fuscus*.

Foi observada heterocromatina centromérica nos cromossomos de *T. relictus*, sendo que a maioria deles possuiu grandes blocos, todavia alguns mostraram marcação bem discreta (Figura 3c).

A presença de heterocromatina em *T. fuscus* e *T. relictus* foi observada apenas na região centromérica, porém Murakami *et al.* (1998) observaram a presença de heterocromatina centromérica e intersticial nos cromossomos de uma das espécies de *Trachymyrmex*.

Embora exista variação no número cromossômico nas espécies de *Trachymyrmex* do presente trabalho e das estudadas por Murakami *et al.* (1998) ( $2n=12, 18, 20, 22$ ), não foram observados cromossomos de menor tamanho e/ou com braço curto de tamanho reduzido que indicassem eventos de rearranjos cromossômicos do tipo fissão cêntrica. Além disso, *T. relictus* e *T. fuscus* apresentaram heterocromatina exclusivamente na região centromérica. O estudo da heterocromatina deste gênero em trabalhos posteriores será muito informativo quanto aos rearranjos cromossômicos envolvidos na evolução destas formigas, contribuindo para melhor entendimento do grupo.

#### Gênero *Apterostigma*

Duas espécies foram estudadas citogeneticamente – *A. steigeri* e *A. madidiense* – com os números cromossômicos  $2n=22$  (Figura 4a) e  $n=23$  (Figura 4b)

(Tabela 1). Em *A. steigeri*, foi observada presença de constrição secundária em pelo menos um dos homólogos do maior par metacêntrico, indicando que este par é provavelmente o portador da NOR. A constrição secundária não foi observada em *A. madidiense* e não foi relatada nos estudos realizados por Murakami *et al.* (1998) e Fadini & Pompolo (1996).

O gênero *Apterostigma* possui 46 espécies descritas (Fernández, 2003; Agosti, & Johnson, 2005), e apenas quatro táxons estudados citogeneticamente: *A. mayri* ( $2n=24$  cromossomos, Murakami *et al.*, 1998), *Apterostigma* sp. ( $2n=24$  cromossomos, Murakami *et al.*, 1998), *Apterostigma* sp. ( $2n=20$  cromossomos, Fadini & Pompolo 1996) e *Apterostigma* sp. ( $2n=32$  cromossomos, Mariano *et al.*, no prelo).

*Apterostigma madidiense* apresentou em machos  $n=23$  cromossomos e provavelmente  $2n=46$  cromossomos nas fêmeas, mais que o dobro do número cromossômico da espécie estudada por Fadini & Pompolo (1996), que apresentou  $2n=20$  cromossomos.

Tsutsui *et al.* (2008) levantam a possibilidade de duplicação do genoma no gênero *Apterostigma*, pois o estudo do conteúdo de DNA de diferentes espécies de formigas indicou cerca do dobro do conteúdo de DNA para *Apterostigma dentigerum*, em relação a outras espécies da tribo Attini: *Atta cephalotes*, *Atta colombica* e *Sericomyrmex amabilis*. Além disso, *A. dentigerum* apresentou o maior conteúdo de DNA na subfamília Myrmicinae (cerca do dobro das outras espécies), o que pareceu indicar a possibilidade de duplicação do genoma em formigas ancestrais do gênero *Apterostigma*. Entretanto, não existe relato da citogenética em *A. dentigerum*.

Considerando a falta de dados citogenéticos sobre o gênero *Apterostigma*, a hipótese de fissão cêntrica é mais provável do que a da poliploidia, por apresentar melhor suporte da Teoria da Interação Mínima, ou seja, parece haver uma tendência de aumento do número cromossômico por rearranjos do tipo fissão cêntrica. Além disso, *Apterostigma* sp., estudada por Mariano *et al.* (no prelo), apresentou número cromossômico intermediário ( $2n=32$  cromossomos).

Assim, estudos citogenéticos de mais espécies do gênero *Apterostigma* são necessários para conhecer o número e a morfologia dos cromossomos de outras espécies, além da aplicação de técnicas de bandamento cromossômico e de citogenética molecular, o que será útil para o melhor entendimento da evolução

cromossômica do gênero e da possível duplicação do conteúdo de DNA destas formigas, seja por meio de poliploidia ou um possível aumento no conteúdo de DNA por outras formas, como, por exemplo, duplicações devidas ao *crossing-over* desigual, translocações, elementos transponíveis ou mesmo aumento no conteúdo de heterocromatina (Gregory, 2005).

Estudos citogenéticos de espécies da tribo Attini são necessários para verificar se o número cromossômico ( $2n=50$  cromossomos) se mantém nas diferentes espécies ou em grupos de espécies do gênero *Sericomyrmex*, assim como o estudo da heterocromatina no gênero *Trachymyrmex* o qual será muito informativo quanto aos rearranjos cromossômicos envolvidos na evolução destas formigas, assim como a composição e localização de heterocromatina dos outros gêneros, . Além disso, a descrição do número e morfologia de mais espécies de Attini poderão ser associados aos dados do presente trabalho e aos dados disponíveis na literatura para que inferências sobre a evolução cromossômica destas formigas possam ser feitas.

## Referências Bibliográficas

- Agosti D and Johnson N F Editors. (2005) Antbase. World Wide Web electronic publication. antbase.org, version (05/2005). Acesso em 18 março de 2010.
- Araújo MS, Della Lucia TMC and Mayhé-Nunes AM (2002) Caracterização de ninhos e atividade forrageadora de *Trachymyrmex fuscus* Emery (Hymenoptera, Formicidae) em plantio de eucalipto. Rev Bras Zool 19: 419 – 427.
- Barros LAC, Mariano CSF, Hora RR, Della-Lucia TMC, Delabie JHC and Pompolo SG (2008) 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, 2008, Salvador-BA (Brasil): 351.
- Barros LAC, Aguiar HJAC, Mariano CSF, Delabie JHCD and Pompolo SG (2010) Cytogenetic characterization of the lower-Attine *Mycocepurus goeldii* (Formicidae: Myrmicinae: Attini). Sociobiology: 55 (3) (no prelo).
- Brandão CRF and Mayhé-Nunes AJ (2007) A phylogenetic hypothesis for the *Trachymyrmex* species groups, and the transition from fungus-growing to leaf-cutting in the Attini. Mem Am Entomol Inst 80: 72–88.
- Bridges C D (1935) Bridges: maps of salivary chromosomes. J Heredity 26: 60-64.
- Camacho JPM, Navas-Castillo J and Cabrero J (1986) Extra nucleolar activity associated with presence of a supernumerary chromosome segment in the grasshopper *Oedipoda fuscocincta*. Heredity 56: 237-241.
- Camacho JPM, Viseras E, Navas J and Cabrero J (1984) C-heterochromatin content of supranumerary chromosome segments of grasshoppers: detection of an euchromatic extra segment. Heredity 53: 167-175
- Camacho JPM and Cabrero (1987) New hypotheses about the origin of supranumerary chromosome segments in grasshoppers. Heredity 58: 341-343.

- Chapela IH, Rehner SA, Schultz TR and Mueller UG (1994) Evolutionary history of the symbiosis between fungus-growing ants and their fungi. *Science* 226: 1691-1694.
- Crosland MWJ and Crozier RH (1986) *Myrmecia pilosula*, an ant with only one pair of chromosomes. *Science* 231: 1278.
- Delabie JHC, Mariano CSF, Mendes L F, Pompolo SG and Fresneau D (2008) Problemas apontados por estudos morfológicos, ecológicos e citogenéticos no gênero *Pachycondyla* na região neotropical: o caso do complexo apicalis. In: Santos IA, Vilela EF, Schoereder HH, Lino Neto J, Campos LAO and Serrão JE (eds) *Insetos Sociais: da Biologia à Aplicação*. 1ª edição. Editora UFV, Viçosa, MG, Brasil, pp 197-222.
- Dobzhansky T (1973) Seleção balanceada e polimorfismos cromossômicos. In: *Genética do processo evolutivo*. Tradução de Celso Abbade Mourão. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, pp 113-147.
- Fadini MAM and Pompolo SG (1996) Cytogenetics of some ant species of the tribe Attini (Hymenoptera, Formicidae) from the region of Viçosa, MG. *Braz J Gen* 19: 53-55.
- Fadini MAM, Mayhé-Nunes AJ and Pompolo SG (1996) Citogenética de duas espécies do gênero *Mycetarotes* (Hymenoptera: Formicidae). XLII Congresso Nacional de Genética, Caxambu, MG (Brasil): 126.
- Fernández F (2003) Lista de las especies de hormigas de la Región Neotropical. In: Fernández F (ed) *Introducción a las hormigas de la región Neotropical*. Instituto de investigación de recursos biológicos Alexander von Humboldt, Bogotá, Colômbia, pp 379-411.
- Futuyma DJ 2003. *Biologia Evolutiva*. 2ª edição. Sociedade Brasileira de Genética/CNPq, Ribeirão Preto, 631 pp.
- Goñi G, Zolessi LC and Imai HT (1983) Karyotype of thirteen ant species from Uruguay (Hymenoptera - Formicidae). *Caryologia* 36: 363-371.

- Gregory TR (2005) The C-value enigma in plants and animals: a review of parallels and an appeal for partnership. *Ann Botany* 95: 133-146.
- Hernández-Marín H, Zimmerman JK and Wcislo WT (2005) Colony foundation, nest architecture and demography of a basal fungus-growing ant, *Mycocepurus smithii* (Hymenoptera, Formicidae). *J Nat Hist* 39: 1735-1743.
- Hölldobler B and Wilson EO (1990) *The Ants*. Harvard University Press, USA, 732 pp.
- Imai HT, Crozier RH and Taylor RW (1977) Karyotype evolution in Australian ants. *Chromosoma* 59: 341-393.
- Imai H, Taylor RW, Crosland MW and Crozier RH (1988) Modes of spontaneous chromosomal mutation and karyotype evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis. *Japan J Genet* 63: 159-185.
- Imai HT, Taylor RW and Crozier RH (1994) Experimental bases for the minimum interaction theory. Chromosome evolution in ants of the *Myrmecia pilosula* species complex (Hymenoptera: Formicidae: Myrmeciinae). *Jpn J Genet* 69: 137-182.
- Kempf WW (1972) Catálogo abreviado de formigas neotropicais (Hymenoptera, Formicidae). *Stud Entomol* 15: 1-344.
- Klingenberg K and Brandão CRF (2009) Revision of the fungus-growing ant genera *Mycetophylax* Emery and *Paramycetophylax* Kusnezov rev. stat., and description of *Kalathomyrmex* n. gen. (Formicidae: Myrmicinae: Attini). *Zootaxa* 2052: 1-31.
- Koszul G and Fischer G (2009) A prominent role for segmental duplications in modeling Eukaryotic genomes. *C R Biol* 332: 254-266.
- Lattke JE (1999) A new species of fungus-growing ant and its implications for attine phylogeny (Hymenoptera: Formicidae). *Systematic Entomol* 24: 1-6.

- Leal IR and Oliveira PS (2000) Foraging ecology of attine ants in a Neotropical savanna: seasonal use of fungal substrate in the cerrado vegetation of Brazil. *Insectes Soc* 47: 376-382.
- Levan A, Fredga K and Sandberg A (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.
- Lorite P and Palomeque T (2010) Karyotype evolution in ants (Hymenoptera: Formicidae), with a review of the known ant chromosome numbers. *Myrmecol News* 13: 89-102.
- Mackay WP, Maes JM, Fernández PR and Luna G (2004) The ants of North and Central America: the genus *Mycocepurus* (Hymenoptera: Formicidae). *J Insect Sci* 4 (27): 1-7.
- Maistro EL, Oliveira C and Foresti F (2001) Cytogenetic characterization of a supernumerary chromosome segment and of B-chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae). *Genetica* 110: 177-183.
- Mariano CSF (2004) Evolução cariotípica em diferentes grupos de Formicidae. Tese. (Doutorado em Entomologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Brasil 205 pp.
- Mariano CSF, Delabie JHC, Ramos LS, Lacau S and Pompolo SG (2004) *Dinoponera lucida* Emery (Formicidae: Ponerinae): the highest number of chromosomes known in Hymenoptera. *Naturwissenschaften* 91: 182-185.
- Mariano CSF, Pompolo SG, Barros LAC, Mariano-Neto E, Campiolo S and Delabie JHC (2008) A biogeographical study of the threatened ant *Dinoponera lucida* Emery (Hymenoptera: Formicidae: Ponerinae) using a cytogenetic approach. *Insect Conserv Diversity* 1: 161-168.
- Mariano CSF, Santos IS, Groc S, Leroy C, Malé PJ, Ruiz-Gonzalez M, Dejean A and Delabie JHC The karyotypes of *Gigantiops destructor* (Fabricius) and other ants from French Guiana (Formicidae). *Ann Soc Entomol Fr* (no prelo).

- Mayhé-Nunes AJ and Jaffé K (1998) On the biogeography of Attini (Hymenoptera: Formicidae). *Ecotropicos* 11: 45-54.
- Mehdiabadi NJ and Schultz TR (2009) Natural history and phylogeny of the fungus-farming ants (Hymenoptera: Formicidae). *Myrmecol News* 13: 37-55.
- Mueller UG, Rehner SA and Schultz TR (1998) The evolution of agriculture in ants. *Science* 281: 2034-2038.
- Murakami T, Fujiwara A and Yoshida MC (1998) Cytogenetics of ten ant species of the tribe Attini (Hymenoptera, Formicidae) in Barro Colorado Island, Panama. *Chromosome Sci* 2: 135-139.
- Palomeque T, Chica E and Díaz RG (1993) Supernumerary chromosome segments in different genera of Formicidae. *Genetica* 90: 17-29.
- Pompolo SG and Mariano CSF (2003) Considerações citogenéticas sobre a condição derivada da tribo Attini (Formicidae: Myrmicinae). In: XVI Simpósio de Mirmecologia, Florianópolis. *Anais do XVI Simpósio de Mirmecologia. Florianópolis: 267-270.*
- Pompolo SG and Takahashi CS (1990) Chromosome numbers and C bands in two wasp species of the genus *Polistes* (Hymenoptera, Vespidae, Polistinae). *Insectes Soc* 37: 251-257.
- Rabeling C, Verhaagh M and Engels W (2007) Comparative study of nest architecture and colony structure of the fungus-growing ants, *Mycocepurus goeldii* and *M. smithii*. *J Insect Sci* 7: 40.
- Rabeling C, Lino-Neto J, Cappellari SC, Santos IA, Mueller UG and Bacci M Jr (2009) Thelytokous parthenogenesis in the fungus-growing ant *Mycocepurus smithii* (Hymenoptera: Formicidae). *PLoS ONE* 4: e6781
- Rufas JS, Gimenez-Abian J, Garcia de la Vega C and Gosálvez J (1988) Recombination within extra segments: evidence from the Grasshopper *Chorthippus jucundus*. *Chromosoma* 96: 95-101.

- Santos-Colares MC, Viégas J, Roth MGM, Loeck AE (1997) Preparation of mitotic chromosomes of leaf-cutting ants from the genera *Atta* and *Acromyrmex*. *Braz J Genet* 20: 20-27.
- Schultz TR and Brady SG (2008) Major evolutionary transitions in ant agriculture. *PNAS* 105: 5435–5440.
- Schultz TR and Meier R (1995) A phylogenetic analysis of the fungus growing ants (Hymenoptera: Formicidae: Attini) based on morphological characters of the larvae. *Syst Entomol* 20: 337-370.
- Stebbins GL (1970) *Processos de evolução orgânica*. Tradução de Sérgio de Almeida Rodrigues e Paulo Roberto Rodrigues. Ed. Universidade de São Paulo, São Paulo, 252 pp.
- Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res* 83: 438-442.
- Tsutsui ND, Suarez AV, Spagn JC and Johnston JS (2008) The evolution of genome size in ants. *BMC Evolutionary Biology* 8:64.
- Villesen P, Murakami T, Schultz TR and Boomsma JJ (2002) Identifying the transition between single and multiple mating of queens in fungus-growing ants. *Proc R Soc Lond B* 269: 1541–1548.
- Weber NA (1966) Fungus-growing ants. *Science* 153: 587-604.
- White MJD (1973) *Animal Cytology and Evolution*. 3<sup>rd</sup> Ed. Cambridge University Press, Cambridge, 961 pp.

## Tabelas e Figuras

Tabela 1 – Espécies estudadas citogeneticamente, localidade, número de colônias/ número de indivíduos estudados, número cromossômico diploide (2n)/ haploide (n), fórmula cariotípica (2n) segundo Levan *et al.*, (1964).

Espécies	Localidade	Colônias indivíduos	2n (n)	Fórmula cariotípica 2n (n)
<i>Sericomyrmex</i> sp.	Viçosa – MG	1 – 10	50 (25)	44m+6sm 22m+3sm
<i>Trachymyrmex fuscus</i> Emery	Paraopeba – MG	2 – 20	18 (9)	16m+2sm (8m+1sm)
<i>Trachymyrmex relictus</i> Borgmeier	Viçosa – MG	5 – 21	20 (10)	20m (10m)
<i>Trachymyrmex</i> sp.	Viçosa – MG	1 – 5	22	18m+4sm
<i>Apterostigma steigeri</i> Santschi	Viçosa – MG	2 – 6	22	20m+2sm
<i>Apterostigma madidiense</i> Weber	Viçosa – MG	1 – 4	(23)	(7m+10sm+5st+1a)

Tabela 2 – Comprimento médio (em micrômetros) dos braços curtos e longos do par de cromossomos submetacêntricos de *Trachymyrmex fuscus* obtidos de 19 indivíduos de duas colônias (16 da Colônia 1 e 3 da Colônia 2).

Indivíduo	Colônia	Braço curto (Média) <sup>1</sup>		P valor	Braço longo (Média) <sup>1</sup>		P valor
		Cromossomo 1	Cromossomo 2		Cromossomo 1	Cromossomo 2	
1	1	2,126	1,393	0,006 *	3,534	3,419	0,833
2		1,581	1,194	0,010 *	2,598	2,605	0,987
3		1,813	1,189	0,005 *	2,779	2,895	0,787
4		2,217	1,552	0,026 *	3,469	3,430	0,943
6		1,186	1,111	0,373	2,781	2,656	0,446
7		1,767	1,252	0,049 *	2,802	2,833	0,952
8		1,416	1,327	0,555	3,066	3,121	0,905
9		0,996	0,925	0,439	2,240	2,245	0,983
10		1,310	1,224	0,562	2,846	2,838	0,985
11		1,718	1,284	<0,001 *	2,949	2,793	0,343
12		1,391	1,109	0,002 *	2,587	2,582	0,977
13		1,434	1,115	0,006 *	2,417	2,386	0,916
14		1,332	1,257	0,619	3,039	3,069	0,920
15		1,273	1,017	0,036 *	2,188	2,179	0,983
16		1,343	1,241	0,408	2,962	2,918	0,876
17		1,255	1,176	0,616	2,758	2,611	0,729
1		2	1,620	1,255	0,030 *	2,759	2,820
3	1,852		1,343	0,043 *	2,902	3,062	0,705
5	1,474		1,354	0,285	2,573	2,466	0,600

\* significativo pelo teste t, em nível de 5% de probabilidade.

<sup>1</sup> obtido de 10 metáfases.

Tabela 3 – Resumo da análise de variância dos valores médios obtidos de 10 metáfases da razão entre braços longos/ braços curtos do par de cromossomos submetacêntricos de *Trachymyrmex fuscus* de 8 fêmeas das duas colônias que não apresentaram diferença significativa de tamanho entre estes homólogos e também de um macho da colônia 2.

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Entre indivíduos	8	0,601	10,141	<0,001*
Resíduo	81	0,059		
Total	89			

\* significativo a 5% probabilidade pelo teste F.

Tabela 4 – Razões médias entre braços longos/ braços curtos do par de cromossomos submetacêntricos de *Trachymyrmex fuscus* de 10 metáfases dos indivíduos que não apresentaram diferença significativa de tamanho nestes homólogos submetidas ao teste de Tukey.

<b>Indivíduo - Colônia</b>	<b>Médias</b>
6 - 1	2,360 a
14 - 1	2,304 a
9 - 1	2,257 a
16 - 1	2,194 a
17 - 1	2,174 a
10 - 1	2,147 a
8 - 1	2,122 a
5 - 2	1,753 b
macho - 2	1,627 b

As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Tabela 5 – Resumo da análise de variância dos valores médios obtidos da razão entre braços longos/ braços curtos do par de cromossomos submetacêntricos de 19 fêmeas e 1 macho de duas colônias de *Trachymyrmex fuscus* obtidas pela medição de 10 metáfases. Para os indivíduos heterozigotos (HB) foi utilizada a razão do maior cromossomo submetacêntrico (B), ou seja, que difere do cromossomo padrão.

FV	GL	QM	F	P
Tratamentos	19	0,874	20,383	<0,001*
Resíduo	180	0,043		
Total	199			

\* significativo a 5% probabilidade pelo teste F.

Tabela 6 – Razões médias de braços (longos/ curtos) obtidas de 10 metáfases do par submetacêntrico (sm) dos indivíduos sem diferença de tamanho nos braços curtos do referido par submetidas ao teste Dunnett. Foi utilizada a razão de braços do maior cromossomo submetacêntrico do Indivíduo 01/ Colônia 1, como parâmetro, o qual é heterozigoto. Foram ainda incluídas no teste as razões médias dos braços cromossômicos com aumento de tamanho (que difere do cromossomo padrão) dos indivíduos heterozigotos das duas colônias.

Indivíduos	Colônias	Diferença das médias	Classificação do par sm
6 <sup>a</sup>		0,706*	Padrão
14 <sup>a</sup>		0,651*	Padrão
17 <sup>a</sup>		0,620*	Padrão
9 <sup>a</sup>		0,603*	Padrão
16 <sup>a</sup>		0,541*	Padrão
10 <sup>a</sup>		0,493*	Padrão
8 <sup>a</sup>		0,469*	Padrão
3	1	0,123	Heterozigoto
7		0,110	Heterozigoto
12		0,099	Heterozigoto
4		0,094	Heterozigoto
2		0,083	Heterozigoto
11		0,066	Heterozigoto
15		0,025	Heterozigoto
13		0,016	Heterozigoto
1		0,031	Heterozigoto
3	2	0,057	Heterozigoto
5 <sup>a</sup>		0,099	Homozigoto
macho		0,025	Homozigoto

<sup>a</sup> indivíduos sem diferença de tamanho entre os braços curtos do par submetacêntrico.

\* significativo pelo teste Dunnett, ao nível de 5% de probabilidade.

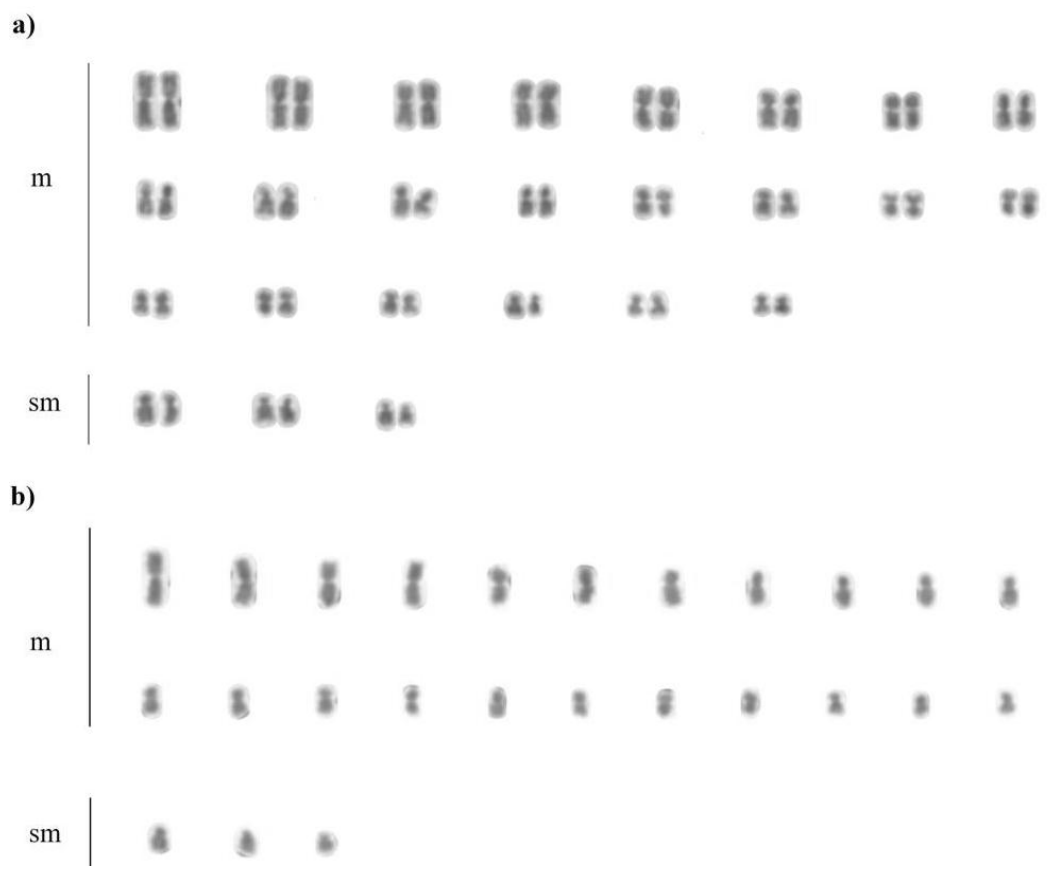


Figura 1 – Cariótipo de *Sericomyrmex* sp. a) fêmea (2n=50), b) macho (n=25). Barra = 5  $\mu$ m.

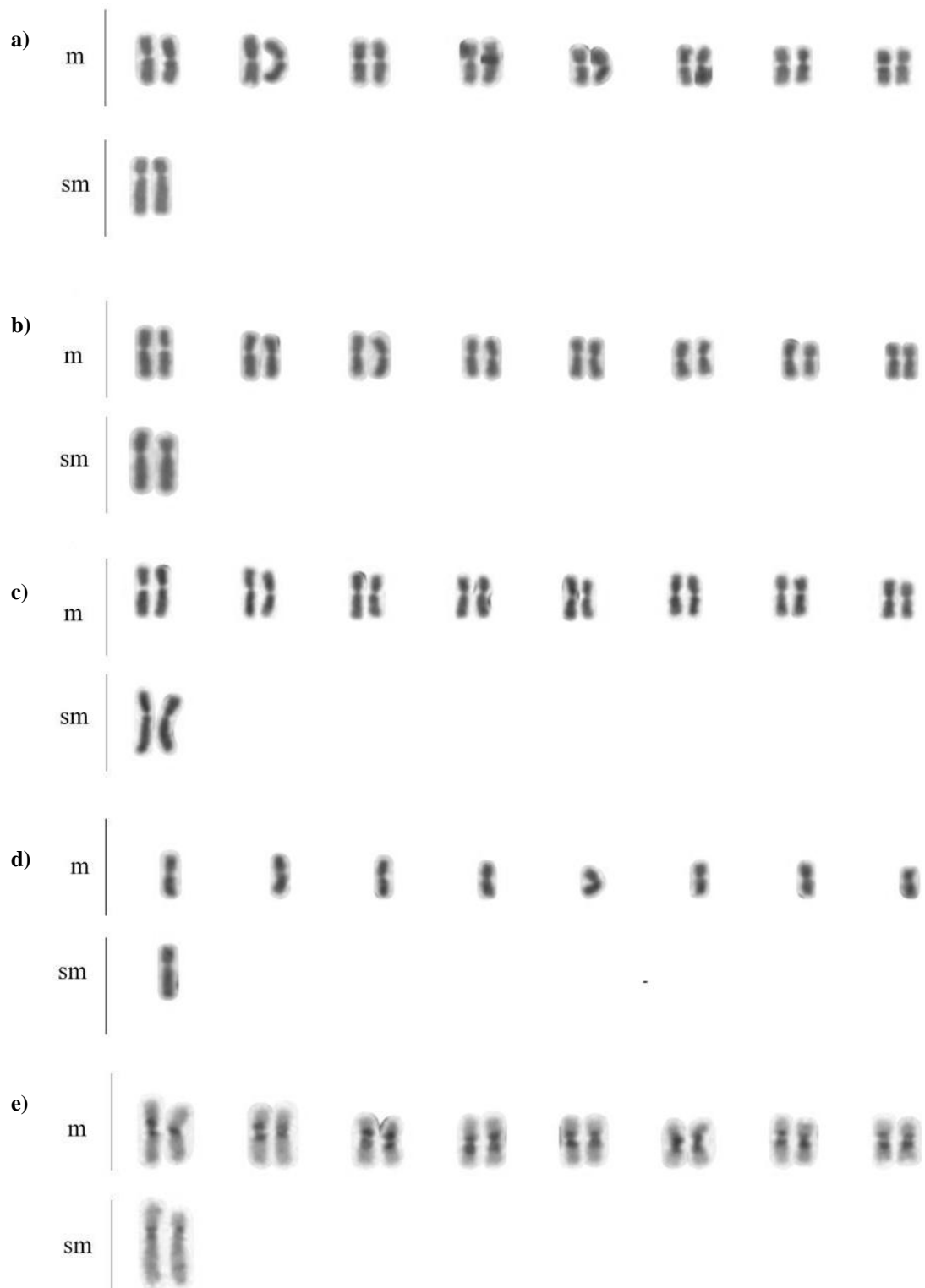


Figura 2 – Cariótipo de *Trachymyrmex fuscus* ( $2n=18$ ,  $n=9$ ), a) fêmea com o par submetacêntrico padrão HH (braços curtos menores), b) fêmea heterozigota HB para o polimorfismo no par submetacêntrico (com diferença de tamanho entre os braços curtos), c) fêmea homozigota BB (braços curtos maiores no par submetacêntrico), d) macho com aumento de tamanho no cromossomo submetacêntrico (B), e) banda C em fêmea heterozigota. Barra = 5  $\mu$ m.

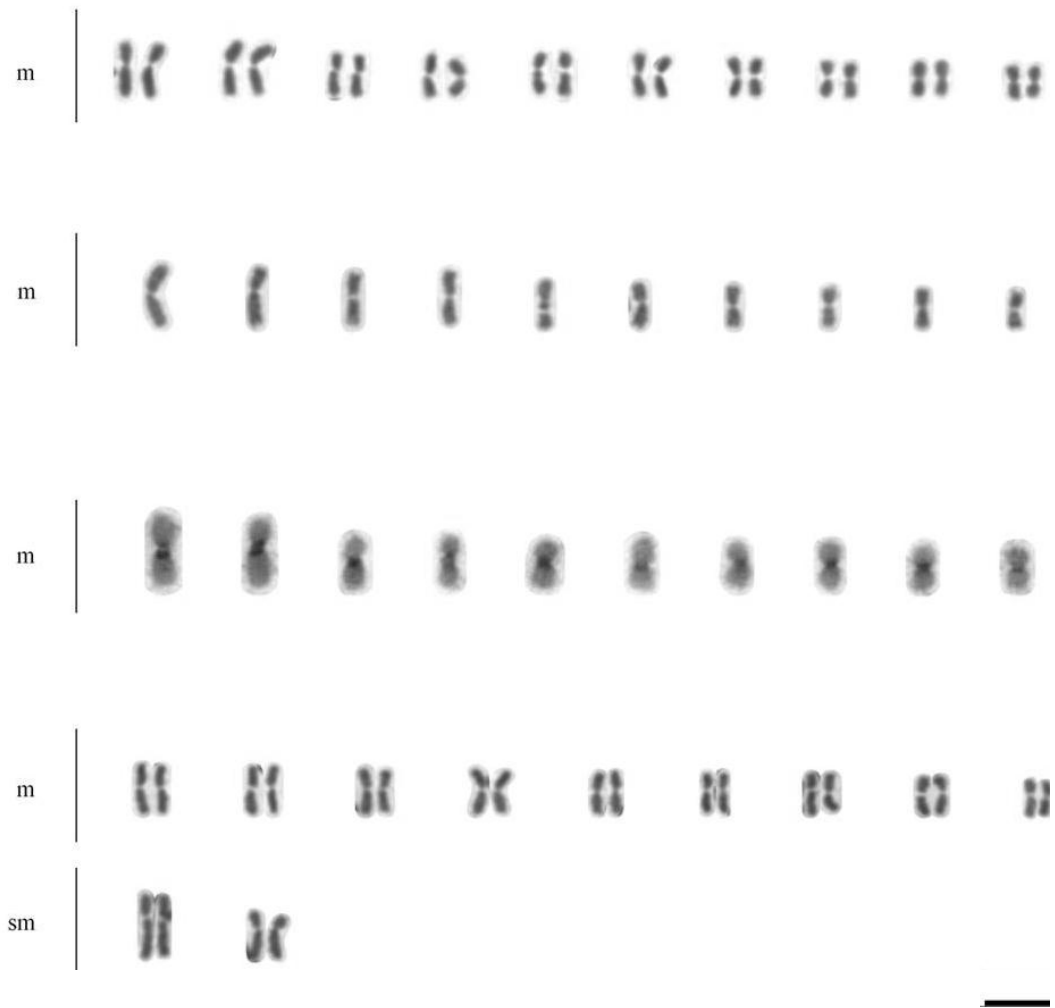


Figura 3 – Cariótipo de *Trachymyrmex* a) fêmea de *T. relictus* ( $2n=20$ ), b) macho de *T. relictus* ( $n=10$ ), c) banda C em macho de *T. relictus*, d) fêmea de *Trachymyrmex* sp. ( $2n=22$ ). Barra = 5  $\mu\text{m}$ .

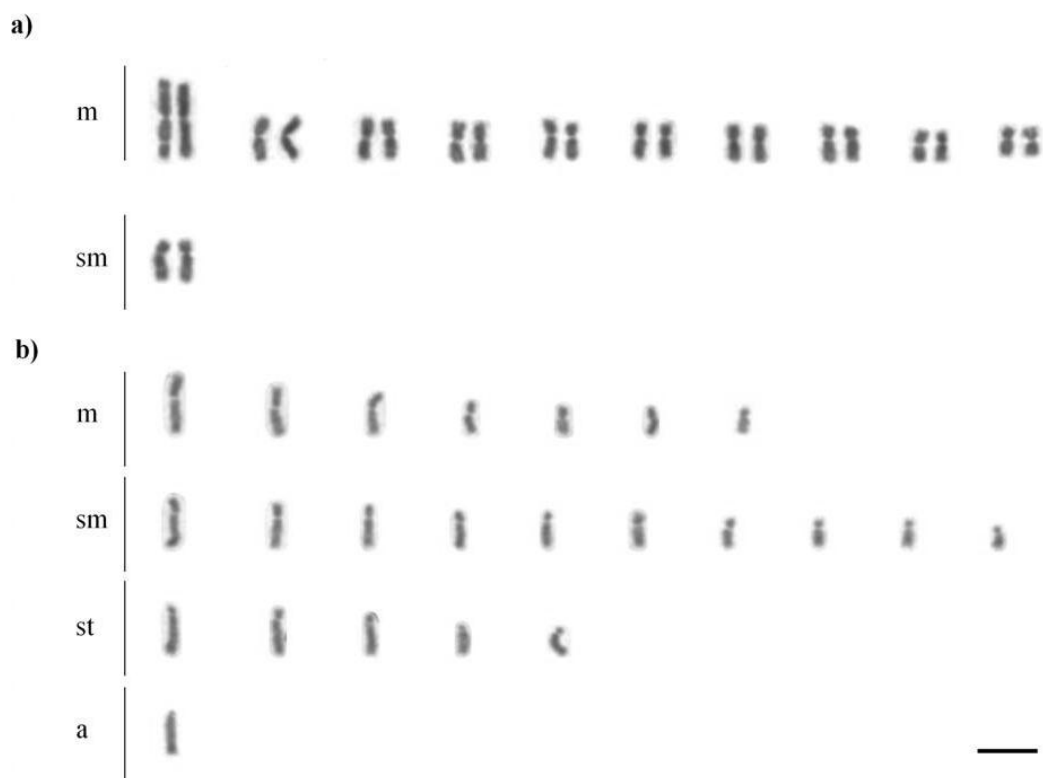


Figura 4 – Cariótipos de espécies de *Apterostigma* a) fêmea de *A. steigeri* ( $2n=22$ ), b) macho de *A. madidiense* ( $n=23$ ). Barra = 5  $\mu\text{m}$ .

## Capítulo 2

---

**Caracterização citogenética de seis espécies do gênero *Acromyrmex* (Formicidae: Myrmicinae)**

## Caracterização citogenética de seis espécies do gênero *Acromyrmex* (Formicidae: Myrmicinae)

### Resumo

Estudos citogenéticos de espécies do gênero *Acromyrmex* estudadas no Brasil e no Uruguai mostraram número cromossômico constante ( $2n=38$  cromossomos), com exceção da parasita social *Acromyrmex ameliae* Souza, Soares & Della Lucia, com  $2n=36$  cromossomos. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo estudar citogeneticamente outras seis espécies: *Acromyrmex balzani* (Emery), *Acromyrmex coronatus* (Fabricius), *Acromyrmex disciger* (Mayr), *Acromyrmex echinator* (Forel), *Acromyrmex niger* (Smith) e *Acromyrmex rugosus* (Smith), todas coletadas em Minas Gerais – Brasil, com exceção de *A. echinator* que foi coletada na Ilha Barro Colorado – Panamá. Foram analisados o número, a morfologia dos cromossomos e também aplicadas técnicas de bandamento: banda C (heterocromatina), os fluorocromos CMA<sub>3</sub> e DAPI, e a FISH, para detecção de sítios rDNA 45S. As seis espécies estudadas apresentaram o mesmo número cromossômico já observado para as outras espécies do gênero:  $2n=38$  cromossomos. *Acromyrmex balzani* teve um cariótipo diferente em relação às demais principalmente pela presença de um par metacêntrico de maior tamanho. A distribuição da heterocromatina se mostrou variável entre as espécies: nos braços curtos de cromossomos submetacêntricos e subtelo-cêntricos e na região centromérica de alguns cromossomos metacêntricos em *A. balzani*, *A. coronatus*, *A. disciger* e *A. rugosus*; no primeiro e segundo pares de subtelo-cêntricos em *A. echinator* e *A. niger*. Entretanto, todas as espécies apresentaram uma marcação no braço curto do primeiro par subtelo-cêntrico. O fluorocromo CMA<sub>3</sub> evidenciou marcação no braço curto do primeiro par subtelo-cêntrico para as seis espécies enquanto *A. rugosus* e *A. niger* mostraram também marcações em outros cromossomos. Para o fluorocromo DAPI não foram observadas marcações específicas. Os genes ribossomais 45S, utilizando a técnica de FISH, foram localizados no braço curto do primeiro par de subtelo-cêntricos para *A. coronatus* e *A. disciger* e *A. niger*.

## Introdução

A tribo Attini inclui as formigas cortadeiras dos gêneros *Acromyrmex* e *Atta*, considerados os mais derivados, tendo surgido há cerca de 8-12 milhões de anos (Hölldobler & Wilson, 1990; Schultz & Meier, 1995; Villesen *et al.*, 2002; Fernández-Marín *et al.*, 2004; Schultz & Brady, 2008; Mehdiabadi & Schultz, 2009).

Um total de 30 espécies está incluído no gênero *Acromyrmex* (Agosti & Johnson, 2005), porém, somando-se as subespécies e variações existem mais de 60 táxons descritos (Bolton, 2003). A distribuição geográfica vai desde a Califórnia (EUA) até a Patagônia (Argentina), com exceção do Chile. Dois táxons não são da Região neotropical - *A. versicolor versicolor* (Pergande) e *A. versicolor chisosensis* Wheeler. A maior parte das espécies constatadas no Brasil apresenta ampla distribuição, algumas, porém, com distribuição mais restrita (Gonçalves, 1961; Mayhé-Nunes, 1991).

O gênero é subdividido em dois subgêneros: *Acromyrmex* e *Moellerius*. Este último inclui as cortadeiras de gramíneas, consideradas uma transição morfológica entre *Acromyrmex* e *Atta* (Fowler, 1988). O estudo da filogenia baseada em caracteres morfológicos desse gênero mostrou que os dois subgêneros formam dois grupos distintos sendo que o subgênero *Moellerius* é considerado o mais derivado (Mayhé-Nunes, 1991).

Estudos citogenéticos realizados na família Formicidae mostraram a grande relevância desta ferramenta em estudos filogenéticos e taxonômicos nas mais de 750 espécies de formigas estudadas (Imai *et al.*, 1988; 1994; Mariano *et al.*, 2006; Delabie *et al.*, 2008), pois os rearranjos cromossômicos podem desempenhar papel direto na especiação e, assim, a citogenética deve ocupar lugar central nos estudos de mecanismos de especiação (White, 1970).

Da tribo Attini são conhecidos até o momento os cariótipos de 23 espécies (26 espécies e subespécies) com informações de pelo menos o número e a morfologia dos cromossomos (Goñi *et al.* 1983; Fadini & Pompolo 1996; Fadini *et al.*, 1996; Santos-Colares *et al.*, 1997; Murakami *et al.*, 1998; Pompolo & Mariano, 2003; Barros *et al.* 2008; Barros *et al.*, 2010), o que corresponde a 10% do número total de espécies descritas (Schultz & Brady, 2008; Mehdiabadi & Schultz 2009). Em alguns gêneros, os números cromossômicos das espécies estudadas são variáveis, enquanto em *Atta* (Fadini & Pompolo 1996; Santos-Colares *et al.*, 1997; Murakami *et al.*, 1998) e *Acromyrmex* (Goñi *et al.* 1983; Fadini & Pompolo 1996; Santos-Colares *et*

*al.*, 1997; Murakami *et al.*, 1998; Barros *et al.* 2008) uma uniformidade cariotípica foi observada com  $2n=22$  e 38 cromossomos, respectivamente.

A citogenética em *Acromyrmex* é restrita a um total de seis espécies (oito espécies e subespécies) coletadas no Brasil: *A. (A.) crassipinus* (Forel), *A. (A.) subterraneus molestans* Santschi (Fadini & Pompolo, 1996), *A. (Moellerius) heyeri* (Forel) (Santos-Colares *et al.*, 1997), *A. (A.) subterraneus subterraneus* Forel (Fadini & Pompolo, 1996; Barros *et al.*, 2008), *A. (A.) subterraneus brunneus* Forel, *A. (A.) ameliae* Souza, Soares & Della Lucia (Barros *et al.*, 2008), e no Uruguai: *A. (A.) ambiguus* (Emery), *A. (A.) hispidus* (Santschi) e *A. (Moellerius) heyeri* (Forel) (Goñi *et al.*, 1983). Todas apresentaram o mesmo número cromossômico ( $2n=38$  cromossomos) com exceção da parasita social *A. ameliae*, com  $2n=36$  cromossomos (Barros *et al.*, 2008).

O objetivo deste trabalho foi estudar citogeneticamente espécies do gênero *Acromyrmex* – número, morfologia, utilização de técnicas de bandamento C, fluorocromos CMA<sub>3</sub> e DAPI e detecção de sítios rDNA 45S através da técnica de FISH – para testar a constância do cariótipo de diferentes espécies deste gênero com o intuito de enriquecer os conhecimentos sobre a evolução cromossômica do gênero.

## **Material e Métodos**

Seis espécies do gênero *Acromyrmex* foram estudadas citogeneticamente, todas coletadas em Minas Gerais – Brasil, com exceção de *Acromyrmex echinatio* a qual foi gentilmente cedida pela Dra. Cléa S. F. Mariano (Tabela 1). As metáfases foram obtidas utilizando-se gânglios cerebrais ou testículos de larvas pós-defecantes de acordo com o protocolo de Imai *et al.*, (1988). Para a definição da morfologia dos cromossomos, as lâminas foram coradas com Giemsa 4% e foi feita análise de pelo menos 10 metáfases por indivíduo. O número de colônias e indivíduos amostrados estão disponíveis na Tabela 1. Para as técnicas de bandamento cromossômico, foram usados de 4-10 indivíduos: banda C para a detecção de heterocromatina de acordo com Sumner (1972), com adaptações propostas por Pompolo & Takahashi (1990); e a coloração sequencial com os fluorocromos CMA<sub>3</sub>/DA/DAPI (Schweizer, 1980) para evidenciação de regiões ricas em GC e AT. Para a detecção de regiões organizadoras de nucléolo (NORs), 2-4 indivíduos foram submetidos à técnica de FISH, usando-se uma sonda rDNA 45S isolada de *Arabidopsis thaliana* (Moscone *et*

*al.*, 1996). As metáfases foram observadas e fotografadas com o auxílio de um microscópio BX 60 com objetivas de 100X, acoplado a um sistema de captura de imagens Q Color 3 Olympus<sup>®</sup>. Para a análise dos fluorocromos, foram utilizados filtros WB (450 - 480 nm) e WU (330 - 385 nm) para o CMA<sub>3</sub> e DAPI, respectivamente, enquanto para a técnica de FISH, foram utilizados o microscópio Leica DMRA2 filtros Y3 (545/30 nm), o programa de captura de imagens D Leica IM50 Version 5 Release 190, e as figuras foram organizadas usando-se o programa Adobe Photoshop C3<sup>®</sup>.

O cariótipo foi montado em ordem decrescente de tamanho alinhando-se os cromossomos na base do braço longo, seguindo-se a classificação de Levan *et al.*, (1964), que considera a razão de braços dos cromossomos (*r*), que consiste na razão do braço longo pelo braço curto. Dessa forma, os cromossomos foram classificados em metacêntricos (*m*,  $r=1-1,7$ ), submetacêntricos (*sm*,  $r=1,7-3$ ), subtelocêntricos (*st*,  $r=3-7$ ) e acrocêntricos (*a*,  $r>7$ ). O programa utilizado para a montagem dos cariótipos foi o Corel Photopaint 9<sup>®</sup> e para a medição dos cromossomos foi o Image Pro Plus<sup>®</sup>.

Espécimes adultos foram identificados pelo Dr. Jacques H. C. Delabie e depositados na coleção do Laboratório de Mirmecologia do Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC/Brasil), tombados sob o número #5570.

## Resultados

As seis espécies estudadas apresentaram o mesmo número diplóide de cromossomos:  $2n=38$  (Tabela 1, Figura 1). Em machos de *A. coronatus*, foi encontrado  $n=19$  cromossomos (Tabela 1).

Medições realizadas nos cromossomos indicaram diferenças morfológicas entre os cariótipos das seis espécies (Tabela 1). Um grupo de cromossomos foi de fácil reconhecimento entre as espécies: o primeiro par de metacêntricos, os dois primeiros pares de subtelocêntricos e o maior (ou único) par acrocêntrico (Figura 1). O cariótipo de *A. balzani* se destacou por apresentar o primeiro par de metacêntricos maior em relação às outras espécies (Figura 1a). Além disso, comparando-se o tamanho do primeiro par metacêntrico e o primeiro par subtelocêntrico, pode-se observar grande semelhança de tamanho entre estes dois pares para todas as espécies (figuras 1b-f), com exceção de *A. balzani*. Não foram encontradas diferenças nos cariótipos das espécies amostradas em mais de uma localidade (Tabela 1).

Os resultados do bandamento C em *A. balzani*, *A. coronatus*, *A. disciger*, *A. rugosus* indicaram variações nas marcações de alguns cromossomos: nos braços curtos de submetacêntricos e subtelocêntricos e na região centromérica em metacêntricos (Figura 2). O primeiro par de cromossomos subtelocêntricos (st1) mostrou marcação em todas as espécies: na região telomérica do braço curto em *A. disciger* (Figura 2c) e *A. rugosus* (Figura 2d); no braço curto em *A. balzani* (Figura 2a), *A. coronatus* (Figura 2b) e *A. echinator* (Figura 2f), na região telomérica do braço curto e na região pericentromérica do braço longo do par st1 em *A. niger* (Figura 2e), na região pericentromérica no segundo par de subtelocêntricos em *A. rugosus* e *A. niger*. Para *A. echinator* e *A. niger* só foram observadas marcações envolvendo o primeiro e segundo pares de subtelocêntricos.

Com o fluorocromo CMA<sub>3</sub>, os braços curtos do par st1 apresentaram variações nas marcações nas seis espécies. *Acromyrmex disciger* nas regiões teloméricas (Figura 3c); *A. balzani* (Figura 3a) e *A. coronatus* (Figura 3b) nos braços curtos; e *A. echinator* na região intersticial (Figura 3f). Entretanto, em *A. niger* (Figura 3e) e *A. rugosus* (Figura 3d), além da região telomérica do par st1 outros cromossomos mostraram-se marcados: na região pericentromérica do braço longo do par st1 e no braço longo do segundo maior par de subtelocêntricos, em *A. niger* (Figura 3e); marcações pequenas nas regiões teloméricas em pelo menos mais três cromossomos, em *A. rugosus* (Figura 3d).

Para o fluorocromo DAPI (Figura 3a'-f'), foram observadas marcações negativas correspondentes as marcações positivas para o fluorocromo CMA<sub>3</sub>.

A técnica de FISH, para detecção de sítios rDNA 45S, marcou o braço curto do par st1 de *A. coronatus*, *A. disciger* e *A. niger* (Figura 4).

## Discussão

A distinção entre os cariótipos das espécies do gênero *Acromyrmex*, estudadas neste trabalho, só pode ser feita com base na medição dos cromossomos. *Acromyrmex balzani*, porém, apresentou o maior par de metacêntricos bastante diferenciado em relação às demais espécies e esta espécie está, inclusive, incluída no subgênero *Moellerius*, considerado o mais derivado do gênero (Fowler, 1988; Mayhé-Nunes, 1991). Esta é primeira vez que se realizou medições cromossômicas em espécies de *Acromyrmex*.

A presença de heterocromatina nos braços curtos de alguns cromossomos submetacêntricos e subtlocêntricos indicou a presença de rearranjos do tipo fissão cêntrica em formigas ancestrais do gênero o que pode ter contribuído para o surgimento do número cromossômico de  $2n=38$ , em *Acromyrmex*. Estudos filogenéticos recentes (Schultz & Brady, 2008) evidenciaram que um grupo de espécies de *Trachymyrmex* é o grupo mais próximo de *Acromyrmex*. Dados citogenéticos estão disponíveis para algumas espécies de *Trachymyrmex* e foi observada variação no número cromossômico de  $2n=12-20$  no Panamá (Murakami *et al.*, 1998) e  $2n=18-22$  no Brasil (Barros *et al.*, dados não publicados). Isto parece indicar que formigas ancestrais apresentavam baixo número cromossômico e que os rearranjos do tipo fissão cêntrica podem ter contribuído para a evolução do cariótipo de *Acromyrmex*. O posterior crescimento de heterocromatina após as fissões teria o papel de auxiliar na manutenção da estabilidade telomérica dos cromossomos, o que está de acordo com a Teoria da Interação Mínima proposta por Imai *et al.* (1988, 1994).

O padrão de banda C observado em *A. balzani*, *A. coronatus*, *A. disciger*, *A. rugosus* (do presente trabalho) é semelhante aos resultados de *A. ameliae* e suas hospedeiras *A. subterraneus subterraneus* e *A. subterraneus brunneus* (Barros *et al.*, 2008), ou seja, marcações nos braços curtos e na região centromérica de alguns cromossomos. Além disso, a marcação no braço curto do par st1 foi observada em todas as espécies.

O rearranjo cromossômico do tipo translocação pode estar envolvido na evolução do cariótipo de *A. balzani* em função da grande diferença de tamanho comparando-se o primeiro par metacêntrico com os das outras espécies.

Para o fluorocromo CMA<sub>3</sub>, o padrão de marcação apenas no braço curto do par st1 observado em *A. balzani*, *A. coronatus* e *A. disciger* é semelhante ao de *Acromyrmex ameliae* e suas subespécies hospedeiras (Barros *et al.*, 2008). Embora *A. niger* e *A. rugosus* tenham apresentado marcações em outros cromossomos, também foi observada marcação no par st1. As marcações intersticiais no par st1 em *A. echinator* podem sugerir rearranjo cromossomo do tipo inversão paracêntrica.

O padrão de marcação inespecífico do fluorocromo DAPI é semelhante ao observado para *Acromyrmex ameliae* e suas hospedeiras (Barros *et al.*, 2008), pois se mostrou negativo nas regiões ricas em pares GC, mostrando uma complementaridade

dos dois fluorocromos. Porém, não foi observado um padrão específico de regiões ricas em sequências AT nas espécies estudadas.

As seis espécies apresentaram marcação no braço curto do par st1 para a banda C, assim como para o fluorocromo CMA<sub>3</sub>, indicando que esta região heterocromática rica em GC corresponde à NOR, como confirmado pela técnica de FISH para os sítios rDNA 45S nos cromossomos de *A. coronatus*, *A. disciger* e *A. niger*. Esta técnica possibilitou, inclusive, a detecção de NOR simples em *A. niger*, embora tenham sido observadas marcações múltiplas para o CMA<sub>3</sub>. Isto pode indicar que várias destas marcações não estão relacionadas aos genes ribossomais. As NORs são geralmente ricas em GC e produzem bandas fluorescentes nestes sítios com o CMA<sub>3</sub> em diferentes organismos (Schmid & Guttenbach, 1988; Reed & Phillips, 1995), porém outras regiões podem ter a referida especificidade e não apresentar sítios rDNA (Sumner, 1990), assim como foi observado para *A. niger*. Marcações múltiplas com o CMA<sub>3</sub> e NOR simples também foram observadas em *Mycocephalus goeldii* (Forel) (Barros *et al.*, no prelo; dados não publicados). Uma possível explicação para a presença de marcações múltiplas para o fluorocromo CMA<sub>3</sub> em *A. niger* e *A. rugosus* se deve à presença de transposons, ou elementos transponíveis do genoma, que poderiam ser os responsáveis pela inserção destes fragmentos em diferentes cromossomos (Bowen & Jordan, 2002).

A diferença de tamanho das marcações no par st1 para as diferentes técnicas (banda C, fluorocromo CMA<sub>3</sub> e FISH) mostrou que o par portador da NOR é heteromórfico, e isto evidenciou que há variação no número de cópias de genes ribossomais entre os homólogos, refletindo duplicações em *tandem* da NOR. A diferença entre os homólogos pode ter ocorrido por meio de mecanismos de *crossing-over* desigual, transposição e outros rearranjos (Galetti-Jr *et al.*, 1995). Este padrão também foi observado em *A. ameliae* e suas subespécies hospedeiras (Barros *et al.*, 2008). O heteromorfismo no tamanho da NOR também foi observado para outros organismos como abelhas (Mampumbu, 2002), anfíbios (Busin *et al.*, 2001; Busin *et al.*, 2008) e peixes (Galetti Jr *et al.*, 1995).

Cinco das seis espécies do gênero *Acromyrmex* deste trabalho foram coletadas no estado de Minas Gerais – Brasil, o que corresponde a distâncias geográficas relativamente pequenas. Porém, *A. echinator*, coletada no Panamá a uma distância de mais de 5.000 km. Além disso, três espécies estudadas por Goñi *et al.* (1983) são provenientes do Uruguai. Considerando o número cromossômico

constante encontrado nas diferentes espécies já estudadas, e embora tenham sido observadas diferenças nos cariótipos, pode-se considerar que as espécies do gênero *Acromyrmex* apresentam estabilidade no número cromossômico com diferenças nos cariótipos.

Estudos sobre filogenia molecular com os genes COI e COII de várias espécies de *Acromyrmex* incluíram *A. balzani* em um clado muito próximo ao gênero *Atta* (Attini). Embora os autores admitam o baixo suporte da posição filogenética obtida para *A. balzani* (Sumner *et al.*, 2004), os dados citogenéticos das cinco colônias estudadas no presente trabalho (3 de Viçosa e 2 de Paraopeba – MG) mantiveram o mesmo número cromossômico observado para a maioria das espécies de *Acromyrmex*, além de semelhanças na morfologia de alguns cromossomos. As espécies do gênero *Atta* estudadas no Brasil e Panamá, porém, possuem  $2n=22$  cromossomos: *Atta colombica* Guérin-Ménéville (Murakami *et al.* 1998), *Atta bisphaerica* (Forel), *Atta laevigata* (Smith), *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Fadini & Pompolo, 1996) e *Atta sexdens piriventris* Santschi (Santos-Colares *et al.*, 1997), o que parece confirmar o baixo suporte observado pelos dados moleculares.

Existem dados citogenéticos para 12 espécies (14 espécies e subespécies) de *Acromyrmex*, incluindo os do presente trabalho. Com exceção da parasita social *A. ameliae*, que apresenta  $2n=36$  cromossomos, todas as outras 11 espécies apresentam  $2n=38$  cromossomos, o que inclui dados para os subgêneros *Acromyrmex* e *Moellerius* (Goñi *et al.*, 1983; Fadini & Pompolo, 1996; Santos-Colares *et al.*, 1997; Barros *et al.*, 2008). A diferença no número cromossômico da parasita se deve, provavelmente, à fusão de cromossomos (Barros *et al.*, 2008). Todas as espécies estudadas de *Atta* apresentam número cromossômico constante. Estes gêneros são considerados os mais derivados da tribo e tiveram sua origem e diferenciação recentes (Hölldobler & Wilson, 1990; Schultz & Meier, 1995; Villesen *et al.*, 2002; Fernández-Marín, 2004; Schultz & Brady, 2008; Mehdiabadi & Schultz, 2009). Além disso, muitas dessas espécies possuem ampla distribuição, o que provavelmente contribuiu para a conservação do número cromossômico (Mariano, 2004), embora diferenças no padrão de marcações das técnicas de bandamento cromossômico e na morfologia dos cromossomos possam ser observadas no gênero *Acromyrmex*.

Espécies com número cromossômico constante já foram observadas em diferentes gêneros de formigas, como em *Pogonomyrmex*, que tem 13 das 15

espécies estudadas com o mesmo número cromossômico. As outras duas pertencem a um outro subgênero: *Epebomyrmex* (Taber *et al.*, 1988). Isto também ocorreu para o subgênero *Myrmothrix* do gênero *Camponotus*, que apresentou o mesmo número cromossômico (Mariano *et al.*, 2001; Mariano *et al.*, 2003), assim como nos gêneros *Pheidole*, *Lasius* e *Iridomyrmex* (revisado em Lorite & Palomeque, 2010).

Números cromossômicos constantes já foram observados em vários outros organismos, como, por exemplo, para a maior parte das aves e também para diferentes gêneros de insetos da ordem Lepidoptera (White, 1973). Tal característica também é observada em gêneros de abelhas tais como *Melipona* (revisado em Rocha *et al.*, 2007) e *Partamona* (revisado em Martins *et al.*, 2009).

O gênero *Acromyrmex* apresentou manutenção do número cromossômico ( $2n=38$ ) em mais de 1/3 do total das espécies (com exceção de *A. ameliae*). Entretanto, rearranjos do tipo inversão, crescimento de heterocromatina e translocações devem ter ocorrido durante a diferenciação das espécies deste gênero, levando a modificações no tamanho, morfologia dos cromossomos o que já aponta certa diferenciação deste grupo de formigas. O estudo de mais espécies deste gênero assim como um estudo mais detalhado das espécies do gênero *Atta*, considerado o mais derivado dentro da tribo Attini, incluindo técnicas de bandamento cromossômico, será muito importante para confirmar a hipótese de que gêneros recentes apresentam maior uniformidade cariotípica, contribuindo assim para melhor compreensão da evolução cromossômica das formigas cortadeiras e da família Formicidae.

## Referências Bibliográficas

- Agosti D and Johnson N F Editors. (2005). Antbase. World Wide Web electronic publication. antbase.org, version (05/2005). Acesso em 18 março de 2010.
- Barros LAC, Mariano CSF, Hora RR, Della-Lucia TMC, Delabie JHC and Pompolo SG (2008) 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, 2008, Salvador-BA (Brasil): 351.
- Barros LAC, Aguiar HJAC, Mariano CSF, Delabie JHCD and Pompolo SG (2010) Cytogenetic characterization of the lower-Attine *Mycocepurus goeldii* (Formicidae: Myrmicinae: Attini). Sociobiology (no prelo).
- Bolton B (2003) Synopsis and classification of Formicidae. Mem Am Entomol Inst 71: 1-370.
- Bowen NJ & Jordan IK (2002) Transposable elements and the evolution of eukaryotic complexity. Curr Issues Mol Biol 4: 65-76.
- Busin CS, Andrade GV, Bertoldo J, Grande ML, Uetanabaro M and Recco-Pimentel SM (2008) Cytogenetic analysis of four species of *Pseudis* (Anura, Hylidae), with the description of ZZ/ZW sex chromosomes in *P. tocantins*. Genética: 133: 119-127.
- Busin CS, Vinciprova G and Recco-Pimentel SM (2001) Chromosomal rearrangements as the source of variation in the number of chromosomes in *Pseudis* (Amphibia, Anura). Genética: 110: 131-141.
- Delabie JHC, Mariano CSF, Mendes L F, Pompolo SG and Fresneau D (2008) Problemas apontados por estudos morfológicos, ecológicos e citogenéticos no gênero *Pachycondyla* na região neotropical: o caso do complexo apicalis. In: Santos IA, Vilela EF, Schoereder HH, Lino Neto J, Campos LAO and Serrão JE (eds) Insetos Sociais: da Biologia à Aplicação. 1ª edição. Editora UFV, Viçosa, MG, Brasil, pp 197-222.

- Fadini MAM and Pompolo SG (1996) Cytogenetics of some ant species of the tribe Attini (Hymenoptera, Formicidae) from the region of Viçosa, MG. *Braz J Gen* 19: 53-55.
- Fadini MAM, Mayhé-Nunes AJ and Pompolo SG (1996) Citogenética de duas espécies do gênero *Mycetarotes* (Hymenoptera: Formicidae). XLII Congresso Nacional de Genética, Caxambu, MG (Brasil): 126.
- Fernández-Marín H, Zimmerman JK and Wcislo WT (2004) Ecological traits and evolutionary sequence of nest establishment in fungus-growing ants (Hymenoptera, Formicidae, Attini). *Biol J Linn Soc* 81: 39-48.
- Fowler HG (1988) Taxa of the Neotropical grass-cutting ants, *Acromyrmex* (*Moellerius*) (Hymenoptera: Formicidae: Attini). *Científica* 16: 281-295.
- Galetti PM Jr, Mestriner CA, Mônaco PJ and Rasch EM (1995) Post-zygotic modifications and intra- and inter-individual nucleolar organizing region variations in fish: report of a case involving *Leporinus friderici*. *Chromosome Res* 3: 285-290.
- Gonçalves CR (1961) O gênero *Acromyrmex* no Brasil (Hym. Formicidae). *Studia Entomol* 4: 113-180.
- Goñi G, Zolessi LC and Imai HT (1983) Karyotype of thirteen ant species from Uruguay (Hymenoptera - Formicidae). *Caryologia* 36: 363-371.
- Hölldobler B and Wilson EO (1990) *The Ants*. Harvard University Press, USA, 732 pp.
- Imai H, Taylor RW, Crosland MW and Crozier RH (1988) Modes of spontaneous chromosomal mutation and karyotype evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis. *Japan J Genet* 63: 159-185.
- Imai HT, Taylor RW and Crozier RH (1994) 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.

- Levan A, Fredga K and Sandberg A (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.
- Lorite P and Palomeque T (2010) Karyotype evolution in ants (Hymenoptera: Formicidae), with a review of the known ant chromosome numbers. *Myrmecol News* 13: 89-102.
- Mampumbu AR (2002) Análise citogenética da heterocromatina em população da abelha sem ferrão *Friesella schrottkyi* (Friese, 1900). (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). Dissertação (Mestrado em Biologia Celular). Universidade Estadual de Campinas, SP, 80 pp.
- Mariano CSF (2004) Evolução cariotípica em diferentes grupos de Formicidae. Tese. (Doutorado em Entomologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Brasil 205 pp.
- Mariano CSF, Delabie JHC, Campos, LAO and Pompolo SG (2001) Estudos cariotípicos de algumas espécies neotropicais de *Camponotus* Mayr (Hymenoptera: Formicidae) Mayr Neotropicais. *Rev Bras Entomol* 45: 267-274.
- Mariano CSF, Delabie JHC, Campos LAO, Pompolo SG (2003) Trends in karyotype evolution in the ant genus *Camponotus* Mayr (Insecta: Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology* 42: 831-839.
- Mariano CSF, Pompolo SG, Lacau S and Delabie JHC (2006) Questions sur la monophylie du taxon *Pachycondyla* Smith, 1858: approche cytogénétique sur le sous-genre *Pachycondyla* sensu Emery, 1901 (Hymenoptera: Formicidae: Ponerinae). *Bull Soc Entomol Fr* 111: 299-304.
- Martins CCC, Duarte OMP, Waldschmidt AM, Alves RMO and Costa MA (2009). New occurrence of B chromosomes in *Partamona helleri* (Friese, 1900) (Hymenoptera, Meliponini). *Genet Mol Biol* 32: 782-785.
- Mayhé-Nunes AJM (1991) Estudo de *Acromyrmex* (Hymenoptera, Formicidae) com ocorrência constatada no Brasil: subsídios para uma análise filogenética. Dissertação (Mestrado em Entomologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, MG, 122 pp.

- Mehdiabadi NJ and Schultz TR (2009) Natural history and phylogeny of the fungus-farming ants (Hymenoptera: Formicidae). *Myrmecol News* 13: 37-55.
- Moscone EA, Matzke MA and Matzke AJM (1996) The use of combined FISH/GISH in conjunction with DAPI counterstaining to identify chromosomes containing transgenes inserts in amphidiploid tobacco. *Chromosoma* 105: 231–236.
- Murakami T, Fujiwara A and Yoshida MC (1998) Cytogenetics of ten ant species of the tribe Attini (Hymenoptera, Formicidae) in Barro Colorado Island, Panama. *Chromosome Sci* 2: 135-139.
- Pompolo SG and Mariano CSF (2003) Considerações citogenéticas sobre a condição derivada da tribo Attini (Formicidae: Myrmicinae). In: XVI Simpósio de Mirmecologia, Florianópolis. *Anais do XVI Simpósio de Mirmecologia*: 267-270.
- Pompolo SG and Takahashi CS (1990) Chromosome numbers and C bands in two wasp species of the genus *Polistes* (Hymenoptera, Vespidae, Polistinae). *Insectes Soc* 37: 251-257.
- Reed KM and Phillips RB (1995) Molecular cytogenetic analysis of the Double-CMA<sub>3</sub> chromosome of lake trout, *Salvelinus namaycush*. *Cytogenet Cell Genet* 40: 104-107.
- Rocha MP, Pompolo SG, Fernandes A and Campos LAO (2007) *Melipona* - seis décadas de citogenética. *Bioscience J (UFU)* 23: 111-117.
- Santos-Colares MC, Viégas J, Roth MGM, Loeck AE (1997) Preparation of mitotic chromosomes of leaf-cutting ants from the genera *Atta* and *Acromyrmex*. *Braz J Genet* 20: 20-27.
- Schmid M and Guttenbach M (1988) Evolutionary diversity of reverse (R) fluorescent chromosome bands in vertebrates. *Chromosoma* 97: 101- 114.

- Schultz TR and Meier, R (1995) A phylogenetic analysis of the fungus-growing ants (Hymenoptera: Formicidae: Attini) based on morphological characters of the larvae. *Systematic Entomol* 20: 337-370.
- Schultz TR and Brady SG (2008) Major evolutionary transitions in ant agriculture. *PNAS* 105: 5435–5440.
- Schweizer D (1980) Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA/DAPI-bands) in human chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 27: 190-193.
- Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res* 83: 438-442.
- Sumner, A.T. 1990. *Chromosome Banding*. Uniwin Hyman, London, 434pp.
- Sumner S, Aanen, DK, Delabie J and Boomsma JJ (2004) The evolution of social parasitism in *Acromyrmex* leaf-cutting ants: a test of Emery' rule. *Insect Soc* 51: 37-42.
- Taber, S.W., Cokendolpher, J.C., Francke, O.F. 1988. Karyological study of North American *Pogonomyrmex* (Hymenoptera: Formicidae). *Insect Soc* 35: 47-60.
- Villesen P, Murakami T, Schultz TR, Boomsma JJ (2002) Identifying the transition between single and multiple mating of queens in fungus-growing ants. *Proc R Soc Lond B* 269: 1541–1548.
- White MJD (1970) Cytogenetics of speciation. *J Aust Entomol* 9: 1-6.
- White MJD (1973) *Animal Cytology and Evolution*. 3rd edition. Cambridge University Press, London, 961 pp.

## Tabela e Figuras

Tabela 1 – Espécies do gênero *Acromyrmex* estudadas citogeneticamente. Local de coleta, número de colônias e de indivíduos analisados com Giemsa, número cromossômico e fórmula cariotípica.

Espécie	Localidade	Col. – Ind. <sup>a</sup>	2n (n)	Fórmula cariotípica
<i>A. (Moellerius) balzani</i> (Emery)	Viçosa – MG – Brasil	3 – 12	38	2n = 12m + 10sm + 14st + 2a
<i>A. (Moellerius) balzani</i> (Emery)	Paraopeba – MG – Brasil	2 – 15	38	2n = 12m + 10sm + 14st + 2a
<i>A. (A.) coronatus</i> (Fabricius)	São Tiago – MG – Brasil	1 – 10	38 (19)	2n = 12m + 12sm + 12st + 2a
<i>A. (A.) coronatus</i> (Fabricius)	Paraopeba – MG – Brasil	5 – 20	38	2n = 12m + 12sm + 12st + 2a
<i>A. (A.) disciger</i> (Mayr)	Santos Dumont – MG – Brasil	2 – 15	38	2n = 10m + 12sm + 14st + 2a
<i>A. (A.) niger</i> (Smith)	Viçosa – MG – Brasil	3 – 21	38	2n = 12m + 18sm + 6st + 2a
<i>A. (A.) rugosus</i> (Smith)	Florestal – MG – Brasil	1 – 6	38	2n = 16m + 12sm + 8st + 2a
<i>A. (A.) rugosus</i> (Smith)	Paraopeba – MG – Brasil	5 – 22	38	2n = 16m + 12sm + 8st + 2a
<i>A. (A.) echinator</i> (Forel)	Ilha Barro Colorado – Panamá	2 – 10	38	2n = 8m + 6sm + 14st + 10a

<sup>a</sup> número de colônias e de indivíduos analisados.

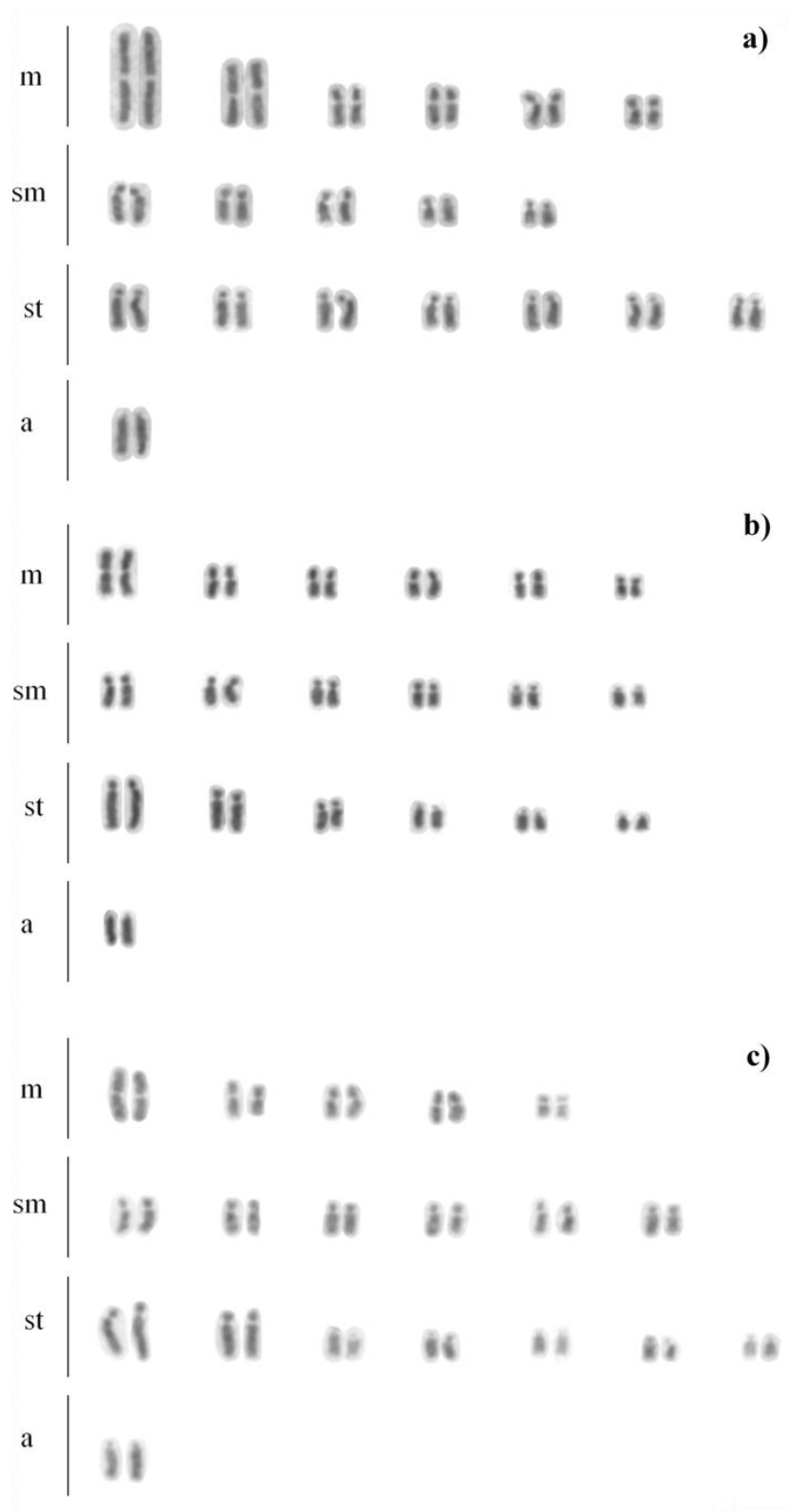


Figura 1 – Cariótipo das espécies de *Acromyrmex*: a) *A. balzani*, b) *A. coronatus*, c) *A. disciger*, d) *A. rugosus*, e) *A. niger*, f) *A. echinator*. As seis espécies apresentam  $2n=38$  cromossomos. Barra =  $5\mu\text{m}$ .

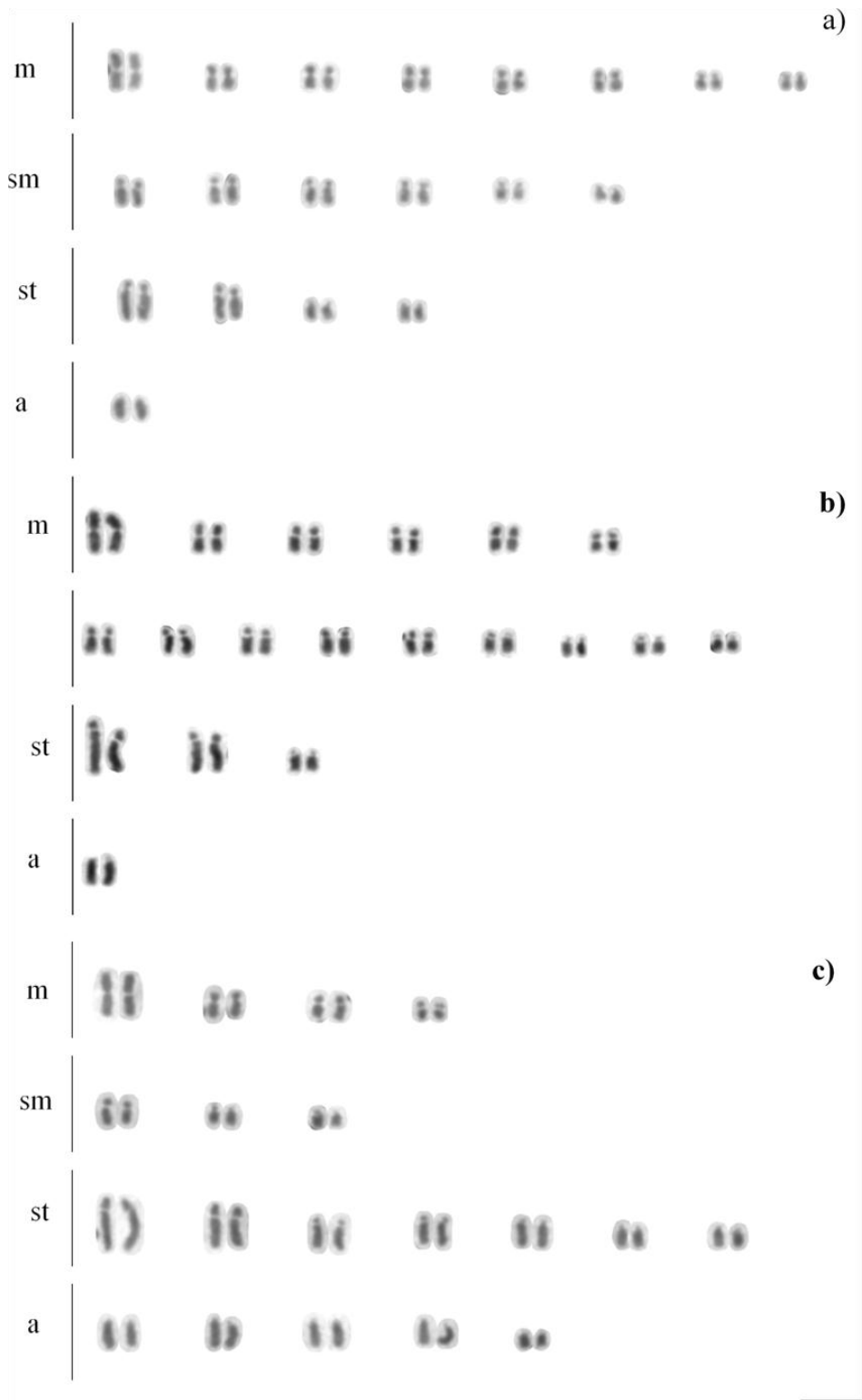


Figura 1 – Cont.

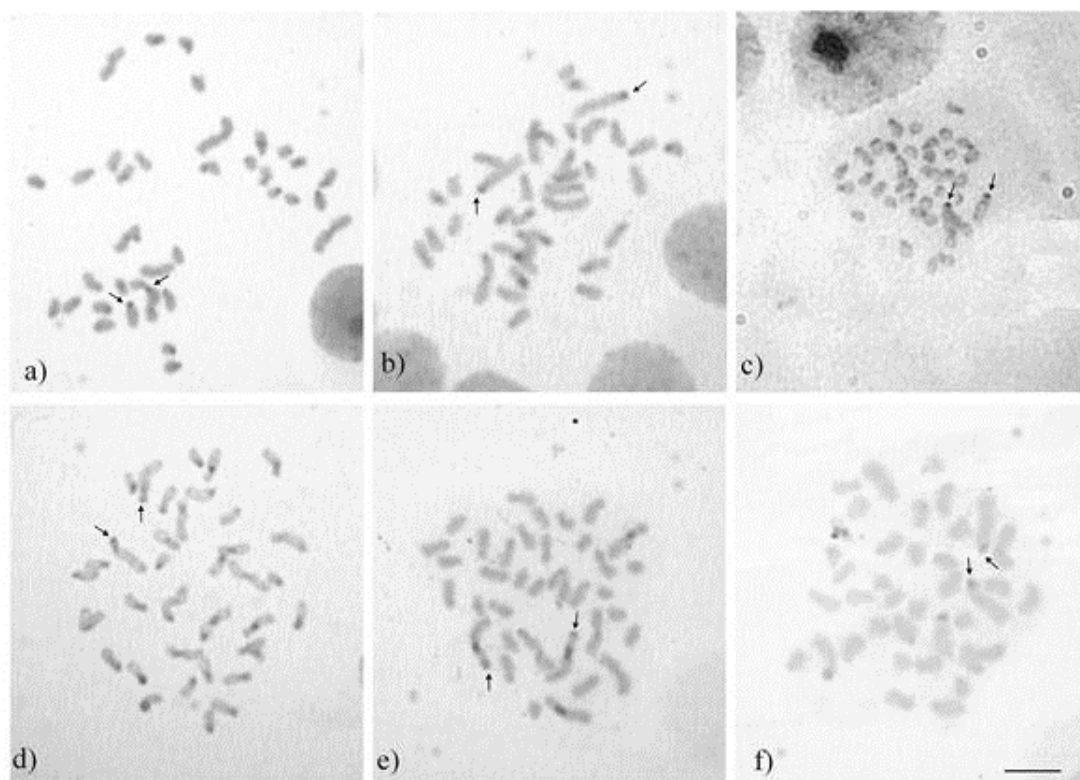


Figura 2 – Metáfases submetidas à técnica de banda C para detecção de heterocromatina. a) *A. balzani*, b) *A. coronatus*, c) *A. disciger*, d) *A. rugosus*, e) *A. niger*, f) *A. echinator*. Setas indicam marcação no maior par de cromossomos subtelocêntricos. Barra = 5 $\mu$ m.

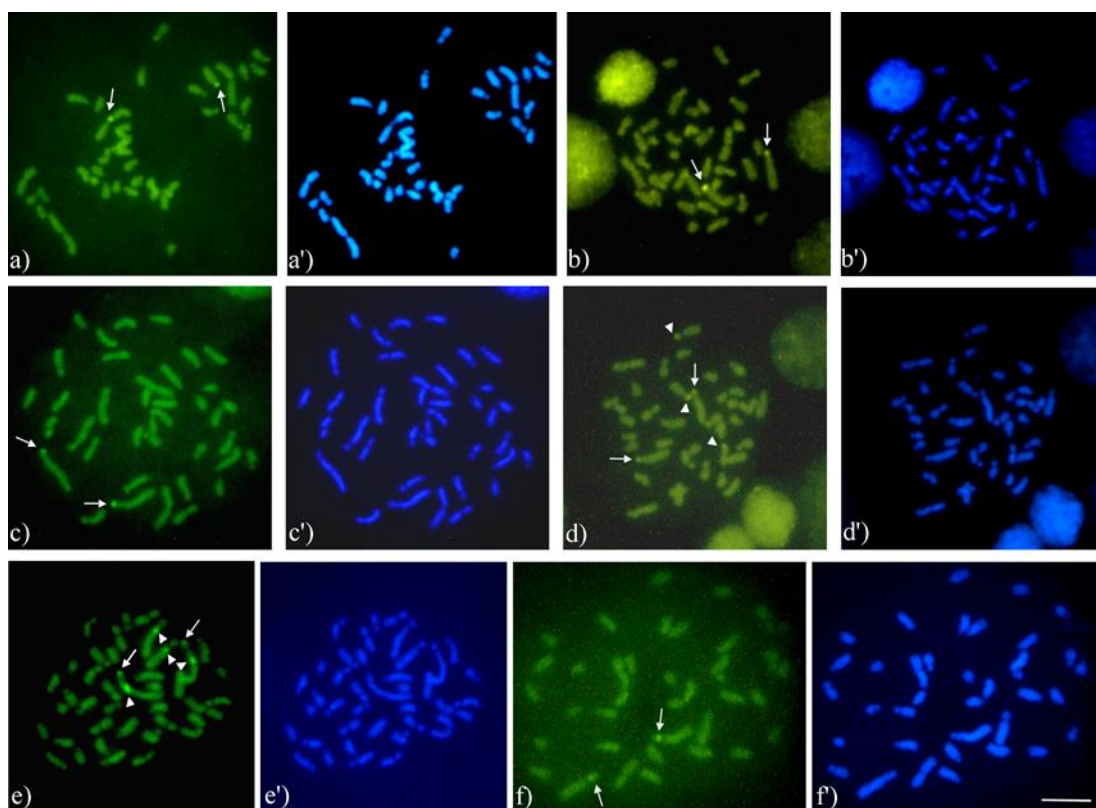


Figura 3 – Metáfases das espécies de *Acromyrmex* submetidas aos fluorocromos CMA<sub>3</sub> e DAPI, respectivamente. a) *A. balzani*, b) *A. coronatus*, c) *A. disciger*, d) *A. rugosus*, e) *A. niger*, f) *A. echinator*. Setas indicam marcação para o CMA<sub>3</sub> no maior par de cromossomos subtelocêntrico. Cabeças de seta indicam marcações adicionais para o CMA<sub>3</sub> em *A. niger* e *A. rugosus*. Barra = 5µm.

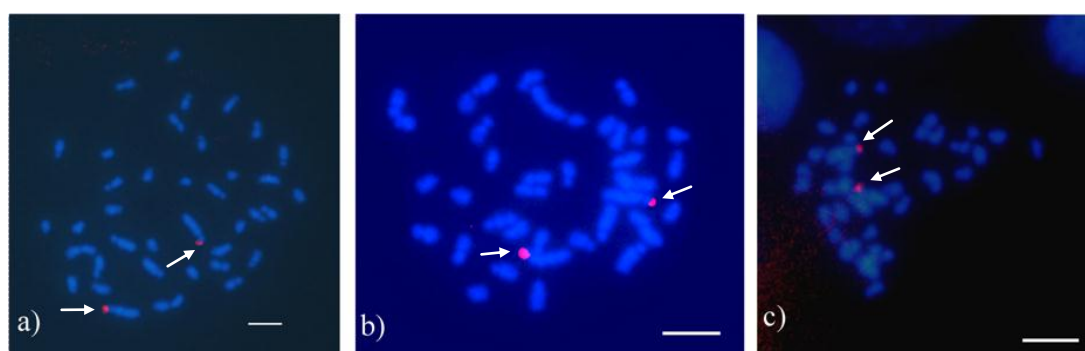


Figura 4 – Metáfases submetidas à técnica de FISH para detecção de sítios rDNA 45S. a) *A. disciger*, b) *A. coronatus*, c) *A. niger*. Setas indicam marcação no maior par subtelocêntrico. Barra = 5µm.

## Capítulo 3 – Artigo aceito para publicação

---

Cytogenetic Characterization of the Lower-Attine *Mycocepurus goeldii* (Formicidae: Myrmicinae: Attini)

## Cytogenetic Characterization of the Lower-Attine *Mycocepurus goeldii* (Formicidae: Myrmicinae: Attini)

by

Luísa Antônia Campos Barros<sup>1,2</sup>, Hilton Jeferson Alves Cardoso de Aguiar<sup>1,2</sup>,  
Cléa dos Santos Ferreira Mariano<sup>3,4</sup>, Jacques Hubert Charles Delabie<sup>3,5\*</sup>  
& Silvia das Graças Pompolo<sup>1,2</sup>

### ABSTRACT

The objective of this study was the cytogenetic characterization - number, morphology and banding pattern - of *Mycocepurus goeldii* Forel, 1893 as a contribution for a better comprehension of the evolution of the Attini tribe, a particular group of ants that obligately depend on the cultivation of fungus for food. The chromosome number observed was  $2n=8$  chromosomes ( $2K=8M$ ). C-banding technique indicated positive markings in the centromeric regions of three pairs of chromosomes, and the second-largest pair had a pericentromeric band on its long arm. Also, C-banding markings were coincident with CMA3 fluorochrome markings. The genus *Mycocepurus* is characterized by the lowest chromosome number in the Attini tribe, suggesting the karyotype to be relict, based on Minimum Interaction Theory. This plesiomorphy confirms this genus in a basal condition relative to the remaining Attini.

Key words: cytogenetics, ant, chromosome banding, evolution

### INTRODUCTION

Cytogenetics has gained a deserved place in comparative biology as an important tool for the study of evolution, since chromosome alterations are important

<sup>1</sup> Departamento de Biologia Geral; Laboratório de Citogenética de Insetos. Universidade Federal de Viçosa; Viçosa-MG, 36570-000, Brazil. luufv@yahoo.com.br, hilton.aguiar@hotmail.com, spompolo@ufv.br

<sup>2</sup> Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento. Universidade Federal de Viçosa – UFV – MG, Brazil.

<sup>3</sup> Laboratório de Mirmecologia, CEPEC/CEPLAC; Itabuna-BA, CP7, Brazil. camponotu@hotmail.com, jacques.delabie@gmail.com

<sup>4</sup> Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz; 45650-000 Ilhéus-BA, Brazil.

<sup>5</sup> Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais, Universidade Estadual de Santa Cruz; 45650-000 Ilhéus-BA, Brazil.

\*- corresponding author

for species evolution and are able to influence their adaptation (Hoffmann & Rieseberg 2008), acting also as isolation factors that contribute to speciation (White 1970). Moreover, gene expression is regulated, at least partially, by the neighboring genes' location, and thus a chromosomal rearrangement can lead to phenotypic alterations (Ridley 2006). Thus, cytogenetic data are useful for phylogenetic, taxonomic and evolutionary studies (McGregor 1993).

Ants occupy a keystone position in most terrestrial environments and are useful as model organisms for many studies (Schultz 2000). There are almost 12,600 species described (Agosti & Johnson 2005) and chromosome numbers are known for more than 750 ant populations (Lorite & Palomeque 2010). Chromosome numbers range from  $2n=2$  chromosomes in *Myrmecia croslandi* Taylor (Crosland & Crozier 1986) to 120 chromosomes in *Dinoponera lucida* Emery (Mariano *et al.* 2008). Few cytogenetic data are available for the Attini tribe, a particular group of ants that obligately depend on the cultivation of fungus for food, where only 23 taxa have been studied to date (Goñi *et al.* 1983; Fadini & Pompolo 1996; Fadini *et al.* 1996; Murakami *et al.* 1998; Barros *et al.* 2008) which represents about 10% of described species. Within this tribe, chromosome numbers range from  $2n=8$  chromosomes in *Mycocepurus* sp. (Murakami *et al.* 1998) to  $2n=54$  chromosomes in *Mycetarotes paralellus* Emery (Fadini & Pompolo 1996).

The Neotropical genus of fungus-growing ants *Mycocepurus* (Myrmicinae, Attini) includes currently five valid species (Kempf 1963; Mackay 1998; Fernandez 2003) that have been until recently little studied probably because of the difficulties of excavations of ant nests (Rabeling *et al.* 2007, 2009). Morphologic and behavioral data suggesting that this genus is plesiomorphic within Attini (Schultz & Meyer 1995; Rabeling *et al.* 2007; Mehdiabadi & Schultz 2009), and therefore cytogenetic, are particularly relevant for the understanding of the evolution in the tribe. Most of the evolutionary studies are related to the genera of higher agriculturists (*sensu* Mehdiabadi & Schultz 2009), which are more derived and less informative for the elucidation of the events related to the first steps of the evolution of the group (Rabeling *et al.* 2007).

The morphology of *Mycocepurus* ants is easily characterized among the fungus-growing ants because of their numerous spines on most bodily surfaces; additionally, this is the only genus in the New World that have a crown of spines on the pronotum (Mayhé-Nunes & Meneguete 2000; Mackay *et al.*

2004). *Mycocepurus goeldii* (Forel) is widely distributed, ranging from northern Argentina to the Guyana (Kempf 1963; Mackay 2004). An interaction between this species and the *Hymenaea courbaril* L. (Fabaceae: Caesalpinioideae) tree has been reported, where the removal of fruit matter by ant predation lowers fungal seed attack, enhancing seed germination (Oliveira *et al.* 1995). *Mycocepurus goeldii*, as well as *Mycocepurus Smithii* (Forel), accumulates nutrients in low soil layers that can be utilized by higher plants after they leave the ant nest chambers (Rabeling *et al.* 2007, 2009).

*Mycocepurus smithii* is a rare case of thelytokous parthenogenesis in ants (Rabeling *et al.* 2009; Mehdiabadi & Schultz 2009), while *M. goeldii* reproduces sexually, being reported as mating with several males (polyandry) (Rabeling *et al.* 2009; Mehdiabadi & Schultz 2009). The only cytogenetic information available for this genus is for an unidentified *Mycocepurus* species from Panama ( $2n=8$ ) (Murakami *et al.* 1998).

Fluorochromes are substances that can emit fluorescence under specific wavelengths. They are very useful in cytogenetics by their binding to the DNA with different affinities regarding the base pair composition. Usually fluorochromes are classified in two categories: AT- and GC-specific (Sumner 2003). Heterochromatin study and characterization is also important in cytogenetic studies of the family Formicidae, due to its central role in chromosome evolution of the group (Imai *et al.* 1988; Imai 1991). The fluorochrome Chromomycin A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>) marks regions which are rich in GC pairs and has already been used for ant chromosomes such as in *D. lucida* (Mariano *et al.* 2008), *Wasmannia auropunctata* (Roger) (Souza 2007), the social parasite *Acromyrmex ameliae* Souza, Soares & Della Lucia and its hosts *Acromyrmex subterraneus subterraneus* Forel and *Acromyrmex subterraneus brunneus* Forel (Barros *et al.*, 2008), *Tapinoma nigerrimum* (Nylander) (Lorite *et al.* 1997), and *Gnamptogenys striatula* Mayr (Barros *et al.*, unpublished data). Typically, all studied ants have CMA<sub>3</sub> markings on only one pair of chromosomes. In *D. lucida* and *T. nigerrimum*, the pair of chromosomes marked by CMA<sub>3</sub> overlaps with nucleolus organizing regions (NOR) evidenced with FISH through rDNA hybridization.

This study focused the cytogenetic characterization of *M. goeldii* (chromosome number, morphology and banding pattern), in a putative plesiomorphic position of this genus within Attini (Mehdiabadi & Schultz 2009).

## MATERIALS AND METHODS

A colony of *M. goeldii* with a single queen was collected in the Forest Reserve Mata do Paraíso in Viçosa, State of Minas Gerais, Brazil (20°41'20"S - 20°49'35"S; 42°49'36"W - 42°54'27"W) and reared at the Insect Cytogenetics Laboratory, Federal University of Viçosa, to warrant brood production used for cytogenetic studies. The metaphases were obtained from brain ganglia of pharate pupae of 20 workers, according to Imai *et al.* (1988). Eight to 10 metaphases were observed per individual. No male brood was found in the colony.

A portion of the obtained slides was stained with Giemsa to define chromosome morphology and the remaining part was submitted to chromosome banding techniques. The chromosomes were classified according to the nomenclature proposed by Imai (1991).

The distribution pattern of heterocromatin was obtained by C banding technique (Sumner 1972). The characterization of GC and AT base pairs richness along their chromosomes was obtained with Chromomycin A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>) and by 4'6-diamidin-2-phenylindole (DAPI) fluorochromes according to Schweizer (1980).

The metaphases were analyzed with an Olympus BX 60 microscope coupled to a computer image digitalizing system. The Q Capture® program was used to obtain the images. All slides submitted to the CMA<sub>3</sub> and DAPI fluorochrome techniques were analyzed with an epifluorescence microscope with a WB filter (450 to 480 nm) for the CMA<sub>3</sub> and the WU filter (330 to 385 nm) was used for the DAPI.

Imago vouchers were deposited in the collection Myrmecology Laboratory at the Cocoa Research Center (CEPEC), Ilheus, State of Bahia, Brazil.

## RESULTS AND DISCUSSION

The chromosome number of *M. goeldii* was  $2n=8$  chromosomes (Fig. 1) in all individuals (workers). All chromosomes were metacentric according to Imai (1991) and karyotypic formula  $2K=8M$ . However, according to the chromosome classification proposed by Levan *et al.* (1964), both the biggest and smallest chromosome pairs are assorted as metacentric, and the other two pairs are submetacentric. The *Mycocepurus* sp. karyotype studied in Panama by Murakami *et al.* (1998) had the same chromosome number and type. In

some metaphases observed in *M. goeldii*, the second pair of chromosomes presented secondary constriction on the long arm, close to the centromere region, which can be seen at least in one of the homologous chromosomes (Fig.2).

The C-banding technique indicated positive markings at centromeric and pericentromeric regions. Three pairs of chromosomes presented centromeric markings and the second-largest pair presented pericentromeric markings on its long arm.



Fig. 1. a) Female metaphase of *Mycocephalus goeldii* stained with Giemsa; and b) its karyotype. Bar=5  $\mu$ m.



Fig. 2. Second-largest pair of chromosomes indicating the presence of the secondary constriction at least in one of the homologous pairs. Bar=5  $\mu$ m.



Fig. 3. a) Metaphase submitted to the C banding technique for heterochromatin detection; and b) its karyotype. Bar=5  $\mu$ m.

Centromeric regions of three chromosome pairs were rich in GC base pairs ( $\text{CMA}_3^+$ ), and one pair presented a marking on the pericentromeric region of the long arm ( $\text{CMA}_3^+$ ) (Fig. 4a). The centromeric and pericentromeric regions that were rich in GC base pairs evidenced by the  $\text{CMA}_3$  fluorochrome were the same regions highlighted by heterochromatin using C banding technique. The fluorochrome DAPI did not present a specific marking pattern but the  $\text{CMA}_3^+$  regions showed DAPI, indicating that these fluorochromes were complementary (Fig. 4b). Unlike the pattern observed in different ant species studied with only one pair of markings for  $\text{CMA}_3$  fluorochrome, *M. goeldii* showed four marks for this fluorochrome.

Cytogenetic studies in ants indicate conservative pattern of NORs restricted to a single pair of chromosomes, in a GC-rich base pairs region. In *M. goeldii*, the  $\text{CMA}_3$  fluorochrome marked all chromosomes and therefore did not show a NOR specific location. It is unlikely that all markings are NOR bearers. However, considering that the second pair of chromosomes showed pericentromeric heterochromatin, secondary constriction and large  $\text{CMA}_3$  fluorescent marking without DAPI marking, we concluded that this pair likely bears NOR regions in this species.

Based on the Minimum Interaction Theory (Imai *et al.* 2002), lower chromosome numbers are expected to be a plesiomorphic trait. The *Mycocepurus* genus presents to date the smallest chromosome number for the Attini tribe,

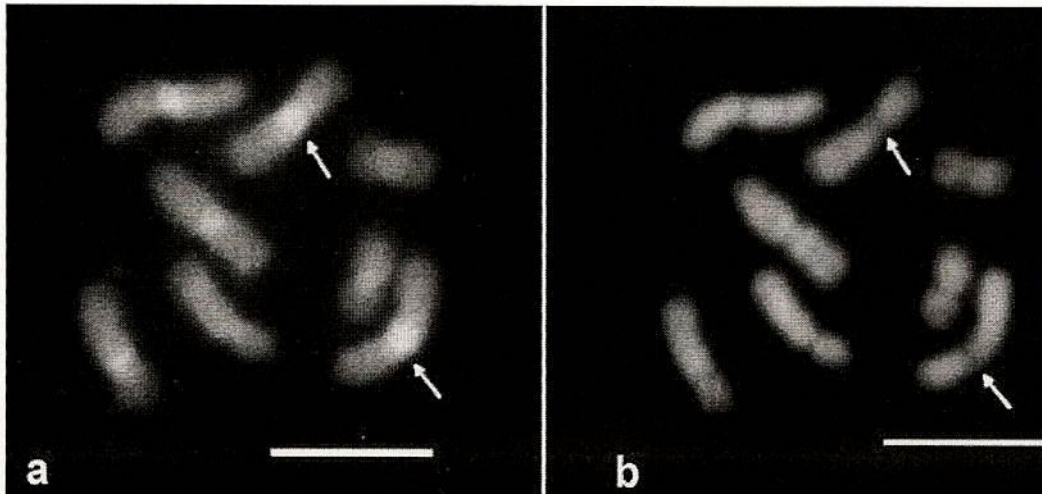


Fig. 4. a) Metaphase stained with the fluorochrome  $\text{CMA}_3$  and b) DAPI. Arrows points the positive and negative marks, for the fluorochromes  $\text{CMA}_3$  and DAPI respectively in the second pair of chromosomes, the likely NOR bearer pair. Bar=5  $\mu\text{m}$ .

a potential plesiomorphic characteristic and so, a relict karyotype (Imai *et al.* 2002), that suggests an older origin for this genus that confirms the phylogenetic molecular study by Schultz and Brady (2008) and other information about fungus-growing ant evolution (Mehdiabadi & Schultz 2009).

Cytogenetic data for the Attini tribe indicate patterns of variation in chromosome numbers that range from  $2n=8$  chromosomes in *Mycocepurus* sp. (Murakami *et al.* 1998), *M. goeldii* (present work) to  $2n=54$  chromosomes in *Myce. paralellus* (Fadini & Pompolo 1996). Most genera of this tribe for which cytogenetic information is available present variation species-level variation in their chromosome numbers. In the genus *Mycetarotes*, for example, *Mycetarotes carenatus* Mahye-Nunes presents  $2n=14$  and *Myce. paralellus*  $2n=54$  (Fadini *et al.* 1996). However, species of *Atta* and *Acromyrmex* have uniform chromosome numbers:  $2n=22$  and  $2n=38$  respectively, with the exception of *Ac. ameliae* which has  $2n=36$  chromosomes. The karyotypic conservatism of these two genera denotes evolutionary stability or recent differentiation from a common ancestor. Then, the low chromosome number observed in *M. goeldii* suggests retention of the low chromosome number which is certainly an ancestral character of the tribe.

The applying of CMA<sub>3</sub> fluorochrome to different ant subfamilies studied to date presented a marking on only a single pair of chromosomes including the *A. ameliae* species and its hosts (Barros *et al.* 2008), that belong to the same tribe as *M. goeldii*. Thus the study of the location and composition of the heterochromatin in other species of this tribe might be informative on the retention or loss of heterochromatin regions that are rich in GC pairs.

## ACKNOWLEDGMENTS

This research was part of the MSc thesis of the first author. LACB, HJACA and JHCD acknowledge their grants from Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq). The authors thank Jorge Dergam for reviewing the manuscript and Manoel José Ferreira for providing the biological material.

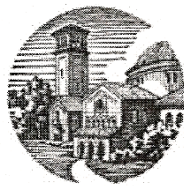
## REFERENCES

- Agosti, D., & Johnson, N.F. Editors. 2005. Antbase. World Wide Web electronic publication. antbase.org, version (05/2005). - <<http://antbase.org/index.htm>>, retrieved on 22 December 2009.

- Barros, L.A.C, Mariano, C.S.F, Hora, R.R., Della-Lucia, T.M.C., Delabie, J.H.C., Pompolo, S.G. 2008. 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, 2008, Salvador-BA (Brazil): 351.
- Crosland, M.W.J. & Crozier, R.H. 1986. *Myrmecia pilosula*, an ant with only one pair of chromosomes. *Science* 231: 1278.
- Fadini, M.A.M. & Pompolo, S.G. 1996. Cytogenetics of some ant species of the tribe Attini (Hymenoptera, Formicidae) from the region of Viçosa, MG. *Revista Brasileira de Genética* 19: 53-55.
- Fadini, M.A.M., Mayé-Nunes, A.J., Pompolo, S.G. 1996. Citogenética de duas espécies do gênero *Mycetarotes* (Hymenoptera: Formicidae). XLII Congresso Nacional de Genética, Caxambu, MG (Brazil): 126.
- Fernandez, F. 2003. Listado de las especies de hormigas de la Región Neotropical. 379-411. In: F. Fernández (Ed.), *Introducción a las Hormigas de la Región Neotropical*. Instituto de investigation de recursos biológicos Alexander von Humboldt, Bogotá, Colômbia.
- Goñi, G., Zolessi, L.C. & Imai, H.T. 1983. Karyotype of thirteen ant species from Uruguay (Hymenoptera - Formicidae). *Caryologia* 36: 363-371.
- Hoffmann, A.A. & Rieseberg, L.H. 2008. Revisiting the impact of inversions in evolution: from population genetic markers to drivers of adaptive shifts and speciation? *The Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 39: 21-42.
- Imai, H.T. 1991. Mutability of constitutive heterochromatin (C-bands) during eukaryotic chromosomal evolution and their cytological meaning. *Japanese Journal of Genetics* 66: 635-661.
- Imai, H.T., Satta, Y., Wada, M., Takahata, N., 2002. Estimation of the Highest Chromosome Number of Eukaryotes Based on the Minimum Interaction Theory. *Journal of Theoretical Biology* 217: 61-74.
- Imai, H.T., Taylor, R.W., Crosland, M.W. & Crozier, R.H. 1988. Modes of spontaneous chromosomal mutation and karyotype evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis. *Japanese Journal of Genetics* 63: 159-185.
- Kempf, W. 1963. A review of the ant genus *Mycocepurus* Forel, 1893 (Hymenoptera: Formicidae). *Studia Entomologica*. 6: 417-433.
- Levan, A., Fredga, K. & Sandberg, A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.
- Lorite, P., Aránega, A.E., Luque, F., Palomeque, T. 1997. Analysis of the nucleolar organizing regions in the ant *Tapinoma nigerrimum* (Hymenoptera, Formicidae). *Heredity* 78: 578-582.
- Lorite, P. & Palomeque, T. 2010. Karyotype evolution in ants (Hymenoptera: Formicidae), with a review of the known ant chromosome numbers. *Myrmecological News* 13: 89-102
- MacGregor, H.C. 1993. Karyology and evolution. In: *An Introduction to Animal Cytogenetics*, Macgregor H.C. (Ed.). London: Chapman & Hall. pp.13-28.

- MacKay, W.P. 1998. Dos especies nuevas de hormigas de la tribu Attini de Costa Rica y México: *Mycetosoritis vinsoni* y *Mycocepurus curvispinosus* (Hymenoptera: Formicidae). *Revista de Biología Tropical* 46: 421-426.
- MacKay, W.P., Maes, J.M., Fernández, P.R., Luna, G. 2004. The ants of North and Central America: the genus *Mycocepurus* (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Insect Science* 4 (27): 1-7.
- Mariano, C.S.F, Pompolo, S.G., Barros, L.A.C., Mariano-Neto, E., Campiolo, S., Delabie, J.H.C. 2008. A biogeographical study of the threatened ant *Dinoponera lucida* Emery (Hymenoptera: Formicidae: Ponerinae) using a cytogenetic approach. *Insect Conservation and Diversity* 1: 161-168.
- Mayhé-Nunes, A.J., Meneguete, P.S. Definição de termos para as projeções mesossomais das operárias de *Mycocepurus* Forel, 1893 (Hymenoptera, Formicidae). 2000. *Contribuições Avulsas sobre a História Natural do Brasil. Série Zoologia* 27: 1-7.
- Mehdiabadi, N.J. & Schultz, T.R. 2009: Natural history and phylogeny of the fungus-farming ants (Hymenoptera: Formicidae). *Myrmecological News* 13: 37-55.
- Murakami T., Fujiwara A., Yoshida, M.C. 1998. Cytogenetics of ten ant species of the tribe Attini (Hymenoptera, Formicidae) in Barro Colorado Island, Panama. *Chromosome Science*. 2: 135-139.
- Oliveira, P.S., Pedroni, F., Morellato, L.P.C., Galetti, M. 1995. Seed cleaning by *Mycocepurus goeldii* ants (Attini) facilitates germination in *Hymenaceae* courbaril (Caesalpiniaceae). *Biotropica* 27: 518-522.
- Rabeling, C., Verhaagh, M., Engels, W. 2007. Comparative study of nest architecture and colony structure of the fungus-growing ants, *Mycocepurus goeldii* and *M. smithii*. *Journal of Insect Science* 7 (40): 1-13.
- Rabeling, C., Lino-Neto, J., Cappellari, S.C., Dos-Santos, I.A., Mueller, U.G & Bacci, M., Jr. 2009. Thelytokous parthenogenesis in the fungus-growing ant *Mycocepurus smithii* (Hymenoptera: Formicidae). *Public Library of Science ONE* 4: e6781.
- Ridley, M., 2006. *Genética Molecular e Mendeliana*. In: *Evolução*. 3<sup>rd</sup> Ed. Porto Alegre – Brazil: Artmed. pp.45-65.
- Schultz, T.R. 2000. In search of ant ancestors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 14028-14029
- Schultz, T.R. & Meier, R. 1995. A phylogenetic analysis of the fungus-growing ants (Hymenoptera: Formicidae: Attini) based on morphological characters of the larvae. *Systematic Entomology* 20: 337-370.
- Schultz, T., & Brady, S. 2008. Major evolutionary transitions in ant agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (14): 5435-5440.
- Souza, A.L.B. 2007. Estudos genéticos e comportamentais em espécies de *Wasmannia* (Hymenoptera: Formicidae). DSc Tese. Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil. 61p. (In Portuguese)
- Schweizer, D. 1980. Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA/DAPI-bands) in human chromosomes. *Cytogenetics and Cell Genetics* 27: 190-193.

- Sumner, A.T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin  
Experimental Cell Research 83: 438-442.
- Sumner, A.T. 2003. Chromosomes: Organization and Function. Blackwell Publishing. North  
Berwick, United Kingdom. 287 p.
- White, M.J.D. 1970. Cytogenetics of speciation. Journal of Australian Entomological  
Society 9: 1-6.



Anexo – Figuras do Capítulo 3



Figure 1 – a) Female metaphase of *Mycocephurus goeldii* stained with Giemsa; and b) its karyotype. Bar = 5  $\mu$ m.

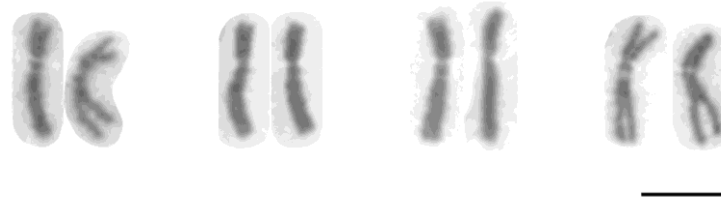


Figure 2 – Second-largest pair of chromosomes indicating the presence of the secondary constriction at least in one of the homologous. Bar = 5  $\mu$ m.



Figure 3 – a) Metaphase submitted to the C-banding technique for heterochromatin detection and b) its karyotype. Bar = 5  $\mu$ m.

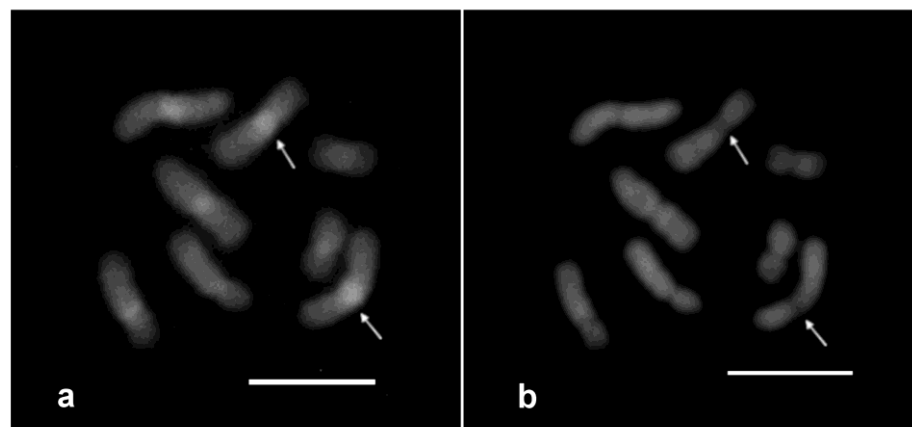


Figura 4 – a) Metaphase stained with the fluorochrome CMA<sub>3</sub> and b) DAPI. Arrows point the positive and negative marks, for the fluorochromes CMA<sub>3</sub> and DAPI, respectively, in the second pair of chromosomes, the likely NOR bearer pair. Bar = 5  $\mu$ m.

## Conclusões Gerais

Os estudos citogenéticos na tribo Attini permitiram concluir que:

O cariótipo de *Sericomyrmex* sp. mostrou  $2n=50$  (44m + 6sm);  $n=25$  (22m + 3sm) semelhante ao cariótipo da espécie endêmica do Panamá, *Sericomyrmex amabilis*.

Para as três espécies do gênero *Trachymyrmex* foram encontradas as seguintes fórmulas cariotípicas: *T. fuscus*  $2n=18$  (16m + 2sm), *T. relictus*,  $2n=20m$  e *Trachymyrmex* sp.  $2n=22$  (18m + 4sm). A heterocromatina foi localizada na região centromérica nas espécies *T. fuscus* e *T. relictus*.

Um polimorfismo de tamanho no braço curto do par submetacêntrico foi observado em *T. fuscus*. Foram encontrados indivíduos heterozigotos (com diferença de tamanho nos braços curtos), padrão (braços curtos sem aumento de tamanho) e homozigotos (braços curtos com aumento de tamanho).

Os cariótipos de *Apterostigma madidiense* e *Apterostigma steigeri* mostraram diferenças na morfologia e no número cromossômico:  $2n=22$  (20m + 2sm) e  $n=23$  (7m + 10sm + 5st + 1a), respectivamente.

As seis espécies do gênero *Acromyrmex* apresentaram  $2n=38$  cromossomos. Cada espécie mostrou um cariótipo diferenciado em relação a morfologia e variações na distribuição de heterocromatina (banda C) e regiões ricas em GC (CMA<sub>3</sub>). Em três espécies (*A. coronatus*, *A. disciger*, *A. niger*) o par subteloentrico de maior tamanho foi o portador de genes ribossomais 45S. Os dados citogenéticos até então obtidos corresponderam a cerca de 1/3 do total de espécies descritas para o gênero.

*Mycocepurus goeldii* apresentou  $2n=8$  cromossomos (4m + 4sm), o que correspondeu ao menor número cromossômico observado na tribo Attini, até o momento. O baixo número cromossômico sugere um cariótipo relíquia, uma potencial característica plesiomórfica. Além disso, a localização da heterocromatina ocorreu na região centromérica em três pares de cromossomos e pericentromérica no braço longo em um par de cromossomos. Este padrão de marcação coincide com o padrão do fluorocromo CMA<sub>3</sub>. O par de cromossomos que apresentou marcação pericentromérica mostrou a maior marcação para os bandamentos além de constrição secundária, o que sugere que este par de cromossomos seja o portador da NOR.