

GISELE AMARO TEIXEIRA

**CITOGENÉTICA CLÁSSICA E MOLECULAR DE
FORMIGAS NEOTROPICAIS**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

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

T

Teixeira, Gisele Amaro, 1993-
T266c Citogenética clássica e molecular de formigas neotropicais
2018 / Gisele Amaro Teixeira. – Viçosa, MG, 2018.
 ix,72f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Pedro Crescêncio Souza Carneiro.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Formigas - Citogenética. 2. Formicidae. 3.
Gnamptogenys. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação
em Genética e Melhoramento. II. Título.


CDD 22. ed. 595.796

GISELE AMARO TEIXEIRA

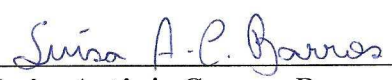
**CITOGENÉTICA CLÁSSICA E MOLECULAR DE
FORMIGAS NEOTROPICAIS**

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

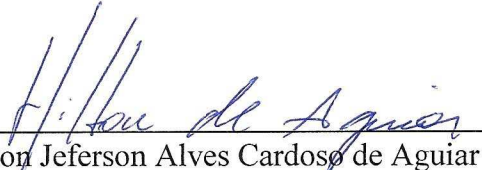
APROVADA: 22 de fevereiro de 2018



Silvia das Graças Pompolo
(Coorientadora)



Luísa Antônia Campos Barros



Hilton Jeferson Alves Cardoso de Aguiar



Pedro Crescêncio Souza Carneiro
(Orientador)

Dedico aos meus pais Imaculada e Edgard,
ao meu marido Sebastião,
ao meu irmão Geovane

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me dar força sempre para eu superar todas as dificuldades e por guiar meus caminhos.

Aos meus pais Edgard e Imaculada pelo amor incondicional, por me incentivarem a dedicar aos estudos desde pequena e por sempre apoiarem na busca por meus objetivos.

Ao meu irmão gêmeo Geovane pela sua amizade e companheirismo.

Ao meu marido Sebastião pelo amor, carinho, por estar sempre ao meu lado me incentivando, dando apoio e tornando a minha caminhada mais fácil e pela ajuda em algumas coletas.

Ao meu orientador Pedro Carneiro por ter aceitado me orientar na genética, pela orientação e por sempre estar disposto a me ajudar.

À minha orientadora Silvia Pompolo pela orientação, pelos conselhos, pelos ensinamentos, pela valiosa amizade, pela contribuição em minha formação e pelo exemplo de dedicação e comprometimento.

Aos professores Luísa Barros e Hilton Aguiar pela valiosa amizade, pelos ensinamentos, por sempre me ajudarem desde o início da minha graduação, pela contribuição para meu crescimento pessoal e profissional, pelo exemplo de dedicação e comprometimento e por terem aceitado fazer parte da banca.

Ao pesquisador Jérôme Orivel por ceder gentilmente material das espécies da Guiana Francesa e a Júlio Chaul por ceder material de *Gnamptogenys triangularis* para análise citogenética;

Ao professor Jacques Delabie pela identificação das espécies.

As amigas Natália, Marina e Camila pelas boas conversas no laboratório de biologia molecular de insetos, e em especial a Natália pelas dicas da técnica de FISH.

As amigas Jaqueline e Alessandra pelos momentos de estudo durante a disciplina de citogenética de insetos.

Aos meus tios, avós e primos por sempre torcerem por mim e desejarem o meu sucesso.

A todos os meus professores da graduação e do mestrado que contribuíram para a minha formação profissional.

A pós-graduação em Genética e Melhoramento pela oportunidade de cursar o mestrado.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

A Universidade Federal de Viçosa pela infraestrutura fornecida, em especial ao Laboratório de Citogenética de Insetos e Biologia Molecular de Insetos pelo suporte técnico.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente me ajudaram a conquistar mais essa etapa, os meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
Introdução Geral	1
Referências Bibliográficas	6
Capítulo 1 – Mapeamento de genes ribossomais 18S dez espécies de formigas neotropicais.....	10
Resumo	11
Introdução	13
Materiais e Métodos	15
Resultados e Discussão	16
Referências Bibliográficas	21
Tabelas e Figuras	25
Capítulo 2 - Citogenética clássica e molecular de quatro espécies de <i>Gnamptogenys</i> Roger, 1863 (Formicidae: Ectatominae)	40
Resumo	41
Introdução	43
Materiais e Métodos	45
Resultados.....	46
Discussão	48
Referências Bibliográficas	55
Tabelas e Figuras.....	60
Conclusões Gerais	71

RESUMO

TEIXEIRA, Gisele Amaro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2018. **Citogenética clássica e molecular de formigas neotropicais**. Orientador: Pedro Crescêncio Souza Carneiro. Coorientadora: Silvia das Graças Pompolo.

A citogenética compreende o estudo do cariótipo das espécies por meio de técnicas clássicas (número e morfologia dos cromossomos e bandamentos) e moleculares (por exemplo hibridização *in situ* fluorescente - FISH). Os estudos citogenéticos, clássicos e moleculares, em formigas têm grande aplicabilidade em áreas como evolução, conservação de espécies e na taxonomia. O conceito de taxonomia integrativa evidencia a importância da integração de dados de diversas áreas da ciência para auxiliar na delimitação de espécies. Dados citogenéticos moleculares empregando FISH para localização de genes ribossomais em formigas neotropicais são escassos e disponíveis apenas para 25 espécies. A maioria das espécies apresentou um par cromossômico carreador desses genes, exceto *Dinoponera gigantea* e *Camponotus renggeri*. Esses genes mostraram-se ricos em pares de bases GC em praticamente todas as espécies, com exceção de *Dolichoderus voraginosus*. A aplicação dos estudos citogenéticos moleculares para a compreensão da evolução cromossômica e auxílio a resolução taxonômica demonstrado até o momento em Formicidae, mostra a relevância da extensão de estudos que visem o mapeamento físico de genes rDNA nas diferentes espécies de formigas. Assim, no primeiro capítulo foi realizado a FISH para mapeamento físico de genes ribossomais 18S em 10 espécies de formigas neotropicais com representantes em três subfamílias (Ponerinae, Formicinae, Myrmicinae), além do emprego da técnica de coloração com o fluorocromo CMA₃, com o intuito de verificar a composição de bases desses genes. No segundo capítulo, seguindo a proposta da taxonomia integrativa, foram estudadas por meio da citogenética clássica e molecular quatro espécies de *Gnamptogenys* (Ectatominae), sendo uma delas, a *Gnamptogenys striatula*, uma espécie de ampla complexidade taxonômica. Todas as quatorze espécies estudadas apresentaram um par carreador dos genes rDNA 18S que coincidiram com as regiões ricas em pares GC, semelhante a maioria das espécies estudadas. Em *Wasmannia auropunctata* e *Camponotus atriceps* foi observado um heteromorfismo sutil do tamanho das regiões de rDNA 18S que pode ter origem por duplicações/deleções devido à crossing-over desigual. Polimorfismos cromossômicos envolvendo regiões de genes ribossomais

18S foram observados em *Odontomachus bauri* e *Gnamptogenys regularis*, que podem ter origem por duplicações/deleções dessas sequências gênicas repetitivas. Esses dados são inéditos em formigas. Os genes rDNA 18S localizados na região pericentromérica de um par metacêntrico na formiga cultivadora de fungo *Myrmicocrypta* sp. pode indicar uma característica ancestral nesse grupo. A localização dos genes rDNA 18S observada em *Acromyrmex echinator* representa uma evidência de uma inversão cromossômica em *Acromyrmex*. Os números cromossômicos e fórmulas cariotípicas observadas nas quatro *Gnamptogenys* spp. foram: $2n=24$ (18m+6sm) em *G. triangularis* de Araponga-MG, $2n=26$ (24m+2sm, 25m+1sm) em *G. regularis* de Ponte Nova-MG, $2n=32$ (20m+10sm+2st) em *G. striatula* do Rio de Janeiro-RJ, $2n=34$ (18m+8sm+8st, 18m+7sm+9st) em *G. striatula* de Petrópolis-RJ, $2n=34$ (18m+8sm+8st) em *G. moelleri* de Viçosa-MG e Petrópolis-RJ e $2n=44$ (22m+14sm+8st) em *G. moelleri* de Açailândia-MA. Em *G. striatula* de Petrópolis foi observado um polimorfismo cromossômico no par cromossômico 17, que pode ter sido originado de duplicações devido à crossing-over desigual ou translocações. Embora *G. moelleri* apresente caracteres morfológicos bem estabelecidos, a população de Açailândia apresentou nítidas variações cromossômicas em relação às populações de Viçosa e Petrópolis, sugerindo que essas podem ser espécies crípticas e isso deve ser melhor investigado. Diferenças cariotípicas foram observadas entre as populações de *G. striatula* do Rio de Janeiro e Petrópolis demonstrando que a citogenética pode ser uma ferramenta útil na resolução dos problemas taxonômicos dessa espécie.

ABSTRACT

TEIXEIRA, Gisele Amaro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2018. **Classical and Molecular cytogenetics of Neotropical ants.** Advisor: Pedro Crescêncio Souza Carneiro. Co-advisor: Silvia das Graças Pompolo.

Cytogenetics includes the study of the karyotype of the species through classical techniques (number, morphology of chromosomes, and banding) and molecular techniques (e.g. fluorescence *in situ* hybridization - FISH). The classical and molecular cytogenetics studies have widely applied in evolution, species conservation and taxonomy. The definition of integrative taxonomy highlights the importance of integrating data from different areas of science to assist the delimitation of species. Molecular cytogenetic data that have used FISH to physically map the ribosomal genes of Neotropical ants are scarce, and such data are available for only 25 species. Most species showed a single pair of NOR bearers, except *Dinoponera gigantea* and *Camponotus renggeri*. These genes are rich in GC base pairs in practically all species, with the exception of *Dolichoderus voraginosus*. The application of molecular cytogenetic studies to the understanding of chromosome evolution and aid to the taxonomic resolution demonstrated to date in Formicidae shows the relevance of the extension of studies aimed at the physical mapping of rDNA genes in the different ant species. Thus, in the first chapter, FISH was used to physical map 18S ribosomal genes in ten Neotropical ant species with representatives of three subfamilies (Ponerinae, Formicinae, Myrmicinae). In addition, the CMA₃ fluorochrome staining technique was performed, in order to verify the base composition of these genes. . In the second chapter, following integrative taxonomy proposal, four species of *Gnamptogenys* (Ectatominae) were studied through classical and molecular cytogenetics. One of them was *Gnamptogenys striatula*, which has a complex taxonomy. All fourteen studied species showed a pair of 18S rDNA bands that coincided with GC-rich regions, similar to the most of the species already studied. In *Wasmannia auropunctata* and *Camponotus atriceps*, a small heteromorphism in the size of the 18S rDNA regions was observed, which may have origin in duplications/deletions due to unequal crossing-over between homologous chromosomes. Chromosomal polymorphisms involving 18S ribosomal genes regions were observed in *Odontomachus bauri* and *Gnamptogenys regularis*, which may have origin in duplications/deletions of these

repetitive genetic sequences. These data are inherited in ants. The 18S rDNA genes located in the pericentromeric region of a metacentric pair on the fungus-growing ant *Myrmicocrypta* sp. may indicate an ancestral characteristic in this group. The location of the 18S rDNA genes observed in *Acromyrmex echinator* represents an evidence of a paracentric inversion in *Acromyrmex*. The karyotypes observed in the four *Gnamptogenys* spp. were: $2n=24$ (18m+6sm) in *G. triangularis* from Araponga-MG, $2n=26$ (24m+2sm, 25m+1sm) in *G. regularis* from Ponte Nova-MG, $2n=32$ (20m+10sm+2st) in *G. striatula* from Rio de Janeiro-RJ, $2n=34$ (18m+8sm+8st, 18m+7sm+9st) in *G. striatula* from Petrópolis-RJ, $2n=34$ (18m+8sm+8st) in *G. moelleri* from Viçosa-MG and Petrópolis-RJ and $2n = 44$ (22m + 14sm + 8st) in *G. moelleri* from Açailândia-MA. In *G. striatula* from Petrópolis, a chromosomal polymorphism was observed in pair 17, which may have origin in duplications due to unequal crossing-over or translocations. Although *G. moelleri* presented well defined morphological characters, the population of Açailândia presented distinct chromosomal variations in relation to those of Viçosa and Petrópolis, suggesting that these may be cryptic species and which should be further investigated. Karyotype differences were observed between populations of *G. striatula* from Rio de Janeiro and Petrópolis, indicating that cytogenetics may be an auxiliary tool for solving taxonomic problems of this species.

INTRODUÇÃO GERAL

Família Formicidae

As formigas constituem um grupo diverso de insetos com mais de 13000 espécies descritas que estão incluídas na família Formicidae (Bolton 2018). Esta abrange 17 subfamílias: Agroecomyrmecinae, Amblyponinae, Aneuretinae, Apomyrminae, Dolichoderinae, Dorylinae, Ectatomminae, Formicinae, Heteroponerinae, Leptanillinae, Martialinae, Myrmeciinae, Myrmicinae, Paraponerinae, Ponerinae, Proceratiinae e Pseudomyrmecinae (Bolton 2018). Esses himenópteros habitam os mais variados ambientes terrestres, com exceção dos polos (Hölldobler e Wilson 1990). As formigas são eussociais, pois apresentam características como cuidado cooperativo com a prole (as operárias alimentam, carregam e limpam as larvas), sobreposição de gerações dentro de um mesmo ninho e divisão reprodutiva do trabalho (operárias estéreis e rainha fértil) (Wilson e Hölldobler 2005).

O sistema de reprodução sexual observado nas formigas em geral é a partenogênese arrenótoca, em que os machos são produzidos a partir de ovos não fertilizados (partenogênese, reprodução assexuada) sendo haploides e as fêmeas são produzidas a partir de ovos fertilizados (reprodução sexuada) sendo diploides (Gokhman e Kuznetsova 2017). Nesse sistema, a determinação do sexo é por haplodiploidia, ou seja, os machos são haploides e herdam apenas o lote cromossômico materno e as fêmeas são diploides herdam os lotes cromossômicos de ambos os pais (Gokhman e Kuznetsova 2017). Algumas espécies apresentam uma forma peculiar de sistema de reprodução sexual que é a partenogênese telítoca. Nesse sistema, as fêmeas diploides desenvolvem novas fêmeas diploides por partenogênese, ou seja, a partir de ovos não fertilizados. Em algumas espécies como *Mycocepurus smithii* existem populações assexuadas, em que não ocorrem machos, e operárias e rainhas são produzidas por telitoquia. Em outras, como em *Wasmannia auropunctata*, esse sistema é utilizado somente para produção de castas reprodutoras e, ainda, em *Platythyrea punctata* somente a produção de operárias é por telitoquia (Rabeling e Kronauer 2013).

Citogenética: clássica e molecular

A citogenética é uma área da genética que combina conhecimentos citológicos e genéticos e estuda o cariótipo dos organismos, ou seja, as características dos cromossomos como número, morfologia, grau de condensação, organização, função e replicação, além de suas variações durante a evolução ocasionadas por rearranjos cromossômicos. Para estudo do número e morfologia dos cromossomos normalmente faz-se a coloração dos cromossomos com o corante convencional Giemsa, que também auxilia na observação de outras características como constrições secundárias, par heteromórfico sexual, presença de cromossomo B e alterações cromossômicas numéricas e estruturais. Além disso, é possível observar padrão de distribuição de heterocromatina no cariótipo pela coloração com Giemsa (Imai et al. 1988). Em Formicidae, estudos citogenéticos já foram conduzidos em mais de 750 espécies (Lorite & Palomeque 2010) e a variação cromossômica observada é de $2n=2$ em *Myrmecia croslandi* (Crosland e Crozier 1986) e $2n=120$ em *Dinoponera lucida* (Mariano et al. 2008).

Os bandamentos cromossômicos evidenciam regiões específicas dos cromossomos que não seriam possíveis de serem visualizadas somente com coloração convencional com Giemsa (Sumner 2003). Uma dessas técnicas é a coloração com fluorocromos base-específicos, que são substâncias que emitem fluorescência quando excitadas em comprimentos de ondas específicos e tem afinidade para determinadas categorias de bases nitrogenadas (AT ou GC) (Sumner 2003, Kasahara 2009). Esses fluorocromos podem funcionar como marcadores citológicos para caracterizar cariótipos sendo muito úteis na comparação de espécies (Kasahara 2009).

Os fluorocromos Cromomicina A_3 (CMA_3) e 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) tem afinidade por regiões ricas em pares de bases GC e AT, respectivamente, e a utilização desses fluorocromos para estudo dos cariótipos de formigas vem aumentando nos últimos anos (Barros et al. 2010, Santos et al. 2010, 2016, Cardoso et al. 2014, Cristiano et al. 2013, Barros et al. 2014, 2015, 2016, Teixeira et al. 2017, Aguiar et al. 2017). Com o fluorocromo CMA_3 , nesses estudos, já foram observadas espécies com apenas um par de marcações, com dois pares de marcações ou com múltiplas marcações. A maioria das espécies não apresenta marcações diferenciais ricas em AT detectadas com o DAPI, somente um padrão negativo complementar referente às regiões ricas em GC observadas com o CMA_3 . No entanto, W.

auropunctata (Souza et al. 2011) e *Mycetophylax conformis* e *Mycetophylax simplex* (Cardoso et al. 2014) apresentaram múltiplas marcações ricas em AT.

A utilização de técnicas da biologia molecular para o estudo do cariótipo das espécies caracteriza a citogenética molecular (Speicher e Carter 2005). Uma das técnicas da citogenética molecular é a hibridização *in situ* fluorescente (FISH) que envolve a hibridização de segmentos de DNA/RNA marcados com fluorescência (sondas) com o DNA-alvo complementar nos cromossomos (Guerra 2004). O princípio da hibridização baseia-se na desnaturação do DNA cromossômico e na sua renaturação sob a presença de sondas marcadas com fluorocromos, assim, a sonda irá se ligar às regiões complementares ao DNA cromossômico e o sinal da sonda será detectado em um microscópio de fluorescência (Guerra 2004). Uma das aplicações dessa técnica é o mapeamento físico e preciso de genes ribossomais (rDNA 45S e 5S), que se apresentam em várias cópias *in tandem* no genoma dos eucariotos, podendo os clusters estarem localizados em um único cromossomo ou vários (Sumner 2003). Uma característica importante desses genes ribossomais é que sua sequência de nucleotídeos é muito conservada evolutivamente e, portanto, são particularmente úteis como marcadores genéticos (Guerra 2004, Sumner 2003). No entanto, a sequência do gene rDNA 5S é mais variável que a do rDNA 45S (Guerra 2004).

As regiões organizadoras de nucléolo (NORs) correspondem aos genes ribossomais 18S, 5.8S e 28S (rDNA 45S) e geralmente formam uma estrutura característica nos cromossomos, a região de constrição secundária (Sumner 2003). Cada cópia do gene rDNA 45S é constituída, nessa ordem para a maioria dos organismos, pelos genes ribossomais 18S, 5.8S e 28S, os espaçadores internos transcritos entre esses genes, os espaçadores externos transcritos flanqueando os genes 18S e 28S, uma região denominada de espaçador intergênico não transcrita, além da região do promotor que contém duas sequências importantes para a formação do complexo transcricional, o elemento de controle a jusante e o núcleo promotor (Sumner 2003, Raska et al. 2004). O gene rDNA 45S geralmente se localiza em uma região distinta da NOR (Sumner 2003).

Os RNAs ribossômicos são os mais abundantes dentre os RNAs existentes em uma célula (Sumner 2003). Os genes da NOR são transcritos em uma unidade de RNAr 45S pela DNA polimerase I no nucléolo onde também são processados (Sumner 2003, Xue e Barna 2012). Os rRNA transcritos a partir desses genes

ribossomais irão constituir as subunidades maior e menor dos ribossomos. Em mamíferos, o rRNA 18S irá compor em associação com 32 proteínas ribossomais a subunidade menor 40S enquanto que os rRNAs 28S, 5.8S e 5S irão compor a subunidade maior 60S com auxílio de 47 proteínas ribossomais (Xue e Barna 2012).

Dados citogenéticos moleculares empregando FISH para localização de genes ribossomais em formigas neotropicais são escassos e estão disponíveis para 26 espécies que incluem os gêneros: *Dinoponera* (Mariano et al. 2008, Aguiar et al. 2011), *Anochetus* (Santos et al. 2010), *Acromyrmex* (Barros et al. 2016, Teixeira et al. 2017), *Mycocepurus* (Barros et al. 2012), *Dolichoderus* (Santos et al. 2016), *Atta* (Barros et al. 2015, Teixeira et al. 2017), *Camponotus* (Aguiar et al. 2017) e *Trachymyrmex* (Barros et al. no prelo). Dentre essas espécies neotropicais estudadas, a maioria apresentou apenas um par cromossômico carreador dos genes ribossomais 45S ou 18S, com exceção de *Dinoponera gigantea* (Aguiar et al. 2011) e *Camponotus renggeri* (Aguiar et al. 2017). Recentemente, o mapeamento de genes ribossomais 5S em formigas foi conduzido em três espécies: *Camponotus renggeri*, *Camponotus rufipes* e *Camponotus cingulatus*, que apresentaram esses genes na região terminal de todos os cromossomos. Essa localização dos blocos de rDNA 5S coincidiu com a heterocromatina terminal nessa espécie, um padrão peculiar que precisa ser investigado em estudos futuros (Aguiar et al. 2017).

O CMA₃ evidencia regiões ricas em pares de bases GC, e como as regiões de genes ribossomais (rDNA) possuem alta frequência desses pares de bases, usualmente as marcações de CMA₃ e FISH coincidem (Sumner 2003). Essa correspondência de regiões ricas em GC e de rDNA 45S ou 18S foi observada para a maioria das formigas neotropicais que tiveram seus genes ribossomais mapeados (por exemplo Mariano et al. 2008, Santos et al. 2016, Barros et al. 2014, 2015, Teixeira et al. 2017, Aguiar et al. 2017). No entanto, nem todas as regiões ricas em GC evidenciadas com o CMA₃ correspondem aos genes rDNA. Nas formigas neotropicais *Mycocepurus goeldii* (Barros et al. 2010, 2012), *Acromyrmex niger* (Barros et al. 2016), *Dolichoderus lutosus*, *Dolichoderus diversus* e *Dolichoderus bidens* (Santos et al. 2016), *Acromyrmex striatus* (Cristiano et al. 2013, Teixeira et al. 2017) e *Trachymyrmex holmgreni* (Barros et al. no prelo) foram observados apenas um par cromossômico carreador de genes ribossomais e regiões CMA₃⁺ localizadas em mais de um par de cromossomos. Além disso, uma observação peculiar foi descrita em *Dolichoderus voraginosus* em que não se observou uma

correspondência entre as regiões ricas em GC, localizadas na região centromérica de todos os cromossomos, e os agrupamentos de rDNA 45S localizados na região terminal do braço menor do maior par metacêntrico (Santos et al. 2016). Isso demonstra a importância da complementação de dados citogenéticos clássicos com moleculares (Barros et al. 2016, Teixeira et al. 2017).

Estudos citogenéticos clássicos e moleculares em formigas têm grande aplicabilidade e relevância em áreas como citotaxonomia, evolução, filogenia e conservação de espécies (Mariano et al. 2008, Santos et al. 2010, 2016, Barros et al. 2015, Cristiano et al. 2013, Aguiar et al. 2017). O conceito de taxonomia integrativa, que tem sido muito discutido, corresponde à integração de dados de diversas áreas da ciência para auxiliar na delimitação de espécies (Schlick-Steiner et al. 2010). Nesse contexto, a citogenética tem se mostrado uma ferramenta útil na resolução de grupos taxonômicos complexos em Formicidae (Cristiano et al. 2013, Correia et al. 2016, Santos et al. 2016, Aguiar et al. 2017). Esses estudos citogenéticos em formigas mostraram variações cariotípicas nítidas entre os táxons morfológicamente complexos estudados, o que permitiu distingui-los, seja em relação ao número, morfologia cromossômica, padrão de bandamentos cromossômicos (citogenética clássica) e/ou a distribuição das regiões de genes ribossomais (citogenética molecular), auxiliando na taxonomia dos mesmos.

Rearranjos cromossômicos são responsáveis por diferenças cariotípicas interindividuais ou interespecíficas observadas nos diferentes organismos (Kasahara 2009) e podem originar polimorfismos cromossômicos em populações naturais (White 1973). Polimorfismos cromossômicos foram definidos por Sumner (1990) como resultado de inversões e outros rearranjos em que somente as formas selvagem e as rearranjadas são possíveis de ocorrer sendo essas claramente descontínuas. Vários estudos de variações cromossômicas estão de acordo com esse conceito, pois em uma mesma população observam-se os portadores heteromórficos do rearranjo e os indivíduos homomórficos para um ou outro tipo de cromossomos, podendo existir formas distintas de constituição cariotípica (Kasahara 2009). O estudo citogenético em diferentes populações de espécies de formigas tem permitido a identificação e caracterização de polimorfismos cromossômicos e a compreensão da dinâmica evolutiva cromossômica nas espécies (Mariano et al. 2008, Aguiar et al. 2017).

É bastante comum observar em diferentes organismos variações entre os cromossomos homólogos referentes a tamanho ou intensidade no padrão de

coloração de marcações observadas em técnicas citogenéticas. Essas variações são denominadas de heteromorfismos cromossômicos, um termo mais neutro, reconhecido em 1985 durante o ISCN (Supplement to the Paris Conference), que indica diferentes formas cromossômicas que não necessariamente são descontínuas e, ainda, não obrigatoriamente ocorrem juntas no mesmo habitat. Os heteromorfismos cromossômicos mais comuns são os de regiões heterocromáticas e de regiões de genes ribossomais (NORs). Nesse último, as diferenças no tamanho das regiões de rDNA entre os homólogos carreadores desses genes é devido a variações no número de cópias *in tandem* dessas sequências ribossomais (Sumner 1990, Kasahara 2009). Heteromorfismos de regiões de genes ribossomais em formigas já foram relatados, por exemplo, em *Anochetus altiquamis* e *Anochetus horridus* (Santos et al. 2010), *Azteca trigona* (Cardoso et al. 2012) e *Camponotus cingulatus* (Aguiar et al. 2017).

Portanto, para conhecer o número, localização e composição de bases dos genes ribossomais no cariótipo de outras formigas neotropicais, no primeiro capítulo deste estudo foi realizado o FISH para mapeamento de genes ribossomais 18S em 10 espécies de formigas neotropicais com representantes em três subfamílias (Ponerinae, Formicinae, Myrmicinae), além do emprego da técnica de coloração com o fluorocromo CMA₃, com o intuito de verificar correspondência na localização das regiões ricas em pares de bases GC e dos genes ribossomais 18S.

No segundo capítulo foram estudadas por meio da citogenética clássica (número, morfologia cromossômica e localização das regiões ricas em pares de bases GC, AT) e molecular (localização dos genes rDNA 18S) quatro espécies de *Gnamptogenys*, sendo uma delas, a *Gnamptogenys striatula* Mayr, 1884, uma espécie com grande complexidade taxonômica que há tempos é um desafio aos mirmeccólogos (Lattke et al. 2008).

Referências Bibliográficas

- Aguiar H.J.A.C., Barros L.A.C., Mariano C.S.F., Delabie J.H.C., Pompolo S.G. (2011) 45S rDNA localization for the giant ant *Dinoponera gigantea* (Perty, 1833) with evolutionary inferences for *Dinoponera* genus (Formicidae: Ponerinae). *Sociobiology*, 57: 607-620.
- Aguiar H.J.A.C., Barros L.A.C., Alves D.R., Mariano C.S.F., Delabie J.H.C., Pompolo S.G. (2017) Cytogenetic studies on populations of *Camponotus rufipes* (Fabricius, 1775) and *Camponotus renggeri* Emery, 1894 (Formicidae: Formicinae). *PLoS ONE*, 12(5): e0177702.

- Barros L.A.C., Aguiar H.J.A.C., Mariano C.S.F., Delabie J.H.C., Pompolo S.G. (2010) Cytogenetic characterization of the lower-Attine *Mycocepurus goeldii* (Formicidae: Myrmicinae: Attini). *Sociobiology*, 56: 57-66.
- Barros L.A.C., Aguiar H.J.A.C., Andrade-Souza V., Mariano C.S.F., Delabie J.H.C., Pompolo S.G. (2012) Occurrence of pre-nucleolar bodies and 45S rDNA location on the chromosomes of the ant *Mycocepurus goeldii* (Forel) (Formicidae, Myrmicinae, Attini). *Hereditas*, 149: 50-54.
- Barros L.A.C., Teixeira G.A., Aguiar H.J.A.C., Mariano C.S.F., Delabie J.H.C., Pompolo S.G. (2014) Banding patterns of three leafcutter ant species of the genus *Atta* (Formicidae: Myrmicinae) and chromosomal inferences. *Florida Entomologist*, 97: 1694-1701.
- Barros L.A.C., Aguiar H.J.A.C., Teixeira G.A., Mariano C.S.F., Teixeira M.C., Delabie J.H.C., Pompolo S.G. (2015) Cytogenetic data on the threatened leafcutter ant *Atta robusta* Borgmeier, 1939 (Formicidae: Myrmicinae: Attini). *Comptes rendus biologiques*, 338(10): 660-665.
- Barros L.A.C., Aguiar H.J.A.C., Mariano C.S.F., Andrade-Souza V., Costa M.A., Delabie J.H.C., Pompolo S.G. (2016) Cytogenetic data on six leafcutter ants of the genus *Acromyrmex* Mayr, 1865 (Hymenoptera, Formicidae, Myrmicinae): insights into chromosome evolution and taxonomic implications. *Comparative Cytogenetics*, 10: 229-243.
- Barros L.A.C., Teixeira G.A., Aguiar H.J.A.C., Lopes D.M., Pompolo S.G. (no prelo) Cytogenetic studies in *Trachymyrmex holmgreni* Wheeler, 1925 (Formicidae: Myrmicinae) by conventional and molecular methods. *Sociobiology*.
- Bolton B. (2018) An online catalog of the ants of the world. <http://antcat.org>. (accessed on 05 January 2018..)
- Cardoso D.C, Cristiano M.P., Barros L.A.C., Lopes D.R., Pompolo S.G. (2012) First cytogenetic characterization of a species of the arboreal ant genus *Azteca* Forel, 1978 (Dolichoderinae, Formicidae). *Comparative Cytogenetics*, 6(2): 107-114.
- Cardoso D.C., Pompolo S.G., Cristiano M.P., Tavares M.G. (2014) The role of fusion in ant chromosome evolution: insights from cytogenetic analysis using a molecular phylogenetic approach in the genus *Mycetophylax*. *PLoS ONE*, 9(1): e87473.
- Correia J.P.S.O., Mariano C.S.F., Delabie J.C.H., Lacau S., Costa M.A. (2016) Cytogenetic analysis of *Pseudoponera stigma* and *Pseudoponera gilberti* (Hymenoptera: Formicidae: Ponerinae): a taxonomic approach. *Florida Entomologist*, 99(4): 718-721.
- Cristiano M.P., Cardoso D.C., Fernandes-Salomão T.M. (2013) Cytogenetic and molecular analyses reveal a divergence between *Acromyrmex striatus* (Roger,

- 1863) and other congeneric species: taxonomic implications. *PloS one*, 8(3): e59784.
- Crosland M.W.J., Crozier R.H. (1986) *Myrmecia pilosula*, na ant with only one pair of chromosome. *Science*, 231(4743):1278.
- Gokhman V.E., Kuznetsova V.G. (2017) Parthenogenesis in Hexapoda: holometabolous insects. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 56: 23–34.
- Guerra M. (2004) FISH - Conceitos e aplicações na citogenética. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto. 184pp.
- Hölldobler B., Wilson E.O. (1990) *The ants*. Harvard University Press, USA, 732 pp.
- Imai H., Taylor R.W., Crosland M.W., Crozier R.H. (1988) Modes of spontaneous chromosomal mutation and karyotype evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis. *Japanese Journal of Genetics*, 63: 159-185.
- Kasahara S. (2009) *Introdução à pesquisa em Citogenética de Vertebrados*. 1ª ed. Sociedade Brasileira Genética. Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. 160 pp.
- Lattke J.E., Fernández F., Arias-Penna T.M., Palacio E.E.; Mackay W., Mackay E. (2008) Género *Gnamptogenys* Roger. In: Jiménez E, Fernández F, Arias-Penna TM, Lozano-Zambrano FH (org). *Sistemática, Biogeografía y conservación de las hormigas cazadoras de Colombia*. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Bogotá D.C., Colombia. pp. 66-107.
- Lorite P., Palomeque T. (2010) Karyotype evolution in ants (Hymenoptera: Formicidae), with a review of the known ant chromosome numbers. *Myrmecological News*, 13: 89-102.
- Mariano C.S.F., Pompolo S.G., Barros L.A.C., Mariano-Neto E., Campiolo S., Delabie J.H.C. (2008) A biogeographical study of the threatened ant *Dinoponera lucida* Emery (Hymenoptera: Formicidae: Ponerinae) using a cytogenetic approach. *Insect Conservation and Diversity*, 1: 161-168.
- Rabeling C., Kronauer D.J.C. (2013) Thelytokous Parthenogenesis in Eusocial Hymenoptera. *Annual Review of Entomology*, 58: 273–92.
- Raška I., Koberna K., Malínský J., Fidlerová H., Mašata M. (2004) The nucleolus and transcription of ribosomal genes. *Biology of the Cell*, 96(8): 579-594.
- Santos I.S., Costa M.A., Mariano C.S.F., Delabie J.H.C., Andrade-Souza V., Silva J.G. (2010). A cytogenetic approach to the study of Neotropical *Odontomachus* and *Anochetus* ants (Hymenoptera: Formicidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 103(3): 424-429.
- Santos I.S., Mariano C.S.F., Delabie J.H.C., Costa M.A., Carvalho A.F., Silva J.G. (2016) "Much more than a neck": karyotype differentiation between

- Dolichoderus attelaboides* (Fabricius, 1775) and *Dolichoderus decollatus* F. Smith, 1858 (Hymenoptera: Formicidae) and karyotypic diversity of five other Neotropical species of *Dolichoderus* Lund, 1831. *Myrmecological News*, 23:61-69.
- Schlick-Steiner B.C., Steiner F.M., Seifert B., Stauffer C., Christian E., Crozier R.H. (2010) Integrative taxonomy: a multisource approach to exploring biodiversity. *Annual Review of Entomology*, 55: 421-438.
- Souza A.L.B., Mariano C.S.F., Delabie J.H.C., Pompolo S.G., Serrão J.E. (2011) Cytogenetic studies on workers of the neotropical ant *Wasmannia auropunctata* (Roger 1863) (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae). *Annales de la Societé Entomologique de France*, 47: 510-513.
- Speicher M.R., Carter N.P. (2005) The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. *Nature Reviews Genetics*, 6(10): 782-792.
- Sumner A.T. (1990) Chromosome banding. Uniwin Hyman, London, 423 pp.
- Sumner A.T. (2003) Chromosomes: Organization and Function. Blackwell Publishing. North Berwick – United Kingdom. 287 pp.
- Teixeira G.A., Barros L.A.C., Aguiar H.J.A.C., Pompolo S.G. (2017) Comparative physical mapping of 18S rDNA in the karyotypes of six leafcutter ant species of the genera *Atta* and *Acromyrmex* (Formicidae: Myrmicinae). *Genetica*, 145: 351-357.
- White M.J.D. (1973) *Animal Cytology and Evolution*. 3^a ed. Cambridge: Cambridge University Press. 961 pp.
- Wilson E.O., Hölldobler B. (2005) Eusociality: Origin and consequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(38): 13367-13371.
- Xue S., Barna M. (2012) Specialized ribosomes: a new frontier in gene regulation and organismal biology. *Nature Review Molecular Cell Biology*, 13: 355–369.

Capítulo 1

Mapeamento de genes ribossomais 18S em dez espécies de formigas neotropicais

Mapeamento de genes ribossomais 18S em dez espécies de formigas neotropicais

Resumo

Estudos citogenéticos moleculares que empregaram a técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) para mapeamento de genes ribossomais em formigas neotropicais foram conduzidos apenas em 25 espécies. Muitos desses estudos envolvendo citogenética molecular em Formicidae têm subsidiado hipóteses acerca da evolução cromossômica, filogenia e auxiliado na resolução taxonômica de diferentes espécies. A maioria das espécies que tiveram seus genes rDNA (45S ou 18S) mapeados apresentaram apenas um par cromossômico carreador dos genes ribossomais, exceto *Dinoponera gigantea* e *Camponotus renggeri*. Além disso, os genes rDNA mostraram-se ricos em pares de bases GC em praticamente todas as espécies, com exceção de *Dolichoderus voraginosus*. A aplicação dos estudos citogenéticos moleculares para a compreensão da evolução cromossômica e resolução taxonômica demonstrado até o momento em Formicidae mostra a relevância da extensão de estudos que visem o mapeamento físico de genes rDNA nas diferentes espécies de formigas. Assim, o presente estudo teve por objetivo mapear os genes ribossomais 18S de dez espécies de formigas neotropicais: *Acromyrmex echinator*, *Camponotus atriceps*, *Crematogaster longispina*, *Gigantiops destructor*, *Myrmicocrypta* sp., *Pheidole germani*, *Solenopsis geminata*, *Odontomachus bauri*, *Odontomachus haematodus* e *Wasmannia auropunctata*, além de observar a riqueza de pares de bases GC. Todas as dez espécies apresentaram apenas um par de marcações para genes rDNA 18S, que foram ricas em pares de bases GC, semelhante a maioria das espécies de formigas neotropicais estudadas citogeneticamente. Em *O. bauri* foi observado um polimorfismo cromossômico envolvendo regiões de genes rDNA 18S que pode ter sido originado por duplicações/deleções dessas sequências gênicas repetitivas. Em *W. auropunctata* e *C. atriceps* um heteromorfismo sutil no tamanho dessas regiões de rDNA 18S também foi observado. Os genes rDNA 18S localizados na região pericentromérica de um par metacêntrico na formiga cultivadora de fungo *Myrmicocrypta* sp. pode indicar uma característica ancestral para esse grupo. A configuração da localização dos genes rDNA 18S observadas em *A. echinator* representam uma evidência de uma inversão cromossômica em *Acromyrmex*. Os dados citogenéticos moleculares do presente estudo são os primeiros para a maioria dos gêneros aqui estudados e permitirão

discussões posteriores acerca da evolução desses genes ribossomais nos cariótipos dessas espécies e de formigas neotropicais.

Introdução

A citogenética molecular é um campo da genética que compreende a utilização de técnicas da biologia molecular para estudo do cariótipo (Speicher e Carter 2005). Uma dessas técnicas é a hibridização *in situ* fluorescente (FISH) que envolve a hibridização de segmentos de DNA/RNA marcados com fluorescência (sondas da região de interesse) com o DNA-alvo complementar nos cromossomos (Guerra 2004). Uma das aplicações da FISH é o mapeamento físico e preciso dos genes ribossomais (rDNA) (Guerra 2004). Estes codificam os RNAs ribossômicos que em associação com várias proteínas irão constituir as subunidades maior e menor dos ribossomos (Xue e Barna 2012). As regiões organizadoras de nucléolo (NORs) correspondem aos genes ribossomais 45S (28S+18S+5.8S) e estão localizadas em porções no DNA que após sua condensação irão constituir as constrições secundárias nos cromossomos metafásicos (Sumner 2003). Os genes rDNA 45S se apresentam em várias cópias *in tandem* no genoma de eucariotos, podendo os clusters estarem localizados em um único cromossomo ou em vários (Sumner 2003). Uma característica importante desses genes ribossomais é que sua sequência de nucleotídeos é muito conservada evolutivamente e portanto são particularmente úteis como marcadores genéticos (Guerra 2004, Sumner 2003).

O mapeamento físico de genes ribossomais utilizando a técnica de FISH em formigas neotropicais vem aumentando nos últimos anos e já foram conduzidos em 25 das mais de 13.000 espécies descritas e incluem sete gêneros (Tabela 1). Dentre as espécies neotropicais estudadas, a maioria apresentou apenas um par cromossômico carreador dos genes ribossomais 18S ou 45S (18S+ 5.8S+ 28S), com exceção de *Dinoponera gigantea* com múltiplas marcações para rDNA 45S (Aguiar et al. 2011) e *Camponotus renggeri* com os rDNA 18S localizados em dois pares cromossômicos (Aguiar et al. 2017).

Os estudos citogenéticos moleculares empregando FISH para localização de genes ribossomais em formigas neotropicais têm subsidiado hipóteses acerca da evolução cromossômica e filogenia, bem como tem auxiliado na resolução taxonômica de diferentes espécies (Santos et al. 2010, 2016, Teixeira et al. 2017, Aguiar et al. 2017). Por exemplo, o mapeamento físico de genes ribossomais 45S associado aos dados de número cromossômico, morfologia e localização de regiões ricas em pares de bases GC com o fluorocromo CMA₃ em espécies de *Anochetus* e

Odontomachus possibilitaram um melhor entendimento da filogenia e dos processos de evolução cromossômica que levaram a divergência desses gêneros (Santos et al. 2010). Os resultados permitiram apoiar a hipótese de que *Odontomachus* divergiu de uma linhagem de *Anochetus* por meio de rearranjos principalmente do tipo fissão cêntrica, e outros rearranjos menos frequentes (Santos et al. 2010). Outro exemplo mais recente foi o estudo citogenético conduzido por Aguiar et al. (2017) em *Camponotus rufipes* e *Camponotus renggeri*. Os autores mapearam os genes ribossomais 18S nessas duas espécies e observaram que *C. rufipes* tem apenas um par cromossômico carreador desses genes ribossomais e *C. renggeri* tem dois pares. Esses dados citogenéticos moleculares diferenciam de forma clara essas duas espécies, o que não está de acordo com a ideia de sinonimização que foi sugerida para os dois táxons (Aguiar et al. 2017).

O fluorocromo Cromomicina A₃ (CMA₃) evidencia regiões ricas em pares de bases GC, e como as regiões de genes ribossomais (rDNA) possuem alta frequência desses pares de bases, usualmente as marcações de CMA₃ e FISH coincidem (Sumner 2003). Essa correspondência de regiões ricas em GC e de rDNA foi observada para a maioria das formigas neotropicais que tiveram seus genes ribossomais mapeados (Tabela 1). No entanto, nem todas as regiões ricas em GC evidenciadas com o fluorocromo CMA₃ correspondem aos genes rDNA. Nas formigas neotropicais *Mycocepurus goeldii* (Barros et al. 2010, 2012), *Acromyrmex niger* (Barros et al. 2016), *Dolichoderus lutosus*, *Dolichoderus diversus* e *Dolichoderus bidens* (Santos et al. 2016) e *Acromyrmex striatus* (Cristiano et al. 2013, Teixeira et al. 2017) foram observados apenas um par cromossômico carreador de genes ribossomais e regiões CMA₃⁺ localizadas em mais de um par de cromossomos. Além disso, uma situação peculiar foi descrita em *Dolichoderus voraginosus* em que não se observou uma correspondência entre as regiões ricas em GC, localizadas na região centromérica de todos os cromossomos, e os agrupamentos de rDNA 45S localizados na região terminal do braço menor do maior par metacêntrico (Santos et al. 2016). Isso demonstra a importância da complementação de dados citogenéticos clássicos com moleculares (Barros et al. 2016, Teixeira et al. 2017).

A aplicação dos estudos citogenéticos moleculares para a compreensão da evolução cromossômica e resolução taxonômica demonstrado até o momento em Formicidae mostra a relevância da extensão de estudos que visem o mapeamento

físico de genes rDNA nas diferentes espécies de formigas. Portanto, para conhecer o número e localização dos genes ribossomais no cariótipo de outras formigas neotropicais, o presente estudo teve por objetivo mapear fisicamente os rDNA 18S de dez espécies representando três subfamílias (Formicinae, Myrmicinae e Ponerinae), bem como comparar os dados do fluorocromo CMA₃ com os dados do FISH para rDNA 18S, a fim de verificar a composição de bases desses genes.

Materiais e Métodos

Dez espécies de formigas neotropicais tiveram suas sequências de genes ribossomais 18S fisicamente mapeadas: *Acromyrmex echinator* (Forel, 1899), *Camponotus atriceps* (Fabricius, 1804), *Crematogaster longispina* Emery, 1890, *Gigantiops destructor* (Fabricius, 1804), *Myrmicocrypta* sp., *Pheidole germani* Emery, 1896, *Solenopsis geminata* (Fabricius, 1804), *Odontomachus bauri* Emery, 1892, *Odontomachus haematodus* (Linnaeus, 1758) e *Wasmannia auropunctata* (Roger, 1863) (Tabela 2). As coletas dos espécimes no território brasileiro foram autorizadas pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). Já os espécimes da Guiana Francesa foram coletados em parceria com o pesquisador Jérôme Orivel vinculado à EcoFoG (CNRS, UMR Ecologie des Forêts de Guyane). Espécimes adultos foram identificados pelo Dr. Jacques H. C. Delabie e depositados na coleção do Laboratório de Mirmecologia Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC/ Comissão Executiva para o Plano da Lavoura Cacaueira – CEPLAC – Brasil).

As metáfases mitóticas foram obtidas de gânglios cerebrais de larvas após eliminação do *meconium* (pós-defecantes) utilizando a metodologia descrita por Imai et al. (1988). Os cromossomos foram organizados em ordem decrescente de tamanho alinhando-os na base do braço longo, e classificados segundo a metodologia de Levan et al. (1964) que considera a razão de braços dos cromossomos ($r = \text{braço longo}/\text{braço curto}$). Os programas utilizados foram o Adobe® Photoshop® CS6 para a montagem dos cariótipos e o Image Pro Plus® para a medição dos cromossomos.

Lâminas da maioria das espécies, com exceção de *A. echinator*, foram submetidas à coloração sequencial com os fluorocromos Cromomicina A₃ (CMA₃) e 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para localização de regiões ricas em bases GC e AT, respectivamente, de acordo com o protocolo desenvolvido por Schweizer (1980) com modificações.

Os genes rDNA 18S das dez espécies foram mapeados fisicamente pela técnica de FISH de acordo com o protocolo de Pinkel et al. (1986). A sonda da região rDNA 18S foi obtida por amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os *primers* 18SF1 (5'-GTC ATA TGC TTG TCT CAA AGA-3') e 18SR1.1 (5'-CGC AAA TGA AAC TTT TTT AAT CT-3') desenhados para a espécie de abelha *Melipona quinquesfasciata* (Pereira 2006) e DNA total extraído da formiga *Camponotus rufipes*. As condições de amplificação utilizadas foram obtidas de Pereira (2006). As sondas da região rDNA 18S foram marcadas pelo método indireto utilizando-se digoxigenina-11-dUTP (Roche, Mannheim, Alemanha) e o sinal foi detectado com anti-digoxigenina-rodamina (Roche Applied Science).

Para as técnicas de coloração sequencial com os fluorocromos e de FISH para rDNA 18S pelo menos 15 metáfases foram analisadas para cada espécie por técnica ou dois indivíduos por espécie (Tabela 2). As metáfases foram analisadas e/ou documentadas utilizando o microscópio de epifluorescência Olympus BX60 acoplado com um sistema de captura de imagens QColor Olympus® utilizando os filtros WB (450–480 nm), WU (330-385 nm) e WG (510-550 nm) para os fluorocromos CMA₃, DAPI e rodamina, respectivamente.

Resultados e Discussão

Todas as dez espécies de formigas neotropicais estudadas no presente trabalho apresentaram apenas um par carreador dos genes ribossomais 18S (Tabela 3, Figura 1, 4, 6, 8). Esses resultados se assemelham aos observados para a maioria das espécies de formigas neotropicais que já tiveram suas regiões de rDNA mapeadas (Tabela 1). Esse padrão diferiu das espécies *Dinoponera gigantea* que apresentou múltiplas marcações para rDNA 45S (Aguiar et al. 2011) e *Camponotus renggeri* com os clusters de rDNA 18S localizados em dois pares cromossômicos (Aguiar et al. 2017).

A localização das regiões de genes ribossomais 18S em todas as dez espécies coincidiu com a das regiões CMA₃⁺, indicando que esses genes são ricos em pares de bases GC (Figuras 2, 3, 5, 7, 9). Esses dados são semelhantes aqueles observados para a maioria das espécies de formigas neotropicais estudadas citogeneticamente (Tabela 1). A única exceção, até o momento, é *D. voraginosus* em que não se observou uma correspondência entre as regiões ricas em GC, localizadas na região

centromérica de todos os cromossomos, e os agrupamentos de rDNA 45S localizados na região terminal do braço longo do maior par metacêntrico (Santos et al. 2016). Marcações diferenciais com o fluorocromo DAPI, o qual evidencia regiões ricas em pares de bases AT, não foram observadas em nenhuma das espécies do presente estudo: *O. haematodus* (Figura 2b), *O. bauri* (Figura 3b, 3d, e), *C. atriceps* e *G. destructor* (Figura 5b, d, f, respectivamente), *C. longispina*, *P. germani* e *S. geminata* (Figura 7b, d, f, respectivamente), *W. auropunctata* e *Myrmicocrypta sp.* (Figura 9b, d, respectivamente).

Subfamília Ponerinae

Duas espécies representantes dessa subfamília foram estudadas: *Odontomachus haematodus* (2n=44) e *Odontomachus bauri* (2n=44). Os genes ribossomais 18S e as regiões CMA₃⁺ localizaram-se em *O. haematodus* na região pericentromérica do braço longo do terceiro par subtelocêntrico (Figura 1a, 2a) e em *O. bauri* na região pericentromérica do segundo maior par subtelocêntrico (Figura 1b, c e 3a, c). Na colônia estudada de *O. bauri* foi observado um polimorfismo envolvendo as regiões dos genes ribossomais. Alguns indivíduos apresentaram os blocos de rDNA 18S e CMA₃⁺ de tamanhos iguais entre os homólogos (Figura 1b e 3a) enquanto, em outros indivíduos foi observado blocos de rDNA 18S e CMA₃⁺ de tamanhos diferentes entre os homólogos, com um deles apresentando o bloco aproximadamente duas vezes maior em relação ao outro (Figura 1c e 3c). Foi observado um macho com os blocos ricos em GC de tamanho menor (Figura 3d).

Ehmer e Hölldobler (1995) sugeriram que colônias de *O. bauri* são monogínicas. Assim, considerando os cariótipos dos indivíduos analisados, é provável que a rainha parental desses indivíduos apresentasse a condição heteromórfica com um dos homólogos com a região de rDNA 18S aproximadamente duas vezes maior em relação ao outro e o macho parental apresentava o cromossomo homólogo subtelocêntrico com a região de rDNA 18S de tamanho menor. Esse polimorfismo da região de genes ribossomais 18S observado em *O. bauri* pode ter se originado de duplicações/deleções dessas sequências devido à permuta gênica desigual (Kasahara 2009, Schubert e Lysack 2011). Os indivíduos que apresentam blocos extras de genes ribossomais podem aumentar potencialmente a sua capacidade de síntese proteica (Camacho et al. 1986). Embora polimorfismos cromossômicos envolvendo regiões de genes ribossomais já tenham sido descritos

para outros insetos como no gafanhoto *Oedipoda fuscocincta* (Camacho et al. 1986), esses dados são inéditos em formigas. *Odontomachus chelifer* e *Odontomachus meinerti*, ambas com $2n=44$ cromossomos, apresentaram as regiões ricas em pares de bases GC na região pericentromérica do braço longo do nono e décimo par cromossômico telocêntrico, respectivamente (Santos et al. 2016). Os autores sugeriram que essas regiões CMA_3^+ corresponderiam aos genes ribossomais. A localização das regiões ricas em GC e de rDNA 18S observadas em *O. bauri* e *O. haematodus* no presente estudo se assemelham aquelas das espécies *O. chelifer* e *O. meinerti* (região pericentromérica do braço longo de um par subtelocêntrico/telocêntrico) que certamente devem coincidir com as regiões dos genes ribossomais como sugerido por Santos et al. (2010).

Além disso, Santos et al. (2010) mapearam os genes rDNA 45S de duas espécies incluídas no gênero *Anochetus*, considerado grupo irmão de *Odontomachus*. *Anochetus altiquamis* ($2n=30$) apresentou os genes ribossomais 45S na região pericentromérica do braço longo do terceiro par submetacêntrico e *Anochetus horridus* ($2n=46$) na região pericentromérica do braço longo do quarto par telocêntrico. Os dados citogenéticos moleculares obtidos para *O. bauri* e *O. haematodus* do presente estudo confirmam a posição pericentromérica dos genes ribossomais 18S ricos em pares GC em um par cromossômico subtelocêntrico e dão suporte a hipótese evolutiva sugerida por Santos et al. (2010) em que *Odontomachus* teria divergido de uma linhagem de *Anochetus* por meio de rearranjos principalmente do tipo fissão cêntrica e outros rearranjos menos frequentes.

Subfamília Formicinae

Duas espécies representantes dessa subfamília foram estudadas: *Camponotus atriceps* ($2n=40$) e *Gigantiops destructor* ($n=38$). O gênero *Camponotus* é o mais diverso em formigas, com 1023 espécies descritas, por outro lado *Gigantiops* é um gênero monoespecífico (Bolton 2018).

Camponotus atriceps ($2n=40$) apresentou os genes ribossomais 18S na região pericentromérica da extensão principal do braço curto do segundo par submetacêntrico (Figura 4a) que coincidiu com as regiões ricas em pares de bases GC dessa espécie no cerrado observadas por Aguiar et al. (2017) e no presente estudo (região de Mata Atlântica) (Figura 5a). Esse padrão de localização dos rDNA 18S também foi observado em *Camponotus rufipes* ($2n= 39, 40$) e *Camponotus*

cingulatus (2n=40) (Aguiar et al. 2017). No entanto, em *C. renggeri* esses genes também se localizaram no segundo par submetacêntrico e adicionalmente em toda extensão do braço curto de um par subtelocêntrico de tamanho médio (Aguiar et al. 2017). Os autores sugerem que translocações cromossômicas podem ter originado os clusters adicionais de genes ribossomais nesse par subtelocêntrico de *C. renggeri*. Em *C. atriceps* foi observado em todos os indivíduos analisados uma sutil diferença no tamanho dos blocos de rDNA 18S entre os homólogos do par submetacêntrico, caracterizando um heteromorfismo cromossômico. Esse tipo de heteromorfismo de NOR pode ter sido originado de duplicações/deleções devido à crossing-over desigual. Heteromorfismos de tamanho de regiões de genes ribossomais já foram relatados em outras formigas como *C. cingulatus* (Santos et al. 2010, Cardoso et al. 2012, Aguiar et al. 2017), em outros insetos (Cabral-de-Mello et al. 2011, Meneses et al. 2014, Maryńska-Nadachowska et al. 2016), em anfíbios (Amaro-Ghilardi et al. 2008) e em peixes (Kavalco et al. 2005, Mendes et al. 2012).

O macho de *Gigantiops destructor* (n=39) apresentou os genes rDNA 18S em quase toda a extensão do braço curto do oitavo par metacêntrico, com exceção da região centromérica (Figura 4b). Marcações CMA₃⁺ foram observadas na mesma região do par carreador dos genes ribossomais e adicionalmente na região intersticial do braço longo do maior par subtelocêntrico (Figura 5c, e). Assim, nem todas as regiões ricas em GC nessa espécie corresponderam aos genes ribossomais. Outras formigas neotropicais como *M. goeldii* (Barros et al. 2010, 2012), *A. niger* (Barros et al. 2016), *D. lutosus*, *D. diversus* e *D. bidens* (Santos et al. 2016), *A. striatus* (Cristiano et al. 2013, Teixeira et al. 2017) e *T. holmgreni* (Barros et al. no prelo) também apresentaram regiões CMA₃⁺ localizadas em mais de um par de cromossomos e apenas um par cromossômico carreador de genes ribossomais.

Subfamília Myrmicinae

Seis espécies representantes dessa subfamília foram estudadas: *Crematogaster longispina* (2n=24), *Pheidole germani* (2n=22), *Solenopsis geminata* (2n=32), *Wasmannia auropunctata* (2n=32) e as formigas cultivadoras de fungos *Myrmicocrypta* sp. (2n=30) e *Acromyrmex echinator* (2n=38). Os genes rDNA 18S e as regiões ricas em GC localizaram-se: em *C. longispina* na região pericentromérica do braço longo do maior par metacêntrico (Figura 6a, 7a), em *P. germani* na região pericentromérica do braço longo do par subtelocêntrico (Figura

6b, 7c) e em *S. geminata* na região pericentromérica do braço curto do menor par submetacêntrico (Figura 6c, 7e).

Em *W. auropunctata* os genes rDNA 18S localizaram-se em todo o braço curto do sétimo par metacêntrico (Figura 8a), correspondente com as marcações CMA₃⁺ observadas por Souza et al. (2011) para *W. auropunctata* em duas localidades da Bahia e no presente estudo (Figura 9a). Um sutil heteromorfismo cromossômico envolvendo o tamanho dos blocos de rDNA 18S foi observado em todos os indivíduos analisados. Regiões ricas em pares de bases AT (DAPI⁺) foram observadas na região pericentromérica da maioria dos cromossomos em *W. auropunctata* de Ilhéus (BA) e Una (BA) (Souza et al. 2011). No entanto, marcações diferenciais ricas em AT não foram observadas com o fluorocromo DAPI nas colônias de Viçosa (MG) do presente estudo (Figura 9b), padrão semelhante ao de outras espécies de formigas (por exemplo Teixeira et al. 2017, Aguiar et al. 2017).

Em *Myrmicocrypta* sp. os genes rDNA 18S e os blocos ricos em GC foram observados na região pericentromérica do braço longo do menor par metacêntrico (Figura 8b, 9c). O mapeamento físico de genes rDNA em formigas cultivadoras de fungos não cortadeiras de folhas estão disponíveis para *Mycocepurus goeldii* (2n=10) (Barros et al. 2012) e *Trachymyrmex holmgreni* (2n=20) (Barros et al. no prelo), em que a primeira apresentou os genes rDNA 45S na região pericentromérica do segundo par metacêntrico e a segunda os genes rDNA 18S se localizaram na região centromérica do quarto par metacêntrico. Porém foram observadas nessas espécies marcações ricas em GC na região centromérica nos demais cromossomos (Barros et al. 2010, Barros et al. no prelo). Os gêneros *Myrmicocrypta*, *Mycocepurus* e *Apterostigma* são considerados os menos derivados dentre as formigas cultivadoras de fungos enquanto *Trachymyrmex* o gênero de transição para as formigas cortadeiras, mais derivadas (Schultz e Brady 2008). Assim, a localização pericentromérica em um par metacêntrico dos genes rDNA, observada tanto em *Myrmicocrypta* sp. (presente estudo) como em *M. goeldii* (Barros et al. 2012) e *T. holmgreni* (Barros et al. no prelo), pode ser um caráter ancestral em formigas cultivadoras de fungos.

A formiga cortadeira *A. echinator* apresentou os genes rDNA 18S na região intersticial do braço curto do maior par cromossômico subtelocêntrico (Figura 8c), denominado de par ST₁ por Barros et al. (2016). Essa localização dos genes ribossomais em *A. echinator* diferiu das demais *Acromyrmex* spp. estudadas, com

2n=38 cromossomos, as quais apresentaram esses genes na região terminal do braço curto do par ST₁ que também são ricos em GC (Barros et al. 2016, Teixeira et al. 2017). A ocorrência de uma inversão pericêntrica foi sugerida para explicar a posição intersticial das regiões ricas em bases GC observadas em *A. echinator*. A localização dos genes rDNA 18S observadas nessa espécie no presente estudo coincidiu com as regiões CMA₃⁺ observadas por Barros et al. (2016), o que confirma a ocorrência do rearranjo inversão paracêntrica envolvendo a região de genes ribossomais em *Acromyrmex*.

Em conclusão, todas as dez espécies estudadas apresentaram apenas um par portador dos genes ribossomais 18S ricos em pares de bases GC. Os genes rDNA 18S localizados na região pericentromérica de um par metacêntrico na formiga cultivadora de fungo *Myrmicocrypta* sp. pode indicar uma característica ancestral para o grupo. O estudo dos genes rDNA 18S nessas espécies permitiram sugerir a presença de um polimorfismo em *Odontomachus bauri*, e heteromorfismo sutil em *Wasmannia auropunctata* e *Camponotus atriceps*, originados possivelmente por duplicações/deleções, e ainda confirmar inversão paracêntrica em *Acromyrmex echinator*. Os dados citogenéticos moleculares referentes à utilização da técnica de FISH para mapeamento dos genes rDNA 18S obtidos no presente estudo são os primeiros para a maioria dos gêneros aqui estudados, com exceção de *Camponotus* (Aguiar et al. 2017) e *Acromyrmex* (Barros et al. 2016, Teixeira et al. 2017) e permitirão discussões posteriores acerca da evolução desses genes ribossomais nos cariótipos de formigas neotropicais e conseqüentemente dos próprios cariótipos dessas formigas. Este estudo contribui para ampliar os dados referentes à citogenética molecular em Formicidae neotropical.

Referências Bibliográficas










- Aguiar H.J.A.C., Barros L.A.C., Mariano C.S.F., Delabie J.H.C., Pompolo S.G. (2011) 45S rDNA localization for the giant ant *Dinoponera gigantea* (Perty, 1833) with evolutionary inferences for *Dinoponera* genus (Formicidae: Ponerinae). *Sociobiology*, 57: 607-620.
- Aguiar H.J.A.C., Barros L.A.C., Alves D.R., Mariano C.S.F., Delabie J.H.C., Pompolo S.G. (2017) Cytogenetic studies on populations of *Camponotus rufipes* (Fabricius, 1775) and *Camponotus renggeri* Emery, 1894 (Formicidae: Formicinae). *PLoS ONE*, 12(5): e0177702.

- Amaro-Ghilard R.C., Silva M.J.J., Rodrigues M.T., Yonenaga-Yassuda Y. (2008) Chromosomal studies in four species of genus *Chaunus* (Bufonidae, Anura): localization of telomeric and ribosomal sequences after fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Genetica*, 134: 159-168.
- Barros L.A.C., Aguiar H.J.A.C., Mariano C.S.F., Delabie J.H.C., Pompolo S.G. (2010) Cytogenetic characterization of the lower-Attine *Mycocepurus goeldii* (Formicidae: Myrmicinae: Attini). *Sociobiology*, 56: 57-66.
- Barros L.A.C., Aguiar H.J.A.C., Andrade-Souza V., Mariano C.S.F., Delabie J.H.C., Pompolo SG (2012) Occurrence of pre-nucleolar bodies and 45S rDNA location on the chromosomes of the ant *Mycocepurus goeldii* (Forel) (Formicidae, Myrmicinae, Attini). *Hereditas*, 149: 50-54.
- Barros L.A.C., Teixeira G.A., Aguiar H.J.A.C., Mariano C.S.F., Delabie J.H.C., Pompolo S.G. (2014) Banding patterns of three leafcutter ant species of the genus *Atta* (Formicidae: Myrmicinae) and chromosomal inferences. *Florida Entomologist*, 97: 1694-1701.
- Barros LAC, Aguiar HJAC, Teixeira GA, Mariano CDSF, Teixeira MC, Delabie JHC, Pompolo SG (2015) Cytogenetic data on the threatened leafcutter ant *Atta robusta* Borgmeier, 1939 (Formicidae: Myrmicinae: Attini). *Comptes Rendus Biologies*, 338(10): 660-665.
- Barros L.A.C., Aguiar H.J.A.C., Mariano C.S.F., Andrade-Souza V., Costa M.A., Delabie J.H.C., Pompolo S.G. (2016) Cytogenetic data on six leafcutter ants of the genus *Acromyrmex* Mayr, 1865 (Hymenoptera, Formicidae, Myrmicinae): insights into chromosome evolution and taxonomic implications. *Comparative Cytogenetics*, 10:229-243.
- Barros L.A.C., Teixeira G.A., Aguiar H.J.A.C., Lopes D.M., Pompolo S.G. (no prelo) Cytogenetic studies in *Trachymyrmex holmgreni* Wheeler, 1925 (Formicidae: Myrmicinae) by conventional and molecular methods. *Sociobiology*.
- Bolton B. (2018) An online catalog of the ants of the world. <http://antcat.org>. (accessed on 05 January 2018).
- Cabral-de-Mello D.C., Martins C, Souza MJ, Moura RC (2011) Cytogenetic mapping of 5S and 18S rRNAs and H3 histone genes in 4 ancient Proscopiidae grasshopper species: contribution to understanding the evolutionary dynamics of muligenes families. *Cytogenetic and Genome Research*, 132: 89-93.
- Camacho J.P.M., Navas-Castillo J., Cabrero J. (1986). Extra nucleolar activity associated with presence of a supernumerary chromosome segment in the grasshopper *Oedipoda fuscocincta*. *Heredity*. 56: 237–241.
- Cardoso D.C, Cristiano M.P., Barros L.A.C., Lopes D.R., Pompolo S.G. (2012) First cytogenetic characterization of a species of the arboreal ant genus *Azteca* Forel, 1978 (Dolichoderinae, Formicidae). *Comparative Cytogenetics*, 6(2): 107-114.

- Cristiano M.P., Cardoso D.C., Fernandes-Salomão T.M. (2013) Cytogenetic and molecular analyses reveal a divergence between *Acromyrmex striatus* (Roger, 1863) and other congeneric species: taxonomic implications. *PLoS ONE*, 8(3): e59784.
- Ehmer B, Hölldobler B (1995) Foraging behavior of *Odontomachus bauri* on Barro Colorado Island, Panama. *Psyche*, 102: 215-224.
- Guerra M. (2004) FISH - Conceitos e aplicações na citogenética. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto. 184pp.
- Imai H., Taylor R.W., Crosland M.W., Crozier R.H. (1988) Modes of spontaneous chromosomal mutation and karyotype evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis. *Japanese Journal of Genetics*, 63: 159-185.
- Kasahara S. (2009) Introdução à pesquisa em Citogenética de Vertebrados. 1ª ed. Sociedade Brasileira de Genética. Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. 160 pp.
- Kavalco K.F., Pazza R., Bertollo L.A.C., Moreira-Filho O. (2005) Molecular cytogenetics of *Oligosarcus hepsetus* (Teleostei, Characiformes) from two Brazilian locations. *Genetica*, 124: 85-91.
- Levan A., Fredga K., Sandberg A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 201-220.
- Mariano C.S.F., Pompolo S.G., Barros L.A.C., Mariano-Neto E., Campiolo S., Delabie J.H.C. (2008) A biogeographical study of the threatened ant *Dinoponera lucida* Emery (Hymenoptera: Formicidae: Ponerinae) using a cytogenetic approach. *Insect Conservation and Diversity*, 1: 161-168.
- Maryańska-Nadachowska A., Anokhin B.A., Gnezdilov V.M., Kuznetsova V.G. (2016) Karyotype stability in the Family Issidae (Hemiptera, Auchenorrhyncha) revealed by chromosome techniques and FISH with telomeric (TTAGG)_n and 18S rDNA probes. *Comparative Cytogenetics*, 10(3): 347-369.
- Mendes V.P., Portela-Castro A.L.B, Júlio-Júnior H.F. (2012) First record of supernumerary (B) chromosomes in electric fish (Gymnotiformes) and the karyotype structure of three species of the same order from the upper Paraná River basin. *Comparative Cytogenetics*, 6(1): 1-16.
- Menezes R.S.T., Carvalho A.F., Correia J.P.S.O., Silva T.S., Somavilla A., Costa M.A. (2014). Evolutionary trends in the chromosome numbers of swarm-founding social wasps. *Insectes Sociaux*, 61(4): 385-393.
- Pereira J.O.P. (2006) Diversidade genética da abelha sem ferrão *Melipona quinquefasciata* baseada no sequenciamento das regiões ITS1 parcial e 18S do DNA ribossômico nuclear. D.Sc. Thesis, Programa de Pós-graduação em Zootecnia. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza - CE - Brazil. 141 pp.





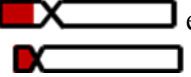
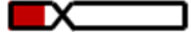




- Pinkel D., Straume T., Gray J.W. (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83: 2934-2938.
- Santos I.S., Costa M.A., Mariano C.S.F., Delabie J.H.C., Andrade-Souza V., Silva J.G. (2010). A cytogenetic approach to the study of Neotropical *Odontomachus* and *Anochetus* ants (Hymenoptera: Formicidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 103(3): 424-429.
- Santos I.S., Mariano C.S.F., Delabie J.H.C., Costa M.A., Carvalho A.F., Silva J.G. (2016) "Much more than a neck": karyotype differentiation between *Dolichoderus attelaboides* (Fabricius, 1775) and *Dolichoderus decollatus* F. Smith, 1858 (Hymenoptera: Formicidae) and karyotypic diversity of five other Neotropical species of *Dolichoderus* Lund, 1831. *Myrmecological News*, 23:61-69.
- Schultz T.R., Brady S.G. (2008) Major evolutionary transitions in ant agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105: 5435–5440.
- Schweizer D. (1980) Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA/DAPI-bands) in human chromosomes. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 27: 190-193.
- Schubert I., Lysak M.A. (2011) Interpretation of karyotype evolution should consider chromosome structural constraints. *Trends in Genetics*. 27(6): 207–216.
- Souza A.L.B., Mariano C.S.F., Delabie J.H.C., Pompolo S.G., Serrão J.E. (2011) Cytogenetic studies on workers of the neotropical ant *Wasmannia auropunctata* (Roger 1863) (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae). *Annales de la Société Entomologique de France*, 47: 510-513.
- Speicher M.R., Carter N.P. (2005) The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. *Nature Reviews Genetics*, 6(10): 782-792.
- Sumner A.T. (2003) *Chromosomes: Organization and Function*. Blackwell Publishing. North Berwick – United Kingdom. 287 pp.
- Teixeira G.A., Barros L.A.C., Aguiar H.J.A.C., Pompolo S.G. (2017) Comparative physical mapping of 18S rDNA in the karyotypes of six leafcutter ant species of the genera *Atta* and *Acromyrmex* (Formicidae: Myrmicinae). *Genetica*, 145: 351-357.
- Xue S., Barna M. (2012) Specialized ribosomes: a new frontier in gene regulation and organismal biology. *Nature Review Molecular Cell Biology*, 13: 355–369.

Tabela 1 – Resumo dos dados citogenéticos moleculares para detecção de rDNA (45S ou 18S) por FISH em espécies de formigas neotropicais. Espécie, número cromossômico diploide, localização dos genes ribossomais no cariótipo, representação gráfica do cromossomo carreador dos genes ribossomais (blocos vermelhos-rDNA 18S, blocos amarelos-rDNA45S), correspondência das marcações CMA₃⁺ e de rDNA (45S ou 18S) e respectivas referências bibliográficas

Espécie	2n/(n)	Localização dos genes rDNA no cariótipo	Ideograma	Correspondência CMA ₃ /rDNA	Referências CMA ₃ /rDNA
<i>Acromyrmex aspersus</i>	38	Maior par subtelocêntrico		Sim	Teixeira et al. (2017)
<i>Acromyrmex coronatus</i>	38	Maior par subtelocêntrico		Sim	Barros et al. (2016)
<i>Acromyrmex disciger</i>	38	Maior par subtelocêntrico		Sim	Barros et al. (2016)
<i>Acromyrmex niger</i>	38	Maior par subtelocêntrico		Sim*	Barros et al. (2016)
<i>Acromyrmex striatus</i>	22	Segundo par metacêntrico		Sim*	Cristiano et al. (2013)/ Teixeira et al. (2017)
<i>Acromyrmex subterraneus molestans</i>	38	Maior par subtelocêntrico		Sim	Teixeira et al. (2017)
<i>Anochetus altiquamis</i>	30	Terceiro par submetacêntrico		-	Santos et al. (2010)
<i>Anochetus horridus</i>	46	Quarto par telocêntrico		-	Santos et al. (2010)
<i>Atta bisphaerica</i>	22	Quarto par metacêntrico		Sim	Barros et al. (2014)/ Teixeira et al. (2017)







*Marcações adicionais CMA₃⁺, †Múltiplos pares carreadores dos genes ribossomais

Tabela 1 – Cont.

Espécie	2n/(n)	Localização dos genes rDNA no cariótipo	Ideograma	Correspondência CMA₃/rDNA	Referências CMA₃/rDNA
<i>Atta laevigata</i>	22	Quarto par metacêntrico		Sim	Barros et al. (2014)/ Teixeira et al. (2017)
<i>Atta robusta</i>	22	Quarto par metacêntrico		Sim	Barros et al. (2015)
<i>Atta sexdens rubropilosa</i>	22	Quarto par metacêntrico		Sim	Barros et al. (2014)/ Teixeira et al. (2017)
<i>Camponotus cingulatus</i>	40	Segundo par submetacêntrico		Sim	Aguiar et al. (2017)
<i>Camponotus renggeri</i>	40	Segundo par submetacêntrico e par subtelo-cêntrico de tamanho médio		Sim	Aguiar et al. (2017)
<i>Camponotus rufipes</i>	40	Segundo par submetacêntrico		Sim	Aguiar et al. (2017)
<i>Dinoponera gigantea</i> †	82	Não foi possível observar a morfologia dos cromossomos	-	-	Aguiar et al. (2011)
<i>Dinoponera lucida</i>	(59)	Maior par cromossômico (AM ¹)		Sim	Mariano et al. (2008)
<i>Dolichoderus attelaboides</i>	58	Maior par submetacêntrico		Sim	Santos et al. (2016)
<i>Dolichoderus bidens</i>	18	Maior par metacêntrico		Sim*	Santos et al. (2016)
<i>Dolichoderus decollatus</i>	38	Segundo par metacêntrico		Sim	Santos et al. (2016)

*Marcações adicionais CMA₃⁺, †Múltiplos pares carreadores dos genes ribossomais

Tabela 1 – Cont.

Espécie	2n/(n)	Localização dos genes rDNA no cariótipo	Ideograma	Correspondência CMA₃/rDNA	Referências CMA₃/rDNA
<i>Dolichoderus diversus</i>	22	Maior par metacêntrico		Sim*	Santos et al. (2016)
<i>Dolichoderus imitator</i>	38	Maior par metacêntrico		Sim	Santos et al. (2016)
<i>Dolichoderus lutosus</i>	10	Segundo par metacêntrico		Sim*	Santos et al. (2016)
<i>Dolichoderus voraginosus</i>	20	Maior par metacêntrico		Não	Santos et al. (2016)
<i>Mycocepurus goeldii</i>	8	Segundo par metacêntrico		Sim*	Barros et al. (2010)/ Barros et al. (2012)
<i>Trachymyrmex holmgreni</i>	20	Quarto par metacêntrico		Sim	Barros et al. no prelo

*Marcações adicionais CMA₃⁺, †Múltiplos pares carreadores dos genes ribossomais

Tabela 2 – Localidade, número de indivíduos e metáfases analisados por espécie de formiga neotropical no presente estudo. Estados brasileiros: MG: Minas Gerais e MA: Maranhão

Espécies	Localidade	Indivíduos	Metáfases
<i>Acromyrmex echinator</i>	Barro Colorado - Panamá	2	8
<i>Camponotus atriceps</i>	Viçosa (MG) - Brasil	3	28
<i>Crematogaster longispina</i>	Montagne des Singes - Guiana Francesa	2	33
<i>Gigantiops destructor</i>	Sinnamary - Guiana Francesa	3	41
<i>Myrmicocrypta</i> sp.	Sinnamary - Guiana Francesa	2	31
<i>Odontomachus bauri</i>	Açailândia (MA) - Brasil	5	45
<i>Odontomachus haematodus</i>	Ubá (MG) - Brasil	3	41
<i>Pheidole germani</i>	Viçosa (MG) - Brasil	4	54
<i>Solenopsis geminata</i>	Sinnamary - Guiana Francesa	4	49
<i>Wasmannia auropunctata</i>	Viçosa (MG) - Brasil	4	51

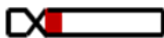


Tabela 3 – Resumo dos dados citogenéticos moleculares para detecção de rDNA 18S por FISH das espécies de formigas neotropicais do presente estudo. Número cromossômico diploide/ (haploide), localização desses genes no cariótipo, representação gráfica do cromossomo carreador desses genes (blocos vermelhos-rDNA 18S), correspondência das marcações CMA₃⁺ e de rDNA 18S e respectivas referências bibliográficas

Espécie	2n/(n)	Localização dos genes rDNA no cariótipo	Ideograma	Correspondência CMA ₃ /rDNA
Subfamília Ponerinae				
<i>Odontomachus haematodus</i>	44	Terceiro par subtelocêntrico		Sim
<i>Odontomachus bauri</i>	44/(22)	Segundo par subtelocêntrico		Sim
Subfamília Formicinae				
<i>Camponotus atriceps</i>	40	Segundo par submetacêntrico		Sim
<i>Gigantiops destructor</i>	(39)	Oitavo par metacêntrico		Sim*
Subfamília Myrmicinae				
<i>Acromyrmex echinator</i> [‡]	38	Maior par subtelocêntrico		Sim
<i>Myrmicocrypta</i> sp.	30	Menor par metacêntrico		Sim
<i>Crematogaster longispina</i>	24	Maior par metacêntrico		Sim

*Marcação CMA₃⁺ adicional no maior par subtelocêntrico

‡Regiões ricas em pares de bases GC estudadas por Barros et al. (2016)

Tabela 3 – Cont.

Espécie	2n/(n)	Localização dos genes rDNA no cariótipo	Ideograma	Correspondência CMA₃/rDNA
Subfamília Myrmicinae				
<i>Pheidole germani</i>	22	Maior par subtelocêntrico		Sim
<i>Solenopsis geminata</i>	32	Menor par submetacêntrico		Sim
<i>Wasmannia auropunctata</i>	32	Sétimo par metacêntrico	 ou	Sim

*Marcação CMA₃⁺ adicional no maior par subtelocêntrico

†: Regiões ricas em pares de bases GC estudadas por Barros et al. (2016)

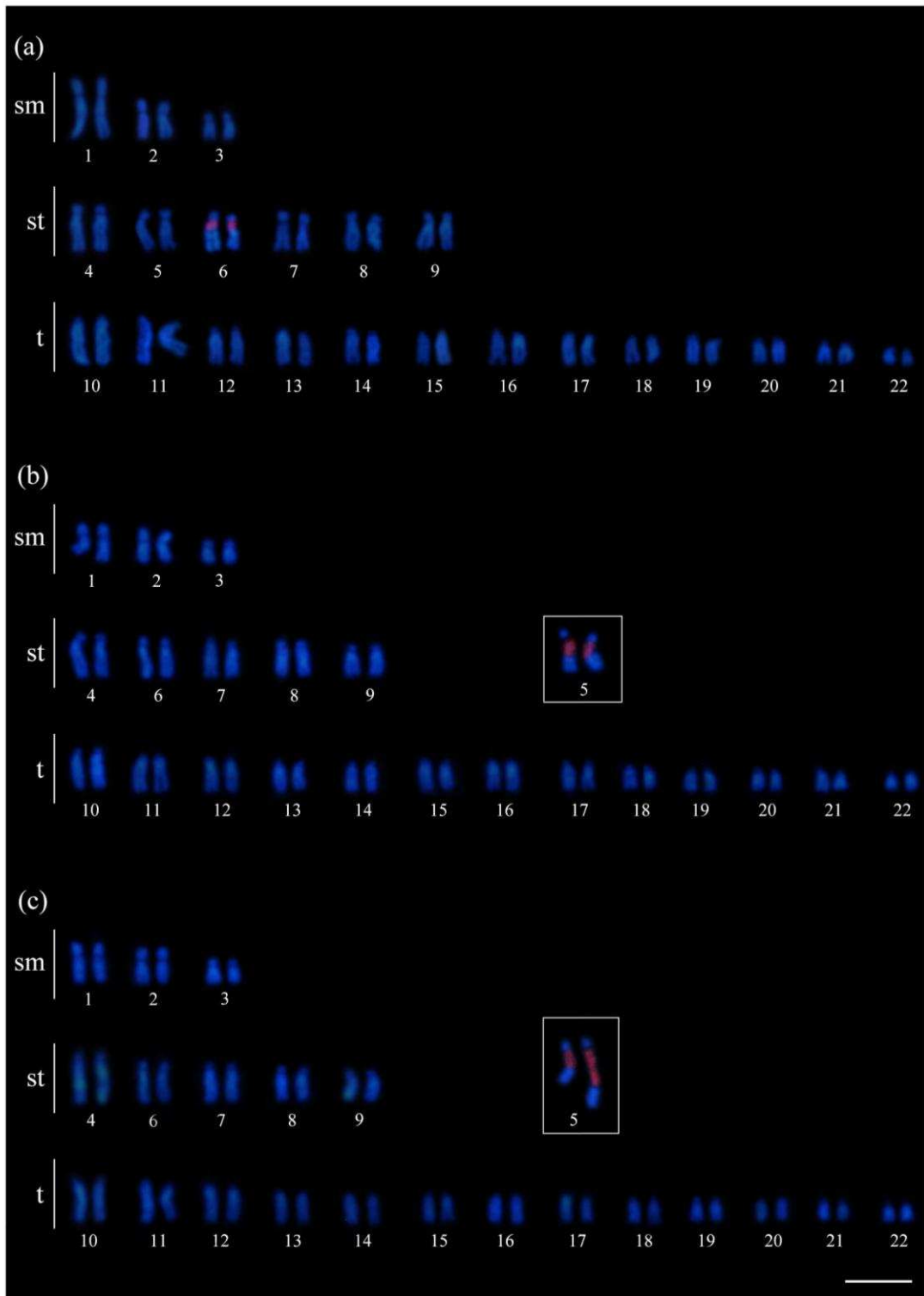


Figura 1 - Cariótipos de fêmeas de *Odontomachus haematodus* ($2n=44$) (a) e *Odontomachus bauri* ($2n=44$) (b,c) submetidas a técnica de FISH para sonda rDNA 18S (blocos vermelhos). Caixas mostram par cromossômico 5 em *O. bauri* em (b) uma das formas homocigotas com os blocos de rDNA 18S de tamanho pequeno e (c) na forma heterocigota com um dos homólogos com os blocos de rDNA 18S de tamanho duplicado. Barra: 5 μm .

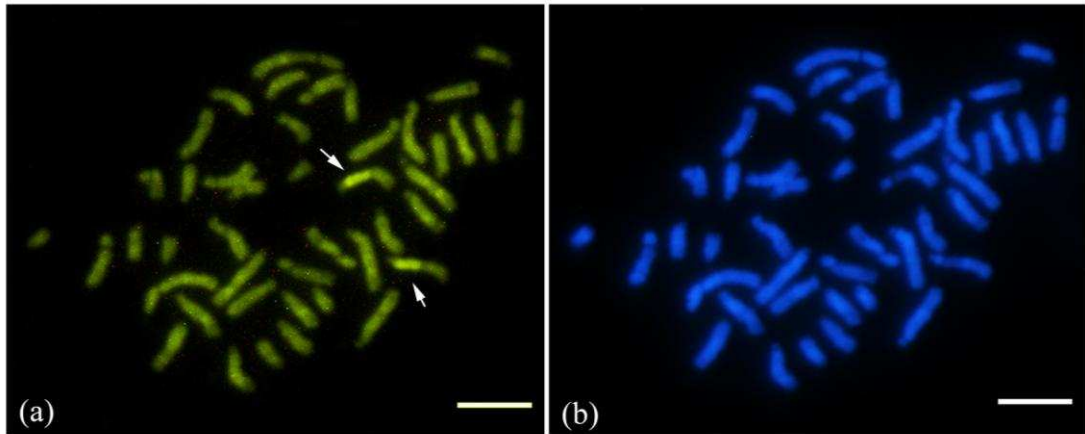


Figura 2 - Metáfases de fêmeas de *Odontomachus haematodus* ($2n=44$) submetidas a coloração com os fluorocromos CMA₃ (a) e DAPI (b). Setas indicam regiões ricas em pares de baes GC. Barra: 5 μ m.

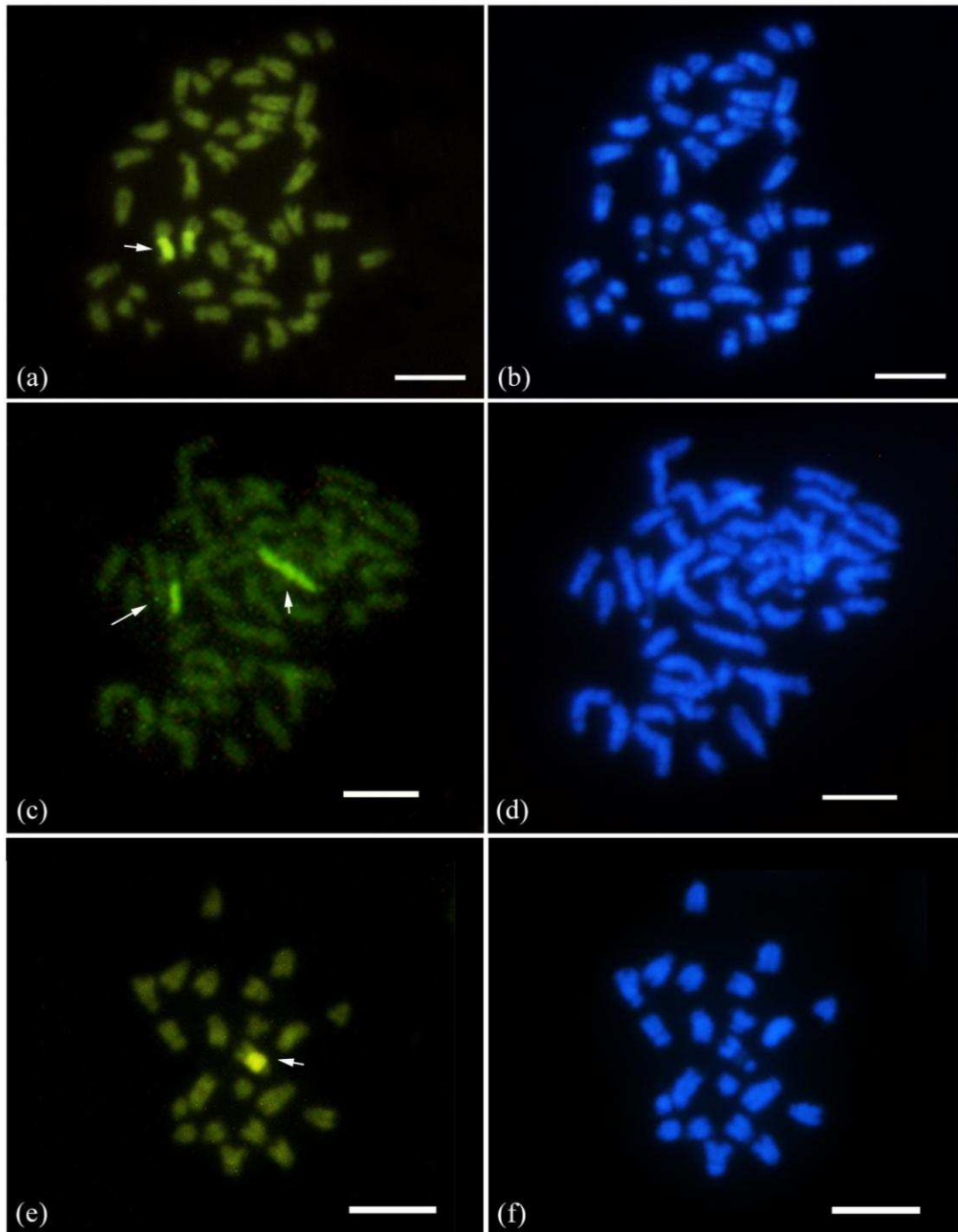


Figura 3 - Metáfases de fêmeas ($2n=44$, a, b, c, d) e macho ($n=22$, e, f) de *Odontomachus bauri* submetidas à coloração com os fluorocromos CMA₃ (a, c, e) e DAPI (b, d, f). Setas indicam regiões ricas em pares de bases GC no par cromossômico 5. Em (a) uma das formas homozigotas com os blocos CMA₃⁺ de tamanho pequeno, (b) forma heterozigota com um dos homólogos com os blocos CMA₃⁺ de tamanho duplicado e (c) macho portando o bloco CMA₃⁺ de tamanho menor. Barra: 5 μ m.

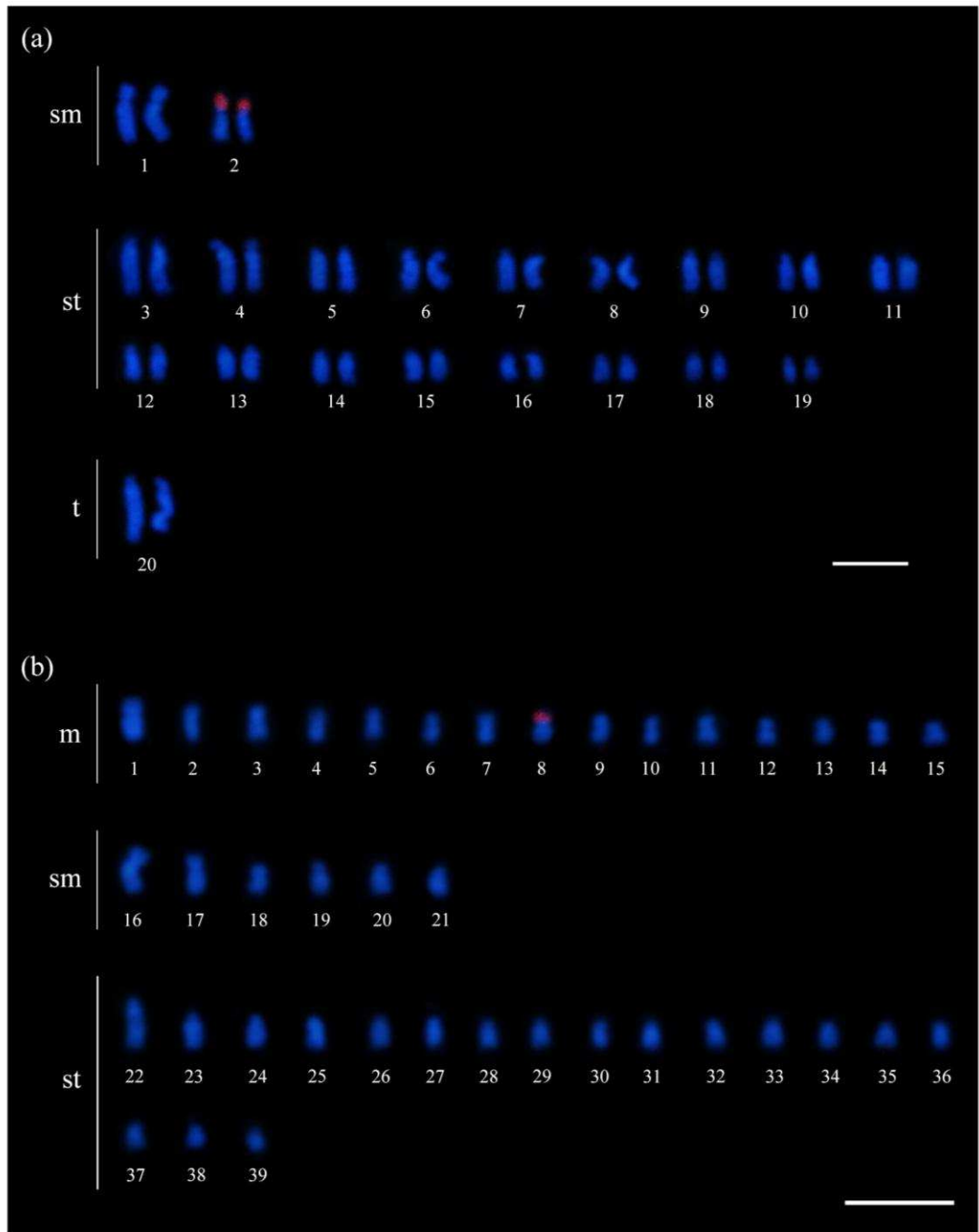


Figura 4 - Cariótipos de (a) fêmea de *Camponotus atriceps* (2n=40) e (b) macho de *Gigantiops destructor* (n=39) submetidas à técnica de FISH para sonda rDNA 18S (blocos vermelhos). Barra: 5 μm.

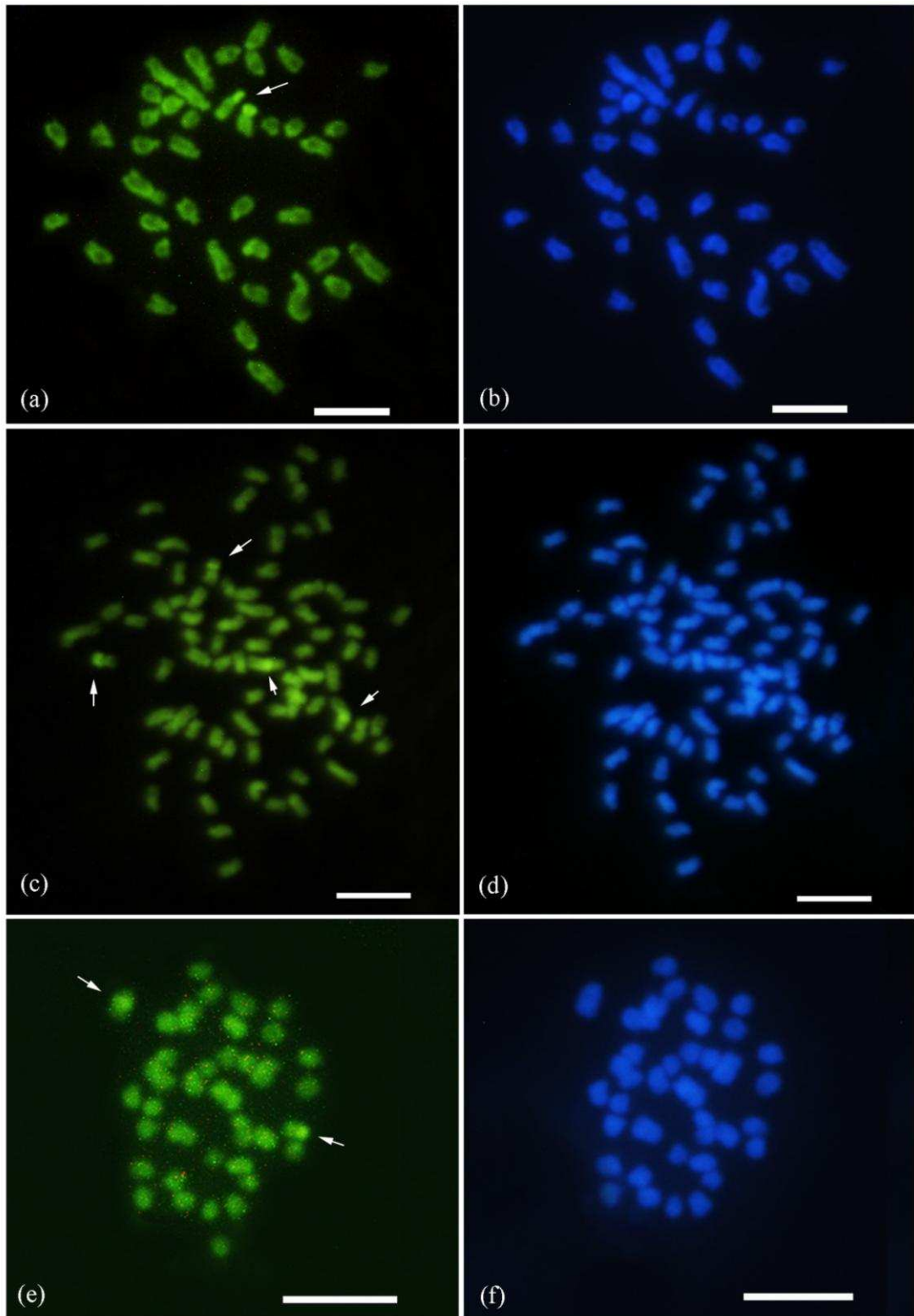


Figura 5 - Metáfases de fêmea de *Camponotus atriceps* (2n=40, a,b) e de fêmea (2n=78, c, d) e macho (n=39, e,f) de *Gigantiops destructor* submetidas a coloração sequencial com os fluorocromos CMA₃ (a, c, e) e DAPI (b, d, f), respectivamente. Setas indicam regiões ricas em pares de bases GC. Barra: 5 μm.

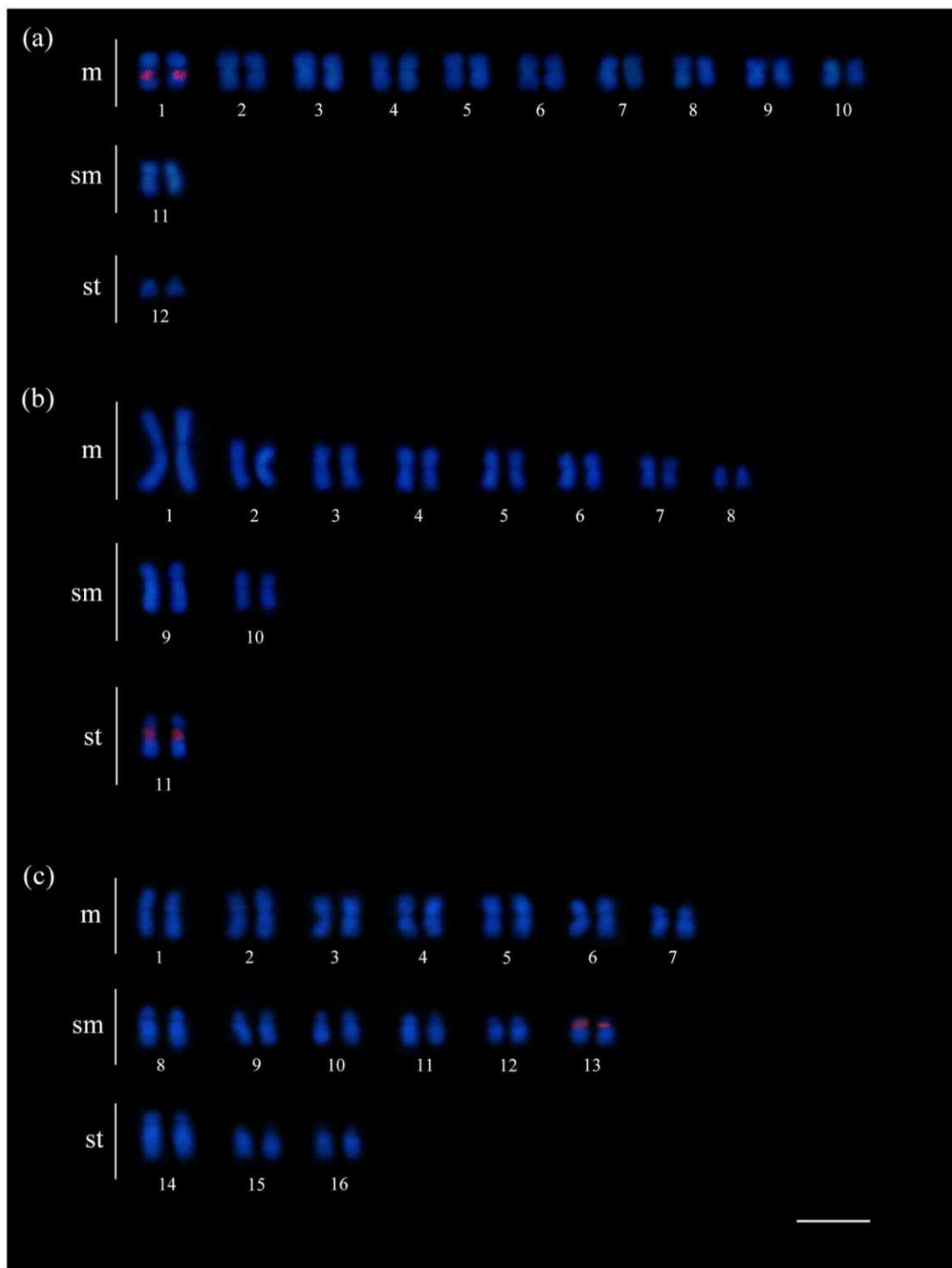


Figura 6 - Cariótipos de fêmeas de (a) *Crematogaster longispina* (2n=24), (b) *Pheidole germani* (2n=22) e (c) *Solenopsis geminata* (2n=32) submetidas à técnica de FISH para sonda rDNA 18S (blocos vermelhos). Barra: 5 µm.

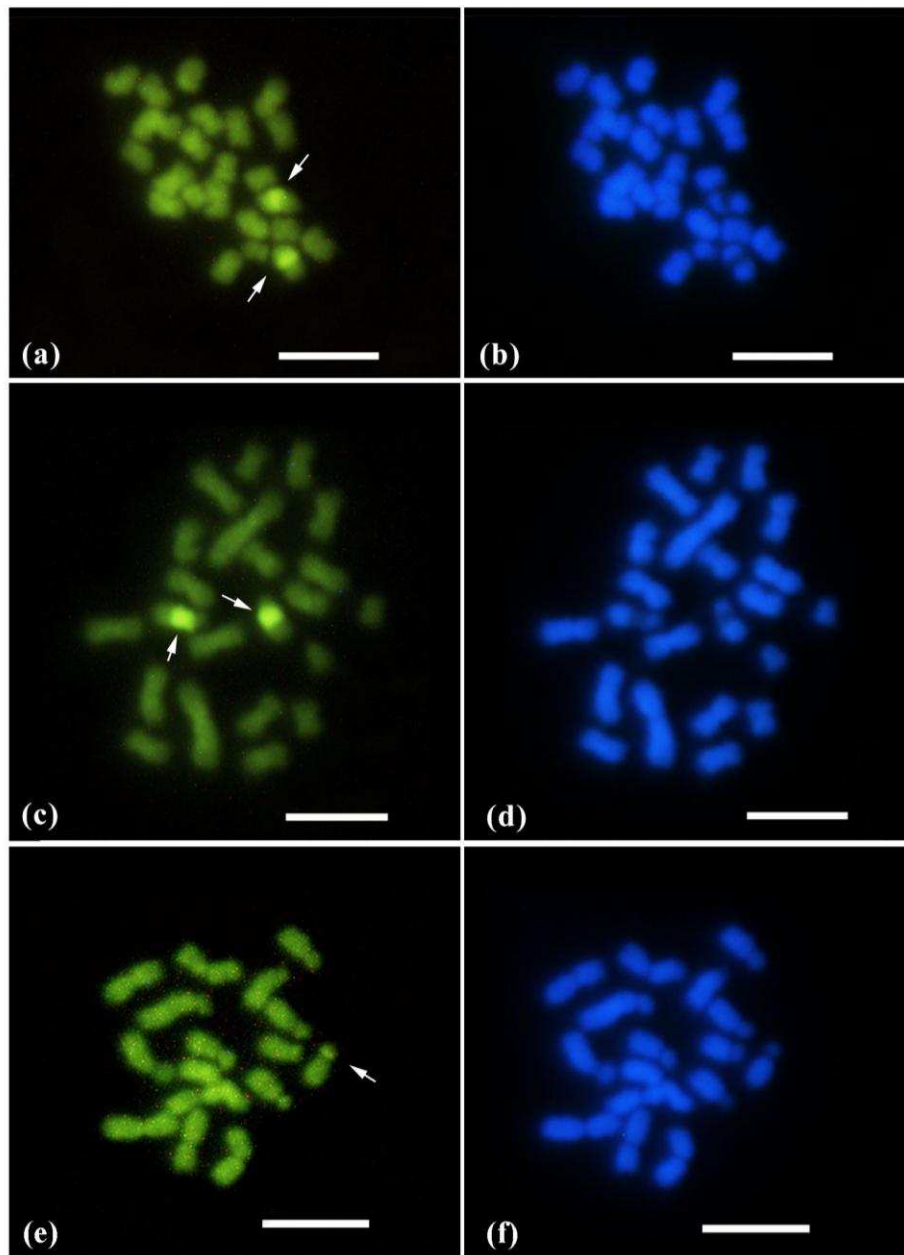


Figura 7 - Metáfases de fêmeas de *CreMATogaster longispina* (2n=24), *Pheidole germani* (2n=22) e macho de *Solenopsis geminata* (n=16) submetidas a coloração com os fluorocromos CMA₃ (a, c, e) e DAPI (b, d, f), respectivamente. Setas indicam regiões ricas em pares de bases GC. Barra: 5 μm.

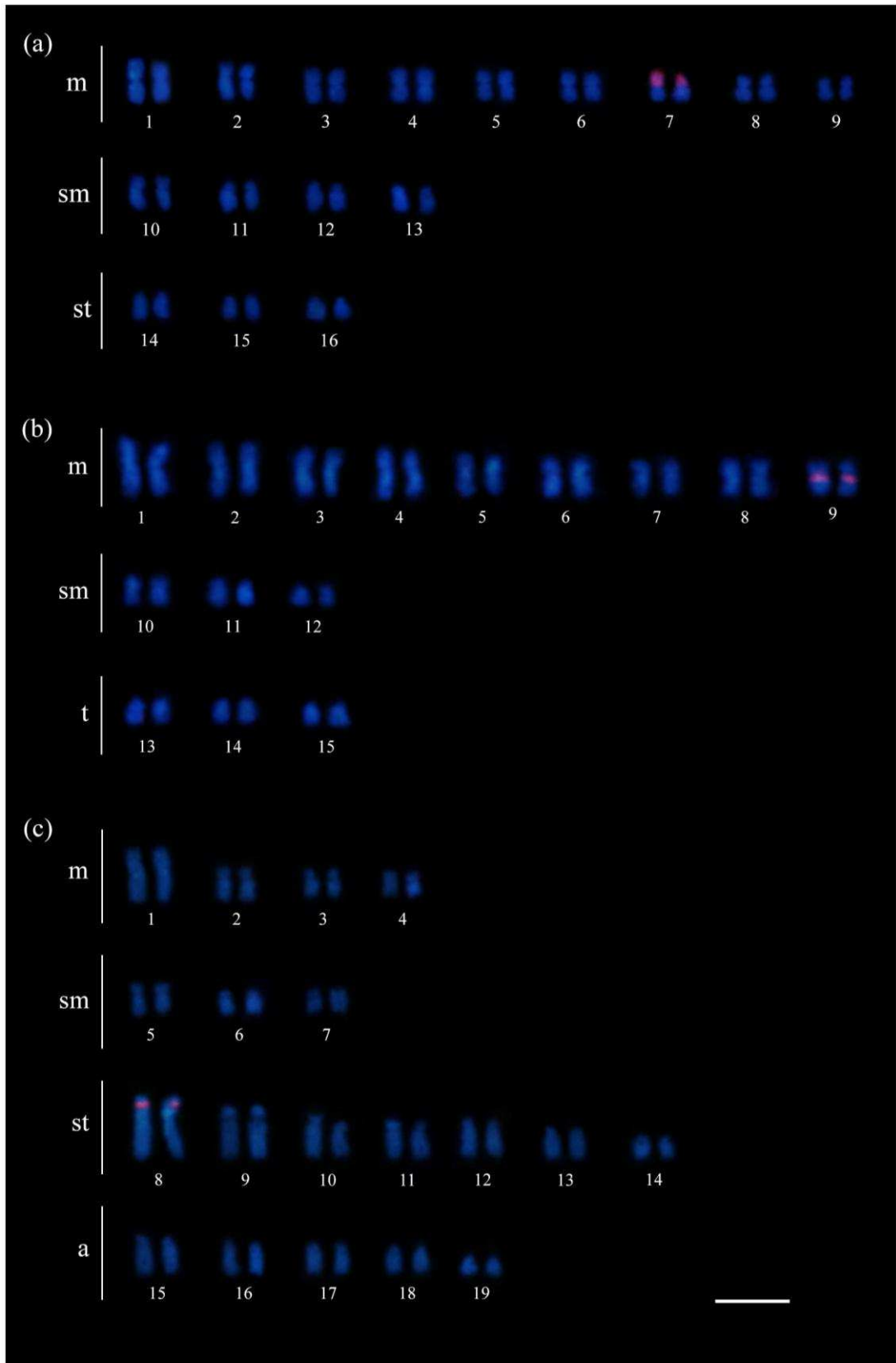


Figura 8 - Cariótipos de fêmeas de (a) *Wasmannia auropunctata* (2n=32), (b) *Myrmicocrypta* sp. (2n=30) e (c) *Acromyrmex echinator* (2n=38) submetidas à técnica de FISH com sonda para rDNA 18S (blocos vermelhos). Barra: 5 µm.

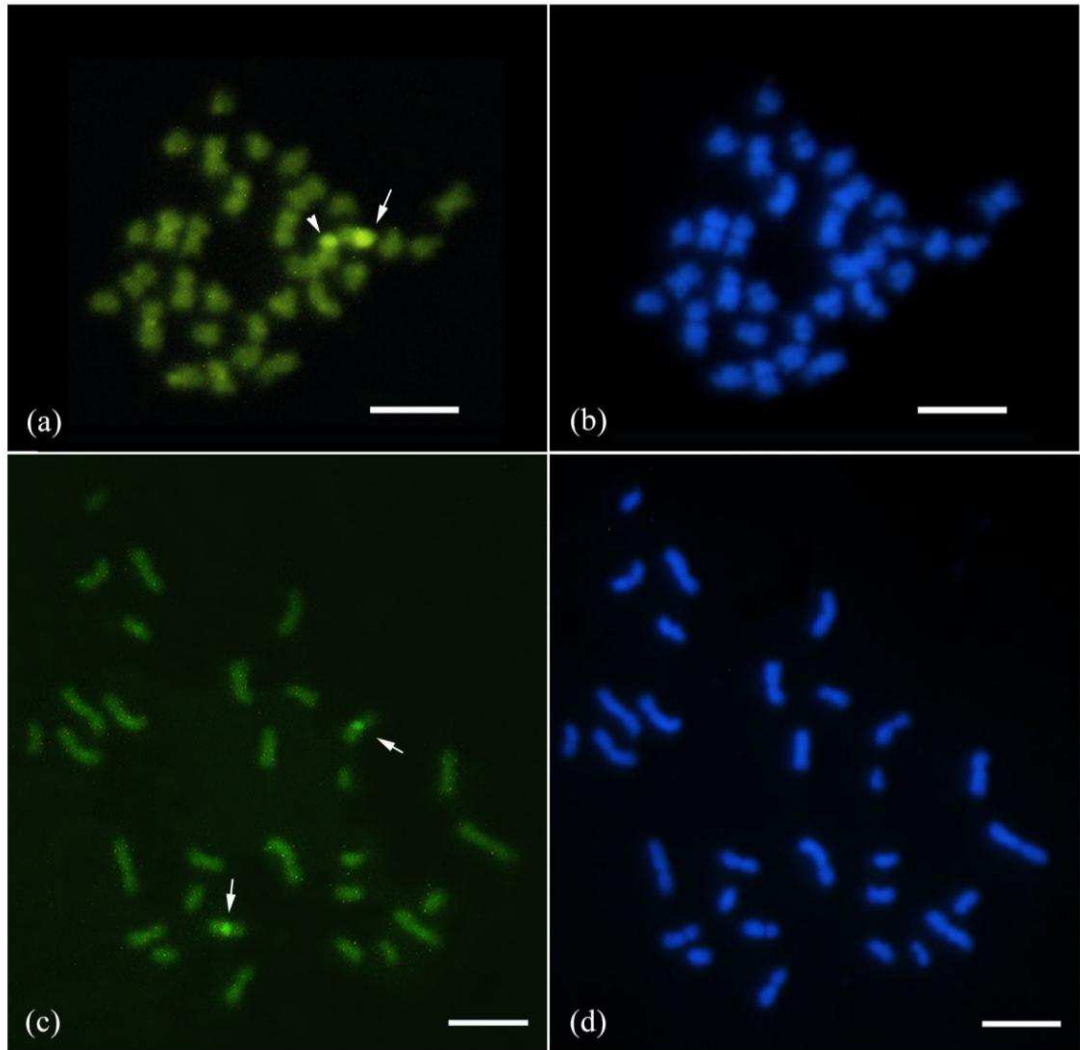


Figura 9 - Metáfases de fêmeas de *Wasmannia auropunctata* (2n=32) e *Myrmicocrypta* sp. (2n=30) submetidas a coloração sequencial com os fluorocromos CMA₃ (a) e DAPI (b). Setas indicam regiões ricas em pares de bases GC. Barra: 5 μm.

Capítulo 2

**Citogenética clássica e molecular de quatro espécies de
Gnamptogenys Roger, 1863 (Formicidae: Ectatominae)**

**Citogenética clássica e molecular de quatro espécies de *Gnamptogenys* Roger,
1863 (Formicidae: Ectatominae)**

Resumo

O gênero *Gnamptogenys* apresenta 140 espécies descritas com ampla distribuição, sendo sua maior diversidade observada na região neotropical. Algumas espécies neotropicais apresentam uma complexa taxonomia, como é o caso de *Gnamptogenys striatula*, em que se observa variações morfológicas intraespecíficas em diferentes populações. Muitos estudos citogenéticos clássicos e moleculares em formigas têm auxiliado na resolução taxonômica de diferentes espécies com morfologia complexa. Dados citogenéticos estão disponíveis para 14 táxons e incluem somente número e alguns estudos com a morfologia dos cromossomos. Assim, seguindo a proposta da taxonomia integrativa e considerando a complexidade morfológica de algumas espécies como *G. striatula*, o presente estudo objetivou caracterizar por meio de técnicas citogenéticas clássicas e moleculares quatro espécies de *Gnamptogenys*: *G. striatula*, *G. moelleri*, *G. regularis* e *G. transversus*. Os números cromossômicos e fórmulas cariotípicas observadas foram: $2n=24$ (18m+6sm) em *G. triangularis*, $2n=26$ (24m+2sm, 25m+1sm) em *G. regularis*, $2n=32$ (20m+10sm+2st) em *G. striatula* do Rio de Janeiro-RJ, $2n=34$ (18m+8sm+8st, 18m+7sm+9st) em *G. striatula* de Petrópolis-RJ, $2n=34$ (18m+8sm+8st) em *G. moelleri* de Viçosa-MG e Petrópolis-RJ e $2n=44$ (22m+14sm+8st) em *G. moelleri* de Açailândia-MA. Em *G. striatula* de Petrópolis foi observado um polimorfismo cromossômico no par 17. Rearranjos cromossômicos como duplicações devido à crossing-over desigual ou translocações podem estar envolvidos na origem desse polimorfismo. Em *G. regularis* foi observado um polimorfismo envolvendo a região de genes ribossomais no par cromossômico 13, que pode ter sido originado por duplicações/deleções dessas sequências repetitivas devido a permuta gênica desigual. Todas as quatro espécies estudadas apresentaram um par de marcações para rDNA 18S que coincidiram com as regiões ricas em pares de bases GC (CMA_3^+), como observado para a maioria das formigas neotropicais já estudadas. Embora *G. moelleri* apresente caracteres morfológicos bem definidos, a população de Açailândia apresentou variações cromossômicas em relação às de Viçosa e Petrópolis, e isso sugere que essas sejam espécies crípticas. Diferenças cariotípicas foram observadas entre as populações de *G. striatula* do Rio de Janeiro e

Petrópolis demonstrando que a citogenética pode ser uma ferramenta na resolução dos problemas taxonômicos dessa espécie.

Introdução

O gênero *Gnamptogenys* Roger, 1863 possui 140 espécies descritas (Feitosa 2015) distribuídas na região neotropical, neártica, indo-malaia e australiana (Lattke 1995, Lattke et al. 2008). A região neotropical apresenta maior diversidade de *Gnamptogenys* spp., com 90 espécies válidas, o que corresponde a aproximadamente 64% do total das espécies desse gênero (Feitosa 2015, Camacho e Feitosa 2015). Até o momento, 33 espécies de *Gnamptogenys* estão presentes no Brasil (Feitosa 2015, Camacho e Feitosa 2015).

Gnamptogenys foi dividido em dez grupos de espécies com base em caracteres morfológicos sendo quatro no velho mundo (*taivanensis*, *coxalis*, *epinotalis* e *laevior*) (Lattke 2004) e seis na região neotropical (*striatula*, *minuta*, *rastrata*, *sulcata*, *mordax* e *concinna*) (Lattke 1995). A filogenia disponível, baseada em caracteres morfológicos, dos grupos de espécies da região neotropical sugere que o grupo *striatula* é o menos derivado e grupo irmão das demais *Gnamptogenys* spp. neotropicais; *rastrata* é possivelmente o mais próximo de *striatula*, *mordax* e *sulcata* são considerados grupos-irmãos e os mais derivados e o grupo *concinna* provavelmente não é um grupo monofilético (Lattke 1995).

Lattke et al. (2008) enfatizam a complexa resolução taxonômica de algumas espécies neotropicais, como *Gnamptogenys striatula*, pois esta apresenta notável variabilidade morfológica intraespecífica em diferentes populações que dificulta sua delimitação, o que indica de que se trata de um complexo de espécies. Os autores apontam algumas possíveis causas dessas variações morfológicas como a plasticidade fenotípica para diferentes ambientes, a existência de espécies crípticas, o deslocamento de caracteres e ainda a existência de zonas de ocorrência de híbridos (Lattke et al. 2008). As espécies de *Gnamptogenys* incluídas no grupo *striatula* e complexo *rastrata* (grupo *rastrata*) presentes no Brasil foram revisadas taxonomicamente por Camacho (2013) e Gualberto (2013), respectivamente. Ao todo dez espécies foram redescritas e outras seis novas espécies foram descritas (Camacho 2013, Gualberto 2013).

O conceito de taxonomia integrativa, que tem sido muito discutido, corresponde à integração de dados de diversos campos de estudo, como por exemplo, o estudo da morfologia, do DNA nuclear e mitocondrial, da ecologia, do comportamento, da química, da citogenética, para auxiliar na delimitação de espécies

(Schlick-Steiner et al. 2010). Nesse contexto, a citogenética tem se mostrado uma ferramenta útil na resolução de grupos taxonômicos complexos em Formicidae (Cristiano et al. 2013, Correia et al. 2016, Santos et al. 2016, Aguiar et al. 2017). Esses estudos citogenéticos em formigas mostraram variações cariotípicas nítidas entre os táxons morfológicamente complexos estudados, o que permitiu distingui-los, seja em relação ao número, morfologia cromossômica, padrão de bandamentos cromossômicos (citogenética clássica) e/ou a distribuição das regiões de genes ribossomais (citogenética molecular).

A variação numérica cromossômica observada em formigas neotropias é de $2n=4$ em *Strumygenys louisianae* (Alves-Silva et al. 2014) e $2n=120$ em *Dinoponera lucida* (Mariano et al. 2008). Imai et al. (1994) propuseram a Teoria da Interação Mínima para explicar essa grande variação cromossômica observada em formigas. Segundo essa teoria, os cariótipos tendem a um aumento do número de cromossomos e redução do tamanho dos mesmos por meio de fissões cêntricas. Posteriormente, ocorreria crescimento *in tandem* de heterocromatina para estabilidade telomérica resultando em cromossomos com braços heterocromáticos. Esse processo diminuiria a proximidade física dos cromossomos no núcleo interfásico reduzindo assim as chances de ocorrência de rearranjos cromossômicos deletérios.

Estudos citogenéticos em *Gnamptogenys* são escassos e foram conduzidos em 14 táxons, com informações sobre o número e, em alguns trabalhos, com informações da morfologia dos cromossomos (Tabela 1). A variação no número cromossômico observada entre as *Gnamptogenys* spp. estudadas é $2n=16$ em *Gnamptogenys* sp. 2 (Mariano et al. 2015) e $2n=68$ em *Gnamptogenys annulata* (Borges et al. 2004). Os grupos *rastrata*, *striatula*, *mordax* da região neotropical e *coxalis* da região oriental apresentam espécies com informação citogenética. Dados referentes a bandamentos cromossômicos e mapeamento de genes ribossomais são ausentes para o gênero. De acordo com os dados citogenéticos disponíveis para as espécies de *Gnamptogenys*, Mariano et al. (2015) sugerem que os cariótipos tendem em direção a um aumento do número de cromossomos por meio de processos de fissão cêntrica, o que segue as propostas da Teoria da Interação Mínima.

Considerando a complexa resolução taxonômica de alguns grupos em *Gnamptogenys* como o complexo *striatula* (*G. striatula*), e assim, seguindo a proposta da taxonomia integrativa, o presente estudo teve por objetivo estudar por meio de técnicas citogenéticas clássicas e moleculares quatro espécies de

Gnamptogenys: *Gnamptogenys striatula* Mayr, 1884 e *Gnamptogenys moelleri* (Forel, 1912) ambas do grupo *striatula*, *Gnamptogenys triangularis* (Mayr, 1887) do grupo *rastrata* e *Gnamptogenys regularis* Mayr, 1870 do grupo *mordax*.

Materiais e Métodos

Quatro espécies de *Gnamptogenys* foram estudadas citogeneticamente (Tabela 2). As coletas dos espécimes foram autorizadas pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). Espécimes adultos foram identificados pelo Dr. Jacques H. C. Delabie e depositados na coleção do Laboratório de Mirmecologia (Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC/ Comissão Executiva para o Plano da Lavoura Cacaueira – CEPLAC – Brasil). Todas as colônias de *Gnamptogenys* spp. estudadas no presente trabalho foram coletadas de troncos caídos no chão em decomposição, nidificação característica da maioria das espécies do gênero (Lattke 1995).

As colônias foram mantidas no Laboratório de Citogenética de Insetos da Universidade Federal de Viçosa para obtenção de larvas em estágio específico de desenvolvimento. As metáfases mitóticas foram obtidas de gânglios cerebrais de larvas após eliminação do *meconium* (pós-defecantes) utilizando a metodologia descrita por Imai et al. (1988). Para determinar o número e morfologia cromossômica das *Gnamptogenys* spp. estudadas um total de cinco metáfases de três indivíduos para cada espécie foram analisados. Para as técnicas subsequentes pelo menos 30 metáfases foram analisadas para cada espécie (Tabela 2).

Os cariótipos foram montados em ordem decrescente de tamanho alinhando-se os cromossomos na base do braço longo e foram medidos e classificados segundo a metodologia de Levan et al. (1964) que considera a razão de braços dos cromossomos ($r = \text{braço longo}/\text{braço curto}$). Segundo essa metodologia os cromossomos são classificados em metacêntricos ($1 \leq r < 1,7$), submetacêntricos ($1,7 \leq r < 3$), subtelocêntricos ($3 \leq r < 7$) e telocêntricos ($r \geq 7$). Os programas utilizados foram o Adobe® Photoshop® CS6 para a montagem dos cariótipos e o Image Pro Plus® para a medição dos cromossomos.

Lâminas de todas as espécies foram submetidas à coloração sequencial com os fluorocromos Cromomicina A₃ (CMA₃) e 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para

localização de regiões ricas em bases GC e AT, respectivamente, de acordo com o protocolo desenvolvido por Schweizer (1980) com modificações.

Os genes rDNA 18S das quatro espécies estudadas foram mapeados pela técnica de FISH de acordo com o protocolo de Pinkel et al. (1986). A sonda da região rDNA 18S foi obtida por amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os *primers* (5'-GTC ATA TGC TTG TCT CAA AGA-3') e 18SR1.1 (5'-CGC AAA TGA AAC TTT TTT AAT CT-3') desenhados para a espécie de abelha *Melipona quinquesfasciata* (Pereira 2006) e DNA total extraído da formiga *Camponotus rufipes*. As condições de amplificação utilizadas foram obtidas de Pereira (2006). As sondas rDNA 18S foram marcadas pelo método indireto utilizando-se digoxigenina-11-dUTP (Roche, Mannheim, Alemanha) segundo condições de PCR do fabricante e o sinal foi detectado com anti-digoxigenina-rodamina (Roche Applied Science).

As metáfases foram analisadas e documentadas utilizando um microscópio de epifluorescência Olympus BX60 acoplado com um sistema de captura de imagens QColor Olympus® utilizando os filtros WB (450–480 nm), WU (330-385 nm) e WG (510-550 nm) para os fluorocromos CMA₃, DAPI e rodamina, respectivamente.

Resultados

Os dados cromossômicos obtidos para as espécies de *Gnamptogenys* estudadas foram resumidos na tabela 2. O número cromossômico observado em *G. triangularis* foi $2n=24$ ($2n=18m+6sm$) (Figura 1). *Gnamptogenys regularis* apresentou $2n=26$ cromossomos (Figura 2). Um polimorfismo cromossômico foi observado no par cromossômico 13. Os indivíduos heterozigotos apresentaram este par com um cromossomo metacêntrico com o braço longo menor e seu homólogo submetacêntrico com braço longo aproximadamente três vezes maior ($2n=26$, $25m+1sm$) (Figura 2a). Também foram observados nessa colônia indivíduos homozigotos com o par 13 formado por dois cromossomos submetacêntricos com braço longo triplicado ($2n=26$, $24m+2sm$) (Figura 2b). Não foram observados indivíduos homozigotos com dois cromossomos metacêntricos de braço longo de menor tamanho. Traços de mosaicismos não foram observados nos indivíduos analisados.

Gnamptogenys striatula e *G. moelleri* apresentaram variações no cariótipo entre as populações estudadas. Em *G. striatula* do Rio de Janeiro (RJ) foram observados $2n=32$ cromossomos ($2n=20m+10sm+2st$) (Figura 3a), enquanto que *G. striatula* de Petrópolis (RJ) apresentou número cromossômico $2n=34$ (Figura 3b, c). Em Petrópolis (RJ), *G. striatula* apresentou o par cromossômico 17 em estado polimórfico. Os indivíduos heterozigotos apresentaram um cromossomo subtelocêntrico com braço longo maior e seu homólogo submetacêntrico com braço longo menor ($2n=34$, $18m+7sm+9st$) (Figura 3b). Também foram observados indivíduos homozigotos com dois cromossomos submetacêntricos de braços longos menores ($2n=34$, $18m+8sm+8st$) (Figura 3c). Não foram observados indivíduos homozigotos com dois cromossomos subtelocêntricos de braço longo maior.

Em *G. moelleri* foi observado número cromossômico $2n=34$ ($2n=18m+8sm+8st$ nas populações de Petrópolis (RJ) e Viçosa (MG)) (Figura 4a, b) e $2n=44$ cromossomos ($2n=22m+14sm+8st$) na população de Açailândia (MA) (Figura 4c). Para todas as populações estudadas de *G. striatula* e *G. moelleri* as regiões de constrição secundária coincidiram com a localização das bandas CMA_3^+ e rDNA 18S (Figura 3, 4, asteriscos).

Apenas um par de regiões ricas em pares de bases GC (CMA_3^+) e de regiões de genes ribossomais 18S foi observado com o fluorocromo CMA_3 e com a técnica de FISH, respectivamente, em todas as quatro espécies estudadas. Em *G. triangularis*, as marcações CMA_3^+ e rDNA 18S foram observadas na região intersticial do braço longo no maior par metacêntrico (Figura 5a, 9). *G. regularis* apresentou as regiões CMA_3^+ e de rDNA 18S localizadas no braço longo do par cromossômico 13 polimórfico. Foram observados indivíduos com diferença no tamanho das bandas entre os homólogos, com uma banda menor pericentromérica no homólogo metacêntrico e uma banda maior no submetacêntrico em quase todo o braço longo (Figura 6a, 10a) e indivíduos com as bandas do mesmo tamanho entre os homólogos submetacêntricos e se localizaram em quase todo o braço cromossômico longo (Figura 6c, 10b). As regiões ricas em pares de bases GC e de genes rDNA 18S localizaram-se em *G. striatula* ($2n=32$) na região intersticial do braço longo do sexto par metacêntrico (Figura 7a, 11b) e em *G. striatula* ($2n=34$), *G. moelleri* ($2n=34$) e *G. moelleri* ($2n=44$) na região intersticial do braço menor do quinto par metacêntrico (Figura 7c, 8a, c, e, 12a, b). Marcações diferenciais com fluorocromo DAPI não

foram observadas em nenhuma das espécies estudadas (Figura 5b, 6b, 6d, 7b, 7d, 8b, 8d, 8f).

Discussão

O número cromossômico observado para *G. triangularis* do presente estudo com $2n=24$ cromossomos diferiu da mesma espécie da Guiana Francesa, a qual apresentou $2n=20$ cromossomos (Mariano et al. 2015). Embora apenas dados de número cromossômico estejam disponíveis para a *G. triangularis* da Guiana Francesa esses resultados já mostram divergência cariotípica entre elas. Além disso, é preciso considerar a distância entre as duas populações (Guiana Francesa e Minas Gerais-Brasil) e as suas características biogeográficas muito diferentes (Mata Atlântica e Floresta Amazônica).

Os dados citogenéticos obtidos para *G. regularis* representam os primeiros para o grupo *mordax* e já mostram uma diversidade cariotípica para essa espécie. Foi possível observar variação cromossômica entre os indivíduos da colônia em relação ao tamanho das regiões de rDNA 18S entre os homólogos carreadores desses genes. Isso refletiu em diferenças no tamanho dos braços longos e, conseqüentemente, na morfologia cromossômica entre os homólogos do par 13 nos diferentes indivíduos, caracterizando um polimorfismo cromossômico estrutural. Alguns indivíduos apresentaram a condição heterozigota com um cromossomo metacêntrico com uma banda de rDNA 18S pequena e seu homólogo submetacêntrico com uma banda de rDNA 18S aproximadamente três vezes maior. Outros indivíduos apresentaram uma das formas homozigotas com os dois homólogos submetacênticos com as bandas de rDNA 18S de tamanho triplicado.

Lattke (1990) e Lattke et al. (2008) reportam a ocorrência de oito rainhas sem asas em um mesmo ninho de *G. regularis*, o que parece indicar que as colônias dessa espécie são poligínicas. Dessa forma, não há como ter certeza de que os indivíduos analisados foram gerados de uma mesma rainha ou de várias e analisar o possível cariótipo da rainha parental. No entanto, devido alguns indivíduos terem apresentado o par homozigoto com dois cromossomos submetacênticos com as bandas de rDNA 18S triplicadas, é possível afirmar que o macho haploide parental desses indivíduos certamente apresentava o cromossomo submetacêntrico com as regiões de rDNA 18S

em quase todo o braço cromossômico, ou seja, com maior número de cópias desses genes.

Esse polimorfismo cromossômico envolvendo regiões de genes ribossomais observado em *G. regularis* pode ter sido originado por duplicações/deleções dessas sequências, consequência de permuta gênica desigual (Kasahara 2009, Schubert e Lysac 2011). Ainda não há relatos de polimorfismos envolvendo regiões de genes ribossomais em formigas. No entanto, polimorfismos envolvendo duplicações de regiões de genes ribossomais já foram observados em outros insetos como no gafanhoto *Oedipoda fusconicta* (Camacho et al. 1986). Neste estudo, os autores observaram machos com apenas uma NOR (Região Organizadora de Nucléolo) ativa no par cromossômico M9 e machos heterozigotos com duas NORs ativas no par cromossômico M9 e S10. Esse segmento cromossômico adicional contendo NOR ativa observado nos machos heterozigotos foi originado possivelmente devido à ocorrência de translocação entre os cromossomos não homólogos M9 e S10. Os indivíduos que apresentam blocos extras de genes ribossomais podem aumentar potencialmente a sua capacidade de síntese proteica (Camacho et al. 1986). Em peixes, polimorfismos cromossômicos de NOR também já foram observados (Vicari et al. 2006, Phimpan et al. 2013).

A população de *G. striatula* de Petrópolis (RJ) ($2n=34$) do presente estudo apresentou um polimorfismo cromossômico observado pela diferença de tamanho do braço longo entre os homólogos do par cromossômico 17. Em todas as quatro colônias analisadas foram observados indivíduos heterozigotos com um cromossomo submetacêntrico com braço longo pequeno e um cromossomo subtlocêntrico com braço longo de tamanho maior. Somente em uma dessas colônias (CI 20) foram observados homozigotos com dois homólogos submetacêntricos de braço longo pequeno. Nas três colônias em que somente os heterozigotos foram observados não foi possível obter muitos indivíduos para análise (Tabela 2). Em *G. striatula*, as colônias podem apresentar várias rainhas ou várias gamergates (operárias férteis acasaladas) que compartilham a reprodução, sendo ambas funcionalmente poliginícas (Blatrix e Jaisson 2000, Giraud et al. 2000). Dessa forma, não há como ter certeza de que os indivíduos analisados foram gerados de uma mesma fêmea reprodutora ou de várias e não há como analisar o possível cariótipo da fêmea parental. No entanto, devido alguns indivíduos da colônia CI 20 terem apresentado o par homozigoto com dois cromossomos submetacêntricos de braço longo pequeno, o

macho haploide parental desses indivíduos certamente apresentava o cromossomo submetacêntrico com braço longo pequeno.

O polimorfismo cromossômico observado em *G. striatula* de Petrópolis ($2n=34$) pode ter sido originado por duplicações devido à permuta gênica desigual entre homólogos ou translocações entre cromossomos não homólogos (Imai et al. 1977, Schubert e Lysak 2011). Inversões pericêntricas seguidas de permuta gênica na área invertida também podem originar duplicações ou deleções de segmentos cromossômicos. Em uma inversão pericêntrica é muito raro as quebras ocorrerem equidistantes da região centromérica (Kasahara 2009). Assim, se uma inversão pericêntrica tivesse ocorrido o homólogo rearranjado teria o centrômero deslocado da sua posição original, e conseqüentemente, alteraria a medida dos braços cromossômicos. No entanto, essa hipótese é pouco provável, uma vez que os braços curtos dos homólogos do par cromossômico polimórfico possuem tamanhos muito semelhantes.

Polimorfismos cromossômicos devido a duplicações, translocações e inversões já foram observados em muitas outras espécies de formigas (revisão em Lorite e Palomeque 2010, Barros et al. 2014a, Aguiar et al. 2017). Rearranjos do tipo translocações são mais comuns em espécies de formigas com baixo número cromossômico ($n < 12$) (Imai et al. 1977, Barros et al. 2014a). No entanto, *G. striatula*, a qual o polimorfismo cromossômico foi observado, apresentou $n=17$ cromossomos. A ocorrência de polimorfismos cromossômicos devido à translocações em formigas com alto número cromossômico ($n>12$) tem sido relatada, como em *Camponotus rufipes* ($n=20$) (Mariano et al. 2001, Aguiar et al. 2017). Nessa espécie foi possível detectar um polimorfismo cromossômico numérico devido à translocação robertsoniana em diferentes populações, inclusive machos portando o cromossomo rearranjado foram observados (Aguiar et al. 2017).

Em *G. striatula* ($2n=34$), o polimorfismo cromossômico envolveu a modificação da morfologia dos cromossomos homólogos (um cromossomo submetacêntrico e seu homólogo subteloicêntrico). No entanto, podem ser observados sem mudanças na morfologia cromossômica dos homólogos como observado na formiga *Trachymyrmex fuscus* (Barros et al. 2014a). Os cromossomos rearranjados podem ser identificados mesmo na análise por coloração convencional, se houver mudança na morfologia dos cromossomos, mas se os segmentos forem muito curtos

e a morfologia cromossômica não for alterada, o rearranjo pode ser de difícil identificação (Kasahara 2009).

A população de *G. striatula* de Petrópolis (RJ) ($2n=34$) do presente estudo apresentou cariótipo muito semelhante, quanto o número e morfologia cromossômica, as populações da mesma espécie de Viçosa (MG) e Ilhéus (BA) estudadas por Borges et al. (2004). Entretanto o polimorfismo cromossômico supracitado na população de Petrópolis (RJ) não foi relatado por Borges et al. (2004) nas localidades de Viçosa e Ilhéus.

Nítidas diferenças cromossômicas, no entanto, foram observadas entre a população de Petrópolis (RJ) quando comparada com à *G. striatula* do Rio de Janeiro (RJ). Considerando a citogenética clássica, *G. striatula* do Rio de Janeiro apresentou número cromossômico menor, $2n=32$, enquanto em *G. striatula* de Petrópolis foi observado $2n=34$ cromossomos. Ao comparar a morfologia dos cromossomos entre as duas populações é possível distinguir alguns pares cromossômicos entre elas. O cariótipo do Rio de Janeiro apresentou dois pares de tamanho maior adicionais, um metacêntrico e um submetacêntrico, em relação ao cariótipo de Petrópolis. Em contrapartida, esse último apresentou dois pares subtlocêntricos de maior tamanho e um par subtlocêntrico de tamanho menor com braço curto muito pequeno que não foram observados no primeiro. Em relação à citogenética molecular, a localização dos genes ribossomais 18S, ricos em pares de bases GC, também diferiu nas duas populações. Em *G. striatula* do Rio de Janeiro esses genes foram observados no braço curto do sexto par metacêntrico e em *G. striatula* de Petrópolis no braço longo do quinto par metacêntrico.

Todas essas diferenças citogenéticas clássicas (número, morfologia cromossômica, localização das regiões ricas em pares de base GC) e moleculares (localização dos genes ribossomais 18S) observadas entre a população do Rio de Janeiro (RJ) e a de Petrópolis (RJ) sugerem que *G. striatula* seja complexo de espécies. Esses dados citogenéticos estão de acordo com os dados morfológicos observados para *G. striatula*, que apresenta uma grande variação morfológica intraespecífica em diferentes populações e que também indicam de que se trata de um complexo de espécies (Lattke et al. 2008, Camacho 2013).

As populações de *G. moelleri* de Viçosa-MG e Petrópolis-RJ do presente estudo apresentaram mesmo número de cromossomos, morfologia cromossômica, e localização das regiões de rDNA 18S ricas em pares de bases GC. O mesmo número

cromossômico ($2n=34$) foi observado em *G. moelleri* da Bahia (Mariano et al. 2015). Entretanto, a população de *G. moelleri* de Açailândia apresentou um cariótipo diferente com número cromossômico maior ($2n=44$), cinco pares cromossômicos adicionais, em relação às demais populações ($2n=34$). Considerando a morfologia cromossômica, *G. moelleri* ($2n=44$) apresentou dois pares metacêntricos e três pares submetacêntricos adicionais em relação a *G. moelleri* ($2n=34$). A localização dos genes ribossomais 18S nas três populações de *G. moelleri* estudadas foi semelhante, no braço longo do quinto par cromossômico metacêntrico. No entanto, observou-se uma pequena diferença no tamanho do par cromossômico carreador desses genes, uma vez que o tamanho desse par em *G. moelleri* de $2n=44$ se assemelha muito ao do quarto par metacêntrico enquanto em *G. molleri* de $2n=34$ ele é menor em relação ao quarto par metacêntrico. Assim, o par carreador dos genes ribossomais 18S é maior em *G. moelleri* ($2n=44$) em relação ao de *G. moelleri* ($2n=34$).

Em *G. moelleri* não se observa alto grau de variabilidade morfológica intraespecífica nas diferentes populações, como em *G. striatula*, ou seja, os caracteres diagnósticos de *G. moelleri* se mantêm bem definidos ao longo do seu gradiente de distribuição (Camacho 2013). No entanto, as diferenças cariotípicas descritas entre a população de Açailândia ($2n=44$) e as demais ($2n=34$) (presente estudo, Mariano et al. 2015), mostraram divergência dessa população ($2n=44$) em relação às outras ($2n=34$), o que sugere que essas podem ser espécies crípticas. Posteriores estudos citogenéticos em outras populações dessa espécie permitirão investigar melhor essa hipótese.

Os cariótipos de *G. striatula* de Petrópolis (RJ) e *G. moelleri* de Petrópolis (RJ) e Viçosa (MG) do presente estudo apresentaram o mesmo número cromossômico ($2n=34$) e morfologia cromossômica ($2n=18m+8sm+8st$), mesma localização das regiões ricas em pares de bases GC e de rDNA 18S (região intersticial do braço longo do quinto par metacêntrico), o que sugere uma proximidade filogenética em termos citogenéticos entre essas espécies. Comparando os cariótipos dessas duas espécies, pode-se observar que o par cromossômico polimórfico encontrado em *G. striatula* de Petrópolis está presente na forma de dois cromossomos submetacêntricos pequenos, com braço longo menor em *G. moelleri*. Isso implica que possivelmente essa forma homomórfica seria a condição plesiomórfica para esse par cromossômico, e que a forma homomórfica com dois homólogos subteloicêntricos com braço longo maior seria a mais derivada, a qual não

foi observada nos indivíduos de *G. striatula* analisados. Partindo desse pressuposto, é pouco provável a hipótese de ocorrência de deleções de segmentos cromossômicos no par polimórfico de *G. striatula*.

Existe uma grande proximidade de morfologia externa (padrão de esculturação do mesossoma, por exemplo) entre *G. striatula* e *G. moelleri*, e não é incomum a confusão na identificação dessas duas espécies, no entanto, essas podem ser distinguidas, por exemplo, pelas medidas do comprimento da cabeça e do escapo e largura da cabeça que variam significativamente entre elas, sendo caracteres claros que as segregam (Camacho 2013). Lattke (1995) reportou a ocorrência de vários espécimes de *G. striatula* da Bolívia com uma longa inclinação anterior do nodo, uma condição que se aproxima de *Gnamptogenys pleurodon*. O mesmo autor também reportou espécimes ocasionais de *G. pleurodon* com estriações verticais na declividade do propódeo que se assemelha a *G. striatula*. Além disso, Camacho (2013) também comentou a proximidade, considerando a morfologia externa, de *G. pleurodon* com *G. striatula* e também de *G. moelleri*. Essas três espécies foram incluídas no grupo *striatula*, porém em subgrupos diferentes, *G. moelleri* e *G. striatula* no subgrupo *striatula* enquanto *G. pleurodon* no subgrupo *porcata* (Lattke 1995).

Dados citogenéticos disponíveis para *G. pleurodon* coletada na Guiana Francesa se restringem ao número cromossômico que corresponde a $2n=32$ cromossomos (Mariano et al. 2015). Assim, utilizando *G. pleurodon* como grupo externo é possível propor um caminho evolutivo para os diferentes cariótipos observados nas populações de *G. striatula* e *G. moelleri*. O cariótipo menos derivado seria o de $2n=32$ cromossomos observado tanto em *G. pleurodon* (grupo externo) e *G. striatula* do Rio de Janeiro (RJ). Rearranjos do tipo fissão cêntrica dariam origem ao cariótipo de $2n=34$ cromossomos ($2n=18m+8sm+8st$), o qual é observado em *G. striatula* de Petrópolis (RJ) (presente estudo), Bahia (BA) e Viçosa (MG) (Borges et al. 2014) e em *G. moelleri* de Viçosa, Petrópolis (presente estudo) e Bahia (Mariano et al. 2015). Rearranjos do tipo duplicações ou translocações podem ter originado o polimorfismo cromossômico observado no cariótipo de *G. striatula* ($2n=34$, $18m+7sm+9st$) de Petrópolis (RJ). O cariótipo observado em *G. moelleri* de Açailândia com $2n=44$ cromossomos ($2n=22m+14sm+8st$) seria o mais derivado e originado por meio de fissões cêntricas a partir de $2n=34$ cromossomos. Embora esse cariótipo apresente poucos pares cromossômicos subtelocêntricos e uma

predominância de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, esses poderiam apresentar os braços heterocromáticos, o que estaria de acordo com a teoria da interação mínima proposta por Imai et al. (1994). Posteriores estudos sobre a distribuição de heterocromatina nos cariótipos dessas populações poderão auxiliar na melhor compreensão desse caminho evolutivo cariotípico em *G. striatula* e *G. moelleri*.

As NORs contêm os genes que codificam os RNAs ribossômicos (45S – 28S+18S+5.8S) e estão localizadas em porções no DNA que após sua condensação irão constituir as constrições secundárias nos cromossomos metafásicos (Sumner 2003). Regiões de constrições secundárias foram observadas nos diferentes cariótipos das populações de *G. striatula* e *G. moelleri*, que corresponderam às localizações dos genes ribossomais 18S. Constrições secundárias correspondentes às NORs já foram observadas em outras formigas como *Mycocepurus goeldii* (Barros et al. 2010) e *Atta* spp. (Barros et al. 2014b).

Somente um par de marcações para genes ribossomais 18S em todas as populações das quatro espécies de *Gnamptogenys* estudadas foi observado, semelhante à maioria das espécies de formigas neotropicais que já tiveram suas regiões de rDNA mapeadas (Mariano et al. 2008, Santos et al. 2010, 2016, Barros et al. 2012, 2015, 2016, Aguiar et al. 2017, Teixeira et al. 2017). Esse padrão diferiu das formigas neotropicais *Dinoponera gigantea* (Aguiar et al. 2011) e *Camponotus renggeri* (Aguiar et al. 2017). A localização dos rDNA 18S das *Gnamptogenys* spp. estudadas coincidiram com as marcações CMA₃⁺ o que indica que essas regiões são ricas em pares de bases GC. Essa relação também foi observada para a maioria de formigas neotropicais já estudadas (Mariano et al. 2008, Barros et al. 2015, 2016, Santos et al. 2016, Teixeira et al. 2017, Aguiar et al. 2017). A exceção, até o momento, é a espécie *Dolichoderus voraginosus* em que não se observou uma correspondência entre as regiões ricas em GC, e os agrupamentos de rDNA 45S (Santos et al. 2016).

A variação no número cromossômico observada dentre as *Gnamptogenys* spp. estudadas citogeneticamente foram até o momento de 2n= 16, 20, 24, 26, 32, 34, 36, 42, 44, 46 e 68 cromossomos (Tabela 1, presente estudo), incluindo dados para os grupos *striatula*, *mordax*, *rastrata* da região neotropical e *coxalis* da região oriental. Além disso, duas espécies do presente estudo, *G. regularis* (2n=26) e *G. striatula* de Petrópolis-RJ (2n=34), apresentaram polimorfismo cromossômico estrutural

envolvendo regiões de rDNA 18S e de uma região com sequência desconhecida, respectivamente. Cariótipos distintos foram observados em populações de *G. striatula* ($2n=32, 34$) e *G. moelleri* ($2n=34, 44$) no presente estudo. Todos esses dados citogenéticos, que incluem informações somente para 14 das 140 espécies descritas, já mostram uma grande complexidade e diversidade cariotípica para o gênero, provavelmente reflexo de sua longa história evolutiva (Lattke 1995, Lattke et al. 2008).

No presente estudo foi possível distinguir populações de *G. striatula* (Rio de Janeiro – RJ e Petrópolis – RJ) e *G. moelleri* (Petrópolis-RJ/Viçosa-MG e Açailândia-MA) por meio do número e morfologia cromossômica, par cromossômico carreador das regiões ricas em pares de bases GC e dos genes ribossômicos 18S. Além disso foi possível identificar padrões de polimorfismos cromossômicos que auxiliaram a compreensão da evolução cariotípica em *G. regularis* e *G. striatula* de Petrópolis. Posteriores estudos em diferentes populações de *G. moelleri* serão úteis para investigar melhor a hipótese sugerida de espécies crípticas. Os dados cromossômicos obtidos para *G. striatula* demonstram que a citogenética, clássica e molecular, pode ser uma ferramenta útil para auxiliar na delimitação dos limites específicos desse complexo de espécies, seguindo o conceito da taxonomia integrativa. Toda essa diversidade cariotípica observada nas espécies do presente trabalho demonstra o quanto futuros estudos citogenéticos em *Gnamptogenys* são promissores.

Referências Bibliográficas

- Aguiar H.J.A.C., Barros L.A.C., Mariano C.S.F., Delabie J.H.C., Pompolo S.G. (2011) 45S rDNA localization for the giant ant *Dinoponera gigantea* (Perty, 1833) with evolutionary inferences for *Dinoponera* genus (Formicidae: Ponerinae). *Sociobiology*, 57: 607-620.
- Aguiar H.J.A.C., Barros L.A.C., Alves D.R., Mariano C.S.F., Delabie J.H.C., Pompolo S.G. (2017) Cytogenetic studies on populations of *Camponotus rufipes* (Fabricius, 1775) and *Camponotus renggeri* Emery, 1894 (Formicidae: Formicinae). *PLoS ONE*, 12(5): e0177702.
- Alves-Silva A.P., Barros L.A.C., Chaul J.C.M., Pompolo S.G. (2014) The First cytogenetic data on *Strumigenys louisianae* Roger, 1863 (Formicidae: Myrmicinae: Dacetini): The lowest chromosome number in the Hymenoptera of the Neotropical region. *PLoS ONE*, 9(11): e111706.

- Barros L.A.C., Aguiar H.J.A.C., Mariano C.S.F., Delabie J.H.C., Pompolo S.G. (2010) Cytogenetic characterization of the lower-Attine *Mycocepurus goeldii* (Formicidae: Myrmicinae: Attini). *Sociobiology*, 56: 57-66.
- Barros L.A.C., Aguiar H.J.A.C., Andrade-Souza V., Mariano C.S.F., Delabie J.H.C., Pompolo SG (2012) Occurrence of pre-nucleolar bodies and 45S rDNA location on the chromosomes of the ant *Mycocepurus goeldii* (Forel) (Formicidae, Myrmicinae, Attini). *Hereditas*, 149: 50-54.
- Barros L.A.C., Aguiar H.J.A.C., Mariano C.S.F., Delabie JHC, Pompolo SG (2014a) Cytogenetic characterization of the ant *Trachymyrmex fuscus* Emery, 1934 (Formicidae: Myrmicinae: Attini) with the description of a chromosomal polymorphism. *Annales de la Société Entomologique de France*, 49(4): 367-373.
- Barros L.A.C., Teixeira G.A., Aguiar H.J.A.C., Mariano C.S.F., Delabie J.H.C., Pompolo S.G. (2014b) Banding patterns of three leafcutter ant species of the genus *Atta* (Formicidae: Myrmicinae) and chromosomal inferences. *Florida Entomologist*, 97: 1694-1701.
- Barros L.A.C., Aguiar H.J.A.C., Teixeira G.A., Mariano C.D.S.F., Teixeira M.C., Delabie JHC, Pompolo SG (2015) Cytogenetic data on the threatened leafcutter ant *Atta robusta* Borgmeier, 1939 (Formicidae: Myrmicinae: Attini). *Comptes Rendus Biologies*, 338(10): 660-665.
- Barros L.A.C., Aguiar H.J.A.C., Mariano C.S.F., Andrade-Souza V., Costa M.A., Delabie J.H.C., Pompolo S.G. (2016) Cytogenetic data on six leafcutter ants of the genus *Acromyrmex* Mayr, 1865 (Hymenoptera, Formicidae, Myrmicinae): insights into chromosome evolution and taxonomic implications. *Comparative Cytogenetics*, 10:229-243.
- Blatrix R., Jaisson P. (2000) Optional gamergates in the queenright ponerine ant *Gnamptogenys striatula* Mayr. *Insectes Sociaux*, 47: 193-197.
- Borges D.S., Mariano C.S.F., Delabie J.H.C., Pompolo S.G. (2004) Cytogenetics studies in Neotropical ants of the genus *Gnamptogenys* Roger (Hymenoptera, Formicidae, Ectatominae). *Revista Brasileira de Entomologia*, 48(4): 481-484.
- Camacho G.P. (2013) Estudo taxonômico do grupo *striatula* de *Gnamptogenys* Roger (Hymenoptera, Formicidae, Ectatomminae) para o Brasil. M.Sc. Dissertação, Programa de Pós-graduação em Entomologia. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG - Brasil. 119 pp.
- Camacho G.P., Feitosa R.M. (2015) Estado da arte sobre a taxonomia e filogenia de Ectatomminae. In: Delabie JHC, Feitosa RM, Serrao JE, Mariano CSF, Majer JD (org). *As formigas poneromorfas do Brasil*. 1ª edição. Editora da Universidade Estadual da Bahia. pp. 23-32.
- Camacho J.P.M., Navas-Castillo J., Cabrero J. (1986) Extra nucleolar activity associated with presence of a supernumerary chromosome segment in the grasshopper *Oedipoda fuscocincta*. *Heredity*, 56: 237-241.

- Correia J.P.S.O., Mariano C.S.F., Delabie J.C.H., Lacau S., Costa M.A. (2016) Cytogenetic analysis of *Pseudoponera stigma* and *Pseudoponera gilberti* (Hymenoptera: Formicidae: Ponerinae): a taxonomic approach. *Florida Entomologist*, 99(4): 718-721.
- Cristiano M.P., Cardoso D.C., Fernandes-Salomão T.M. (2013) Cytogenetic and molecular analyses reveal a divergence between *Acromyrmex striatus* (Roger, 1863) and other congeneric species: taxonomic implications. *PloS ONE*, 8(3): e59784.
- Feitosa R.M. (2015) Lista de formigas poneromorfas do Brasil. In: Delabie JHC, Feitosa RM, Serrao JE, Mariano CSF, Majer JD (org). *As formigas poneromorfas do Brasil*. 1ª edição. Editora da Universidade Estadual da Bahia. pp. 95- 101.
- Giraud T., Blatrix R., Poteaux R., Solignac M., Jaisson P. (2000) Population structure and mating biology of the polygynous ponerine ant *Gnamptogenys striatula* in Brazil. *Molecular Ecology*, 9: 1835–184.
- Gualberto M.P. (2013) Estudo taxonômico do complexo *rastrata*, gênero *Gnamptogenys* Roger, 1863 (Hymenoptera: Formicidae: Ectatomminae) no Brasil. M.Sc. Dissertação, Programa de Pós-graduação em Entomologia. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus - AM- Brasil. 94 pp.
- Imai H.T., Crozier R.H., Taylor R.W. (1977) Karyotype evolution in Australian ants. *Chromosoma*, 59: 341–393.
- Imai H., Taylor R.W., Crosland M.W., Crozier R.H. (1988) Modes of spontaneous chromosomal mutation and karyotype evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis. *Japanese Journal of Genetics*, 63: 159-185.
- Imai H. (1991) Mutability of constitutive heterochromatin (C-bands) during eukaryotic chromosomal evolution and their cytological meaning. *Japanese Journal of Genetics*, 66: 635-661.
- Imai H.T., Taylor R.W., Crozier R.H. (1994) Experimental bases for the minimum interaction theory. *Chromosome evolution in ants of the *Myrmecia pilosula* species complex* (Hymenoptera: Formicidae: Myrmeciinae). *Japanese Journal of Genetics*, 69: 137-182.
- Kasahara S. (2009) *Introdução à pesquisa em Citogenética de Vertebrados*. 1ª ed. Sociedade Brasileira Genética. Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. 160 pp.
- Lattke J.E. (1990) Revisión del género *Gnamptogenys* Roger en Venezuela (Hymenoptera: Formicidae). *Acta Terramaris*, 2: 1-47.
- Lattke J.E.. (1995) Revision of the ant genus *Gnamptogenys* in the New World (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Hymenoptera Research*, 4: 137-93.
- Lattke J.E. (2004) A taxonomic revision and phylogenetic analysis of the ant genus *Gnamptogenys* Roger in Southeast Asia and Australasia (Hymenoptera:

- Formicidae: Ponerinae). University of California Publications in Entomology, 122: 1-266.
- Lattke J.E., Fernández F., Arias-Penna T.M., Palacio E.E.; Mackay W., Mackay E. (2008) Género *Gnamptogenys* Roger. In: Jiménez E, Fernández F, Arias-Penna TM, Lozano-Zambrano FH (org). Sistemática, Biogeografía y conservación de las hormigas cazadoras de Colombia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Bogotá D.C., Colombia. pp. 66-107.
- Levan A., Fredga K., Sandberg A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 201-220.
- Lorite P., Palomeque T. (2010) Karyotype evolution in ants (Hymenoptera: Formicidae), with a review of the known ant chromosome numbers. *Myrmecological News*, 13: 89-102.
- Mariano C.S.F., Pompolo S.G., Barros L.A.C., Mariano-Neto E., Campiolo S., Delabie J.H.C. (2008) A biogeographical study of the threatened ant *Dinoponera lucida* Emery (Hymenoptera: Formicidae: Ponerinae) using a cytogenetic approach. *Insect Conservation and Diversity*, 1: 161-168.
- Mariano C.S.F., Pompolo S.G., Delabie J.H.C., Campos L.A.O. (2011) Estudos cariotípicos de algumas espécies neotropicais de *Camponotus* Mayr (Hymenoptera: Formicidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, 45: 267-274.
- Mariano C.S.F., Santos I.S., Silva J.G., Costa M.A., Pompolo S.G. (2015) Citogenética e evolução do cariótipo em formigas poneromorfas. In: Delabie JHC Feitosa RM, Serrao JE, Mariano CSF, Majer JD (org). As formigas poneromorfas do Brasil. 1ª edição. Editora da Universidade Estadual da Bahia. pp. 103-125.
- Pereira J.O.P. (2006) Diversidade genética da abelha sem ferrão *Melipona quinquefasciata* baseada no sequenciamento das regiões ITS1 parcial e 18S do DNA ribossômico nuclear. D.Sc. Tese, Programa de Pós-graduação em Zootecnia. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza - CE - Brazil. 141 pp.
- Pinkel D., Straume T., Gray J.W. (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83: 2934-2938.
- Phimpan S., Tanomtong A., Jumrusthanasan S., Supiwong W., Siripiyasing P., Sanoamuang L. (2013) First report of NOR polymorphism and chromosome analysis of John's Snapper, *Lutjanus johnii* (Perciformes, Lutjanidae) in Thailand. *Cytologia*, 78(4): 335-344.
- Santos I.S., Costa M.A., Mariano C.S.F., Delabie J.H.C., Andrade-Souza V., Silva J.G. (2010). A cytogenetic approach to the study of Neotropical *Odontomachus* and *Anochetus* ants (Hymenoptera: Formicidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 103(3): 424-429.

- Santos I.S., Mariano C.S.F., Delabie J.H.C., Costa M.A., Carvalho A.F., Silva J.G. (2016) "Much more than a neck": karyotype differentiation between *Dolichoderus attelaboides* (Fabricius, 1775) and *Dolichoderus decollatus* F. Smith, 1858 (Hymenoptera: Formicidae) and karyotypic diversity of five other Neotropical species of *Dolichoderus* Lund, 1831. *Myrmecological News*, 23:61-69.
- Schlick-Steiner B.C., Steiner F.M., Seifert B., Stauffer C., Christian E., Crozier R.H. (2010) Integrative taxonomy: a multisource approach to exploring biodiversity. *Annual Review of Entomology*, 55: 421-438.
- Schubert I., Lysak M.A. (2011) Interpretation of karyotype evolution should consider chromosome structural constraints. *Trends in Genetics*. 27(6): 207–216.
- Schweizer D. (1980) Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterocromatic regions (DA/DAPI-bands) in human chromosomes. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 27: 190-193.
- Sumner A.T. (2003) *Chromosomes: Organization and Function*. Blackwell Publishing. North Berwick – United Kingdom. 287 pp.
- Teixeira G.A., Barros L.A.C., Aguiar H.J.A.C., Pompolo S.G. (2017) Comparative physical mapping of 18S rDNA in the karyotypes of six leafcutter ant species of the genera *Atta* and *Acromyrmex* (Formicidae: Myrmicinae). *Genetica*, 145: 351-357.
- Vicari M.R., Almeida M.C., Bertollo L.A.C., Moreira-Filho O., Artoni R.F. (2006) Cytogenetic analysis and chromosomal characteristics of the polymorphic 18S rDNA in the fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetics and Molecular Biology*, 29(4): 621-625.

Tabela 1 – Resumo dos dados citogenéticos disponíveis na literatura de *Gnamptogenys* spp. Espécie, grupos segundo classificação de Latke 1995 e 2004, número cromossômico diploide/ haploide, fórmula cariotípica, localidade e referências bibliográficas. Estados brasileiros: MG: Minas Gerais e BA: Bahia

Espécie	Grupo	2n / n	Fórmula Cariotípica	Localidade	Referências
<i>Gnamptogenys</i> sp. 2	-	16 / 8	-	Brasil - BA	Mariano et al. 2015
<i>Gnamptogenys triangularis</i>	<i>Rastrata</i>	20 / 10	-	Guiana Francesa	Mariano et al. 2015
<i>Gnamptogenys</i> sp1	-	26 / 13	14M + 12A	Costa Rica	Mariano et al. 2015
<i>Gnamptogenys pleurodon</i>	<i>striatula</i>	32 / 16	-	Guiana Francesa	Mariano et al. 2015
<i>Gnamptogenys</i> sp2	-	32 / 16	16M + 16A	Costa Rica	Mariano et al. 2015
<i>Gnamptogenys moelleri</i>	<i>striatula</i>	34 / 17	20M + 14A	Brasil - BA	Mariano et al. 2015
<i>Gnamptogenys striatula</i>	<i>striatula</i>	34	24M + 10A	Brasil - BA, MG	Borges et al. 2004
<i>Gnamptogenys</i> sp. 1	-	36 / 18	-	Brasil - BA	Mariano et al. 2015
<i>Gnamptogenys</i> sp. 2	-	36	-	Cingapura	Goni et al. 1981, Imai et al. 1983
<i>Gnamptogenys menadensis</i>	<i>coxalis</i>	42	-	Malásia	Imai et al. 1983
<i>Gnamptogenys</i> sp. 1	-	42	-	Malásia, Cingapura	Goni et al. 1981, Imai et al. 1983
<i>Gnamptogenys binghami</i>	<i>coxalis</i>	- / 22	-	Malásia	Imai et al. 1983
<i>Gnamptogenys</i> sp. nv.	-	46/ 23	16M + 30A	Brasil - BA	Borges et al. 2004
<i>Gnamptogenys annulata</i>	<i>rastrata</i>	68	6M + 62A	Brasil - BA	Borges et al. 2004

Classificação dos cromossomos segundo Imai (1991): M:metacêntrico, A:acrocêntrico

Tabela 2 – Espécies de *Gnamptogenys* estudadas citogeneticamente no presente trabalho. Colônias, espécies, grupos segundo classificação de Lattke (1995), localidade, número total de indivíduos e metáfases analisados por colônia, número cromossômico diploide e fórmula cariotípica. Estados brasileiros: MG: Minas Gerais, RJ: Rio de Janeiro e MA: Maranhão

Colônia	<i>Gnamptogenys</i> spp.	Grupo	Localidade	Ind/Met	2n	Fórmula Cariotípica
CI 61	<i>G. triangularis</i>	<i>rastrata</i>	Araponga – MG	6/48	24	18m + 6sm
Lu 62	<i>G. regularis</i>	<i>mordax</i>	Ponte Nova – MG	4/56	26	25m + 1sm*
				3/46	26	24m + 2sm
CI 104	<i>G. striatula</i>	<i>striatula</i>	Rio de Janeiro – RJ	10/122	32	20m + 10sm + 2st
CI 105	<i>G. striatula</i>	<i>striatula</i>	Rio de Janeiro – RJ	4/35	32	16m + 12sm + 4st
CI 14	<i>G. striatula</i>	<i>striatula</i>	Petrópolis – RJ	1/10	34	18m + 7sm + 9st**
CI 18	<i>G. striatula</i>	<i>striatula</i>	Petrópolis – RJ	2/31	34	16m + 7sm + 9st**
CI 19	<i>G. striatula</i>	<i>striatula</i>	Petrópolis – RJ	1/8	34	16m + 7sm + 9st**
CI 20	<i>G. striatula</i>	<i>striatula</i>	Petrópolis – RJ	5/98	34	16m + 7sm + 9 st**
				2/24	34	16m + 8sm + 8st
CI 26	<i>G. moelleri</i>	<i>striatula</i>	Petrópolis – RJ	5/134	34	18m + 8sm + 8st
CI 75	<i>G. moelleri</i>	<i>striatula</i>	Viçosa-MG	6/87	34	18m + 8sm + 8st
CI 349	<i>G. moelleri</i>	<i>striatula</i>	Viçosa – MG	4/36	34	18m + 8sm + 8st
CI 350	<i>G. moelleri</i>	<i>striatula</i>	Viçosa – MG	1/19	34	18m + 8sm + 8st
CI 389	<i>G. moelleri</i>	<i>striatula</i>	Viçosa – MG	4/79	34	18m + 8sm + 8st
CI 180	<i>G. moelleri</i>	<i>striatula</i>	Açailândia – MA	9/109	44	22m + 14sm + 8st

* Indivíduos heterozigotos para o polimorfismo envolvendo regiões de genes ribossomais do par 13 em *G. regularis*

**Indivíduos heterozigotos para o polimorfismo cromossômico do par 17 em *G. striatula* de Petrópolis - RJ

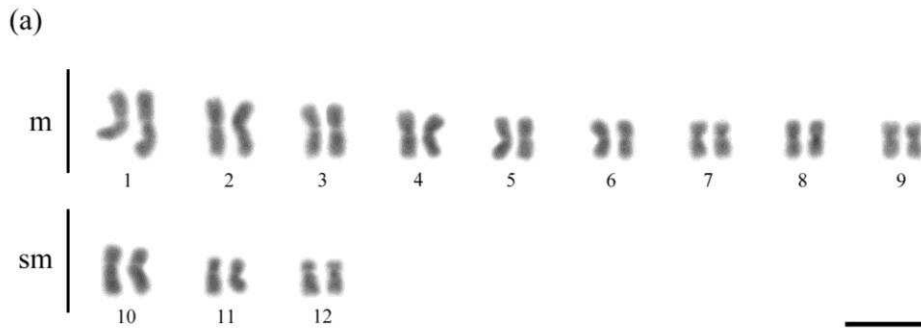


Figura 1 - Cariótipo de fêmea de *Gnamptogenys triangularis* (grupo *rastrata*) com $2n=24$ (18m+6sm) cromossomos. Barra: 5 μm .

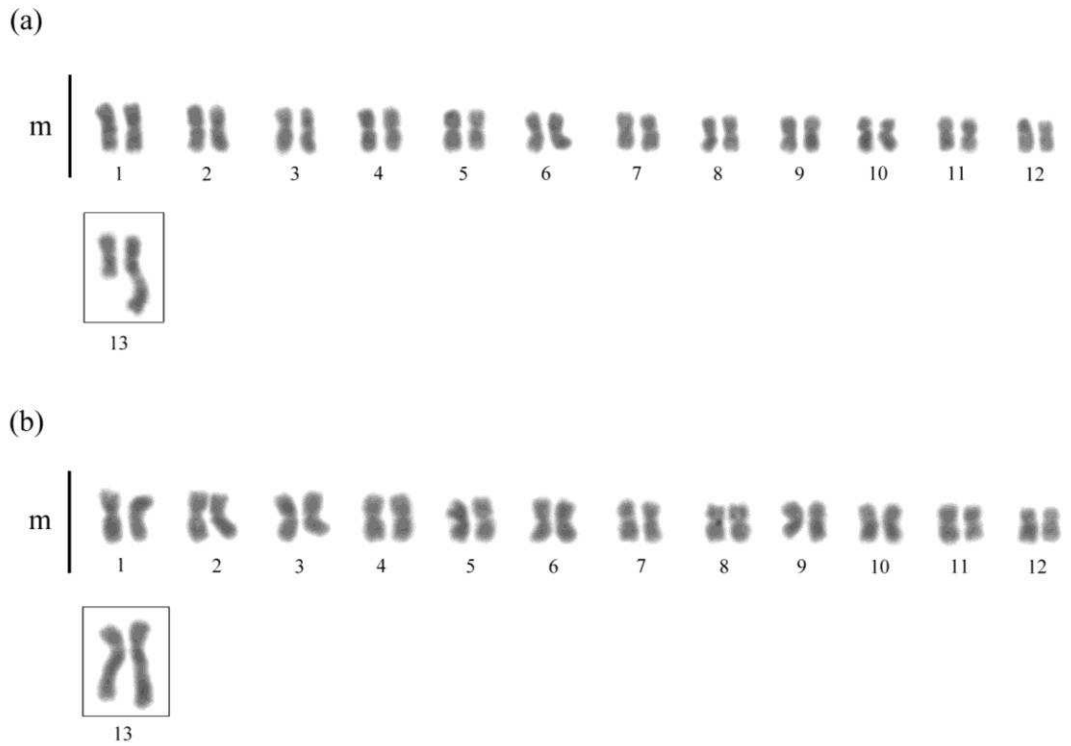


Figura 2 - Cariótipos de fêmeas de *Gnamptogenys regularis* (grupo *mordax*) com (a) $2n=26$ cromossomos e fórmula cariotípica (a) $2n=25m+1sm$ e (b) $2n=24m+2sm$. Caixas mostram par cromossômico 13 polimórfico, (a) no estado heterozigoto e em (b) em um dos estados homozigotos. Barra: 5 μm .

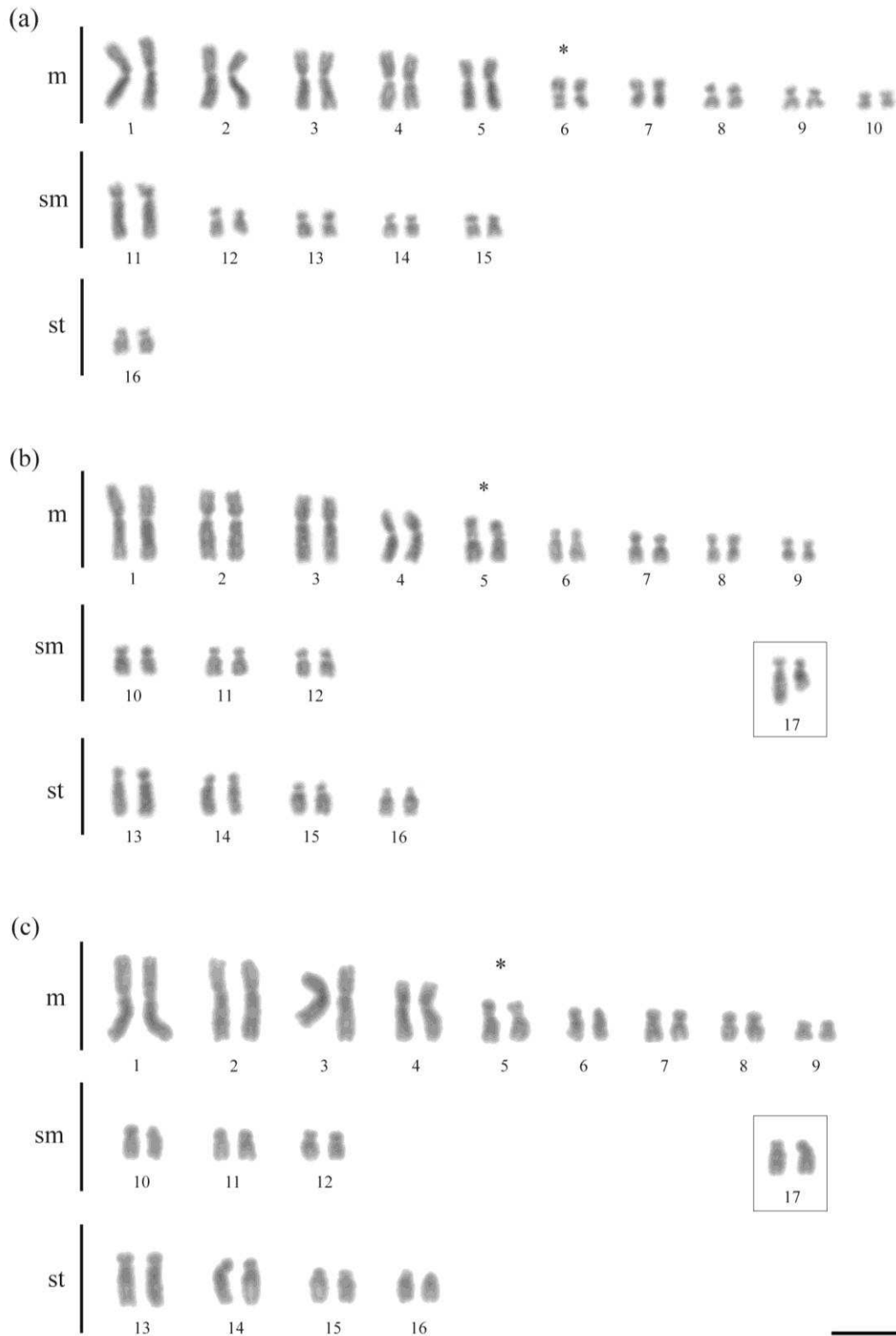


Figura 3 - Cariótipos de fêmeas de *Gnaptogenys striatula* (grupo *striatula*) do (a) Rio de Janeiro (RJ), ($2n=32$, $18m+10sm+2st$), (b) de Petrópolis (RJ) ($2n=34$, $18m+7sm+9st$) e (c) de Petrópolis (RJ) ($2n=34$, $18m+8sm+8st$). As caixas mostram par cromossômico polimórfico na população de Petrópolis (RJ), (b) no estado heterozigoto e (c) em um dos estados homozigotos. Asteriscos indicam pares cromossômicos metacêntricos com constrição secundária. Barra: 5 μ m.

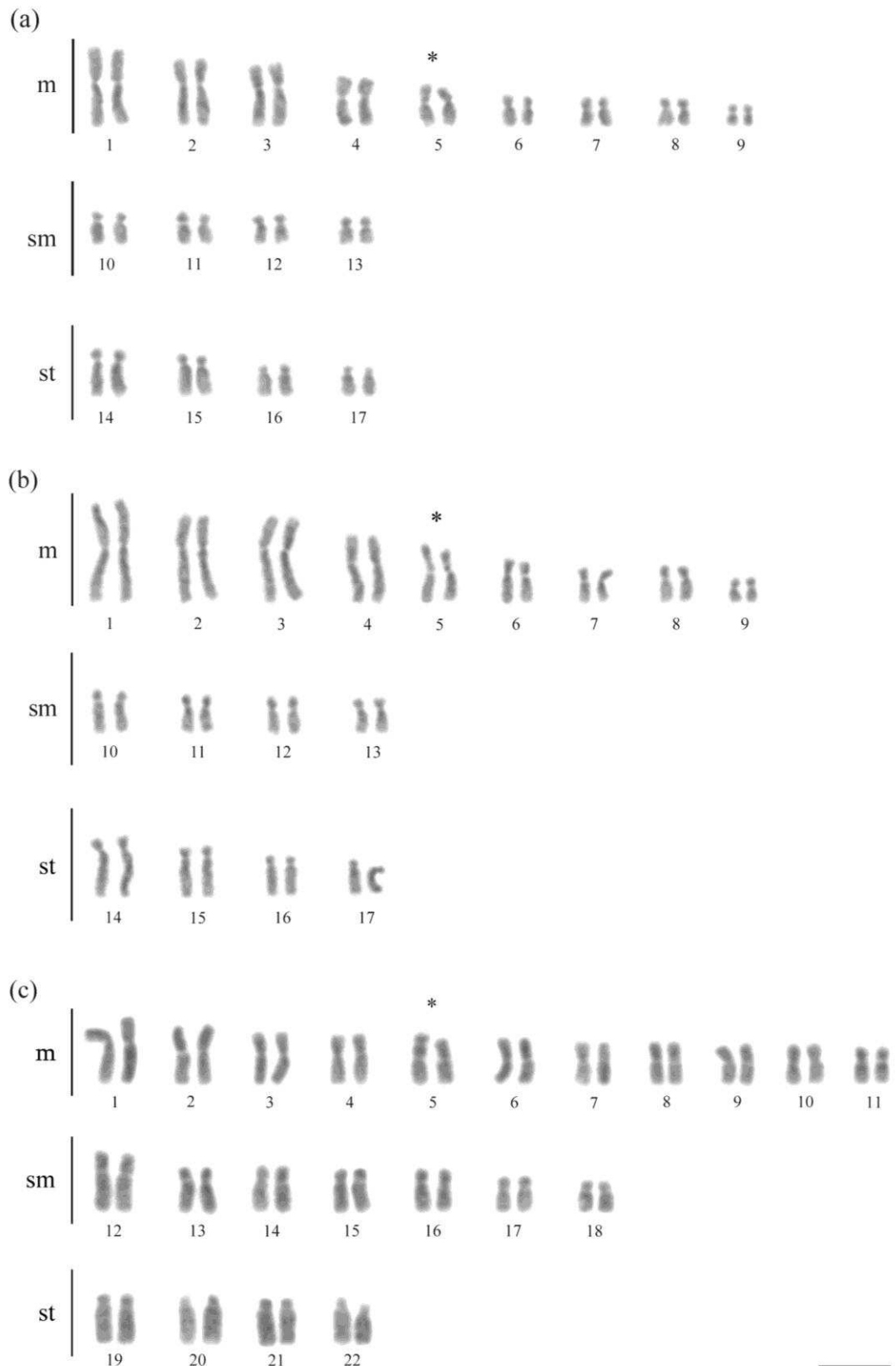


Figura 4 - Cariótipos de fêmeas de *Gnampptogenys moelleri* (grupo *striatula*) de: (a) Petrópolis (RJ) - $2n=34$ (18m+8sm+8st), (b) Viçosa (MG) - $2n=34$ (18m+8sm+8st) e (c) Açailândia (MA) - $2n=44$ (22m+14sm+8m). Os asteriscos indicam pares cromossômicos com constrição secundária. Barra: 5 μm .

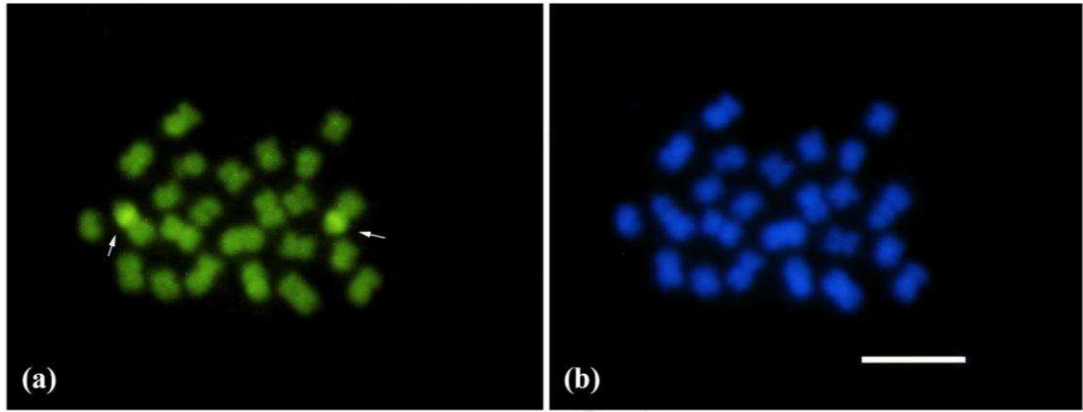


Figura 5 - Metáfases de fêmeas de *Gnampptogenys triangularis* ($2n=24$) submetidas aos fluorocromos CMA₃ (a) e DAPI (b). Setas indicam regiões ricas em pares de bases GC. Barra: 5 μ m.

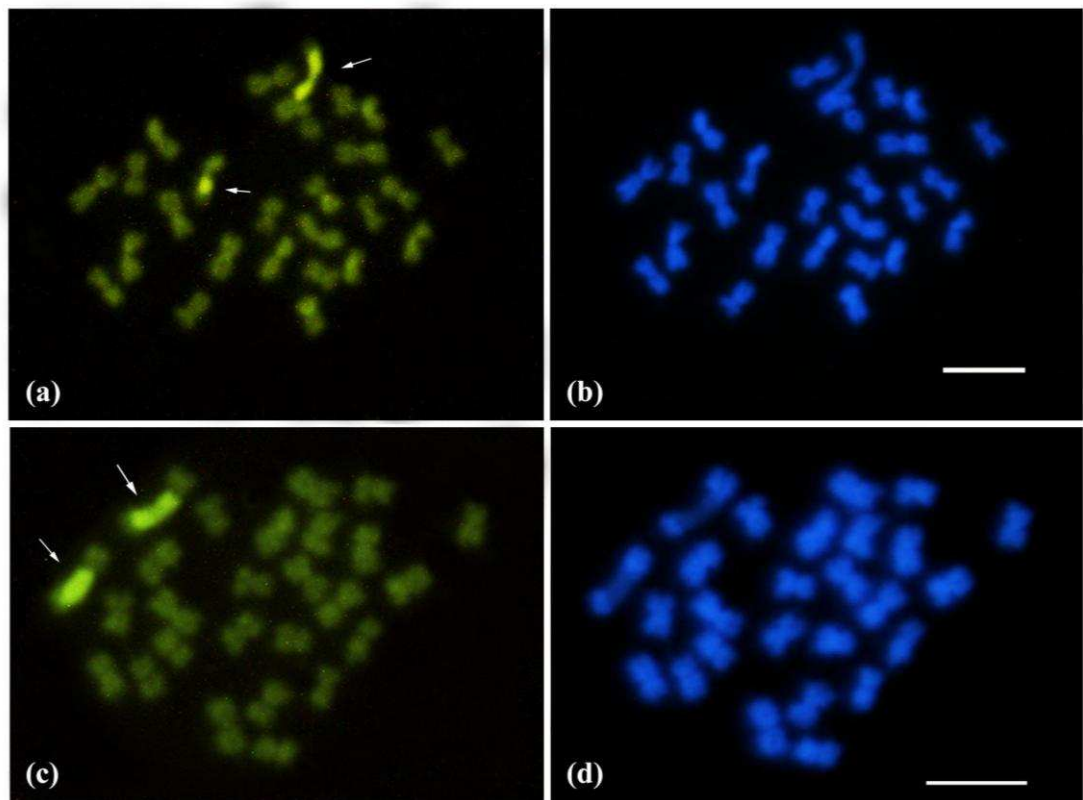


Figura 6 - Metáfases de fêmeas de *Gnampptogenys regularis* submetidas aos fluorocromos CMA₃ (a, c) e DAPI (b, d). Setas indicam regiões ricas em pares de bases GC que se localizaram no par cromossômico 13. Em (a) as regiões CMA₃⁺ são de tamanhos diferentes entre os homólogos e em (b) as regiões CMA₃⁺ são do mesmo tamanho. Barra: 5 μ m.

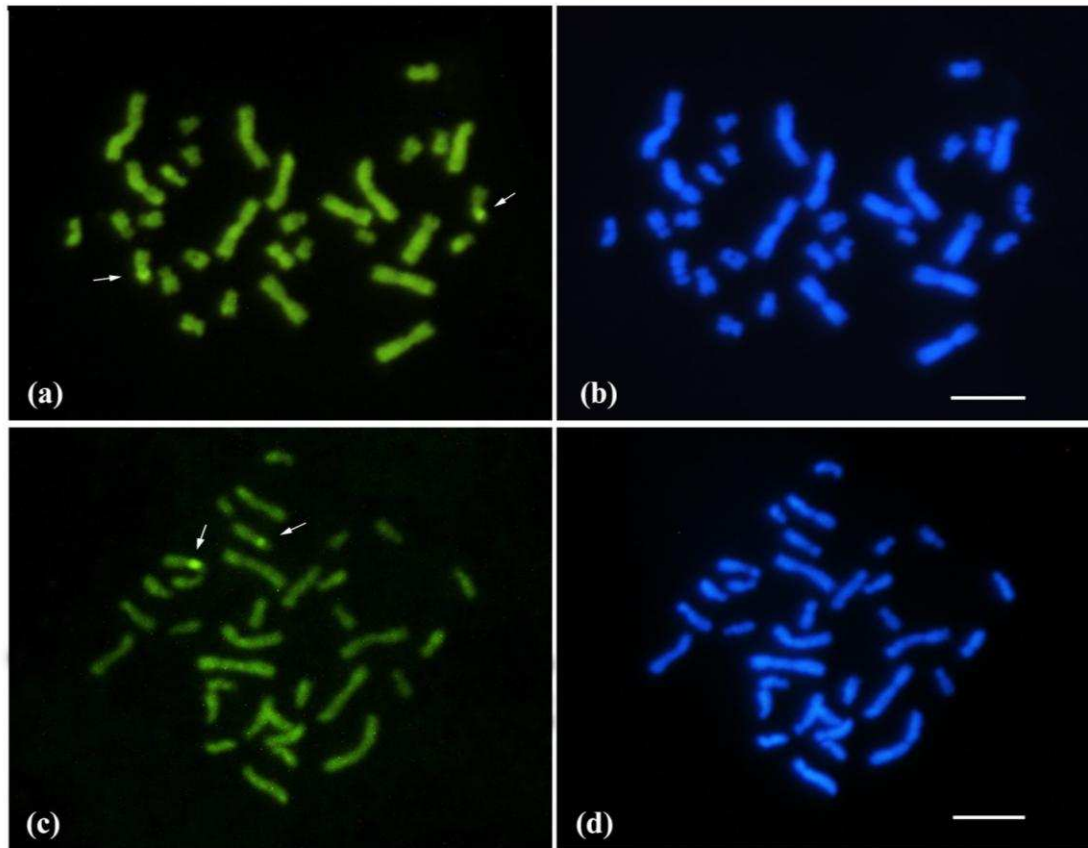


Figura 7 - Metáfases de *Gnamptogenys striatula* do Rio de Janeiro (RJ) ($2n=32$) e Petrópolis (RJ) ($2n=34$) coradas com os fluorocromos CMA₃ (a, c) e DAPI (b, d), respectivamente. Setas indicam regiões ricas em pares de bases GC. Barra: 5 μ m.

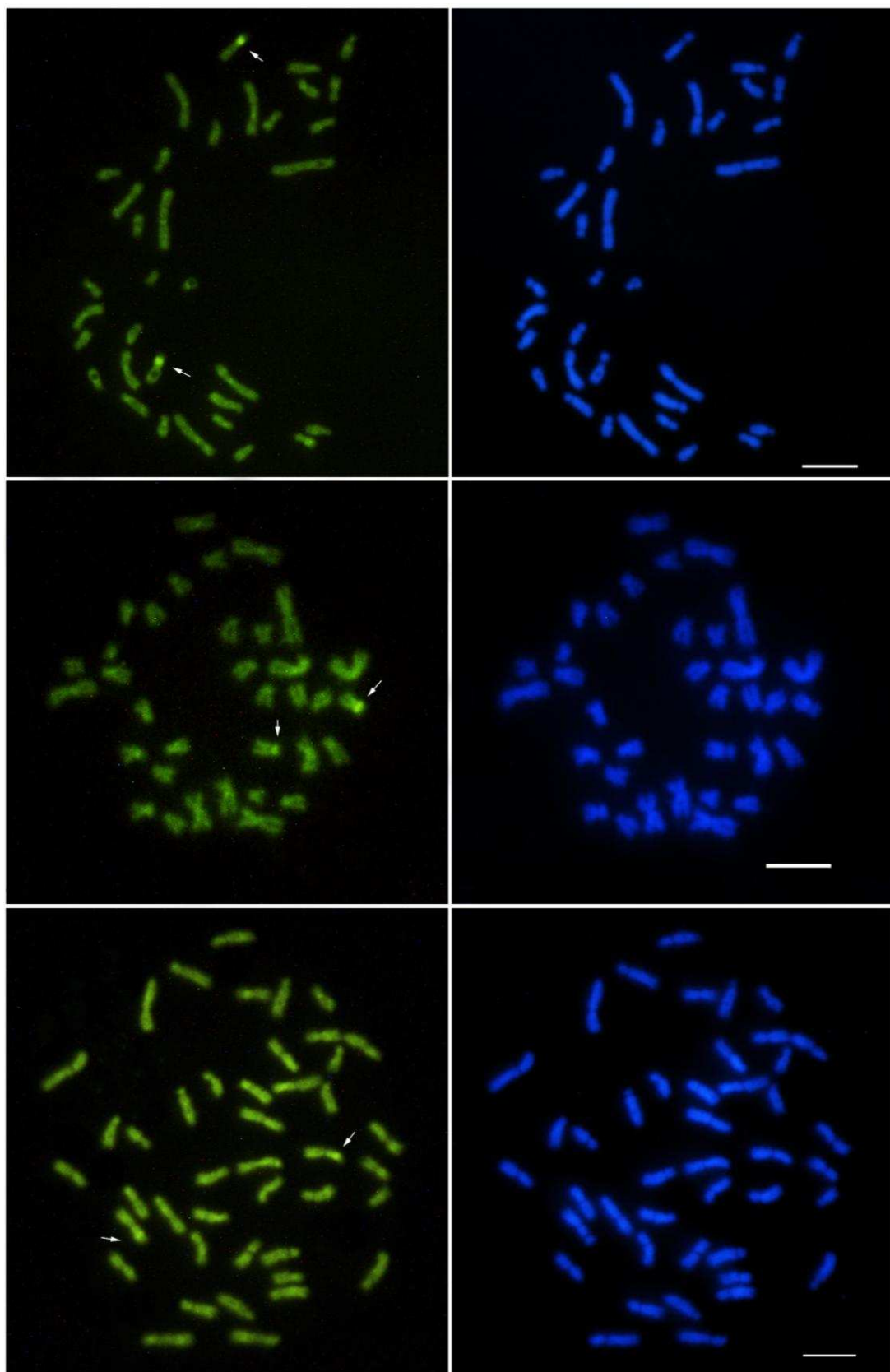


Figura 8 - Metáfases de fêmeas de *Gnamptogenys moelleri* de Petrópolis (RJ) ($2n=34$), Viçosa (MG) ($2n=34$) e Açailândia (MA) ($2n=44$) submetidas a coloração com os fluorocromos CMA₃ (a, c, e) e DAPI (b, d, f), respectivamente. Setas indicam regiões ricas em pares de bases GC. Barra: 5 μ m.

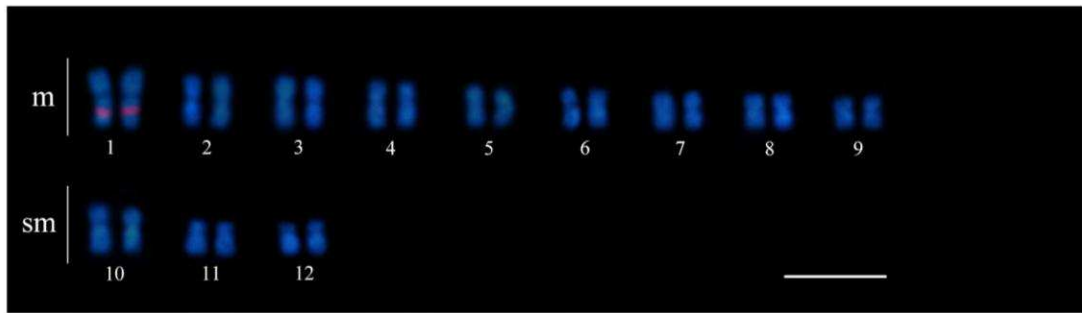


Figura 9 - Cariótipo de fêmea de *Gnamptogenys triangularis* submetida a técnica de FISH com sonda rDNA 18S (blocos vermelhos). Barra: 5 μ m.

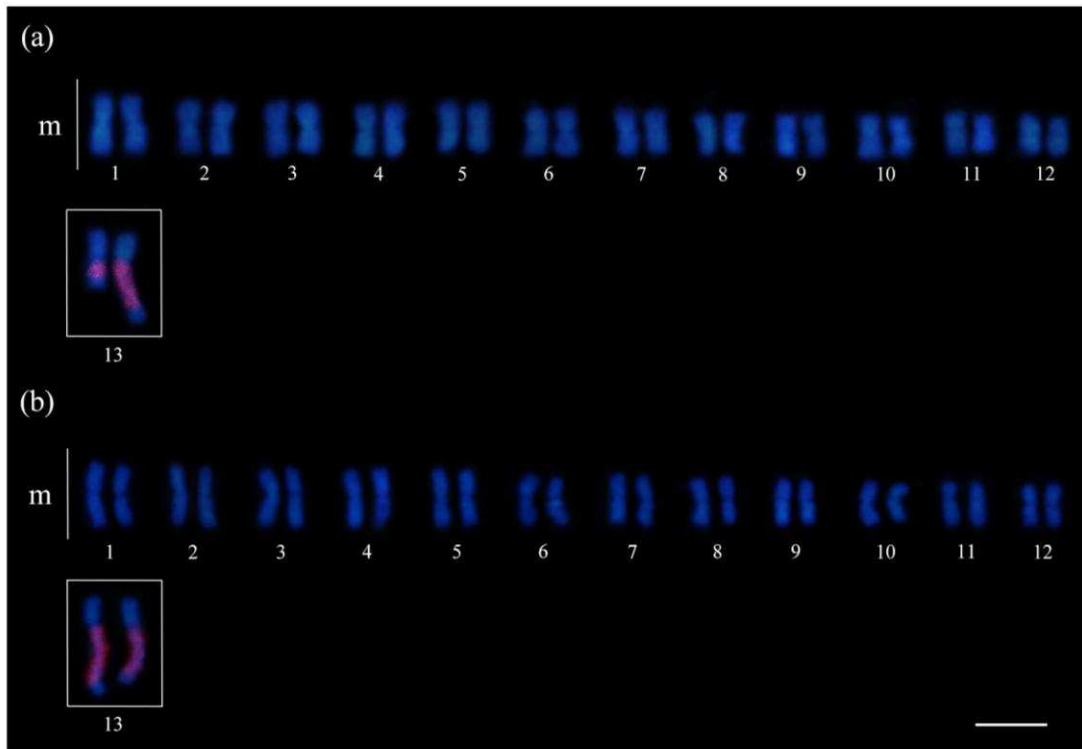


Figura 10 - Cariótipos de fêmeas de *Gnamptogenys regularis* submetidas a técnica de FISH com sonda de rDNA 18S (blocos vermelhos). Os blocos de genes ribossomais 18S se localizaram no par cromossômico polimórfico 13. Caixas mostram esse par em (a) estado heterozigoto com diferença no tamanho dos blocos rDNA 18S entre os homólogos e (b) um dos estados homozigotos, homólogos submetacêntricos com blocos de rDNA 18S de mesmo tamanho. Barra: 5 μ m.

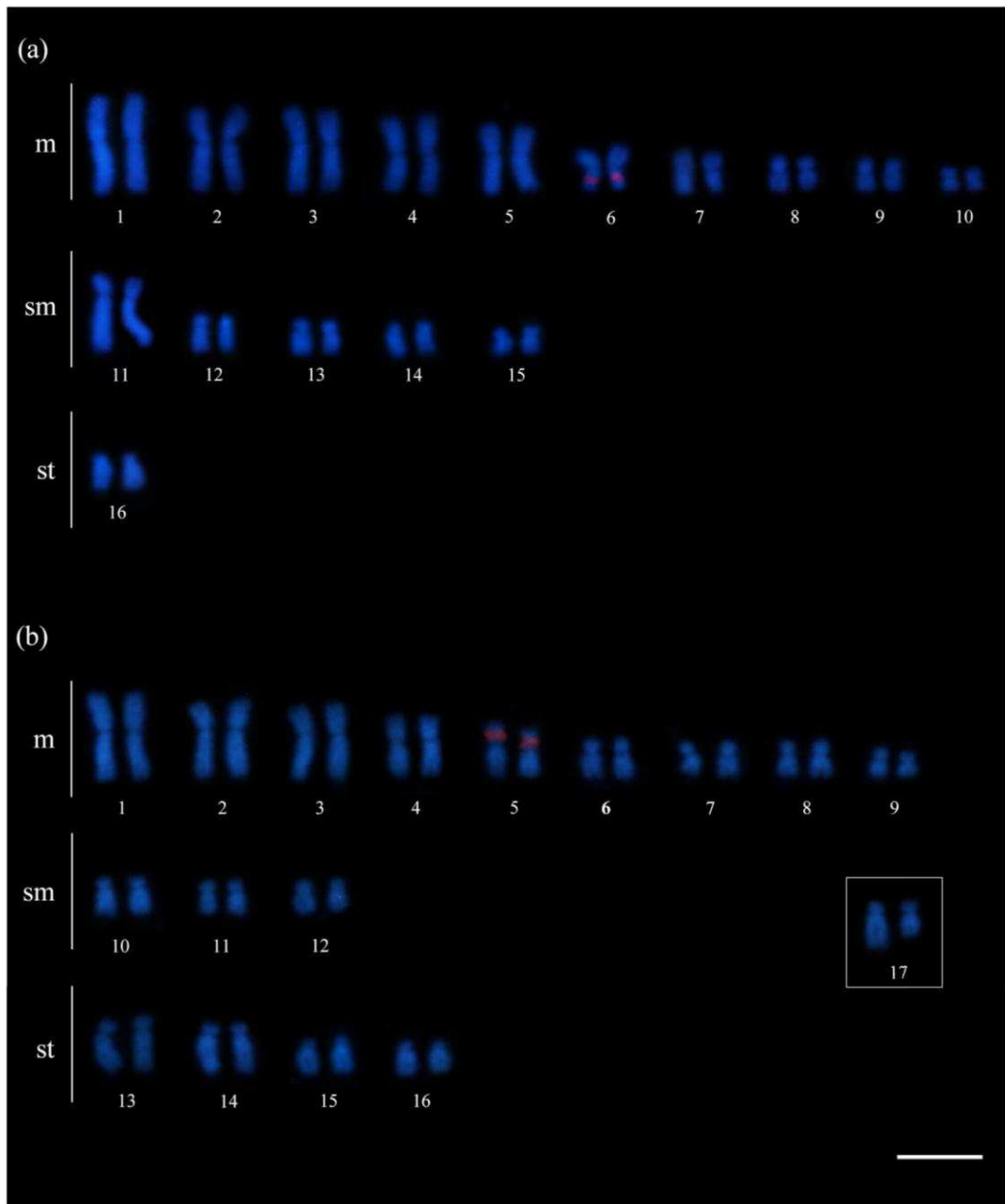


Figura 11 - Cariótipos de fêmeas de *Gnampptogenys striatula* de (a) Rio de Janeiro (RJ) ($2n=32$) e (b) Petrópolis (RJ) ($2n=34$) submetidas à técnica de FISH com sonda para rDNA 18S (blocos vermelhos). Caixa mostra o par cromossômico 17 no estado heterozigoto não carreador dos genes ribossomais 18S. Barra: 5 μ m.

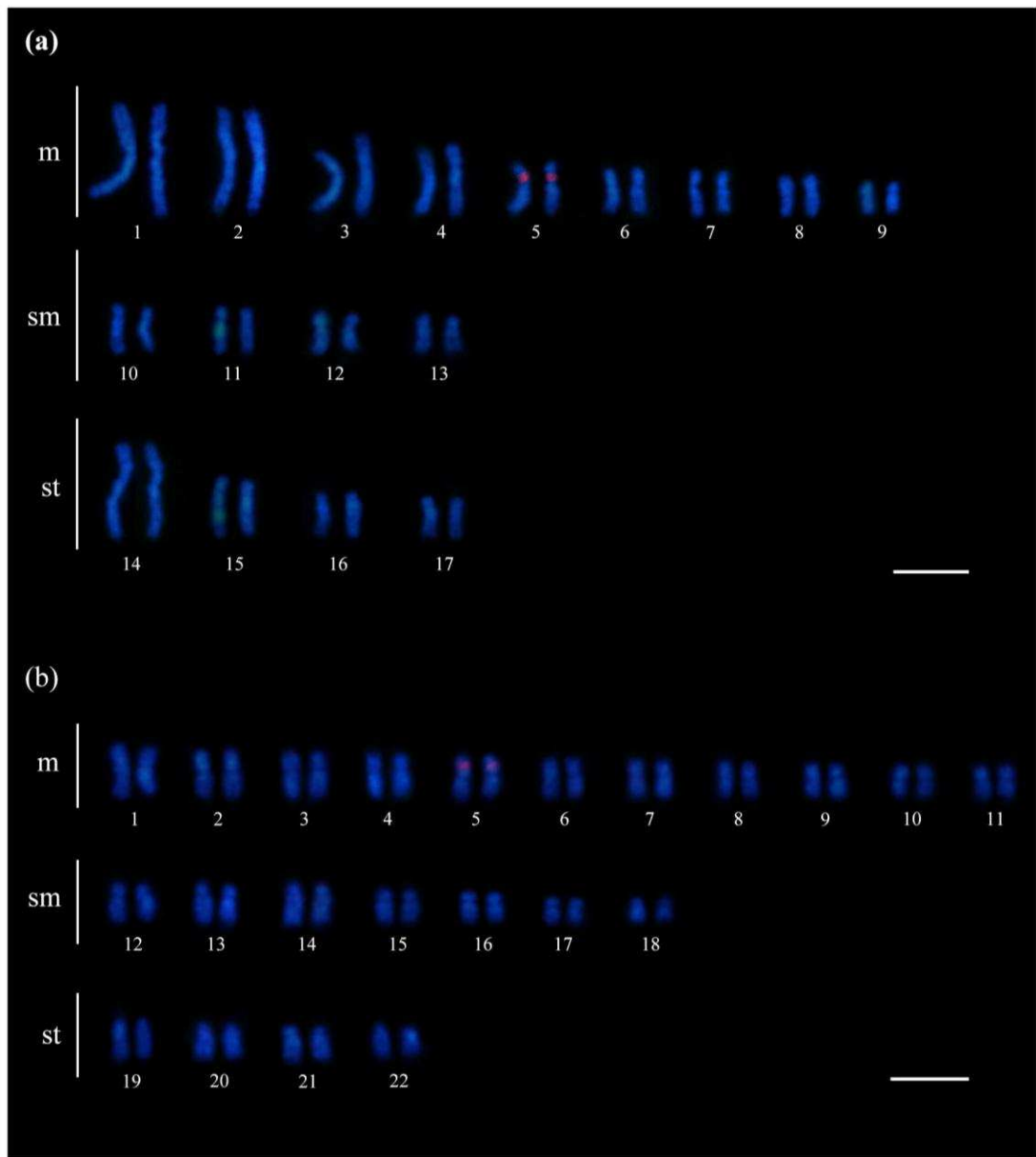


Figura 12 - Cariótipos de fêmeas de *Gnampptogenys moelleri* de (a) Petrópolis (RJ) (2n=34) e (b) Açailândia (MA) (2n=44), submetidas a técnica de FISH com sonda para rDNA 18S (blocos vermelhos). Barra: 5 μm.

CONCLUSÕES GERAIS

O presente estudo permitiu concluir que:

- Todas as 14 espécies de formigas neotropicais estudadas, que incluíram representantes de quatro subfamílias (Ponerinae, Ectatominae, Formicinae e Myrmicinae) apresentaram apenas um par cromossômico carreador dos genes ribossomais 18S;

- Em todas as 14 espécies de formigas neotropicais estudadas, as regiões de genes rDNA 18S coincidiram com as regiões positivas ao fluorocromo CMA₃, evidenciando que esses genes são ricos em pares de bases GC;

- Um sutil heteromorfismo de regiões de genes ribossomais 18S foi observado em *Camponotus atriceps* e *Wasmannia auropunctata* e podem ter sido originados de um pequeno número de duplicações/deleções devido à crossing-over desigual;

- A localização dos genes ribossomais na região pericentromérica em um par cromossômico metacêntrico observada tanto em *Myrmicocrypta* sp. e em *Mycocepurus goeldi* (Barros et al. 2012), espécies consideradas menos derivadas entre as formigas cultivadoras de fungos, pode ser um caráter ancestral nesse grupo de formigas;

- *Acromyrmex echinator* apresentou os genes rDNA 18S na região intersticial do braço curto do maior par subtelocêntrico, o que coincidiu com as regiões CMA₃⁺ observadas por Barros et al. (2016), e confirma a ocorrência do rearranjo do tipo inversão paracêntrica em *Acromyrmex*;

- Polimorfismos cromossômicos envolvendo regiões de rDNA 18S foram observados em *Odontomachus bauri* e em *Gnamptogenys regularis*. Rearranjos como duplicações/deleções nessas sequências cromossômicas repetitivas podem ter originado esses polimorfismos cromossômicos nessas duas espécies. Esses dados de polimorfismos envolvendo regiões de genes ribossomais são inéditos em formigas.

- Um polimorfismo de tamanho no braço longo do par cromossômico 17 foi observado em *Gnamptogenys striatula* de Petrópolis-RJ. Foram encontrados indivíduos heterozigotos (dois cromossomos submetacêntricos pequenos) e indivíduos com uma das formas homozigotas (um cromossomo pequeno submetacêntrico e um cromossomo maior subtelocêntrico). Rearranjos do tipo

duplicações devido à permuta gênica desigual ou translocação podem ter originado esse polimorfismo cromossômico;

- Embora *Gnamptogenys moelleri* apresente caracteres morfológicos bem definidos, a população de Açailândia apresentou variações cromossômicas (número, morfologia e par cromossômico carreador das regiões de genes ribossomais 18S) em relação às de Viçosa e Petrópolis, o que sugere que essas sejam espécies crípticas;

- Foi possível diferenciar citogeneticamente duas populações de *Gnamptogenys striatula* (Rio de Janeiro – RJ e Petrópolis – RJ) por meio do número e morfologia cromossômica, par cromossômico carreador das regiões de genes ribossomais 18S, ricas em pares de bases GC. Isso demonstra que a citogenética, clássica e molecular, pode ser uma ferramenta auxiliar na resolução taxonômica dessa espécie.