

**TÁSSIA TATIANE PONTES PEREIRA**

**ESTUDO ECOLÓGICO E CITOGENÉTICO DA FORMIGA CULTIVADORA DE FUNGO *Trachymyrmex holmgreni* Wheeler, 1925 EM ECOSISTEMA COSTEIRO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ecologia da Universidade Federal de Viçosa como parte dos requisitos para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS- BRASIL  
2017**

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da  
Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

P436e  
2017  
Pereira, Tássia Tatiane Pontes, 1987-  
Estudo ecológico e citogenético da formiga  
cultivadora de fungo *Trachymyrmex holmgreni* Wheeler,  
1925 em ecossistema Costeiro / Tássia Tatiane Pontes  
Pereira. - Viçosa, MG, 2017.

x, 42f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador : Maykon Passos Cristiano.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Formigas. 2. Evolução (Biologia).  
3. Cromossomos. 4. Ecologia das restingas.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Biologia Geral. Programa de Pós-graduação em  
Ecologia. II. Título.

CDD 22 ed. 595.796

**TÁSSIA TATIANE PONTES PEREIRA**

**ESTUDO ECOLÓGICO E CITOGÉNÉTICO DA FORMIGA CULTIVADORA DE FUNGO *Trachymyrmex holmgreni* Wheeler, 1925 EM ECOSISTEMA COSTEIRO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ecologia da Universidade Federal de Viçosa como parte dos requisitos para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Aprovada: 27 de março de 2017.

---

**Terezinha Maria Castro Della Lucia**

---

**Jéferson Nunes Fregonezi**

---

**Danon Clemes Cardoso**  
(coorientador)

---

**Maykon Passos Cristiano**  
(orientador)

**Ao meu pai, meu porto seguro, dedico.**

*“Estamos na situação de uma criancinha que entra em uma imensa biblioteca, repleta de livros em muitas línguas. A criança sabe que alguém deve ter escrito aqueles livros, mas não sabe como. Não compreende as línguas em que foram escritos. Tem uma pálida suspeita de que a disposição dos livros obedece a uma ordem misteriosa, mas não sabe qual ela é” (Albert Einstein)*

## AGRADEÇO

Aos meus pais e ao Alex pela paciência e apoio incondicional.

Aos meus irmãos pelo incentivo e por serem exemplos de determinação e coragem.

Ao professor Maykon Passos Cristiano por confiar a mim este trabalho, pela oportunidade de aprender sobre o universo das formigas e pela paciência em ter que ensinar tudo até as coisas mais básicas, inclusive a fazer backup do trabalho.

Ao professor Danon Cledes Cardoso pela co-orientação tão presente. Gratidão por me ensinar a persistir nos objetivos, por ensinar através do exemplo que se deve fazer ciência com muito amor ao objeto de estudo e sempre que você fizer o trabalho com dedicação e boa vontade ele te dará resultados melhores. E deu!

Às famílias dos meus orientadores por abrirem suas casas e me receberem tão bem durante as expedições de campo.

À IC Ana Caroline Coelho, por ser a mão direita em todo o trabalho de laboratório executando com eficiência e responsabilidade. Por passar horas e horas sob o microscópio e ainda me agradecer por isso.

Aos amigos “do limbo” Grazieli Dueli, Glória Soares, Giselle Lourenço, Tércia Vargas, André da Paz, Caio da Paz, José Falcon e a todos os “ButEcólogos” que tornaram as angústias e desânimos em risadas e coragem.

Aos amigos da infância, colégio e faculdade: Marina Mol, Júlia Salles, Ana Firmino, Muryel Almeida, Roberta Barletta, Izabella Brunelli, Kel Xavier, Daniela Eloi, Philipe Brito, Marcus Vinicius e as “Meninas de Mariana” que entenderam a ausência e se mantiveram presentes com bons conselhos durante todo o processo.

A Marina Beirão pela ajuda nas análises estatísticas, a Julia Salles pela ajuda no desenho do ninho, a Natália Travenzoli pela ajuda na montagem das pranchas e técnicas de citogenética, José Falcon pela ajuda no R, ao Rodrigo de Jesus por me ensinar a fotografar formigas, ao Júlio Chaul e demais colegas do Laboratório de Ecologia de Comunidades da UFV por se disponibilizarem a me ajudar e dividirem o espaço comigo.

Aos professores Terezinha Maria Castro Della Lucia e Jéferson Nunes Fregonezi por dedicarem o tempo na leitura e contribuição com este trabalho. Muito obrigada!

A Universidade Federal de Viçosa e Universidade Federal de Ouro Preto pela minha formação.

# SUMÁRIO

RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	ix
1. <b>Introdução geral</b> .....	1
2. <b>Referências</b> .....	4
3. <b>Arquitetura, demografia e padrão de distribuição do ninho da formiga cultivadora de fungo <i>Trachymyrmex holmgreni</i> Wheeler, 1925 no ecossistema de Restinga</b> .....	7
3.1. Resumo .....	7
3.2. Introdução .....	8
3.3. Materiais e Métodos .....	9
3.3.1. Área de estudo .....	9
3.3.2. Arquitetura do ninho .....	10
3.3.3. Demografia .....	11
3.3.4. Padrão de distribuição .....	11
3.4. Resultados .....	12
3.4.1. Arquitetura do ninho .....	12
3.4.2. Demografia .....	14
3.4.3. Padrão de distribuição .....	16
3.5. Discussão .....	18
3.5.1. Arquitetura do ninho .....	18
3.5.2. Demografia .....	20
3.5.3. Padrão de distribuição .....	21
3.6. Conclusões .....	22
3.7. Referências .....	24
4. <b>Estudo citogenético da formiga cultivadora de fungo <i>Trachymyrmex holmgreni</i> Wheeler 1925 (Hymenoptera: Formicidae)</b> .....	29
4.1. Resumo .....	29
4.2. Introdução .....	29
4.3. Materiais e Métodos .....	30
4.3.1. Colônias amostradas .....	30
4.3.2. Caracterização e estrutura cromossômica .....	31
4.4. Resultados .....	31
4.5. Discussão .....	36
4.6. Referências .....	39
5. <b>CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	42

## RESUMO

PEREIRA, Tássia Tatiane Pontes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2017. **Estudo ecológico e citogenético da formiga cultivadora de fungo *Trachymyrmex holmgreni* Wheeler, 1925 em ecossistema Costeiro.** Orientador: Maykon Passos Cristiano. Coorientador: Danon Cledes Cardoso.

O gênero *Trachymyrmex* possui um comportamento intermediário entre as formigas cultivadoras de fungo não-cortadeiras e cortadeiras, pois utilizam tanto matéria orgânica em decomposição como as formigas não cortadeiras quanto material vegetal cortado fresco como as cortadeiras para substrato no cultivo do fungo. Além disso, o gênero *Trachymyrmex*, o qual divergiu entre 15 e 20 milhões anos assumi uma posição filogenética intermediária. Esses aspectos fazem com o que o estudo das características biológicas das espécies que compõem esse gênero seja importante para compreender os passos intermediários na evolução do cultivo do fungo simbiote. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi realizar um estudo ecológico e citogenético da espécie de formiga cultivadora de fungo *Trachymyrmex holmgreni* a fim de contribuir para a compreensão da evolução do grupo. A abordagem ecológica consistiu em descrever a arquitetura do ninho, a demografia da colônia em duas estações do ano e avaliar o padrão de distribuição dos ninhos em ecossistema de Restinga. A abordagem citogenética foi realizada por meio do estudo do cariótipo de quatro populações geograficamente distintas. O estudo ecológico foi realizado ao longo de três praias no litoral sul brasileiro, nas localidades de Morro dos Conventos-SC, Balneário Gaivota-SC e Torres-RS e o citogenético, além dessas três, incluímos uma população de Cachoeira do Campo-MG localizada a aproximadamente 1.500km de distância das demais populações. Escavamos e coletamos 50 ninhos para descrição da arquitetura e demografia. Amostramos ninhos na paisagem por meio de quadrantes e utilizamos os índices  $R$  de Clarck e Evans e  $Ip$  de Morisita para o padrão de distribuição. Para o estudo citogenético, utilizamos os ninhos coletados para o estudo demográfico e um ninho da população de Cachoeira do Campo-MG. As colônias foram mantidas vivas em laboratório e utilizamos as larvas para coleta do tecido cerebral para obtenção de cromossomos metafásicos. Conduzimos a técnica convencional de Giemsa para avaliar número e a morfologia. Utilizamos a coloração com fluorocromos CMA<sub>3</sub> e DAPI para avaliar a composição de bases GC/AT dos cromossomos. Nossos resultados nos permitiram afirmar que a arquitetura do ninho e a demografia da colônia variam entre as estações. No outono os ninhos apresentaram três câmaras de fungo e um número significativo de indivíduos da casta reprodutiva, já na primavera apresentou 5 câmaras em média e mais imaturos do que no outono. Estes resultados sugerem que as colônias de *T. holmgreni* investem em reprodução durante o outono estabelecendo novos ninhos durante o inverno e investem em crescimento durante a primavera e verão. Além disso,

encontramos um padrão de distribuição agregado dos ninhos, indicando que provavelmente fatores abióticos como disponibilidade de recurso e condições microclimáticas do solo interferem no sucesso do estabelecimento das colônias. O estudo citogenético mostrou que *T. holmgreni* não apresenta clinas cromossômicas sendo o cariótipo composto por  $2n = 20M$  ( $n = 10$ ), mas apresentam variação no tamanho total dos cromossomos. Além disso, *T. holmgreni* apresentou marcações positivas para o fluorocromo CMA<sub>3</sub> na região centromérica e pericentromérica, as quais foram negativas na coloração com DAPI, mostrando que essa região é rica em pares de bases GC. Esses resultados sugerem uma estabilidade desse cariótipo e que provavelmente as pequenas variações encontradas no gênero sejam resultados de rearranjos cromossômicos a partir desse cariótipo.

## ABSTRACT

PEREIRA, Tássia Tatiane Pontes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2017. **Ecological and cytogenetic study of fungus-growing ant *Trachymyrmex holmgreni* Wheeler, 1925 in Coastal ecosystem.** Adviser: Maykon Passos Cristiano. Co-adviser: Danon Clemes Cardoso.

The genus *Trachymyrmex* has an intermediate behavior between the “leaf-cutters” and “non-cutters” fungus-growing ants, since they can use both fresh cutted and detrits as substrate to grown the simbiotic fungus. In addition, to this behaviour the genus *Trachymyrmex*, which diverged between 15 and 20 million years ago, assume a intermediate phylogenetically position. These aspects make the study of the biological characteristics to characterize *Trachymyrmex* interesting to understand the steps in the evolution of fungus agriculture. In this sense, the objective of this work was to carry out an evolutionary study on the fungus-growing ant species *Trachymyrmex holmgreni*, through an ecological and cytogenetic approach. The former approach consists in describing the fundamental biological characteristics of any social insect: their nest architecture, colony demography, as well as the distribution pattern of the colonies in the ecosystem. The later approach was accomplished by studying the karyotype of four geographically distinct populations. The ecological study was carried out along three beaches in the southern Brazilian coast around the cities of Morro dos Conventos-SC, Balneário Gaivota-SC and Torres-RS. During the cytogenetic study, besides the three populations mentioned before we included a fourth population from Cachoeira do Campo-MG, located more than 1500 km away. We excavated and collected 50 nests to describe the architecture and demography. We sampled nests in the landscape in arbitrarily plotted quadrats, and calculated the R index of Clark and Evans and Ip of Morisita to describe the distribution pattern. For the cytogenetic study, we used the nests collected for the demographic study and one nest from the population of Cachoeira do Campo-MG. The colonies were kept alive in the laboratory and we used the larvae to obtain brain tissue to prepare metaphasic chromosomes. We conducted the conventional staining with Giemsa to evaluate number and morphology and used sequential staining with fluorochromes CMA<sub>3</sub> and DAPI to evaluate the composition of the chromosomes bases AT/CG. Our results allowed us to suggest that the architecture of the nest responds to the seasonal cycle of the colony. In the autumn the nests presented three fungus chambers and significant number of individuals of the reproductive caste, whereas in the spring they displayed, in average, 5 fungus chambers and many immature individuals. These results indicate that the colonies of *T. holmgreni* invest in reproduction during the fall establishing new nests during the winter, which promotes growth during the spring and summer. In addition, we found an aggregate distribution pattern of the nests, indicating that abiotic factors such as

resource availability and microclimatic soil conditions probably interfere with the successful establishment of the colonies. The cytogenetic study showed that *T. holmgreni* does not present chromosomal clines being the karyotype composed of  $2n = 20$  ( $n = 10$ ). In addition, *T. holmgreni* presented positive markings for the CMA<sub>3</sub> fluorochrome in the centromeric and pericentromeric regions, which were negative in the DAPI staining, suggesting that this region is rich in GC-base pairs. This result also suggests a stability in karyotype but that the small variations found are probably results of chromosomal rearrangements from this numeric stable karyotype.

## 1. Introdução geral

O comportamento eussocial evoluiu em quatro grupos de insetos: abelhas, cupins, vespas e formigas e este comportamento é o mais alto grau de organização social conhecido (Wilson, 1971). A eussocialidade consiste em uma vida colonial onde os indivíduos agem em cooperação, há sobreposição de gerações, cuidado com prole e divisão do trabalho, tendo uma casta exclusiva para reprodução (Wilson, 1971). A sobrevivência de cada indivíduo depende da sobrevivência da colônia. Tão forte é essa dependência que uma colônia de insetos eussociais deve ser entendida como um superorganismo (Hölldobler & Wilson, 2009).

Apenas as formigas apresentam eussocialidade em todas as espécies do grupo (Hölldobler & Wilson, 1990). Elas surgiram a aproximadamente 100 milhões de anos, e são considerados os insetos de maior sucesso ecológico (Moreau & Bell, 2013), ocorrendo em todos os ambientes terrestres com exceção dos polos.

Atualmente existem 15.983 espécies e subespécies agrupadas em uma única família denominada Formicidae que compreende 20 subfamílias e 464 gêneros (Bolton, 2016). A subfamília Myrmicinae agrupa 47% das espécies descritas incluindo as formigas cultivadoras de fungo (Bolton, 2016).

As formigas cultivadoras de fungo incluem 16 gêneros e 257 espécies (Klingenberg & Brandão, 2009; Sosa-Calvo, 2013). Elas surgiram por volta de 50 milhões de anos atrás (Schultz & Brady, 2008), são exclusivas do Novo Mundo e mais diversas na região Neotropical (Hölldobler & Wilson, 1990). Esse grupo é caracterizado pela relação mutualística que estabeleceu com fungos basidiomicetos, que são cultivados para alimentação da colônia, principalmente ou exclusivamente das larvas (Weber, 1972; Hölldobler & Wilson, 1990). Essa relação inclui as formigas, seus fungos cultivados, das famílias Leucocoprineae e Pterulaceae, e a bactéria filamentosa do gênero *Pseudonocardia*, que cresce no tegumento das formigas (Schultz & Brady, 2008). Por meio da interação com essas bactérias, e outras estratégias comportamentais, fornecem ao fungo proteção contra patógenos, substrato para seu crescimento e dispersão (Weber, 1972; Mehdiabadi & Schultz, 2010; Fernández-Marín, 2013).

O surgimento da relação formiga-fungo é um passo evolutivo muito importante no grupo das formigas cultivadoras de fungo sendo foco de muitos estudos. Schultz & Brady, (2008) e Mehdiabadi & Schultz, (2009) realizaram um estudo detalhado da evolução desse grupo e dos seus fungos cultivados. A partir das conclusões destes estudos foram estabelecidos cinco sistemas de agricultura praticados por essas formigas, que representam as transições na evolução desse grupo, sendo eles: agricultura basal (*Lower agriculture*), agricultura do fungo

coral (*Coral fungus agriculture*), agricultura de levedura (*Yeast agriculture*), a agricultura generalizada derivada (*Generalized higher agriculture*) e por último a agricultura das cortadeiras de folha (*Leafcutter agriculture*).

Os gêneros *Mycocepurus*, *Myrmicocrypta*, *Apterostigma*, *Kalathomyrmex*, *Paramycetophylax*, *Mycetophylax*, *Mycetarotes*, *Cyphomyrmex*, *Mycetosoritis* e *Mycetagroicus* praticam agricultura basal. Esses gêneros divergiram a aproximadamente 50 milhões de anos atrás de uma linhagem ancestral que deu origem às formigas cultivadoras de fungo. Eles compartilham muitas características consideradas ancestrais. Geralmente apresentam ninhos inconspícuos, colônias pequenas com 10 a 100 operárias monomórficas e utilizam carcaça de insetos, sementes, partes de flores, frutas em decomposição como substrato para o fungo cultivado (Mehdiabadi & Schultz, 2009).

Os gêneros *Sericomyrmex* e *Trachymyrmex* praticam agricultura generalizada derivada, divergiram de um ancestral entre 10 e 20 milhões de anos e compartilham características ancestrais e derivadas. Os ninhos são mais perceptíveis, apresentam tamanho de colônia intermediário com 100 a 3.000 operárias, são monomórficas ou levemente polimórficas. Ainda, utilizam carcaça de insetos, sementes, partes de flores, frutas em decomposição e facultativamente utilizam material vegetal cortado fresco (Mehdiabadi & Schultz, 2009).

Os gêneros *Acromyrmex* e *Atta* praticam a agricultura das cortadeiras de folha, compartilham um ancestral comum com algumas espécies do gênero *Trachymyrmex* e diversificaram-se entre 10 a 12 milhões de anos (Schultz & Brady, 2008). As espécies desses gêneros apresentam características consideradas derivadas, tais como ninhos perceptíveis, colônias muito grandes chegando a 10 milhões de operárias. Elas são polimórficas e utilizam exclusivamente material vegetal cortado fresco como substrato para o fungo. (Mehdiabadi & Schultz, 2009; Della Lucia, 2011; Sosa-Calvo, 2015).

Apesar da transição entre os sistemas de agricultura ser um passo importante para o entendimento da evolução do grupo (Schultz & Brady, 2008), a transição entre sistema de agricultura basal para a agricultura das formigas cortadeiras é reconhecido como o segundo passo mais importante na evolução das formigas cultivadoras de fungo (Mayhé-Nunes & Jaffé, 1998). Isso porque, as formigas cortadeiras são dominantes na paisagem onde ocorrem, apresentam maiores tamanhos de colônias, ninhos altamente sofisticados (Hölldobler & Wilson, 1990; Della Lucia, 2011), podendo ser reconhecidas como as de maior sucesso ecológico entre as formigas cultivadoras de fungo. Apesar de serem focos de muitos estudos devido ao impacto que causam na agricultura, os passos evolutivos intermediários que as permitiram alcançar tal sucesso são pouco estudados.

*Trachymyrmex* é um táxon chave à compreensão da transição entre o sistema de agricultura basal para a agricultura das formigas-cortadeiras (Brandão & Mayhé-Nunes, 2007; Schultz & Brady, 2008). A posição filogenética do gênero *Trachymyrmex*, o compartilhamento de um ancestral comum com *Acromyrmex* e *Atta* e as características ecológicas como o tipo de substrato utilizado no cultivo de fungo e o fungo cultivado justificam tal afirmação (Schultz & Brady, 2008). *Trachymyrmex* é amplamente distribuído na região neotropical com algumas espécies exclusivas do Neártico (Mayhé-Nunes & Jaffé, 1998). Atualmente são 47 espécies descritas (Bolton, 2017) sendo reconhecido como um dos grupos mais diversos entre as formigas cultivadoras de fungo depois de *Acromyrmex* (Brandão & Mayhé-Nunes, 2007).

A espécie *T. holmgreni* tem distribuição conhecida da Bolívia ao sudeste do Brasil (Mayhe-Nunes & Brandão, 2005). Cardoso et al. (2009) registraram a ocorrência da espécie no ecossistema de Restinga na região sul do Brasil. Esse ecossistema pode ser caracterizado por uma fitofisionomia distinta com formações vegetais herbáceas, arbustivas e arbóreas (Thomazi et al., 2013). É considerado um ecossistema frágil devido ao solo arenoso pobre em nutrientes e com grau de salinidade elevado (Rocha et al., 2004). Esses fatores abióticos, somados à exposição intensa do sol, extremos de temperatura, ventos e baixa disponibilidade de água, fazem com que as espécies que ocorrem nesse ambiente apresentem adaptações para suportarem essas condições ambientais (Rocha et al., 2004).

Com o objetivo de entender os “passos evolutivos” entre as formigas não-cortadeiras e cortadeiras realizamos o estudo ecológico e citogenético da espécie *T. holmgreni*. Deste modo, descrevemos a arquitetura do ninho, demografia da colônia no outono e primavera e avaliamos o padrão de distribuição dos ninhos no ecossistema de Restinga. Além disso, por sabermos que a citogenética é uma ferramenta que pode ser utilizada de forma complementar em estudos evolutivos (Macgregor, 1993), caracterizamos o cariótipo da espécie em quatro populações geograficamente distintas. Objetivamos avaliar o número, morfologia e composição de bases dos cromossomos, como intuito de fornecer informação sobre a estrutura cromossômica da espécie além de contribuir no entendimento da evolução cromossômica do taxon.

Este trabalho está dividido em dois capítulos. O Capítulo 1 aborda o estudo ecológico e o Capítulo 2 o estudo citogenético.

## 2. Referências

- BOLTON, B.: **Bolton World Catalog**. AntWeb. Disponível em: <https://www.antweb.org/project.do?name=worldants>. Acessado em 13 de fevereiro de 2017
- BOLTON, B.: **Bolton World Catalog**. AntWeb. Disponível em: <https://www.antweb.org/description.do?subfamily=myrmicinae&genus=trachymyrmex&rank=genus>. Acessado em 13 de fevereiro de 2017
- BURCHILL, A. T.; MOREAU, C. S. Colony size evolution in ants: macroevolutionary trends. **Insectes Sociaux**, v. 63, n. 2, p. 291-298, 2016.
- BRANDÃO, C. R. F.; MAYHÉ-NUNES, A. J. A phylogenetic hypothesis for the *Trachymyrmex* species groups, and the transition from fungus-growing to leaf-cutting in the Attini. **Advances in ant systematics (Hymenoptera: Formicidae): homage to E. O. Wilson**, v. 50, p. 72-88, 2007.
- CARDOSO, C. D. **Determinantes de comunidades de formigas em Restinga**. 2009. 68f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Entomologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2009.
- DA ROCHA, D. F. C.; ESTEVES, D. A. F.; SCARANO, R. F. Pesquisas de longa duração na Restinga de Jurubatiba: ecologia, história natural e conservação. **RiMa**, 2004.
- DELLA LUCIA, C. M. T. **Formigas-cortadeiras**: Viçosa: UFV, 2011. 421 p.
- FERNÁNDEZ-MARÍN, H.; BRUNER, G.; GOMEZ, E. B.; NASH, D. R.; BOOMSMA, J. J.; WCISLO, W. T. Dynamic disease management in *Trachymyrmex* fungus-growing ants (Attini: Formicidae). **The American Naturalist**, v. 181, n. 4, p. 571-582, 2013.
- HÖLLDOBLER, B.; WILSON, O. E. **The ants**. Harvard University Press, p.746, 1990.
- HÖLLDOBLER, B.; WILSON, O. E. **The Superorganism: The Beauty, Elegance, and Strangeness of Insect Societies**. 2009, 544p.
- KLINGENBERG, C.; BRANDAO, C. R. F. Revision of the fungus-growing ant genera *Mycetophylax* Emery and *Paramycetophylax* Kusnezov rev. stat. and description of *Kalathomyrmex* n. gen.(Formicidae: Myrmicinae: Attini). **Zootaxa**, v. 2052, n. 1, p. 1-31, 2009.
- MACGREGOR, C. H. **Introduction to animal cytogenetics**. Springer Science & Business Media, 1993, 238p.

- MAYHE-NUNES, A. J.; BRANDAO, C. R. F. Revisionary studies on the attine ant genus *Trachymyrmex* Forel. Part 2: the Iheringi group (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, v. 45, n. 2, p. 271-305, 2005.
- MAYHÉ-NUNES, A. J.; JAFFÉ, K. On the biogeography of Attini (Hymenoptera: Formicidae). **Ecotropicos**, v. 11, n. 1, p. 45-54, 1998.
- MEHDIABADI, N. J.; SCHULTZ, T. R. Natural history and phylogeny of the fungus-farming ants (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae: Attini). **Myrmecological News**, v. 13, p. 37-55, 2019.
- MOREAU, C. S.; BELL, C. D. Testing the museum versus cradle tropical biological diversity hypothesis: phylogeny, diversification, and ancestral biogeographic range evolution of the ants. **Evolution**, v. 67, n. 8, p. 2240-2257, 2013.
- SCHULTZ, T. R.; BRADY, S. G. Major evolutionary transitions in ant agriculture. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 14, p. 5435-5440, 2008.
- SOSA-CALVO, J.; SCHULTZ, T. R.; BRANDÃO, C. R.; KLINGENBERG, C.; FEITOSA, R. M.; RABELING, C.; VASCONCELOS, H. L. *Cyatta abscondita*: taxonomy, evolution, and natural history of a new fungus-farming ant genus from Brazil. **PloS One**, v. 8, n. 11, p. e80498, 2013.
- SOSA-CALVO, J.; JESOVNIK, A.; OKONSKI, E.; SCHULTZ, T. R. Locating, collecting, and maintaining colonies of fungus-farming ants (Hymenoptera: Myrmicinae: Attini). **Sociobiology**, v. 62, n. 2, p. 300-320, 2015.
- THOMAZI, R. D.; ROCHA, R. T.; OLIVEIRA, M. V.; BRUNO, A. S.; SILVA, A. G. Um panorama da vegetação das restingas do Espírito Santo no contexto do litoral brasileiro. **CEP**, v. 29102, p. 770, 2013.
- WILSON, E. O. **The insect societies**. The insect societies. 1971. 548p

# **3. Capítulo 1**

---

**Arquitetura, demografia e padrão de distribuição do ninho da formiga  
cultivadora de fungo *Trachymyrmex holmgreni* Wheeler, 1925 em  
ecossistema de Restinga**

### **3. Arquitetura, demografia e padrão de distribuição do ninho da formiga cultivadora de fungo *Trachymyrmex holmgreni* Wheeler, 1925 no ecossistema de Restinga**

T. T. P. Pereira<sup>1</sup>, A. C. C. C. dos Reis<sup>2</sup>, D. C. Cardoso<sup>1,2</sup>, M. P. Criatiano<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biologia Geral, Programa de Pós Graduação em Ecologia – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 36570-000, Brasil.

<sup>2</sup> Departamento de Biodiversidade e Evolução – Universidade Federal de Ouro Preto - Campos Morro Do Cruzeiro, s/n - Bauxita, Ouro Preto – Minas Gerais, 35400-000, Brasil

T. T. P. Pereira tassia.pontes@gmail.com

#### **3.1. Resumo**

A arquitetura, demografia e o padrão de distribuição de ninhos da formiga cultivadora de fungo *Trachymyrmex holmgreni* foram estudados no ecossistema de Restinga em três localidades no litoral sul brasileiro, e em duas estações do ano. A arquitetura e demografia foram obtidas a partir da escavação de 50 ninhos, 20 no outono e 30 na primavera. O padrão de distribuição foi calculado por meio do registro das colônias em 3 quadrantes de 20 x 20m. A arquitetura variou entre as estações, apresentando em média 3 câmaras de fungo no outono e 5 na primavera. A demografia não variou em tamanho mas em composição de castas sendo que no outono a colônia investe em reprodução com alto número de indivíduos das castas reprodutivas e na primavera investe em crescimento apresentando maior número de larvas e pupas de operárias comparado ao outono. O padrão de distribuição dos ninhos é agregado e a densidade é 0.04 ninhos/m<sup>2</sup>. Com base em nossos resultados, mostramos que os ninhos de *T. holmgreni* apresentam arquitetura do ninho e demografia colônia intermediária entre as formigas cultivadoras de fungo não-cortadeiras e cortadeiras. Além disso, sugerimos que a distribuição dos ninhos no ecossistema de Restinga é influenciada primordialmente pelas condições microclimáticas do solo do que pelo comportamento agonístico das formigas. Além disso, verificamos a importância do estudo de ninhos de formigas em diferentes estações, pois este pode nos prover conhecimento a despeito do ciclo da colônia.

Palavra chave: evolução, ecologia, ciclo da colônia, formiga

## 3.2. Introdução

As formigas estão entre os organismos terrestres de maior sucesso ecológico (Schultz, 2000; Moreau & Bell, 2013) e a vida colonial é um dos fatores responsáveis por isso. Insetos eussociais, como as formigas, devem ser entendidos como superorganismos onde os indivíduos agem como uma entidade favorecendo o seu desenvolvimento e especialização (Holldobler & Wilson, 2009). O ninho é parte funcional desse superorganismo e a sua arquitetura, produto da seleção natural (Tschinkel, 2011) a qual emerge da ação conjunta de muitas operárias (Tschinkel, 2004)

As formigas cultivadoras de fungo surgiram a aproximadamente 50 milhões de anos (Schultz & Brady, 2008). São representadas por 16 gêneros e 257 espécies (Klingenberg & Brandão, 2009; Sosa-Calvo, 2013). São reconhecidas pela relação mutualística estabelecidas com fungos basidiomicetos. Provavelmente a arquitetura do ninho e a demografia da colônia nesse grupo de formigas evoluiu de forma a garantir a sobrevivência do fungo. Deste modo, o estudo desses aspectos tem muito a contribuir com o entendimento geral da história evolutiva das formigas cultivadoras de fungo.

Essas formigas utilizam uma variedade de substrato no cultivo do fungo. Baseado no tipo de substrato, elas podem ser agrupadas em dois grandes grupos: formigas não herbívoras não-cortadeiras e herbívoras cortadeiras. A maioria das espécies de formigas cultivadoras de fungo são não-cortadeiras. Essas normalmente apresentam menor complexidade social, com demografia de aproximadamente 100 operárias e ninhos com 1 a 3 câmaras. As formigas-cortadeiras, agrupadas em 2 gêneros (*Atta* e *Acromyrmex*), apresentam maior complexidade social e demografia chegando a até 10.000.000 operárias em *Atta texana* (Beckers *et al.*, 1989) por exemplo. Os ninhos podem chegar a centenas de câmaras e são reconhecidas como o grupo mais derivado, surgido a aproximadamente 8 a 12 milhões de anos atrás (Schultz & Brady, 2008)

O gênero *Trachymyrmex* é representado por 47 espécies (Bolton, 2017), apresentam um comportamento intermediário quanto ao tipo de substrato utilizado no cultivo de fungo. Preferencialmente elas coletam matéria orgânica em decomposição, fezes e carcaças de outros animais como as não-cortadeiras, e facultativamente utilizam de matéria orgânica cortada fresca, assim como fazem as formigas-cortadeiras. Este comportamento, juntamente com a posição filogenética (Schultz & Brady, 2008) fazem com que os estudos dos aspectos ecológicos e história natural dessas espécies sejam promissores no esclarecimento dos traços

evolutivos entre as formigas não-cortadeiras e cortadeiras. E isso contribui para nosso entendimento acerca da evolução e diversificação das formigas cultivadoras de fungo.

Embora o conhecimento sobre a nidificação seja importante, a estrutura dos ninhos de formigas subterrâneas é em grande parte desconhecido, e em geral, as informações sobre eles são coletadas incidentalmente, e não como um objetivo primário de pesquisa (Tschinkel, 2004). Com isso, existem poucos dados sobre a arquitetura do ninho, demografia ou padrão de distribuição das espécies de formigas. Isso não é exceção para o gênero *Trachymyrmex*, tendo este, alguma informação sobre os ninhos disponíveis em Lenczewski, 1985; Seal & Tschinkel, 1985; Araújo *et al.*, 2002; Fernández-marín, 2004; Mayhé-Nunes & Brandão, 2005 e Lizidatti, 2006. No entanto, não existe um estudo detalhado para *T. holmgreni* em ecossistema de Restinga.

Com o objetivo de contribuir para o entendimento da biologia das formigas cultivadoras de fungo, realizamos o estudo das características biológicas fundamentais em insetos eussociais na formiga cultivadora de fungo *Trachymyrmex holmgreni*. Descrevemos aqui a arquitetura do ninho, demografia da colônia e padrão de distribuição da espécie no ecossistema de Restinga em duas estações do ano.

### **3.3. Materiais e Métodos**

A espécie *T. holmgreni* foi identificada por Danon Cledes Cardoso e confirmada por Rodrigo Feitosa. As amostras foram depositadas na coleção do Laboratório de Genética Evolutiva e Populações na Universidade Federal de Ouro Preto.

Ressalto que neste trabalho colônia se refere ao conjunto de indivíduos que vivem na colônia e ninho refere-se ao espaço construídos pelos indivíduos da colônia.

#### **3.3.1. Área de estudo**

O estudo foi realizado ao longo de 3 praias (populações) no litoral sul do Brasil: Morro dos Conventos – SC (S28°56'07.9" W49°21'28.29"), Balneário Gaivota – SC (S29°11'42.23"W49°36'30.9") e Torres – RS (S29°24'01"W49°46'33,4"). Mais especificamente, na vegetação pós-duna do ecossistema de Restinga. As áreas de estudos são caracterizadas por um clima quente e temperado com estações bem definidas e chuvas bem distribuídas ao longo dos 12 meses do ano. A classificação do clima segundo Köppen-Geiger para Morro dos Conventos, Balneário Gaivotas e Torres é Cfa com temperatura anual média de 19.1°C, 18.9°C, 18.8 °C com até 8.8°C de variação e pluviosidade de 1301 mm, 1351 mm, 1404 mm, respectivamente (Alvares *et al.* 2014).

O ecossistema de Restinga sul-brasileira é caracterizado por apresentar fitofisionomias distintas sobre terreno predominantemente arenoso de origem diversa de idade quaternária, formam um complexo vegetacional edáfico que ocupam praias, dunas e depressões associadas, cordões arenosos, terraços e planícies (Falkenberg, 1999). O local amostrado neste trabalho foi uma fisionomia de depressão pós-duna a qual apresenta vegetação predominante de gramínea rasteira de crescimento rizomatoso e estolonífero distribuídos em manchas ao longo solo (Cardoso *et al.*, 2010). Além disso, este local apresenta plantas do gênero *Drosera* o qual é característico de áreas sujeitas a alagamentos temporários (Mendonça & Castelani, 1993). Com isso, a área amostrada nesse estudo pode ser caracterizada como heterogênea pois apresenta uma vegetação que se distribui de forma não uniforme na paisagem além de apresentar partes do solo que alagam.

### **3.3.2. Arquitetura do ninho**

Os dados de arquitetura foram obtidos a partir da escavação de 50 ninhos, dos quais 20 foram escavados no outono (Abril) e 30 na primavera (Novembro) no ano de 2016.

Os ninhos foram identificados pela arquitetura externa característica do gênero. Ninhos geralmente conspícuos com entrada normalmente adornada por montes de terra em forma de cratera e uma pequena torre no centro (Bhatkar, 1974; Tschinkel & Bhatkar, 1974) e pela identificação da espécie coletada. Para exposição das câmaras de fungo e coleta do material, seguimos como proposto por Cardoso *et al.*, (2011). Uma trincheira à aproximadamente 30cm da entrada do ninho foi escavada até atingir a profundidade do lençol freático. Em seguida retirou-se a areia de forma cuidadosa no sentido de encontro ao ninho até que as câmaras ficassem expostas. Com o auxílio de uma fita milimétrica obtivemos as medidas do raio do murundu de areia, da altura e diâmetro da torre, da profundidade de cada câmara em relação à abertura do ninho, a profundidade do lençol freático e a profundidade de raízes das plantas que estavam no local da escavação.

Para avaliar o formato e volume das câmaras, e para obtermos um modelo tridimensional dos ninhos, utilizamos aproximadamente 1kg de parafina. Para não sacrificar muitas colônias, o modelo tridimensional foi obtido a partir de um único ninho durante a primavera. A parafina foi derretida e colocada dentro do ninho a partir da abertura que ele apresenta. Aguardamos 2 horas, tempo suficiente para o endurecimento da parafina, e então escavamos e retiramos o material. O volume foi calculado pelo princípio de Arquimedes utilizando o volume de água deslocada como parâmetro para o cálculo do volume da câmara.

Para verificar se a arquitetura do ninho varia em função da estação do ano foi feita uma Regressão Linear Simples no software R environment v. 3.2.0 (R Development Core Team, 2015).

### **3.3.3. Demografia**

Dados demográficos foram obtidos a partir da contagem de todos os indivíduos de todas as castas e estágios de desenvolvimento nos 50 ninhos escavados, considerando as estações do ano.

A partir da escavação dos ninhos e exposição das câmaras, coletamos todo o material em potes plásticos de 1 litro e transferimos para o Laboratório de Genética Evolutiva e Populações da Universidade Federal de Ouro Preto, onde as colônias foram mantidas conforme protocolo descrito por Cardoso *et al.*, (2011). Ainda em campo, anotamos em qual câmara a rainha foi observada, qual tinha maior volume de fungo comparado às demais e maior quantidade de imaturos. No laboratório, a partir da contagem dos indivíduos obtivemos o número de larvas, pupas, operárias, ginas, machos e rainha em cada ninho.

Para verificar se o tamanho da colônia varia entre as estações realizamos uma ANCOVA por meio do software R environment v. 3.2.0 (R Development Core Team, 2015).

### **3.3.4. Padrão de distribuição**

O padrão de distribuição dos ninhos de *T. holmgreni* foi obtido a partir do método de quadrantes e utilizando o índice  $R$  de Clark e Evans, (1954) e do índice  $I_p$  de Morisita, (1962). Os quadrantes de 20 x 20m foram plotados de forma arbitrária nas três localidades estudadas sendo que em cada localidade foram estabelecidos três quadrantes e feito busca exaustiva pelos ninhos por três pessoas em toda área dentro do quadrante.

O índice  $R$  de Clark e Evans baseia-se na média da distância entre os ninhos mais próximos. Para isso é necessário a medição da distância entre os ninhos e então obter-se a média. Para minimizar o erro na medição direta da distância de um ninho ao outro, fizemos as medidas da distância de cada ninho às arestas dos quadrantes e obtivemos a posição relativa dele em um plano cartesiano. A partir desses dados calculamos as distâncias euclidianas com o auxílio do programa MULTIVIT versão 2.1.1 (Pilar, 2000) e então fizemos o cálculo do índice  $R$ .

Para calcular o índice  $I_p$  de Morisita, o qual, simplificadaamente, é baseado na variância entre quadrantes e quanto maior for essa variância maior será a probabilidade da distribuição ser agregada. Utilizamos os nove quadrantes amostrados nas três populações e este foi calculado

no software R environment v. 3.2.00 (R Development Core Team, 2015). Informações detalhadas sobre os índices são descritas em Krebs, 1989.

A densidade de ninhos foi calculada através da razão entre o número de ninhos pela área total amostrada. Para verificar se houve diferença na densidade entre as estações e entre as populações conduzimos uma Regressão Linear Simples no software R environment v. 3.2.0 (R Development Core Team, 2015).

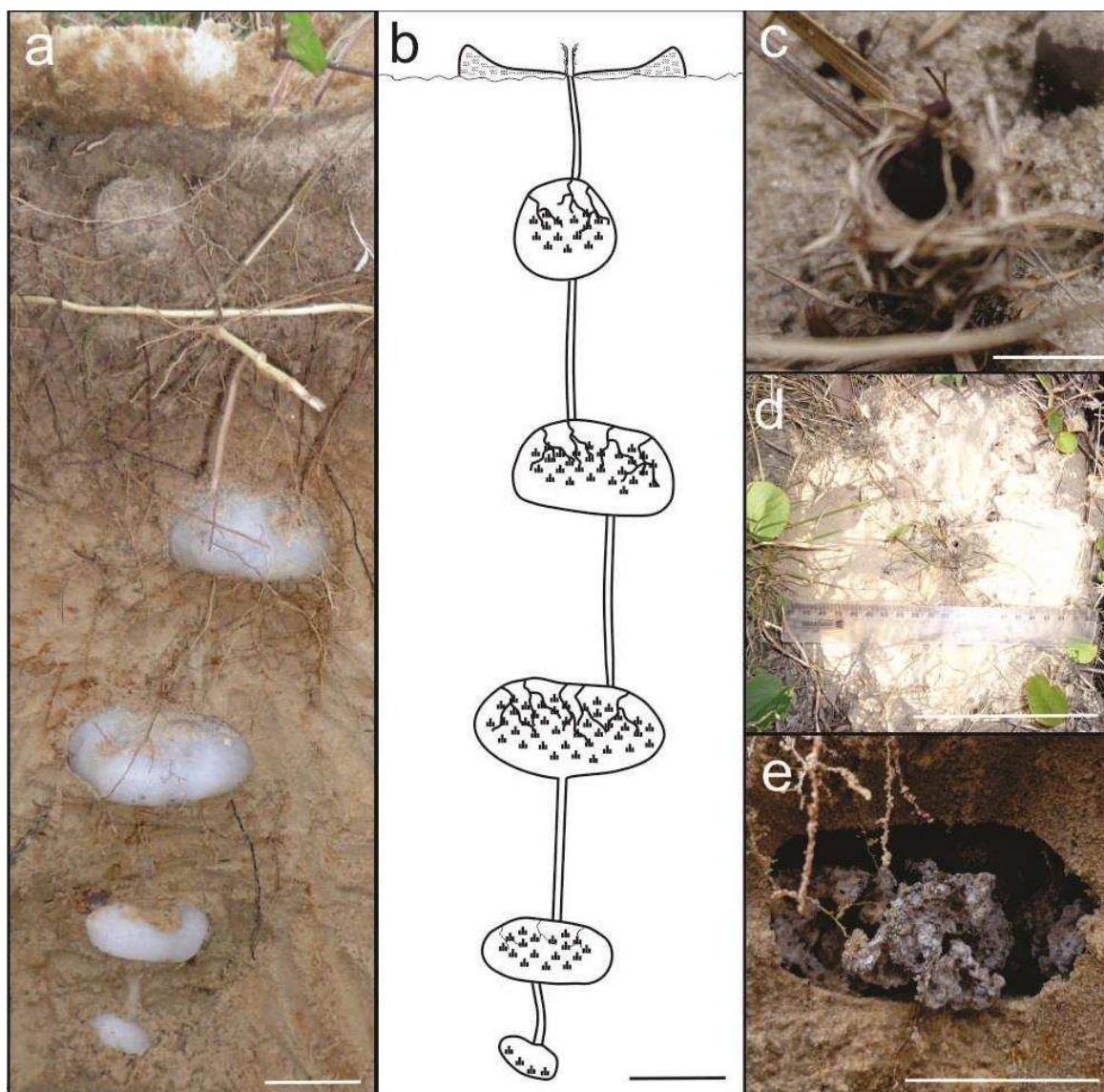
## **3.4. Resultados**

### **3.4.1. Arquitetura do ninho**

O ninho de *T. holmgreni* em ecossistema de Restinga pode ser caracterizado acima do solo por uma torre de palha com aproximadamente 0,5cm de diâmetro e 1,5cm de altura rodeado por um “murundu de areia” de formato circular. Abaixo do solo segue um eixo central fino suficiente para passagem dos indivíduos com câmaras de fungo dispostas ao longo desse eixo (Figura 1). A profundidade média, desvio padrão e o volume das câmaras são apresentados na Tabela 1.

De acordo com a análise Regressão Linear Simples, o número de câmaras variou entre estações estudadas (DF:48 F:14.375 P: 0.0004187). No outono houve um predomínio de ninhos com 3 câmaras em média. Já na primavera ninhos com 5 câmaras, em média, foram predominantes (Figura 2). Além disso, o murundu no outono apresentou-se com raio de aproximadamente 8cm enquanto na primavera com 12cm.

O formato inicial das câmaras parece ser mais oval e torna-se achatada com o crescimento do fungo. Independente da estação, em 10% dos ninhos amostrados foi identificada uma pequena câmara à aproximadamente 2cm da abertura com pouco ou nenhum fungo (não representada na Figura 1). Essa câmara é fundada pela rainha e frequentemente abandonada com o crescimento do ninho (Weber, 1972). Dentro do ninho as câmaras apresentam volumes diferentes. A 2ª e a 3ª câmaras possuem maiores volumes de fungos, acomodam muitas larvas e pupas e geralmente onde observamos a rainha. As câmaras mais profundas apresentavam fungos menores e, provavelmente devido ao aumento da umidade, à medida que se aproximam do lençol freático, foram frequentemente encontradas desabitadas com fungo morto ou usadas como câmara de lixo. Os fungos foram encontrados suspensos em raízes e distantes das paredes das câmaras. Foi comum observar microcâmaras deslocada horizontalmente de uma câmara do eixo principal. Essas microcâmaras ocorreram próximas a 2ª e 3ª câmara.

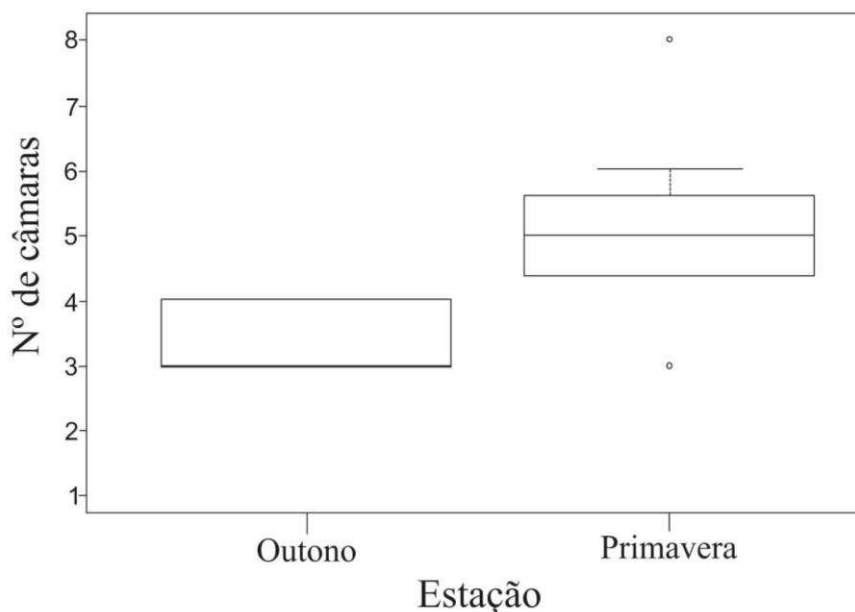


**Figura 1:** Arquitetura do ninho de *T.holmgreni*. a) disposição das câmaras utilizando parafina; b) desenho esquemático; c) torre de palha; d) murundu e e) câmara de fungo. Os valores das barras são: a, b e d 10cm; c 0,5cm; e 4cm.

**Tabela 1:** Dados de profundidade média, desvio padrão e o volume das câmaras do ninho de *T. holmgreni*.

Câmaras de fungo	PM(cm)	DS (cm)	VC (mL)
1°	12,5	6,1	114
2°	22,3	8,1	265
3°	37,6	11,9	204
4°	46,5	10,5	50
5°	51,2	9,6	12
6°	56,5	10,4	-
7°	61,7	6,8	-

PM - profundidade média, DS - desvio padrão, VC - volume das câmaras em mililitros.



**Figura 2:** Análise do efeito da sazonalidade no número de câmaras do ninho de *T.holmgreni*.

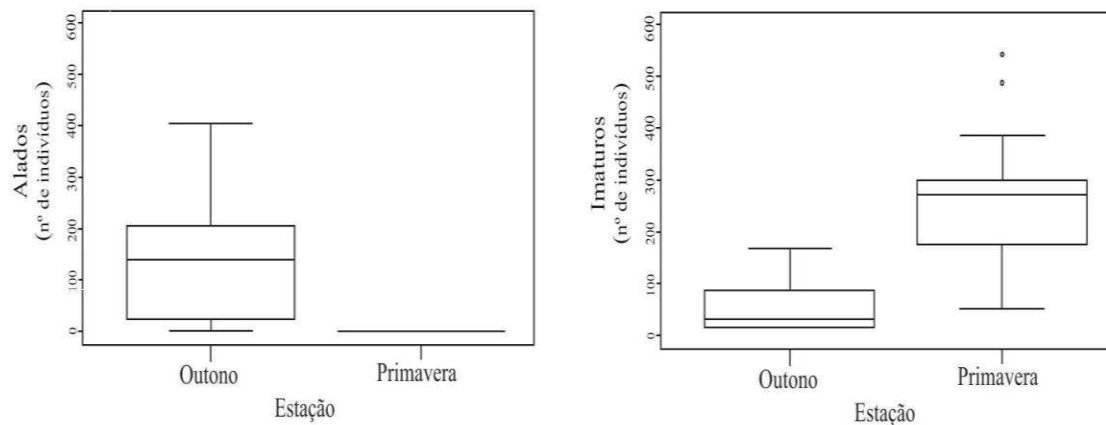
### 3.4.2. Demografia

As colônias de *T. holmgreni* são principalmente monogínicas, porém 6 colônias apresentaram até 3 rainhas, sugerindo que a poliginia é facultativa na espécie. O tamanho da colônia não variou entre as estações estudadas (Df:48 F:1.92 P:0.1723). O número médio de operárias foi de 389. Tamanhos mais pronunciados de colônia foram observados dentro da mesma estação. No outono a menor colônia possuía 151 operárias e a maior 888. Na primavera a menor possuía 107 e a maior 629 operárias. A composição de castas e estágios de desenvolvimento diferiu entre as estações. No outono as colônias tiveram 7 vezes mais pupas do que larvas e maior abundância de castas reprodutivas do que na primavera (Df:38 F:31.836 P: $8.78e^{-07}$ ). Por outro lado, na primavera as colônias apresentaram a mesma proporção de larvas e pupas e uma maior quantidade de imaturos (Df:48 F:58.765 P: $7.07e^{-10}$ ) do que no outono. Os dados demográficos dos 50 ninhos são apresentados na Tabela 2 e a variação da demografia entre as estações na Figura 3.

**Tabela 2:** Dados demográficos das 50 colônias de *T. holmgreni*, em ambas estações. Na primavera as colônias não apresentaram indivíduos da casta reprodutiva.

Colônia	Estação	Larva	Pupa	Operária	Ginas	Machos	Rainha
1	Outono	0	5	456	28	80	1
2	Outono	0	0	268	0	148	1
3	Outono	0	14	350	121	38	1
4	Outono	0	11	444	75	0	1
5	Outono	0	0	191	0	0	1
6	Outono	20	52	308	27	6	3
7	Outono	1	106	585	69	47	1
8	Outono	0	0	151	2	3	3
9	Outono	25	71	399	0	0	1
10	Outono	1	23	216	0	102	1
11	Outono	4	73	552	57	136	1
12	Outono	1	0	380	0	29	1
13	Outono	0	31	296	0	0	1
14	Outono	0	0	583	30	88	1
15	Outono	15	41	601	0	69	1
16	Outono	17	123	445	0	0	1
17	Outono	0	1	888	186	87	1
18	Outono	34	119	307	125	5	2
19	Outono	0	0	838	121	182	2
20	Outono	0	57	321	231	161	1
21	Primavera	148	24	616	0	0	1
22	Primavera	137	48	135	0	0	1
23	Primavera	137	122	360	0	0	1
24	Primavera	155	69	407	0	0	1
25	Primavera	91	55	277	0	0	1
26	Primavera	123	113	542	0	0	1
27	Primavera	192	283	512	0	0	1
28	Primavera	100	169	237	0	0	1
29	Primavera	173	109	327	0	0	1
30	Primavera	179	145	258	0	0	1
31	Primavera	166	112	256	0	0	1
32	Primavera	113	142	443	0	0	1
34	Primavera	109	44	425	0	0	1
35	Primavera	117	125	426	0	0	1
36	Primavera	98	49	357	0	0	2
37	Primavera	148	129	498	0	0	1

38	Primavera	163	178	336	0	2	3
39	Primavera	111	228	540	0	0	1
40	Primavera	275	255	386	0	0	1
41	Primavera	101	195	629	0	0	1
42	Primavera	66	65	205	0	0	1
43	Primavera	155	219	490	0	0	1
44	Primavera	19	40	107	0	0	1
45	Primavera	100	157	261	0	0	1
46	Primavera	9	72	442	0	0	1
47	Primavera	30	8	511	0	0	0
48	Primavera	100	169	237	0	0	1
49	Primavera	95	107	190	0	0	1
50	Primavera	125	153	226	0	0	1

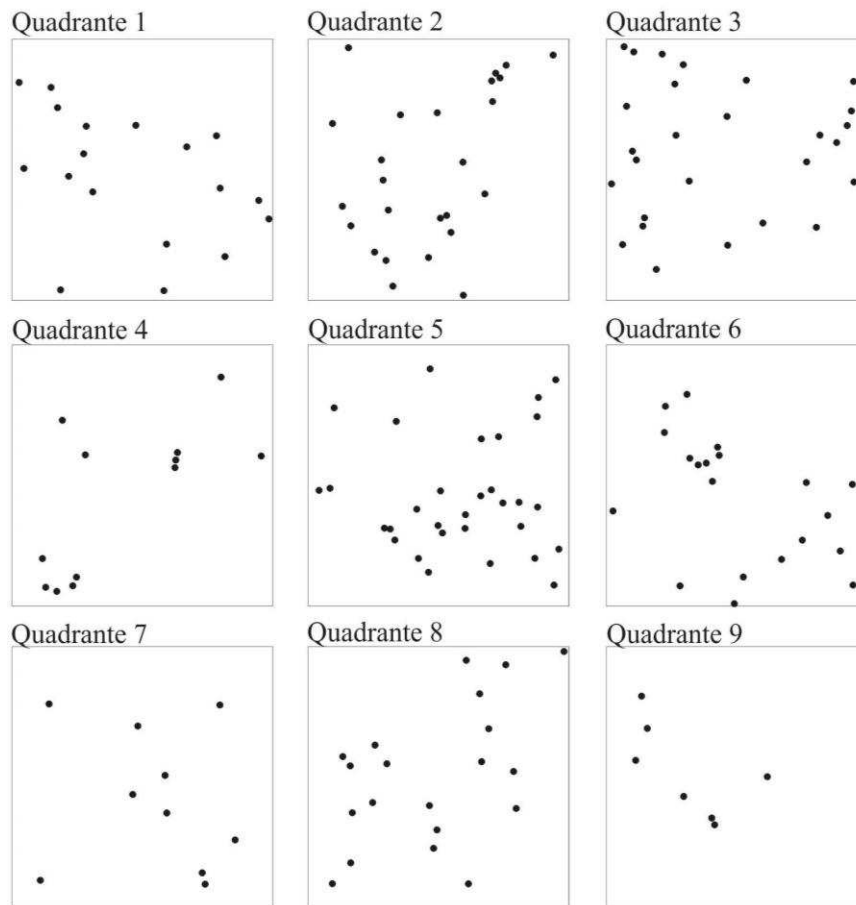


**Figura 3:** Variação demográfica em duas estações do ano. Os ninhos apresentaram predominantemente uma única rainha independente da estação e por isso essa casta não está representada.

### 3.4.3. Padrão de distribuição

A distribuição dos ninhos de *T. homlgreni* nas três populações estudadas em Restinga está representada na Figura 4. O padrão de distribuição foi agregado de acordo com o índice  $I_p$  de Morisita igual à 0,504, com valores de  $\ln m > m \ln c$  igual a 1,115837 >  $m \ln c$  1,056417. Os valores de R por quadrante, significância e o padrão de distribuição estão apresentados na Tabela 3.

A densidade de ninhos nas localidades não variou entre as estações (Df: 16, F: 2.4033 e P: 0.1406). No outono amostramos 37 ninhos em 900m<sup>2</sup> e na primavera 172 em 3.600m<sup>2</sup>. A densidade foi de 0.04 ninhos/m<sup>2</sup> ou 1 ninho a cada 25 metros em ambas estações. A densidade também não variou entre as populações (Df: 6, F: 1.5366 e P: 0.2892).



**Figura 4:** Distribuição dos ninhos de *T. holmgreni* em três população no litoral sul do Brasil. Os quadrantes 1-3, 4-6 e 7-9 referem-se as localidades de Morro dos Conventos (S.C.), Balneário Gaivota (S.C.) e Torres (R.S.), respectivamente. Cada quadrante é a representação de 20 x 20 metros. Cada ponto representa a posição do ninho amostrado no quadrante. (Escala: 1:500).

**Tabela 3:** Padrão de distribuição dos ninhos de *T. holmgreni* para o índice R de Clark e Evans.

Quadrante	R	z	Distribuição
1	0,9941221	-0,0372949	Aleatório
2	0,708617992	-6,970991556	Agregado
3	0,892649085	-6,81886852	Agregado
4	0,429456596	-4,691597823	Agregado
5	0,777473393	-8,230030975	Agregado
6	0,691787896	-5,623099951	Agregado
7	0,602479763	-2,226432241	Agregado
8	0,7772745	-5,70909413	Agregado
9	0,576660508	-2,331838908	Agregado

R = 1 distribuição aleatório, R = 0 distribuição agregada, R>2.15 distribuição regular e z - corresponde a significância do teste.

## 3.5. Discussão

### 3.5.1. Arquitetura do ninho

A arquitetura externa dos ninhos de *T. holmgreni* no solo arenoso do ecossistema de Restinga consiste de uma única entrada por uma torre de palha e uma cratera circular resultado da deposição da areia retirada na construção do ninho. Essa arquitetura parece ser comum às espécies do gênero (Tschinkel & Bhatkar, 1974). Mayhé & Brandão (2005), descreveram brevemente em seu trabalho de revisão taxonômica, a arquitetura do ninho de *T. holmgreni* em solo arenoso no estado de Minas Gerais, o qual apresentava uma entrada de formato mais comprido do que largo com a torre feita de palha e areia localizada ao lado. Lizidatti (2006), descreveu a arquitetura de quatro ninhos em ambiente de pastagem. Esses apresentam, além da cratera e da torre feita de terra e palha, uma falsa entrada mais conspícua que a entrada principal denominado fosso. É possível que a arquitetura externa do ninho possa apresentar variações de acordo com o tipo de solo e condições ambientais. O fosso parece fornecer abrigo às operárias ajudando na proteção de possíveis predadores além de proteger o ninho da água da chuva (Lizidatti, 2006).

O número de câmaras descrito em Mayhé & Brandão (2005) e em Lizidatti (2006) foram 7 e 3, respectivamente. Entre os 50 ninhos amostrados, o número de câmara variou de 3 a 8, sendo que no outono a maioria dos ninhos apresentou 3 câmaras e na primavera 5. Verificamos com isso que o sistema auto-organizacional das operárias na construção do ninho varia entre as estações resultando em maior número de câmaras na primavera.

A arquitetura das câmaras (abaixo do solo) parece seguir um padrão comum aos ninhos subterrâneos da família Formicidae, o qual consiste de um eixo central com câmaras dispostas ao longo deste eixo (Tschinkel, 2015). Os ninhos das formigas cultivadoras de fungo variam em número de câmaras e normalmente, as espécies de formigas não-cortadeiras apresentam ninhos compostos por uma ou até três câmaras (Diehl-Fleig & Diehl, 2007; Fernandez-Marín *et al.*, 2005; Rabeling, 2007; Sosa-Calvo, 2015). Já as espécies cortadeiras dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex*, apresentam ninhos que podem chegar a mais de 300 câmaras de fungo (Hölldobler & Wilson 1990). A arquitetura do ninho de *T. holmgreni* reafirma a posição filogenética intermediária do gênero. Apresentando 3 câmaras que aumentam com a estação do ano e o desenvolvimento da colônia, mas não atingem números tão elevados quanto nas espécies de *Atta* e *Acromyrmex*.

Tschinkel (2015) propõe que em formigas cultivadoras de fungo, o fungo deve servir como modelo tridimensional para a arquitetura final da câmara. Assim, as direções tomadas no

cultivo do fungo e seu crescimento devem afetar diretamente a arquitetura das câmaras. Nossos resultados corroboram tal hipótese pois encontramos colônias aparentemente jovens, com fungos menores, apresentando câmaras de formato mais ovalado do que achatado horizontalmente (Figura 5). Além disso, Fröhle & Roces (2009), mostraram que as formigas cortadeiras removem a parede da câmara a medida que o fungo cresce mantendo sempre uma distância entre eles. Tal distância regular, com aproximadamente 1cm, entre o fungo e a parede da câmara foi sempre observada durante as escavações dos ninhos de *T. holmgreni* (Figura 5a).

Os fungos estavam predominantemente suspensos em raízes e mantidos distantes das paredes das câmaras (Figura 5b). A utilização da raiz como plataforma de fixação para fungo durante a nidificação é uma característica que se manteve ao longo da evolução das formigas cultivadoras de fungo e foi perdido em *Atta* (Fernández-Marín *et al.*, 2004), sendo considerado uma característica plesiomórfica das formigas não-cortadeiras. Esse comportamento parece ter sido selecionado por evitar contaminação do fungo por patógenos presentes no solo (Fernández-Marín *et al.*, 2004), e assim o sucesso do estabelecimento da colônia. Sugerimos que a suspensão do fungo em raízes por *T. holmgreni* e a distância que as operárias mantém o fungo em relação a parede da câmara devem proteger o fungo contra patógenos. Além disso, deve também otimizar a movimentação das operárias no desempenho de outras estratégias de defesa do fungo contra patógenos (Fernández-marín, 2013)

A temperatura e umidade variam com a profundidade do solo (Hillel, 1998) e o desenvolvimento dos fungos cultivados pelas formigas são sensíveis a esses fatores (Quinlan & Cherrett, 1978). Além disso, Seal & Tschinkel, (2006) mostraram que solos quentes estimulam a atividade das operárias e o crescimento das colônias de *Trachymyrmex septentrionalis* enquanto que em solos frios, o desempenho diminui. Dado isso, sugerimos que a variação no volume de fungo observado entre as câmaras são consequências de condições microclimáticas. Fatores os quais, provavelmente, são limitantes para o crescimento de desenvolvimento do fungo em maiores profundidades isso porque as câmaras encontradas abaixo de 50 cm foram frequentemente observadas com fungo morto e desabitadas.

Além disso, os maiores volumes de fungo, a rainha e os imaturos foram encontrados na segunda e terceira câmara. Sugerimos que as condições microclimáticas na profundidade entre 20 e 30 cm do solo no ecossistema de Restinga devem ser mais adequadas para o desenvolvimento do fungo.

As operárias de formigas cultivadoras de fungo são capazes de detectar diferenças de umidade, escolhendo as condições ideais para o cultivo do fungo, e respondem a essa variável com modificações na estrutura do ninho (Roces & Kleineidam, 2000; Bollazzi 2007; Fröhle

2009). Não sendo diferente para *Trachymyrmex holmgreni* no ambiente de Restinga. Sendo que as condições microclimáticas do solo são influenciadas pela vegetação, que na área de ocorrência caracteriza-se por plantas herbáceas e arbustivas com raízes rasas atingindo uma profundidade aproximada de 50cm, e pela proximidade do lençol freático o que torna as câmaras mais profundas mais úmidas e frias em relação as câmaras superiores. Como resultado, os ninhos apresentaram número e formato da câmara, além do volume de fungo, variáveis (Figura 4) não alcançando profundidade superior a 70cm. Com isso, concluímos que a arquitetura final do ninho é resultado da resposta das operárias aos fatores abióticos e as demandas do fungo simbiote.

No entanto, a capacidade de responder a variáveis ambientais e o sincronismo durante a construção e manutenção do ninho é intrínseco de cada espécie, isto porque espécies diferentes apresentam arquiteturas que podem diferir em número e formato de câmaras e profundidade (Tischinkel, 2015) além do substrato utilizado para nidificação. Com isso, ressaltamos o potencial do estudo descritivo da arquitetura de ninhos em diferentes ambientes e épocas do ano com o intuito de verificar as adaptações comportamentais da espécie e entender os padrões deste traço fundamental em insetos sociais.



**Figura 5:** Formato das câmaras do ninho *T.holmgreni*. Fungo suspenso em raízes e distante da parede da câmara (a) Formato ovalado em um ninho jovem (b) forma achada em um ninho maduro (c) fungo removido e entrada do túnel. Barra=5cm

### 3.5.2. Demografia

O tamanho da colônia em formigas pode ser afetado pela sazonalidade, disponibilidade de alimento e também com o grau de polimorfismo na colônia (Tschinkel, 1988). O tamanho das colônias de *T. holmgreni* não variou com os diferentes períodos de amostragem. O tamanho médio encontrado foi de 389 operárias (SD  $\pm$  132.9). No entanto, observamos ninhos com tamanhos de 151 e 888 operárias na mesma estação. Sugerimos que essas variações podem ser

resultado de maior disponibilidade de recurso em um local e o leve grau de polimorfismo observado.

As colônias de *T. holmgreni* são monogínicas, como a maioria das espécies de formigas cultivadoras de fungo. No entanto, observamos 6 colônias com até 3 rainhas, sugerindo que a poliginia pode ser facultativa na espécie. No entanto, isso deve ser visto com cautela pois em alguns casos as ginas perdem suas asas e permanecerem no ninho passando a desempenhar função de operária (Nehring, 2012)

Apesar do tamanho da colônia de *T. holmgreni* não variar entre as estações, a composição de castas e estágios de desenvolvimento diferiram. Com isso, sugerimos que o ciclo da colônia no ecossistema de Restinga ocorra da seguinte forma: investimento em reprodução e estabelecimento do ninho no outono/inverno seguido pelo crescimento na primavera/verão. Revoar e estabelecer ninhos durante o inverno pode ser uma estratégia que minimiza o efeito da competição por local de nidificação pois ninhos de *Mycetophylax simplex* estudados no mesmo ecossistema de Restinga produzem mais alados no verão do que no inverno (Diehl-Fleig & Diehl 2007). Por termos encontrado colônias jovens recém fundadas no outon, não podemos descartar a possibilidade de investimento em reprodução pelas colônias mais de uma vez no ano, com investimento mais significativo quando o ninho já está bem estabelecido.

O menor tamanho de ninho e a maior abundância de pupas comparada as larvas encontradas no outono (Tabela 1), sugerem um padrão anual de redução de tamanho para se preparar para o inverno comum em outras espécies de formigas cultivadoras de fungo de região temperada e subtropical (Weber 1972). No entanto, a presença de alados reafirma nossa hipótese de maior investimento em reprodução no outono e inverno. O estudo demográfico sazonal poderá contribuir para o entendimento do ciclo anual da colônia.

### **3.5.3. Padrão de distribuição**

O padrão de distribuição de espécies na paisagem pode ser de três tipos: aleatório, regular ou agregado. O padrão de distribuição aleatório ocorre quando a probabilidade de um organismo se estabelecer é igual em qualquer local da paisagem. O padrão regular ocorre quando o estabelecimento em um local afeta negativamente a ocorrência de outro. Já o padrão de distribuição agregado ocorre quando algum fator favorece o estabelecimento em um local em detrimento de outro (Krebs, 1989).

Em um ambiente homogêneo espera-se uma distribuição aleatória, a competição interespecífica pode favorecer uma distribuição regular, já um ambiente heterogêneo contribui para uma distribuição agregada. A distribuição agregada apresentada por *T. holmgreni* em

ecossistema de Restinga pode estar relacionada a heterogeneidade do habitat. Os ninhos foram encontrados em uma fisionomia pós-duna a qual apresenta regiões alagadas com vegetação predominante de gramínea rasteira de crescimento rizomatoso e estolonífero formando mosaicos na paisagem.

Por dependerem obrigatoriamente do fungo cultivado, o sucesso no estabelecimento das colônias deve ocorrer em locais da paisagem em que o solo tenha condições de temperatura e umidade suficientes para o crescimento do fungo. Provavelmente, áreas do solo que apresentam uma cobertura de vegetação intermediária seja o local apropriado para a sobrevivência do fungo cultivado por *T. holmgreni* e consequentemente, sucesso no estabelecimento da colônia. Nossos resultados sugerem tal padrão de nidificação, pois os ninhos foram encontrados agregados nesses locais. Bollazzi, 2008 sugere que a escavação do ninho é guiada por faixa de temperaturas ótimas do solo. Além disso, espécies de *Trachymyrmex* costumam forragear de forma solitária e em áreas não mais que 648cm ou 185cm de distância do ninho (Leal & Oliveira, 1998; Araújo, 2002). Portanto, nidificar próximo ao recurso pode garantir a sobrevivência e otimizar a coleta de substratos para o fungo.

Caldeira *et al.* (2005), mostrou que a densidade de ninhos de *Atta* afeta a sua distribuição, sendo aleatória em baixas densidades e regular em locais com alta densidades. Isso provavelmente está relacionado ao comportamento agonístico das formigas. O padrão de distribuição de *T. holmgreni* foi agregado em 8 dos nove quadrantes analisados os quais variaram em densidade de 0.02 ninhos/m<sup>2</sup> a 0.08 ninhos/m<sup>2</sup>. A distribuição dos ninhos em *T. holmgreni* provavelmente é influenciada mais pelas condições microclimáticas do solo e proximidade do recurso do que por competição intraespecífica.

### **3.6. Conclusões**

As menores colônias apresentaram também os menores ninhos com 2 a 3 câmaras. O padrão de crescimento do ninho deve ser consistente com um processo de estimulação da escavação dependente da demografia proposto por Halley 2005. De forma que a medida que o ninho cresce, a densidade diminui o que também diminui o estímulo de escavação, ou seja, a escavação do ninho é autorregulada e o tamanho final deve ser ajustado ao tamanho da colônia. As rainhas recém fecundadas obtém maior sucesso no estabelecimento do ninho quando o faz em locais com cobertura vegetal intermediária pois os ninhos se encontram agregados nestes locais. A arquitetura do ninho e a demografia da colônia *T. holmgreni* corroboram a posição intermediária do gênero entre as formigas cultivadoras de fungo não-cortadeiras e cortadeiras.

Além disso, a colônia desta espécie de formiga cultivadora de fungo investe em reprodução no outono e crescimento durante a primavera.

### 3.7. Referências

- ALVARES, C. A.; STAPE, J. L.; SENTELHAS, P. C.; DE MORAES, G.; LEONARDO, J.; SPAROVEK, G. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 22, n. 6, p. 711-728, 2013.
- ARAUJO, S. M.; DELLA LUCIA, C. M. T.; MAY-NUNES, J. A. Caracterização de ninhos e atividade forrageadora de *Trachymyrmex fuscus* Emery (Hymenoptera, Formicidae) em plantio de eucalipto. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 19, n. 2, p. 419-427, 2002.
- BECKERS, R.; GOSS, S.; DENEUBOURG, J. L.; PASTEELS, J. M. Colony size, communication, and ant foraging strategy. **Psyche**, v. 96, n. 3-4, p. 239-256, 1989.
- BHATKAR, A. P. Oriented crescentic mounds of a gardening ant *Trachymyrmex septentrionalis* (McCook). **Florida Entomologist**, v. 57, n. 1, p. 96, 1974.
- BOLLAZZI, M.; ROCES, F. To build or not to build: circulating dry air organizes collective building for climate control in the leaf-cutting ant *Acromyrmex ambiguus*. **Animal Behaviour**, v. 74, n. 5, p. 1349-1355, 2007.
- BOLTON, B.: **Bolton World Catalog**. AntWeb. Disponível em: <https://www.antweb.org/description.do?subfamily=myrmicinae&genus=trachymyrmex&rank=genus>. Acessado em 13 de fevereiro de 2017
- BRANDÃO, C. R. F.; MAYHÉ-NUNES, A. J. A phylogenetic hypothesis for the *Trachymyrmex* species groups, and the transition from fungus-growing to leaf-cutting in the Attini. **Advances in ant systematics (Hymenoptera: Formicidae): homage to EO Wilson**, v. 50, p. 72-88, 2007.
- CARDOSO, D. C.; CRISTIANO, M. P.; TAVARES, M. G. Methodological remarks on rearing basal Attini ants in the laboratory for biological and evolutionary studies: overview of the genus *Mycetophylax*. **Insectes sociaux**, v. 58, n. 3, p. 427-430, 2011.
- CARDOSO, D. C.; CRISTIANO, M. P. Myrmecofauna of the southern Catarinense Restinga sandy coastal plain: new records of species occurrence for the State of Santa Catarina and Brazil. **Sociobiology**, v. 55, n. 1, p. 229, 2010.
- CLARK, P. J.; EVANS, F. C. Distance to nearest neighbor as a measure of spatial relationships in populations. **Ecology**, v. 35, n. 4, p. 445-453, 1954.
- DE BARCELLOS F, D. Aspectos da flora e da vegetação secundária da restinga de Santa Catarina, sul do Brasil. **INSULA Revista de Botânica**, v. 28, p. 01, 1999.
- DELLA LUCIA, C. M. T. **Formigas-cortadeiras**: Viçosa: UFV, 2011. 421 p.

- DIEHL-FLEIG, E.; DIEHL, E. Nest architecture and colony size of the fungus-growing ant *Mycetophylax simplex* Emery, 1888 (Formicidae, Attini). **Insectes Sociaux**, v. 54, n. 3, p. 242-247, 2007.
- FERNÁNDEZ-MARÍN, H.; ZIMMERMAN, J. K.; WCISLO, W. T.; REHNER, S. A. Colony foundation, nest architecture and demography of a basal fungus-growing ant, *Mycocepurus smithii* (Hymenoptera, Formicidae). **Journal of Natural History**, v. 39, n. 20, p. 1735-1743, 2005.
- FERNÁNDEZ-MARÍN, H.; ZIMMERMAN, J. K.; WCISLO, W. T. Ecological traits and evolutionary sequence of nest establishment in fungus-growing ants (Hymenoptera, Formicidae, Attini). **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 81, n. 1, p. 39-48, 2004.
- FERNÁNDEZ-MARÍN, H.; BRUNER, G.; GOMEZ, E. B., NASH, D. R., BOOMSMA, J. J.; WCISLO, W. T. Dynamic disease management in *Trachymyrmex* fungus-growing ants (Attini: Formicidae). **The American Naturalist**, v. 181, n. 4, p. 571-582, 2013.
- FRÖHLE, K.; ROCES, F. Underground agriculture: the control of nest size in fungus-growing ants. **In From Insect Nests to Human Architecture—Workshop on Engineering Principles of Innovation in Swarm-made Architectures**. Venice, Italy: European Centre for Living Technology. 2009. p. 95-104.
- HILLEL, D. **Environmental soil physics: Fundamentals, applications, and environmental considerations**. Academic press. 1998. 771p
- HÖLLDOBLER, B.; WILSON, O. E. **The ants**. Harvard University Press, 1990. 746 p.
- HÖLLDOBLER, B.; WILSON, O. E. **The Superorganism: The Beauty, Elegance, and Strangeness of Insect Societies**. 2009. 544 p..
- KLINGENBERG, C.; BRANDAO, C. R. F. Revision of the fungus-growing ant genera *Mycetophylax* Emery and *Paramycetophylax* Kusnezov rev. stat. and description of *Kalathomyrmex* n. gen.(Formicidae: Myrmicinae: Attini). **Zootaxa**, v. 2052, n. 1, p. 1-31, 2009.
- KLINGENBERG, C.; BRANDÃO, C. R. F.; ENGELS, W. Primitive nest architecture and small monogynous colonies in basal Attini inhabiting sandy beaches of southern Brazil. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**. 42, n. 2, p. 121-126, 2007.
- KREBS, J.C. **Ecological methodology**. New York: Harper & Row, 1989. 624 p.
- LEAL, I. R.; OLIVEIRA, P. S. Interactions between fungus-growing ants (Attini), fruits and seeds in Cerrado vegetation in southeast Brazil. **Biotropica**. 30, n. 2, p. 170-178, 1998.

- LENCZEWSKI, B. **Natural history, colonization and survival in a northern fungus-gardening ant, *Trachymyrmex septentrionalis* (Attini)**. Florida State University, 1985, 190p.
- LIZIDATTI, S. C. **Arquitetura de ninhos e coleta de substratos no cerrado por formigas cultivadoras de fungo, *Trachymyrmex holmgreni* Wheeler, 1925 (Hymenoptera, Formicidae, Attini)**. 2006. 51f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) Instituto de Biocências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto. 2006.
- MAYHE-NUNES, A. J.; BRANDAO, C. R. F. Revisionary studies on the attine ant genus *Trachymyrmex* Forel. Part 2: the Iheringi group (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, v. 45, n. 2, p. 271-305, 2005.
- MAYHÉ-NUNES, A. J.; JAFFÉ, K. On the biogeography of Attini (Hymenoptera: Formicidae). **Ecotropicos**, v. 11, n. 1, p. 45-54, 1998.
- MENDONÇA, E. N.; CASTELLANI, T. T. Aspectos da ecologia populacional de *Drosera brevifolia* Pursh em um trecho de baixada úmida de dunas, Florianópolis, SC. **Biotemas**, v. 6, n. 1, p. 31-47, 1993.
- MOREAU, C. S.; BELL, C. D. Testing the museum versus cradle tropical biological diversity hypothesis: phylogeny, diversification, and ancestral biogeographic range evolution of the ants. **Evolution**, v. 67, n. 8, p. 2240-2257, 2013.
- MORISITA, M. I  $\sigma$ -Index, a measure of dispersion of individuals. **Researches on population ecology**, v. 4, n. 1, p. 1-7, 1962.
- NEHRING, V.; BOOMSMA, J. J.; D'ETTORRE, P. Wingless virgin queens assume helper roles in *Acromyrmex* leaf-cutting ants. **Current Biology**, v. 22, n. 17, p. R671-R673, 2012.
- PILLAR, V. **MULTIV: Multivariate Data Analysis, Randomization Testing and Bootstrap Resampling**. User's Guide. v. 2.0. 2000.
- QUINLAN, R. J.; CHERRETT, J. M. Aspects of the symbiosis of the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus* (Reich) and its food fungus. **Ecological Entomology**, 3n. 3, p. 221-230, 1978.
- RABELING, C.; VERHAAGH, M.; ENGELS, W. Comparative study of nest architecture and colony structure of the fungus-growing ants, *Mycocepurus goeldii* and *M. smithii*. **Journal of Insect Science**, v. 7, n. 40, p. 1-13, 2007.
- ROCES, F.; KLEINEIDAM, C. Humidity preference for fungus culturing by workers of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **Insectes sociaux** v. 47, n. 4, p. 348-350, 2000.

- SCHULTZ, T. R. In search of ant ancestors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 26, p. 14028-14029, 2000.
- SCHULTZ, T. R.; BRADY, S. G. Major evolutionary transitions in ant agriculture. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 14, p. 5435-5440, 2008.
- SEAL, J. N.; TSCHINKEL, W. R. Colony productivity of the fungus-gardening ant *Trachymyrmex septentrionalis* (Hymenoptera: Formicidae) in a Florida pine forest. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 99, n. 4, p. 673-682, 2006.
- SOLOMON, S. E.; MUELLER, U. G., SCHULTZ, T. R., CURRIE, C. R., PRICE, S. L., OLIVEIRA DA SILVA-PINHATI, A. C. & VASCONCELOS, H. L. Nesting biology of the fungus growing ants *Mycetarotes* Emery (Attini, Formicidae). **Insectes Sociaux**, v. 51, n. 4, p. 333-338, 2004.
- SOSA-CALVO, J.; SCHULTZ, T. R.; BRANDÃO, C. R.; KLINGENBERG, C.; FEITOSA, R. M.; RABELING, C.; VASCONCELOS, H. L. *Cyatta abscondita*: taxonomy, evolution, and natural history of a new fungus-farming ant genus from Brazil. **PloS One**, v. 8, n. 11, p. e80498, 2013.
- SOSA-CALVO, J.; JESOVNIK, A.; OKONSKI, E.; SCHULTZ, T. R. Locating, collecting, and maintaining colonies of fungus-farming ants (Hymenoptera: Myrmicinae: Attini). **Sociobiology**, v. 62, n. 2, p. 300-320, 2015.
- TSCHINKEL, W. R. Colony growth and the ontogeny of worker polymorphism in the fire ant, *Solenopsis invicta*. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 22, n. 2, p. 103-115, 1988.
- TSCHINKEL, W. R. The architecture of subterranean ant nests: beauty and mystery underfoot. **Journal of Bioeconomics**, v. 17, n. 3, p. 271-291, 2015.
- TSCHINKEL, W. R. The nest architecture of the Florida harvester ant, *Pogonomyrmex badius*. **Journal of Insect Science**, v. 4, n. 21, p. 1-19, 2004.
- TSCHINKEL, Walter R. The nest architecture of three species of north Florida *Aphaenogaster* ants. **Journal of Insect Science**, v. 11, n. 105, p. 1-30, 2011.
- TSCHINKEL, W. R.; BHATKAR, A. Oriented mound building in the ant, *Trachymyrmex septentrionalis*. **Environmental Entomology**, v. 3, n. 4, p. 667-673, 1974.
- WILSON, E. O. Sociobiology: The New Synthesis. **Papers: revista de sociologia**, n. 19, p. 149-154, 1983.

# Capítulo 2

---

**Estudo citogenético da formiga cultivadora de fungo *Trachymyrmex holmgreni* Wheeler 1925 (Hymenoptera: Formicidae)**

#### 4. **Estudo citogenético da formiga cultivadora de fungo *Trachymyrmex holmgreni* Wheeler 1925 (Hymenoptera: Formicidae)**

Tássia T. Pontes Pereira<sup>1\*</sup>, Ana C. C. C. dos Reis<sup>2</sup>, Danon C. Cardoso<sup>1,2</sup>, Maykon P. Cristiano<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biologia Geral, Programa de Pós Graduação em Ecologia – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 36570-000, Brasil.

<sup>2</sup> Departamento de Biodiversidade e Evolução – Universidade Federal de Ouro Preto - Campos Morro Do Cruzeiro, s/n - Bauxita, Ouro Preto – Minas Gerais, 35400-000, Brasil.

##### **4.1. Resumo**

Neste trabalho disponibilizamos dados citogenéticos da espécie de formiga cultivadora de fungo *Trachymyrmex holmgreni* Wheeler 1925 analisados a partir de quatro populações distintas geograficamente. As populações não apresentaram clinas cromossômicas sendo o número diploide de cromossomos  $2n=20$  e a fórmula cariotípica  $2k=20M$ . No entanto, a soma total dos tamanhos dos cromossomos variaram entre as populações indicando que rearranjos cromossômicos do tipo deleções e inserções, assim como fissões e fusões, podem explicar a evolução cromossômica em Formicidae. A coloração sequencial com fluorocromos CMA<sub>3</sub>/DA/DAPI indicou regiões ricas em pares de base GC e ausência de pares AT em regiões centroméricas e pericentroméricas em todos os cromossomos. O cariótipo de *T. holmgreni* é similar ao encontrado nas espécies congêneres *T. septentrionalis* e *T. relictus*. Sugerimos que estudo citogenéticos de outras espécies do gênero, aliados a uma análise filogenética com base em dados moleculares dos grupos de *Trachymyrmex*, podem elucidar as relações entre as espécies, bem como diversificação e a evolução do cariótipo do grupo das formigas cultivadoras de fungo.

**Palavras chaves:** Evolução, cromossomos, Myrmicinae, CMA<sub>3</sub>/DA/DAPI.

##### **4.2. Introdução**

Os cromossomos são as unidades de herança e representam a organização do genoma de uma dada espécie. Apresentam diferentes formas com base na posição do centrômero, bem como composição das bases nitrogenadas. O cariótipo trata-se de um dos níveis de diversidade genética de qualquer espécie e podem ser utilizados em estudos filogenéticos e taxonômicos pois como qualquer caráter morfológico são produtos da evolução. De forma que espécies mais proximamente relacionadas apresentam maior similaridade no cariótipo (Guerra, 2012).

Apesar da importância da citogenética nos estudos evolutivos e do baixo custo da técnica, o que tornam os estudos citogenéticos em Formicidae importantes para delimitação de espécies, ainda existem poucas espécies estudadas. As formigas apresentam a maior variação no número cromossômico entre os insetos, variando de  $2n=2$  a  $2n=120$  (Lorite & Palomeque, 2010). Porém os dados citogenéticos estão disponíveis para menos de 6% da diversidade atual e a maioria dos estudos se limitam ao número e forma dos cromossomos (Lorite & Palomeque 2010).

As variações cromossômicas numéricas resultam de rearranjos do tipo fissão e fusão cêntrica, as quais podem aumentar ou diminuir o número de cromossomos. As variações estruturais do tipo inversão, translocação, deleções e inserções não alteram o número cromossômico. Em Formicidae, o principal mecanismo proposto para explicar a evolução cromossômica são fusões e fissões (Lorite & Palomeque, 2010). As grandes variações numéricas cromossômicas observadas em Formicidae fazem com que muitos estudos atuais foquem em descrever o cariótipo de espécies ainda não cariótipadas não tendo, até o momento, nenhum estudo citogenético a nível populacional.

Variações cromossômicas intraespecífica em formigas cultivadoras de fungo já foi observado em *Mycetophyax morschi* por Cardoso *et al.* (2014). Por isso, neste estudo disponibilizamos pela primeira vez os dados citogenéticos da espécie de formiga cultivadora de fungo *Trachymyrmex holmgreni*. Além disso, caracterizamos o cariótipo em 4 populações geograficamente distintas a fim de verificar clinas cromossômicas e contribuir para o entendimento da evolução cromossômica do grupo,

### **4.3. Materiais e Métodos**

#### **4.3.1. Colônias amostradas**

As colônias de *Trachymyrmex holmgreni* foram amostradas em quatro localidades que compreendem a 4 populações geograficamente distintas: Torres – RS (S29°24'01" W49°46'33,4"), Balneário Gaivota – SC (S29°11'42.23" W49°36'30.9"), Morro dos Conventos – SC (S28°56'07.9" W49°21'28.29") e Cachoeira do Campo – MG (S20°20'56.5" W 43°40'20.7"). Foram coletadas 15 colônias em Morro dos Conventos 14 em Torres, 20 em Balneário Gaivota e uma colônia em Cachoeira do Campo. De maneira geral, os ninhos foram facilmente identificados pela presença da uma torre de palha e murundu de areia depositado ao redor em formato circular. A arquitetura externa do ninho de *T. holmgreni* em Cachoeira do Campo difere das demais pela presença de um pequeno fosso próximo a torre de palha. As colônias foram escavadas, coletadas e transferidas para o Laboratório de Genética Evolutiva e

Populações da Universidade Federal de Ouro Preto onde foram mantidas pelo protocolo proposto por Cardoso *et al.* (2011) para obtenção das larvas utilizadas no estudo.

### 4.3.2. Caracterização e estrutura cromossômica

Foram coletados um total de 50 colônias. Analisamos pelo menos 10 larvas de cada colônia, totalizando 500 lâminas. Selecionamos as 10 melhores metáfases de cada população para análise morfométrica dos cromossomos. O cariótipo foi obtido através da dissecação gânglio cerebral de larvas pós-defecantes em solução hipotônica de colchicina e fixação em lâmina (Imai *et al.*, 1988). As metáfases foram avaliadas qualitativamente sob um microscópio de contraste de fase. As melhores lâminas foram usadas para determinar o número de cromossomos e a morfologia através de coloração convencional com Giemsa. A coloração sequencial com fluorocromos foi realizada usando cromomicina A<sub>3</sub>/distamicina A/4', 6-diamidino-2-fenilindole (CMA<sub>3</sub>/DAPI) para caracterizar regiões ricas em pares de base CG e AT respectivamente (Schweizer, 1980). As metáfases foram fotografadas sob o microscópio de luz e epifluorescência Zeiss AxioImager Z2 com câmara digital integrada (AxioCam Mrc). As lâminas com fluorocromos foram analisadas por meio dos filtros GFP (450 a 480nm) para CMA<sub>3</sub> e DAPI (330 a 385nm) para DAPI.

A morfologia dos cromossomos foi classificada seguindo a nomenclatura proposta por Levan *et al.* (1964), o qual utiliza a posição do centrômero para classifica-los como: acrocêntrico (A), subtelocêntrico (ST), submetacêntrico (SM) e metacêntrico (M). Ainda, conduzimos a caracterização cariomorfométrica de *T. holmgreni* avaliando o comprimento total (TL), o comprimento do braço longo (L), comprimento do braço (S) curto, a relação entre o braço longo e braço curto ( $r=L/S$ ) e o comprimento relativo do cromossomo (RL).

Conduzimos uma análise de variância para verificar se o tamanho total dos cromossomos difere entre as populações fizemos Wilcoxon no software R environment v. 3.2.0 (R Development Core Team, 2015).

## 4.4. Resultados

O cariótipo de *T. holmgreni* é  $2n=20$  ( $n=10$ ), com todos os cromossomos metacêntricos. Não houve variação numérica, morfológica ou estrutural entre as populações estudadas, nem mesmo na população geograficamente mais distante (Figura 1). No entanto, o comprimento total varia entre as populações ( $p<0.05$ ) sendo que as populações de Morro dos Conventos (SC) e Cachoeira do Campo (MG) não diferiram ( $p>0.05$ ) (Figura 2). Nas populações de Torres (RS) e Balneário Gaivotas (SC) os tamanhos de cromossomos variaram de  $6,06\pm 0,87\mu\text{M}$  a  $3,4\pm 0,54\mu\text{M}$ , e  $5,18\pm 0,72\mu\text{M}$  a  $2,98\pm 0,48\mu\text{M}$  com comprimento total de  $82,72\mu\text{M}$ ,  $72,83\mu\text{M}$

respectivamente. Já as populações de Morro dos Conventos (SC) e Cachoeira do Campo (MG) o tamanho dos cromossomos variaram de  $4,53 \pm 1,05 \mu\text{M}$  a  $2,42 \pm 0,63 \mu\text{M}$  e de  $4,26 \pm 1,37 \mu\text{M}$  a  $2,32 \pm 0,66 \mu\text{M}$  com comprimento total de  $63,09 \mu\text{M}$  e  $58,79 \mu\text{M}$  respectivamente. A fórmula cariotípica para o conjunto diploide de cromossomos foi  $2k = 20M$ . Os dados morfométricos dos cromossomos de cada população são apresentados na forma de tabela sendo Torres (RS) apresentado na Tabela 1, Balneário Gaivotas (SC) Tabela 2, Morro dos Conventos (SC) Tabela 3 e Cachoeira do Campo (MG) Tabela 4.

*T. holmgreni* apresentou marcações positivas para o fluorocromo CMA<sub>3</sub> na região centromérica e pericentromérica e negativas para DAPI em todos os cromossomos, indicando que estas são ricas em pares de bases GC (Figura 1b e 1c).

**Tabela 1:** Análise morfométrica dos cromossomos de *T. holmgreni* de Torres-RS.

Cromossomo	TL	L	S	RL	r	Classificação
1	6,06±0,87	3,19±0,44	2,87±0,46	7,33±0,35	1,12±0,08	Metacêntrico
2	5,77±0,81	3,05±0,41	2,71±0,41	6,98±0,2	1,13±0,08	Metacêntrico
3	5,1±0,62	2,94±0,4	2,17±0,27	6,19±0,22	1,36±0,12	Metacêntrico
4	4,92±0,59	2,75±0,43	2,17±0,22	5,98±0,31	1,27±0,14	Metacêntrico
5	4,35±0,69	2,35±0,42	2±0,33	5,26±0,19	1,18±0,17	Metacêntrico
6	4,23±0,66	2,26±0,34	1,97±0,33	5,11±0,1	1,15±0,09	Metacêntrico
7	4,11±0,66	2,22±0,36	1,89±0,34	4,96±0,13	1,18±0,14	Metacêntrico
8	4,05±0,63	2,14±0,36	1,91±0,3	4,89±0,13	1,12±0,08	Metacêntrico
9	3,98±0,62	2,12±0,32	1,86±0,32	4,81±0,08	1,15±0,08	Metacêntrico
10	3,92±0,61	2,07±0,33	1,85±0,29	4,73±0,08	1,12±0,07	Metacêntrico
11	3,85±0,62	2,11±0,37	1,74±0,28	4,64±0,1	1,21±0,11	Metacêntrico
12	3,77±0,61	2,01±0,34	1,76±0,3	4,55±0,1	1,15±0,13	Metacêntrico
13	3,73±0,6	2,01±0,3	1,73±0,31	4,51±0,08	1,17±0,07	Metacêntrico
14	3,7±0,58	1,98±0,28	1,72±0,32	4,47±0,08	1,16±0,1	Metacêntrico
15	3,67±0,57	1,93±0,34	1,74±0,24	4,43±0,08	1,1±0,08	Metacêntrico
16	3,6±0,56	1,92±0,27	1,68±0,29	4,35±0,08	1,15±0,06	Metacêntrico
17	3,56±0,55	1,85±0,32	1,71±0,27	4,3±0,07	1,09±0,14	Metacêntrico
18	3,5±0,53	1,89±0,3	1,61±0,25	4,23±0,09	1,18±0,12	Metacêntrico
19	3,45±0,55	1,89±0,38	1,56±0,23	4,17±0,11	1,21±0,2	Metacêntrico
20	3,4±0,54	1,82±0,27	1,58±0,3	4,1±0,09	1,16±0,11	Metacêntrico
Σ	82,72					

TL=comprimento total; L=braço longo; S=braço curto; RL=comprimento relativo; r=razão braço curto/braço longo; Σ= soma do tamanho de todos os cromossomos. Todas as medidas são dadas em  $\mu\text{M}$ .

**Tabela 2:** Análise morfométrica dos cromossomos de *T. holmgreni* de Balneário Gaivotas – SC.

Cromossomo	TL	L	S	RL	r	Classificação
1	5,18±0,72	2,75±0,48	2,43±0,28	7,13±0,43	1,13±0,12	Metacêntrico
2	4,83±0,75	2,55±0,46	2,28±0,3	6,63±0,29	1,11±0,08	Metacêntrico
3	4,42±0,74	2,5±0,44	1,92±0,35	6,06±0,28	1,31±0,16	Metacêntrico
4	4,28±0,72	2,41±0,48	1,87±0,25	5,86±0,23	1,28±0,13	Metacêntrico
5	3,89±0,64	2,05±0,35	1,83±0,31	5,32±0,2	1,12±0,06	Metacêntrico
6	3,78±0,57	2±0,39	1,77±0,21	5,18±0,15	1,12±0,13	Metacêntrico
7	3,66±0,49	1,95±0,3	1,71±0,27	5,03±0,12	1,16±0,21	Metacêntrico
8	3,58±0,49	1,91±0,35	1,66±0,17	4,92±0,12	1,15±0,16	Metacêntrico
9	3,52±0,47	1,85±0,33	1,67±0,17	4,84±0,11	1,11±0,14	Metacêntrico
10	3,45±0,47	1,82±0,34	1,62±0,16	4,74±0,08	1,13±0,15	Metacêntrico
11	3,4±0,46	3,4±0,29	1,59±0,21	4,67±0,09	1,14±0,14	Metacêntrico
12	3,37±0,46	1,79±0,29	1,58±0,21	4,63±0,09	1,13±0,15	Metacêntrico
13	3,33±0,48	1,76±0,28	1,57±0,24	4,57±0,05	1,13±0,15	Metacêntrico
14	3,3±0,47	1,76±0,37	1,54±0,16	4,53±0,08	1,14±0,21	Metacêntrico
15	3,26±0,45	1,71±0,29	1,55±0,2	4,49±0,08	1,1±0,14	Metacêntrico
16	3,24±0,45	1,7±0,29	1,54±0,2	4,46±0,05	1,1±0,14	Metacêntrico
17	3,17±0,46	1,67±0,3	1,49±0,21	4,35±0,16	1,12±0,17	Metacêntrico
18	3,12±0,43	1,67±0,28	1,45±0,19	4,29±0,11	1,15±0,15	Metacêntrico
19	3,07±0,47	1,65±0,32	1,43±0,18	4,22±0,13	1,15±0,18	Metacêntrico
20	2,98±0,48	1,6±0,37	1,38±0,18	4,09±0,16	1,16±0,25	Metacêntrico
Σ	<b>72,83</b>					

TL=comprimento total; L=braço longo; S=braço curto; RL=comprimento relativo; r=razão braço curto/braço longo; Σ= soma do tamanho de todos os cromossomos. Todas as medidas são dadas em µM.

**Tabela 3:** Análise morfométrica dos cromossomos de *T. holmgreni* de Morro dos Conventos – SC.

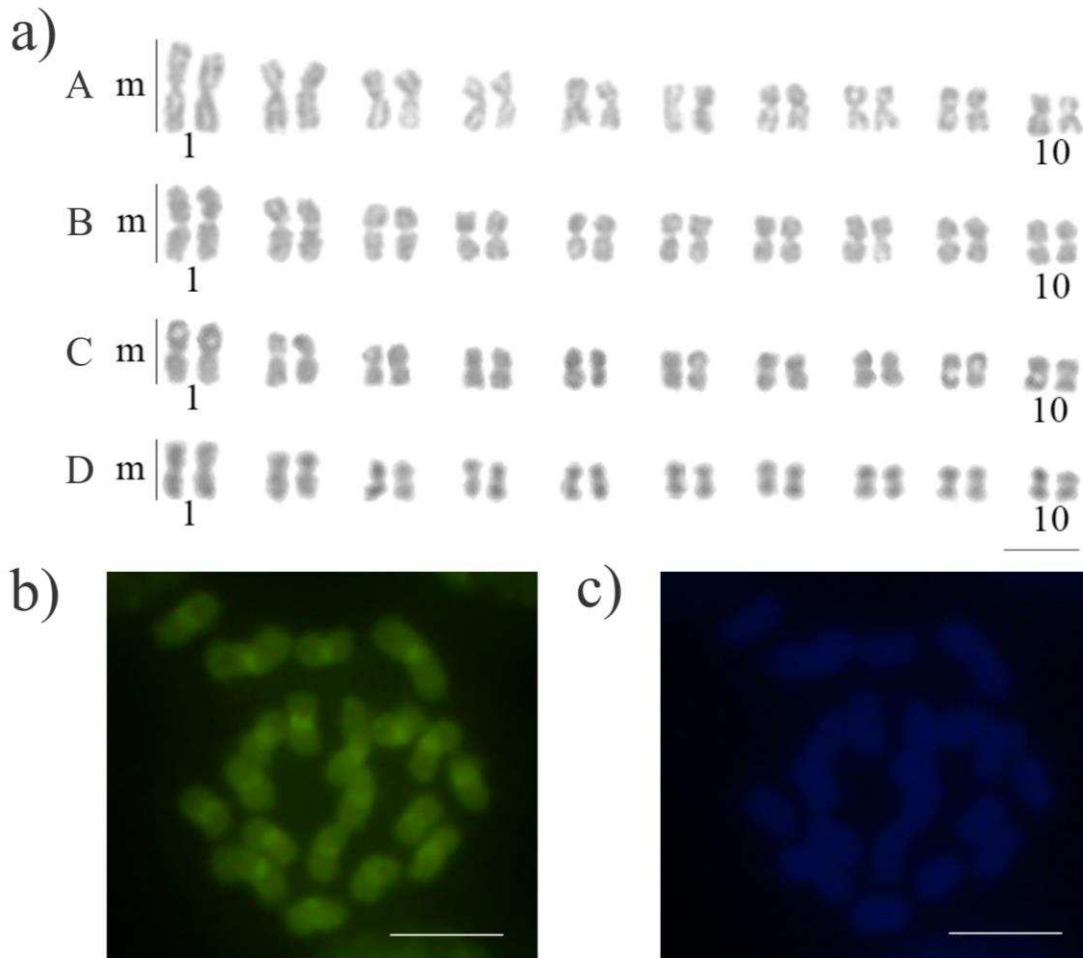
Cromossomo	TL	L	S	RL	r	Classificação
1	4,53±1,05	2,24±0,45	1,99±0,5	7,16±0,29	1,15±0,16	Metacêntrico
2	4,37±1,15	2,13±0,49	1,93±0,51	6,87±0,43	1,12±0,14	Metacêntrico
3	3,77±0,88	2,06±0,44	1,52±0,33	5,97±0,17	1,36±0,14	Metacêntrico
4	3,73±0,87	1,99±0,6	1,68±0,58	5,89±0,15	1,24±0,29	Metacêntrico
5	3,32±0,73	1,85±0,66	1,55±0,58	5,27±0,13	1,24±0,25	Metacêntrico
6	3,21±0,66	1,81±0,59	1,52±0,66	5,11±0,16	1,2±0,22	Metacêntrico
7	3,16±0,71	1,81±0,65	1,46±0,64	5,01±0,08	1,27±0,32	Metacêntrico
8	3,09±0,69	1,62±0,56	1,45±0,38	4,9±0,11	1,06±0,03	Metacêntrico
9	3,05±0,68	1,54±0,35	1,3±0,23	4,84±0,05	1,18±0,12	Metacêntrico
10	3,01±0,67	1,53±0,3	1,27±0,28	4,78±0,07	1,21±0,12	Metacêntrico
11	2,98±0,66	1,5±0,25	1,27±0,31	4,73±0,06	1,2±0,16	Metacêntrico
12	2,92±0,6	1,45±0,24	1,28±0,27	4,64±0,1	1,15±0,11	Metacêntrico
13	2,91±0,61	1,51±0,24	1,21±0,27	4,62±0,09	1,27±0,1	Metacêntrico
14	2,87±0,59	1,46±0,33	1,21±0,19	4,56±0,13	1,21±0,15	Metacêntrico
15	2,85±0,61	1,51±0,39	1,14±0,18	4,52±0,07	1,31±0,31	Metacêntrico
16	2,84±0,61	1,44±0,28	1,19±0,27	4,51±0,06	1,23±0,16	Metacêntrico
17	2,78±0,6	1,37±0,26	1,2±0,29	4,42±0,06	1,21±0,11	Metacêntrico
18	2,73±0,62	1,37±0,31	1,14±0,22	4,32±0,12	1,2±0,11	Metacêntrico
19	2,55±0,6	1,27±0,29	1,1±0,2	4,04±0,2	1,12±0,13	Metacêntrico
20	2,42±0,63	1,25±0,25	0,99±0,26	3,82±0,3	1,23±0,22	Metacêntrico
Σ	<b>63,09</b>					

TL=comprimento total; L=braço longo; S=braço curto; RL=comprimento relativo; r=razão braço curto/braço longo; Σ= soma do tamanho de todos os cromossomos. Todas as medidas são dadas em µM.

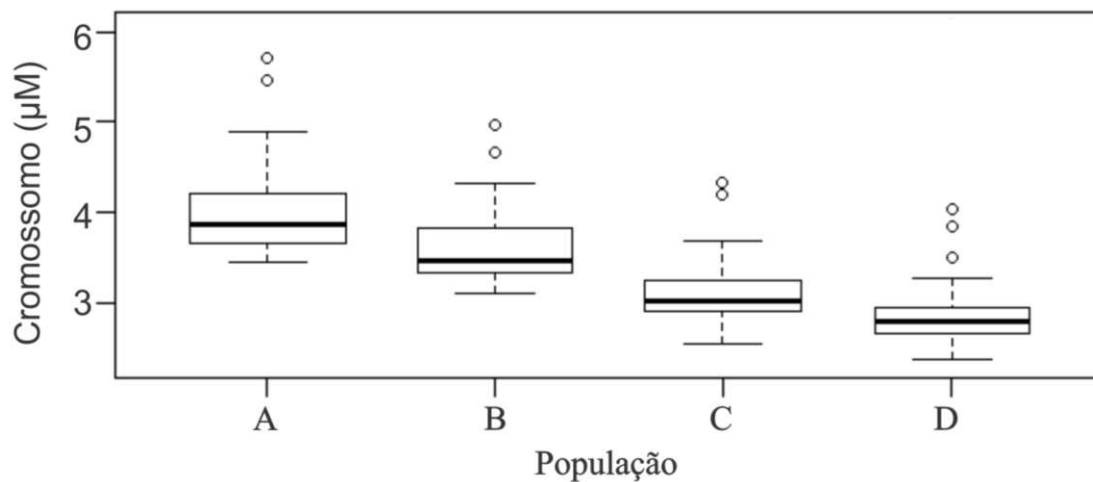
**Tabela 4:** Análise morfométrica dos cromossomos de *T. holmgreni* de Cachoeira do Campo – MG.

<b>Cromossomo</b>	<b>TL</b>	<b>L</b>	<b>S</b>	<b>RL</b>	<b>r</b>	<b>Classificação</b>
<b>1</b>	4,26±1,37	2,19±0,62	1,83±0,64	7,2±0,52	1,23±0,21	Metacêntrico
<b>2</b>	4,04±1,24	1,94±0,66	1,75±0,48	6,85±0,22	1,14±0,11	Metacêntrico
<b>3</b>	3,64±1,06	1,72±0,48	1,63±0,44	6,19±0,22	1,15±0,16	Metacêntrico
<b>4</b>	3,37±1,09	1,67±0,5	1,48±0,48	5,69±0,28	1,23±0,15	Metacêntrico
<b>5</b>	3,05±0,84	1,53±0,36	1,36±0,38	5,22±0,2	1,12±0,08	Metacêntrico
<b>6</b>	2,93±0,83	1,43±0,33	1,33±0,35	5,01±0,11	1,2±0,18	Metacêntrico
<b>7</b>	2,91±0,84	1,39±0,35	1,33±0,33	4,95±0,1	1,1±0,12	Metacêntrico
<b>8</b>	2,88±0,82	1,44±0,35	1,25±0,36	4,92±0,12	1,16±0,09	Metacêntrico
<b>9</b>	2,86±0,82	1,42±0,39	1,25±0,29	4,87±0,11	1,12±0,1	Metacêntrico
<b>10</b>	2,81±0,84	1,38±0,37	1,24±0,34	4,78±0,07	1,1±0,07	Metacêntrico
<b>11</b>	2,8±0,83	1,4±0,32	1,21±0,38	4,75±0,06	1,11±0,12	Metacêntrico
<b>12</b>	2,77±0,82	1,42±0,34	1,16±0,36	4,7±0,04	1,15±0,09	Metacêntrico
<b>13</b>	2,72±0,83	1,36±0,37	1,17±0,33	4,62±0,06	1,21±0,14	Metacêntrico
<b>14</b>	2,68±0,82	1,3±0,35	1,18±0,33	4,55±0,07	1,08±0,09	Metacêntrico
<b>15</b>	2,67±0,81	1,32±0,34	1,16±0,34	4,54±0,06	1,14±0,15	Metacêntrico
<b>16</b>	2,63±0,78	1,27±0,28	1,17±0,38	4,47±0,06	1,11±0,14	Metacêntrico
<b>17</b>	2,56±0,73	1,22±0,35	1,14±0,27	4,37±0,08	1,22±0,13	Metacêntrico
<b>18</b>	2,49±0,71	1,28±0,27	1,07±0,38	4,25±0,05	1,11±0,1	Metacêntrico
<b>19</b>	2,4±0,65	1,23±0,31	1,04±0,26	4,11±0,14	1,11±0,07	Metacêntrico
<b>20</b>	2,32±0,66	1,12±0,3	1,04±0,25	3,96±0,13	1,2±0,14	Metacêntrico
<b>∑</b>	<b>58,79</b>					

TL=comprimento total; L=braço longo; S=braço curto; RL=comprimento relativo; r=razão braço curto/braço longo; ∑= soma do tamanho de todos os cromossomos. Todas as medidas são dadas em µM.



**Figura 1:** (a) Cariótipo de *T. holmgreni* com a técnica convencional de Gimsa as lestra máisculas correspondem as populações: A. Torres, B. Balneário Gaivotas, C. Morro do Conventos e D. Cachoeira do Campo. (b) marcações evidentes do fluorocromo CMA<sub>3</sub> na região centromérica e pericentromérica dos cromossomos e (c) cromossomos negativos para DAPI. Barra = 5µM.



**Figura 2:** Tamanho total dos cromossomos entre as populações. A. Torres, B. Balneário Gaivotas C. Morro do Conventos e D. Cachoeira do Campo.

## 4.5. Discussão

As quatro populações de *T. holmgreni* estudadas apresentaram o mesmo número cromossômico  $2n=20$  com cariótipo consistindo de 10 pares de cromossomos metacêntricos. As populações de Morro dos Conventos (SC), Balneário Gaivotas (SC) e Torres (RS) estão equidistante e separadas por aproximadamente 50km e estas estão distantes da população de Cachoeira do Campo (MG) por aproximadamente 1.500km. Variação numérica e morfológica dos cromossomos de populações geograficamente distantes são possíveis, e de fato clinas cromossômicas dentro de uma mesma espécie têm sido observadas em diferentes espécies de insetos (Lukhtanov *et al.*, 2011). Aqui, observamos que não houve diferença morfológica ou numérica no cariótipo de *T. holmgreni* mesmo entre as populações do litoral sul e a população mais distante de Cachoeira do Campo (MG), sugerindo que *T. holmgreni* apresenta estabilidade no número cromossômico.

No entanto, os tamanhos totais dos cromossomos variaram entre populações. Sendo que as populações de Morro dos Conventos (SC) e Cachoeira do Campo (MG) não diferiram. Os rearranjos cromossômicos do tipo fusão e fissão são os principais mecanismos que explicam a evolução cromossômica em formiga (Lorite & Palomeque, 2010). Isso por que o a família Formicidae apresenta uma grande variação no número cromossômico. Em nosso estudo, retomamos as medições dos cromossomos de formigas, os quais foram aplicados em estudos citogenéticos com plantas (Stebbins, 1971) e que atualmente não tem grande importância em estudos cromossômicos evolutivos. As variações encontradas no tamanho total sofrem que além dos rearranjos citados acima, as deleções e inserções são importantes mecanismos na evolução cromossômica em *T. holmgreni* e provavelmente em Formicidae. Outras técnicas como a hibridização fluorescente *in situ* (FISH) podem ser úteis para identificar diferenciações entre as populações e evidenciar tais rearranjos.

O número de cromossomos na família Formicidae, como dito anteriormente, varia desde  $2n = 2$  em *Mymercia croslandi* (Crosland & Crozier, 1986) à  $2n = 120$  em *Dinoponera lucida* (Mariano *et al.*, 2008). Entre as formigas cultivadoras de fungo, o menor cariótipo conhecido é o da espécie *Mycocephurus goeldii* e *Mycocephurus sp.* que apresenta o conjunto diploide de 8 cromossomos metacêntricos (Murakami *et al.*, 1998, Barros *et al.*, 2010) e o maior em *Mycetarotes parallellus* que apresenta o conjunto diploide de 54 cromossomos (Fadini *et al.* 1996). Das 47 espécies que constituem o gênero *Trachymyrmex* (Bolton, 2017) dados citogenéticos estão disponíveis para menos de 10% delas: *T. septentrionalis* ( $2n = 20$ ), *T. relictus* ( $2n = 20$ ), *T. fuscus* ( $2n = 18$ ), *Trachymyrmex sp.* ( $2n = 22$ ), *Trachymyrmex sp.2* ( $2n =$

18) e *Trachymyrmex sp.1* ( $2n = 12$ ) (Murakami *et al.*, 1998, Barros *et al.*, 2013). O número de cromossomos encontrado em *T. holmgreni* inclui a faixa de variação observada em Formicidae, bem como entre as formigas cultivadoras de fungo e no gênero, e compreende o cariótipo de maior frequência ( $n=10$  ou  $2n=20$ ) na distribuição dos cariótipos conhecidos em Myrmicinae (Lorite & Palomeque, 2010).

Apesar da estabilidade na espécie e do pouco dado disponível, podemos inferir que o gênero *Trachymyrmex* parece não apresentar estabilidade no número cromossômico ( $2n = 12, 18, 20$  e  $22$ ) como observado nos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* (Cristiano *et al.*, 2013). A variação no número de cromossomos dentro dos gêneros parece ser frequente entre as cultivadoras de fungo que divergiram de um ancestral mais antigo, observamos que para os cariótipos conhecidos há grandes variações em *Apterostigma* ( $2n = 20, 22, 24, 32$  e  $46$ ) (Fadini & Pompolo, 1996, Barros *et al.*, 2013), *Mycetarotes* ( $2n = 14, 54$ ) (Fadini & Pompolo 1996), *Cyphomyrmex* ( $2n = 20, 22$  e  $32$ ) (Murakami *et al.*, 1998; Mariano *et al.*, 2011) e *Mycetophylax* ( $2n = 26, 30$  e  $36$ ) (Cardoso *et al.*, 2014), por exemplo.

Por outro lado, todas as espécies citogeneticamente estudadas dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex*, que divergiram de um ancestral mais recente, apresentam o mesmo número cromossômico  $2n = 38$  e  $2n = 22$  respectivamente, com exceção de *Ac. striatus*  $2n = 22$  (Cristiano *et al.*, 2011) e do parasita social *Ac. ameliae*  $2n = 36$  (Barros *et al.*, 2008). Esses dados sugerem que rearranjos cromossômicos do tipo fusão e fissão de fato podem explicar a evolução cromossômica dentro deste grupo. Além disso, a estabilidade no número cromossômico dentro dos gêneros pode estar relacionada ao tempo evolutivo. As espécies de *Acromyrmex* e *Atta* que divergiram entre 8 a 12 milhões de anos (Schultz & Brady, 2008) ainda não experimentaram rearranjos alterando o número cromossômico que tenham se fixado ao longo da evolução.

A coloração sequencial com fluorocromos CMA<sub>3</sub>/DAPI indicou regiões ricas em pares GC na região centromérica e pericentromérica de todos os cromossomos. Em geral, diferentes espécies de formigas apresentam apenas um par de cromossomos rico com uma marcação CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> que estão relacionadas ou representam as regiões organizadoras de nucléolo (NOR) (Cardoso *et al.* 2017). Regiões CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> em vários cromossomos foram observadas em outras espécies como em *Ac. striatus* (Cristiano *et al.*, 2013) e *T. fuscus* (Barros *et al.*, 2013), as quais foram coincidentes com as regiões de heterocromatina evidenciadas pela técnica de bandamento C, sugerindo que este seja um padrão comum às espécies do gênero e a formigas filogeneticamente próximas como *Ac. striatus*.

Brandão & Mayhé-Nunes 2007, com base em caracteres morfológicos, apresentaram uma hipótese filogenética das espécies dos grupos de *Trachymyrmex*, reconhece-se cinco grupos: Septentrionalis, Cornetzi, Iheringi, Opulentus e Urichi. *T. holmgreni*, pertence ao grupo Iheringi, *T. septentrionalis* à Septentrionalis e *T. relictus* inicialmente pertencia ao grupo Opulentos mas caracteres morfológicos e a filogenia não a sustentam no grupo. Essas espécies apresentam o mesmo número e morfologia cromossômica que *T. holmgreni*, com 10 pares metacêntricos. A posição dessas espécies na árvore sugere que *T. septentrionalis* é a espécie mais antiga entre as três, seguida por *T. relictus* e por último *T. holmgreni*. Com base nos dados citogenéticos disponíveis e nas relações filogenéticas mencionadas acima sugerimos que o cariótipo de 10 pares de cromossomos metacêntricos, com regiões centroméricas e pericentoméricas ricas em pares de bases GC, seja estável e ancestral, sendo mantido na linhagem de *T. holmgreni* como características plesiomórficas, porém sofrendo rearranjos do tipo fusão em *T. fuscus*.

Estudos citogenéticos de outras espécies do gênero aliados a uma análise filogenética com base em dados moleculares dos grupos de *Trachymyrmex* podem elucidar as relações entre as espécies, bem como diversificação e a evolução do cariótipo deste grupo de formigas cultivadoras de fungo.

## 4.6. Referências

- BARROS, C. A. L. l. **Citogenética de espécies de Attini (Formicidae: Myrmicinae)**. 2010. 75f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) Genética e Melhoramento, Universidade Federal de Viçosa, 2010
- BARROS, C. A. L.; CARDOSO DE AGUIAR, A. J. H.; MARIANO, F. S. D. C.; DELABIE, C. H. J.; POMPOLO, G. D, S. Cytogenetic characterization of the lower-Attine *Mycocepurus goeldii* (Formicidae: Myrmicinae: Attini). **Sociobiology**, v. 56, n. 1, p. 57-66, 2010.
- BARROS, C. A. L.; CARDOSO DE AGUIAR, A. J. H.; MARIANO, F. S. D. C.; DELABIE, C. H. J.; POMPOLO, G. D, S. Cytogenetic characterization of the ant *Trachymyrmex fuscus* Emery, 1934 (Formicidae: Myrmicinae: Attini) with the description of a chromosomal polymorphism. **In Annales de la Société entomologique de France (NS) Taylor & Francis** v. 49. n. 4, p. 367-373, 2013.
- BOLTON, B.: **Bolton World Catalog**. AntWeb. Disponível em: <https://www.antweb.org/description.do?subfamily=myrmicinae&genus=trachymyrmex&rank=genus>. Acessado em 13 de fevereiro de 2017
- BRANDÃO, C. R. F.; MAYHÉ-NUNES, A. J. A phylogenetic hypothesis for the *Trachymyrmex* species groups, and the transition from fungus-growing to leaf-cutting in the Attini. **Advances in ant systematics (Hymenoptera: Formicidae): homage to EO Wilson**, v. 50, p. 72-88, 2007.
- CARDOSO, D. C.; PEREIRA, T. T. P.; CORDEIRO, A. L.; CRISTIANO, M. P. Cytogenetic data on the agro-predatory ant *Megalomyrmex incisus* Smith, 1947 and its host, *Mycetophylax conformis* (Mayr, 1884) (Hymenoptera, Formicidae). **Comparative Cytogenetics**, v. 11, p. 45, 2017.
- CARDOSO, D. C.; CRISTIANO, M. P.; TAVARES, M. G. Methodological remarks on rearing basal Attini ants in the laboratory for biological and evolutionary studies: overview of the genus *Mycetophylax*. **Insectes sociaux**, v. 58, n. 3, p. 427-430, 2011.
- CARDOSO, D. C.; POMPOLO, G. D, S.; CRISTIANO, M. P.; TAVARES, M. G. The role of fusion in ant chromosome evolution: insights from cytogenetic analysis using a molecular phylogenetic approach in the genus *Mycetophylax*. **PloS one**, v. 9, n. 1, p. e87473, 2014.
- CRISTIANO, M. P.; CARDOSO, D. C.; FERNANDES-SALOMÃO, T. M. Cytogenetic and molecular analyses reveal a divergence between *Acromyrmex striatus* (Roger, 1863) and other congeneric species: taxonomic implications. **PloS one**, v. 8, n. 3, p. e59784, 2013.

- CROSLAND, M. W.; CROZIER, R. H. *Myrmecia pilosula*, an ant with only one pair of chromosomes. **Science**, v. 231, n. 4743, p. 1278-1278, 1986.
- FADINI, M. A. M.; POMPOLO, S. D. G. Cytogenetics of some ant species of the tribe Attini (Hymenoptera, Formicidae) from the region of Viçosa, MG. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 19, n. 1, p. 53-55, 1996.
- GUERRA, M. Cytotaxonomy: the end of childhood. **Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology**, v. 146, n. 3, p. 703-710, 2012.
- IMAI, H. T.; TAYLOR, R. W.; CROSLAND, M. W.; CROZIER, R. H. Modes of spontaneous chromosomal mutation and karyotype evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis. **Idengaku zasshi**, v. 63, n. 2, p. 159-185, 1988.
- KING, MAX. Species evolution: the role of chromosome change. **Cambridge University Press**, 1995, 358 p.
- LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A. A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, v. 52, n. 2, p. 201-220, 1964.
- LORITE, P.; PALOMEQUE, T. Karyotype evolution in ants (Hymenoptera: Formicidae), with a review of the known ant chromosome numbers. **Myrmecological News**, v. 13, p. 89-102, 2010.
- LUKHTANOV, V. A.; DINCĂ, V.; TALAVERA, G.; VILA, R. Unprecedented within-species chromosome number cline in the Wood White butterfly *Leptidea sinapis* and its significance for karyotype evolution and speciation. **BMC evolutionary biology**, v. 11, n. 1, p. 109, 2011.
- MARIANO, C. D. S. F.; POMPOLO, S. D. G.; BARROS, L. A. C.; MARIANO-NETO, E.; CAMPIOLO, S.; DELABIE, J. H. C. A biogeographical study of the threatened ant *Dinoponera lucida* Emery (Hymenoptera: Formicidae: Ponerinae) using a cytogenetic approach. **Insect Conservation and Diversity**, v. 1, n. 3, p. 161-168, 2008.
- MARIANO, C. S.; SANTOS, I. D. S.; GROG, S.; LEROY, C.; MALÉ, P. J.; RUIZ-GONZÁLEZ, M. X.; DELABIE, J. H. The karyotypes of *Gigantiops destructor* (Fabricius) and other ants from French Guiana (Formicidae). **In: Annales de la Société Entomologique de France**. Taylor & Francis Group, 2011. p. 140-146.
- MURAKAMI, T.; FUJIWARA, A.; YOSHIDA, M. C. Cytogenetics of ten ant species of the tribe Attini (Hymenoptera, Formicidae) in Barro Colorado Island, Panama. **Chromosome Science**, v. 2, n. 3, p. 135-139, 1998.
- SCHULTZ, T. R.; BRADY, S. Major evolutionary transitions in ant agriculture. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 14, p. 5435-5440, 2008.

SCHWEIZER, D. Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA-DAPI bands) in human chromosomes. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 27, n. 2-3, p. 190-193, 1980.

STEBBINS, L. G. **Chromosomal evolution in higher plants**. University Park Press, 1971. 220p

WHITE, M. J. D. Animal cytology and evolution. **CUP Archive**, 1977. 933p.

## 5. CONCLUSÕES GERAIS

O objetivo central deste trabalho foi descrever os aspectos ecológicos e citogenéticos da espécie da formiga cultivadora de fungo *Trachymyrmex holmgreni* com o intuito de contribuir para o entendimento da evolução do grupo das formigas cultivadoras de fungo. Descrevemos a arquitetura do ninho, a demografia das colônias, o padrão de distribuição no ambiente de Restinga e o cariótipo da espécie. Levando em consideração o grupo das formigas cultivadoras de fungo, a arquitetura do ninho e tamanho da colônia corroboram a hipótese proposta por Burchill (2016), de que a transição do tamanho da colônia de pequena para grande passou por tamanhos intermediários. Além disso, verificamos que as características preditas e apontadas pela posição filogenética intermediária do gênero *Trachymyrmex* corroboram com a hipótese filogenética baseada em caracteres moleculares apresentado em Schultz e Brady, (2008).

Avaliamos o efeito de duas estações (outono e primavera) na arquitetura e demografia, com o intuito de entender os fatores que podem influenciar o sistema auto-organizacional desempenhado pelas operárias no processo de construção e manutenção do ninho. Nossos resultados sugerem que as operárias respondem a variáveis microclimáticas do solo e que o fungo deve servir como um modelo tridimensional para a forma e o tamanho final das câmaras e da colônia, como proposto por Tschinkel, (2015).

Calculamos também o padrão de distribuição da espécie no ecossistema de Restinga. Nossos resultados mostraram uma densidade igual a 0,04 ninhos/m<sup>2</sup> e um padrão de distribuição agregado congruente com a paisagem heterogênea da Restinga. Este resultado tem potencial para avaliar a qualidade ambiental pois o estabelecimento do ninho parece estar intimamente ligado a fitofisionomia ocorrendo agregações em partes do solo com cobertura vegetal esparsa. Ressaltamos a importância da preservação desse ecossistema para manutenção da espécie.

Disponibilizamos a primeira descrição citogenética da espécie *T. holmgreni* em quatro populações geograficamente distintas. Nossos resultados mostram uma estabilidade no número e morfologia dos cromossomos. Observamos também um padrão incomum de marcações positivas para o fluorocromo CMA<sub>3</sub> na região centromérica e pericentromérica de todos os cromossomos. O mesmo padrão já foi encontrado em outra espécie do gênero, sugerindo que este seja uma plesiomorfia do cariótipo do gênero *Trachymyrmex*. Além disso, ressaltamos a importância do estudo polucional e da morfometria em trabalhos citogenéticos.