

LINDA INÊS SILVEIRA

**CITOGENÉTICA CLÁSSICA E MOLECULAR EM FORMIGAS DO GÊNERO
Crematogaster LUND 1831 (FORMICIDAE: HYMENOPTERA) COM SONDAS
ESPECÍFICAS E DE DNA REPETITIVO**

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

Orientador: Jorge Abdala Dergam dos Santos

Coorientador: Hilton Jeferson A. C. de Aguiar

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

S587c
2022
Silveira, Linda Inês, 1991-
Citogenética clássica e molecular em formigas do gênero
Crematogaster lund 1831 (Formicidae: Hymenoptera) com
sondas específicas e de DNA repetitivo / Linda Inês Silveira. –
Viçosa, MG, 2022.

1 dissertação eletrônica (60 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Jorge Abdala Dergam dos Santos.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Biologia Animal, 2022.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.441>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Formicidae. 2. Formigas - Citogenética.
3. Microssatélites (Genética). 4. DNA recombinante. 5. Formigas
- Amazônia. I. Santos, Jorge Abdala Dergam dos, 1958-.
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia
Animal. Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal.
III. Título.

CDD 22. ed. 595.796

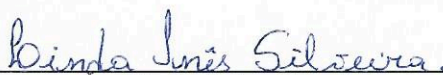
LINDA INÊS SILVEIRA

**CITOGENÉTICA CLÁSSICA E MOLECULAR EM FORMIGAS DO GÊNERO
Crematogaster LUND 1831 (FORMICIDAE: HYMENOPTERA) COM SONDAS
ESPECÍFICAS E DE DNA REPETITIVO**

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

APROVADA: 06 de maio de 2022.

Assentimento:



Linda Inês Silveira
Autora



Jorge Abdala Dergam dos Santos
Orientador

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre me proteger e me dar forças e coragem para enfrentar as dificuldades da vida.

Aos professores Hilton Aguiar (co-orientador) e Luísa Antônia Campos Barros por me guiarem nessa trajetória, por sempre acreditarem em meu potencial, pelo acompanhamento constante, paciência, confiança, amizade ao longo de todos esses anos.

Ao Prof. Jorge Abdala Dergam dos Santos, por aceitar me orientar nessa jornada. Muito obrigada, pela oportunidade e confiança.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao grupo do laboratório de formigas do Campus Binacional de Oiapoque-AP, em especial ao Paulo Castro e Rodrigo Lod por me ajudarem com as coletas,

A Gisele Amaro Teixeira, por sempre se disponibilizar a me ajudar, ensinar e acompanhar no que fosse preciso durante o mestrado. Creio que sem a ajuda dela teria sido bem mais difícil. Obrigada!

À professora Denilce Meneses Lopes, que gentilmente cedeu algumas sondas para que viesse a prosseguir com a pesquisa.

Ao Dr. Jacques Hubert Charles Delabie, pela identificação das espécies.

À Lorene Carla Reis, por me acolher tanto no Beagle, por sempre me animar e incentivar.

A Natália Travenzoli e Fernanda Dias, pelas dicas e disponibilidade.

RESUMO

SILVEIRA, Linda Inês, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2022. **Citogenética clássica e molecular em formigas do gênero *Crematogaster* Lund 1831 (Formicidae: Hymenoptera) com sondas específicas e de DNA repetitivo.** Orientador: Jorge Abdala Dergam dos Santos. Coorientador: Hilton Jeferson Alves Cardoso de Aguiar.

As formigas do gênero *Crematogaster* são amplamente distribuídas, mas atingem sua maior diversidade e abundância em regiões tropicais e subtropicais. Esse gênero representa um grupo monofilético, facilmente reconhecível devido a configuração apomórfica do pós-pecíolo e gáster e é o terceiro maior gênero de formigas, com 773 espécies válidas. *Crematogaster* apresenta alta variabilidade morfológica intraespecífica, o que exige um grande esforço para a identificação das espécies. Citogeneticamente, há dados para 18 morfoespécies de *Crematogaster* com variação cromossômica de $2n= 24-58$. Estudos citogenéticos direcionados ao rDNA e as sequências microssatélites têm auxiliado na compreensão da evolução cromossômica, resolução taxonômica e filogenética em Formicidae. Nesse contexto, o presente estudo teve por objetivo mapear a configuração de regiões específicas de DNA no genoma de espécies de formigas *Crematogaster*, buscando padrões e insights que indiquem mecanismos recorrentes de rearranjos cromossômicos entre as espécies desse gênero. Foram aplicadas nos cromossomos metafásicos de cinco espécies desse gênero a técnica convencional para análise cromossômica (Giemsa), FISH para mapeamento de rDNA 18S e investigação de padrões de marcação de microssatélites. Das colônias analisadas, duas pertencem à *C. erecta* ($2n=22$) (denominada aqui de citótipo I e II). Foram analisadas também *Crematogaster* aff. *erecta* ($2n=28$), *C. tenuicula* ($2n=38$), *C. limata* ($2n=38$) e *Crematogaster* sp.1 ($2n=38$). Todas as espécies analisadas apresentaram um par cromossômico portador rDNA 18S na região intracromossômica. Foi observado heteromorfismo de tamanho de NOR em *C. erecta* citótipo I. *C. tenuicula* apresentou blocos AT-positivos. O padrão disperso do microssatélite (GA)₁₅ nos dois braços cromossômicos de *Crematogaster* sugere que a configuração cariotípica do gênero deve-se a rearranjos cromossômicos do tipo fissões cêntricas seguidas por inversões. Os telômeros das espécies de *Crematogaster* se mostraram ricos com a sequência (TTAGG)₆ em ambas as

extremidades, o padrão observado em Formicidae. A sequência (TCAGG)₆ foi observada nos telômeros de duas espécies de *Crematogaster* estudadas e são inéditos em Formicidae. A sequência (TCAGG)₆ foi observada em região centromérica na espécie *C. erecta* citótipo I, o que sugere que fusões podem estar envolvidas na evolução do gênero. Embora as duas colônias de *C. erecta* sejam morfologicamente indistinguíveis, elas apresentam variações citogenéticas na morfologia dos cromossomos e padrões de NOR e microssatélites, sugerindo a possibilidade da existência de potenciais espécies crípticas na região estudada. Os dados citogenéticos moleculares do presente estudo são inéditos em *Crematogaster* e mostram claramente o seu potencial na contribuição de futuras discussões relacionadas à evolução cromossômica desse gênero de formigas.

Palavras-chave: Formicidae. Microssatélites. rDNA. Amazônia.

ABSTRACT

SILVEIRA, Linda Inês, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May, 2022. **Classical and molecular cytogenetics in ants of the genus *Crematogaster* lund 1831 (Formicidae: Hymenoptera) with specific and repetitive DNA probes.** Adviser: Jorge Abdala Dergam dos Santos. Co-Adviser: Hilton Jeferson Alves Cardoso de Aguiar.

Crematogaster ants are widely distributed and they reach the apex of their diversity and abundance in tropical and subtropical regions. *Crematogaster* is the third largest genus of ants, with 773 valid species and is a monophyletic group easily recognizable due to the post-petiole and gaster configuration considered to be apomorphic. *Crematogaster* species have high intraspecific morphological variability, requiring large taxonomic efforts for species delimitation. 18 *Crematogaster* morphospecies have some kind of cytogenetic information, with chromosomal variation ranging from $2n=24$ to $2n=58$. Cytogenetic studies including physical mapping of rDNA and different microsatellites allowed better understanding of chromosomal evolution, taxonomic issues and phylogenetic resolution within Formicidae. In this context, the present study focused on physically mapping specific regions of DNA in the genome of *Crematogaster* ant species, seeking patterns and insights that indicate recurrent mechanisms of chromosomal rearrangements among species of this genus. Conventional technique for chromosomal analysis (Giemsa), FISH for 18S rDNA mapping and investigation of microsatellite labeling patterns were used. Of the analyzed species, two belong to the species *C. erecta* ($2n=22$) with two different cytotypes (I and II). *Crematogaster* aff. *erecta* ($2n=28$), *C. tenuicula* ($2n=38$), *C. limata* ($2n=38$) and *Crematogaster* sp.1 ($2n=38$). All species analyzed presented a chromosomal pair carrying 18S rDNA in the intrachromosomal region. A size heteromorphism of NOR was observed in *C. erecta* cytotype I. *C. tenuicula* showed AT-positive blocks. The scattered pattern of the microsatellite (GA)₁₅ in the two chromosome arms of *Crematogaster* suggests that the karyotypic configuration of the genus is due to chromosomal rearrangements of the centric fission type followed by inversions. The telomeres of *Crematogaster* species were expectadely rich with the (TTAGG)₆ sequence at both ends: a common pattern observed in Formicidae. However the sequence (TCAGG)₆ was observed in the telomeres of two species of

Crematogaster studied and is unprecedented in Formicidae. The sequence (TCAGG)₆ was observed in a centromeric region in the species *C. erecta* cytotype I, which suggests that fusions may be involved in the evolution of the genus. The two colonies of *C. erecta* are morphologically indistinguishable, however they present cytogenetic variations such as morphological differences, NOR locality, and microsatellite pattern, suggesting the possibility of potential cryptic species. The molecular cytogenetic data of the present study are unprecedented in *Crematogaster* and will contribute to future discussions related to the chromosomal evolution of this extremely complex ant genus.

Keywords: Formicidae. Microsatellites. rDNA. Amazon.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	9
1.1 Família Formicidae	9
1.2 Gênero <i>Crematogaster</i>	9
1.3 Citogenética clássica e molecular	11
1.4 rDNA e Microsatélites	13
1.5 Citogenética clássica e molecular de Formicidae	16
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	18
2. OBJETIVOS.....	29
2.1 Objetivos gerais	29
2.2 Objetivos específicos	29
1. INTRODUÇÃO	31
2. MATERIAIS E MÉTODOS	33
2.1 Análise citogenética clássica	33
2.2 Análise de citogenética molecular	34
3. RESULTADOS.....	35
4. DISCUSSÃO	42
5. CONCLUSÕES.....	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Família Formicidae

As formigas (Hymenoptera: Formicidae) estão presentes em todos os ambientes terrestres, com exceção dos pólos (Hölldobler & Wilson, 1990) e são responsáveis por 15 a 20% da biomassa animal terrestre, sendo as regiões tropicais aquelas onde estes insetos apresentam maior abundância e diversidade, ocupando 25% ou mais da massa animal (Schultz, 2000). A diversificação das espécies de formigas também chama a atenção pela sua forte relação com espécies vegetais (Moreau et al. 2006). Existem 14.064 espécies de formigas descritas, distribuídas em 17 subfamílias e 340 gêneros (Bolton, 2022). Deste total, estão presentes na região neotropical 14 subfamílias e 157 gêneros (Bolton, 2021).

Esses insetos são polimórficos e em algumas espécies essa diferença morfológica é muito evidente, como nas formigas dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* (Fernandez, 2003; Della Lucia et al., 2014; Baccaro et al., 2015) ao passo em que há espécies que possuem operárias monomórficas (Gullan & Cranston, 2012). Os autores explicam ainda, que dentro da colônia há o dimorfismo entre operárias, rainhas, gine e os machos (os dois últimos geralmente são alados).

As formigas, assim como todos os insetos himenópteros, possuem um sistema genético de determinação sexual haplodiploide, no qual as fêmeas são produzidas a partir de ovos fertilizados (diploides) e os machos a partir de ovos não fertilizados (haploides), ou seja, os machos recebem apenas os genes maternos, enquanto que as fêmeas herdam os genes de ambos os pais (Palomeque et al., 1990; Lorite & Palomeque, 2010). Há sistema de castas especializadas com sobreposição de gerações e cooperação entre os os membros que são divididos em reprodutoras e não reprodutoras e machos (Wilson & Hölldobler, 2005). Por este motivo, Gullan & Cranston (2012) atribuem à eusocialidade a chave para o sucesso ecológico desses insetos.

1.2 Gênero Crematogaster

O gênero *Crematogaster* Lund (1831) é o terceiro maior gênero de formigas (Hölldobler & Wilson, 1990; Blaimer, 2012a; Blaimer, 2012c) dentro da maior subfamília, Myrmicinae (Hölldobler & Wilson, 1990; Ward, 2010), pertencem a tribo Crematogastrini (Longino, 2003) e possuem 15 subgêneros dos quais apenas *Oxygyne* e *Atopogyne* são monofiléticos (Blaimer, 2012d). Atualmente, compreendem 515 espécies válidas (Bolton, 2022). Com distribuição global, as espécies desse gênero estão presentes na maioria dos habitats como florestas úmidas e savanas, mas atingem sua maior diversidade e abundância em regiões de clima tropical e subtropical, onde formam elementos dominantes da fauna arbórea (Wheeler, 1986; Blaimer, 2012b; Peeters et al., 2013).

A maioria das espécies de *Crematogaster* tropicais são arbóreas, nidificam tipicamente em árvores, galhos mortos ou galhos no dossel, troncos podres no chão, sob casca e copas de árvores ou musgo (Casevitz-Weulersse, 1972; Santini et al., 2007; Quinet et al., 2009; Santini et al., 2011; Blaimer, 2010, Blaimer, 2012c). Usualmente, exercem uma associação mutualística com plantas hospedeiras (Feldhaar et al., 2003; Fernandez, 2003; Peeters et al., 2013). Algumas espécies tropicais e de zonas temperadas fazem seus ninhos no solo (Wheeler 1906; Hosoishi et al., 2010), outras em serrapilheira, como a *Crematogaster sotobosque* cujas operárias forrageiam durante o dia em vegetação rasteira e são moderadamente abundantes em floresta úmida de planície (Longino, 2003).

As formigas do gênero *Crematogaster* são forrageadores generalistas e onívoras, recrutam outras companheiras de ninho ao detectarem isca de açúcar ou proteínas e raramente atacam presas vivas (Longino, 2003). Além de capturarem presas muito grandes, são capazes de atacar e se alimentar coletivamente, graças ao recrutamento de curto prazo (Richard et al., 2001). Devido ao comportamento agressivo, territorialista e a natureza populosa, as *Crematogaster* exibem potencial significativo para atuar no controle biológico (Adgaba et al., 2014; Kamiyama et al., 2021).

Crematogaster é um gênero monofilético (Longino, 2003; Blaimer, 2012a) e reconhecível pela configuração apomórfica do pós-pecíolo e gáster (Longino, 2003, Blaimer et al., 2018). Usualmente, o gáster das espécies de *Crematogaster* tem sua estrutura que se assemelha a uma gota (Longino, 2003). As formigas operárias deste gênero são facilmente reconhecíveis por algumas características morfológicas únicas

(Fernandez, 2003). Entre elas estão a fixação dorsal do pós-pecíolo ao 4º segmento abdominal e a ausência de nó peciolar (Longino, 2003). Essas características conferem a estas formigas a capacidade de flexionar o gáster para frente sobre o mesossoma, dando a esse gênero o apelido de “formigas acrobatas”, sendo essa uma postura defensiva (Buren, 1959; Blaimer, 2012a; Blaimer, 2012c). Uma outra característica morfológica do gênero é sua picada espatulada, usada para a aplicação do veneno por contato e não por injeção (Buren, 1959; Marlier, 2004).

A taxonomia de *Crematogaster* exige um grande esforço (Ward, 2007; Blaimer, 2010), devido à alta variabilidade morfológica intraespecífica (Longino, 2003; Blaimer, 2010). Alguns taxonomistas sugerem que o gênero está fortemente sobrecarregado de sinônimas (Blaimer, 2012d; Hosoiishi e Ogata, 2009), especialmente em espécies que variam geograficamente e apresentam variação na morfologia, como tamanho ou coloração (Ward, 2010). De acordo com Longino (2003); Ward (2007, 2010) podem ser observados níveis de desorganização na nomenclatura das espécies do gênero *Crematogaster*.

As castas das espécies desse gênero podem ser consideradas monomórficas ou exibir algum nível de polimorfismo (Longino, 2003), ou seja, as castas podem apresentar caracteres morfológicos sutis. Além das castas das operárias e rainha, *Crematogaster* pode apresentar uma terceira casta, os chamados “intermediários”, que possuem morfologia e comportamento especializados para a produção de ovos tróficos, principal fonte de proteína para as larvas (Heinze et al., 1991; Peeters et al., 2013). Esse caso é especialmente observado em larvas de *C. smithi* que não se alimentam de itens sólidos que não sejam ovos e raramente recebem alimentos líquidos via trofalaxia (Heinze et al., 1999).

1.3 Citogenética clássica e molecular

A partir dos trabalhos citológicos principalmente de Sutton (1903) e Boveri (1904) por volta de 1900 (apud Guerra, 1988), a citogenética passou a ser reconhecida como ciência. A citogenética é a ciência proveniente da união dos conhecimentos citológicos e genéticos, que consiste em estudar os cromossomos, abrangendo tanto número, morfologia, organização, função, quanto variação e evolução cariotípica (Guerra, 1988).

Os estudos de citogenética clássica estão relacionados à análise de cromossomos mitóticos, atuando em uma fase específica da divisão celular, a metáfase (Chauffaille, 2005), sendo a fase em que os cromossomos se encontram altamente condensados (Alberts et al., 2011). Esses cromossomos podem ser evidenciados utilizando corantes como Giemsa, e bandamentos transversais como a banda C para detecção de heterocromatina (Sumner, 2003) e a banda NOR para determinação de posição e número de regiões organizadoras de nucléolos com precipitação de nitrato de prata (Howell & Black, 1980). Os parâmetros utilizados na citogenética clássica são número, morfologia e estrutura cromossômica através do pareamento e montagem do cariótipo (Guerra, 1988).

De forma complementar, a citogenética molecular visa a detecção de regiões homólogas dos cromossomos com o uso da hibridização *in situ* fluorescente (FISH), com o uso de sondas marcadas com fluorocromos, que hibridizam com sequências específicas do DNA/RNA-alvo, para verificar a presença e a localização de uma dada sequência de DNA no genoma da espécie estudada (Guerra, 2004). A técnica de FISH consiste em desnaturar e renaturar a dupla hélice de DNA cromossômico. Caso durante a renaturação houver sonda específica disponível, esta poderá se ligar as regiões complementares do DNA-alvo, concluindo o processo de hibridização, e o sinal será detectado em microscópio de fluorescência (Levsky & Singer, 2003; Guerra, 2004).

A técnica de FISH, tem ampliado a capacidade de detectar alterações cromossômicas (Chauffaille, 2005). O mapeamento cromossômico físico por FISH constitui uma estratégia rápida e fácil para determinar a abundância e distribuição cromossômica de sequências alvo que indicam padrões evolutivos e permitem discussões a respeito da evolução do cariótipo de um dado grupo (Guerra, 2004). O uso da técnica FISH, associado ao sondas baseadas em sequências de microssatélites e outras sequências repetitivas são úteis, pois podem fornecer meios para compreender a disposição de agrupamentos de genes no cariótipo (Ruiz-Ruano et al., 2014). Dessa forma, fornece dados para questões relacionadas à estrutura do genoma e evolução de diferentes grupos (Schneider et al., 2015; Cunha et al., 2016; Peixoto et al., 2016; Travenzoli et al., 2019).

Análises cariológicas mostram-se de fundamental importância para realizar comparações entre espécies diferentes ou analisar variações intraespecíficas,

(Guerra, 1988; Loiselle et al., 1990). É possível também caracterizar novas espécies (Imai et al. 1994), comparar populações e espécies simpátricas (Mariano et al., 2012) e auxiliar na separação de espécies crípticas (espécies morfológicamente idênticas) (Guerra, 1988). Nesse contexto, a citogenética que fornece informações não observáveis a nível morfológico (Mariano, 2004), quando associada a uma identificação que é baseada tipicamente em traços morfológicos, que podem ou não ser alteradas ao longo do tempo pela pressão seletiva exercida pelo meio ambiente, a qual cada espécie é submetida (Barros et al., 2014). No entanto, são úteis para estudos filogenéticos, taxonômicos e evolutivos (Lorite & Palomeque, 2010; Barros et al., 2015; Aguiar et al., 2017).

1.4 rDNA e Microssatélites

O genoma dos eucariotos contém grandes quantidades de DNA repetitivo, classificado em sequências moderadamente ou altamente repetitivas de acordo com o grau de repetitividade (Britten & Kohne, 1968). Essas regiões de DNA repetitivo também podem ser agrupadas através dos critérios de organização (em conjunto/tandem ou disperso) ou de acordo com seu papel funcional (Lopez-Florez & Garrido-Ramos, 2012).

Entre os DNAs repetitivos *in tandem*, há DNAs moderadamente repetitivos, como RNA ribossômico (rRNA) (Lopez-Florez & Garrido-Ramos, 2012). Os genes de rRNA estão presentes em uma ou centenas de cópias no genoma (Hadjiolov, 1985) e estão agrupados nas células mitóticas nas regiões organizadoras de nucléolos (NORs) em um ou mais cromossomos (Roussel et al., 1996; Lopez-Florez & Garrido-Ramos, 2012). Durante a mitose, os agrupamentos de genes de rRNA são geralmente vistos na maioria dos casos, como constrições secundárias nos respectivos cromossomos, as quais durante a mitose em um ou alguns cromossomos, são os locais de formação do nucléolo na telófase (Hadjiolov, 1985).

Nas células eucarióticas durante a intérfase, os nucléolos são os locais de transcrição de rDNA, processamento de rRNA e montagem de ribossomos (Warner, 1990; Hadjiolov, 1985). Para a maioria dos organismos, cada cópia do gene rDNA 45S é constituída de uma subunidade pequena 18S, uma subunidade grande 28S, e o gene 5.8S, bem como dois espaçadores externos transcritos cercado os 18S e 28S,

dois espaçadores internos transcritos entre os genes e um espaçador intergênico grande e não transcrito. Há também a região do promotor, que possui duas sequências relevantes, o elemento de controle a jusante e o núcleo promotor (Hillis & Dixon, 1991; Raska et al. 2004; Nei & Rooney, 2005; Lopez-Florez & Garrido-Ramos, 2012). Os ribossomos são compostos por duas subunidades principais, a subunidade pequena (40S) composta pelo rRNA 18S juntamente com 32 proteínas que em eucariotos contêm apenas um tipo de rRNA e a subunidade maior (60S) com três tipos de rRNA, 20S, 5.8S e 5S com 47 proteínas cada uma com rRNAs distintos e proteínas ribossômicas (Hillis & Dixon, 1991; Xue & Barna 2012). Três dos quatro tipos de RNA ribossômico 18S, 5.8S e 28S são transcritos pela RNA polimerase I (Xue & Barna 2012). Enquanto o quarto rRNA, 5S, é transcrito por polimerase III (Hadjiolov, 1985; Raska et al. 2004; Xue & Barna, 2012)

O RNA ribossomal 18S da subunidade menor do ribossomo de eucariotos é um dos genes mais frequentemente usados em estudos filogenéticos, pois possui as sequências de evolução mais lentas encontradas em todos os organismos vivos (Hillis & Dixon, 1991; Anne, 2006). Em geral o rDNA é útil para análises filogenéticas devido às suas diferentes regiões de unidade de repetição que evoluem em taxas muito diferentes (Kocher et al., 1989). Além de serem sequências altamente conservadas dentro da maioria dos genes rRNA, podem ser usadas para construção de primers universais para sequenciamento de rRNA e rDNA (Kocher et al., 1989). Podendo também serem usadas para amplificação de regiões de interesse, através da reação em cadeia da polimerase (PCR), devido ao seu arranjo repetitivo dentro do genoma, fornece quantidades excessivas de DNA para PCR, mesmo em organismos menores (Meyer et al., 2010) ou para análise de enzimas de restrição (Kocher et al., 1989).

As sequências nucleotídicas das regiões codificadoras de rRNA são quase idênticas entre espécies intimamente relacionadas e são semelhantes mesmo entre espécies distantes (Lopez-Florez & Garrido-Ramos, 2012). Desse modo o gene rRNA 18S é um marcador molecular importante, amplamente utilizado em inferências filogenéticas, análises moleculares para reconstruir a história evolutiva dos organismos (Hillis & Dixon, 1991; Meyer et al., 2010).

No outro extremo da taxa de variação, os microssatélites ou repetições simples de sequência (SSRs) são repetições *in tandem* curtas, com menos de 9 nucleotídeos distribuídos nos cromossomos (Cuadrado & Jouve, 2007; Lopez-Florez & Garrido-

Ramos, 2012; Schemberger et al., 2014; Abad et al., 2014) ocorre com frequência no genoma de eucariotos e procariotos (Jentzsch et al., 2008). Os microssatélites podem ser encontrados tanto nas regiões de codificação de proteínas quanto na região de não codificação, incluindo sequências regulatórias (Lopez-Florez & Garrido-Ramos, 2012; Li et al., 2004). A distribuição de microssatélites é altamente variável nos genomas das espécies e estes podem ser encontrados em regiões específicas ou dispersos pelos cromossomos, de forma não aleatória (Li et al., 2004; Hatanaka et al., 2002; Cuadrado & Jouve, 2007; Jentzsch et al., 2008). Os microssatélites são altamente polimórficos tanto entre populações, quanto dentro de uma mesma população e, portanto, podem oferecer uma fonte de informação para uma compreensão mais completa de estrutura populacional (Hatanaka et al., 2002; Cuadrado & Jouve, 2007; Jentzsch et al., 2008).

Os dinucleotídeos são o principal tipo de repetições de microssatélites para muitas espécies (Jentzsch et al., 2008; Lopez-Florez & Garrido-Ramos, 2012). O tipo mais comum de repetição de dinucleotídeo no genoma de algumas espécies de invertebrados são os $(CT)_n / (GA)_n$ (Estoup et al., 1993; Naciri et al., 1995).

Os microssatélites contendo unidades de repetição mais longas (os tetranucleotídeos) tendem a evoluir mais rapidamente do que aqueles que contêm unidades mais curtas, devido ao reparo relativamente ineficiente durante o processo celular (Lopez-Florez & Garrido-Ramos, 2012). A taxa de mutação dos microssatélites é 10 a 100.000 vezes maior que a taxa de mutação em outra parte do genoma (Gemayel et al., 2010). As mutações não são apenas mutações pontuais, mas também estão relacionadas à variação no número de repetições em cada locus dos microssatélites, pois os diferentes indivíduos em uma população diferem em número de repetição em cada locus de microssatélites (Lopez-Florez & Garrido-Ramos, 2012). Ou seja, é devido à variação no número de unidades repetidas que os microssatélites são altamente polimórficos (Lopez-Florez & Garrido-Ramos, 2012; Schneider et al., 2015; Li et al., 2004). Esta característica os tornam uma fonte de informações para estudos de genética evolutiva através de mapeamento genético (Hatanaka et al., 2002). Os microssatélites dentro dos genes evoluem através de processos mutacionais semelhantes aos localizados em outras regiões genômicas, incluindo desvio de replicação, mutação pontual e recombinação (Li et al., 2004).

Os microssatélites são instáveis e as taxas de mutação variam entre as diferentes sondas, e isso irá depender do número de unidades repetidas, pureza e o comprimento da unidade de repetição (Lopez-Florez & Garrido-Ramos, 2012). Além do mais, a evolução dos microssatélites nos genes codificadores e regiões reguladoras devem compartilhar processos mutacionais semelhantes aos microssatélites em regiões não transcritas (Li et al., 2004).

A maioria dos microssatélites em um genoma pode não ter uma função definida, mas a variação em microssatélites é gerada constantemente e estes constituem um rico reservatório de variação genética, pois é essa variação intrínseca dentro dessas sequências, tanto em região funcional quanto regiões não funcionais, que fundamenta a importância evolutiva dos microssatélites (Li et al., 2004; Jentzsch et al., 2008).

De acordo com Lopez-Florez & Garrido-Ramos (2012), essas características inerentes aos microssatélites, bem como sua evolução, fornecem informações para estimativas dos níveis de variabilidade e diversidade genética entre populações, número de alelos por locus, frequências alélicas, distância genética entre populações ou entre indivíduos de uma mesma população, assim como informações para análise filogenéticas.

1.5 Citogenética clássica e molecular de Formicidae

Dados citogenéticos já foram publicados em mais de 800 espécies de formigas (Lorite & Palomeque, 2010; Mariano et al., 2015, 2019; Aguiar et al., 2020; Teixeira et al., 2020; 2021; Barros et al., 2021a, b) com variação no número cromossômico de $2n=2$ em *Myrmecia croslandi* (Myrmeciinae) (Taylor, 1991) a $2n=120$ em *Dinoponera lucida* (Ponerinae) (Emery, 1901) (Mariano et al. 2008). A subfamília Myrmicinae é aquela com o maior número de espécies descritas (Bolton, 2022) e também possui o maior número de espécies já analisadas citogeneticamente (Lorite & Palomeque, 2010). No entanto, análises citogenéticas em Formicidae não são igualmente distribuídas entre as subfamílias e gêneros, e a maioria dessas análises diz respeito somente a número e morfologia cromossômica (Lorite & Palomeque, 2010; Mariano et al., 2019).

O mapeamento físico de genes de rDNA para Formicidae utilizando a técnica de FISH foi descrito pela primeira vez em formigas australianas por Hirai et al., (1994,1996). Atualmente, estão disponíveis dados para 19 gêneros de formigas que tiveram seu genes ribossomais mapeados: *Myrmecia* Fabricius, 1804 (Hirai et al., 1994,1996); *Tapinoma* Foerster, 1850 (Lorite et al., 1997); *Dinoponera* Roger, 1861; (Mariano et al., 2008; Aguiar et al., 2011); *Mycetophylax* Emery, 1913 (Barros et al., 2010, 2012; Cardoso et al., 2014; Micolino et al., 2019a); *Anochetus* Mayr, 1861 (Santos et al., 2010; Teixeira et al., 2021); *Acromyrmex* Mayr, 1865 (Cristiano et al., 2013; Barros et al. 2016; 2021a; Teixeira et al., 2017, 2021); *Atta* Fabricius, 1804 (Barros et al., 2014, 2015, Teixeira et al., 2017); *Dolichoderus* Lund, 1831 (Santos et al., 2016); *Camponotus* Mayr, 1861 (Aguiar et al., 2017; Teixeira et al., 2021); *Mycetomoellerius* Solomon, Rabeling, Sosa-Calvo & Schultz, 2019 (Barros et al., 2018. Publicada como *Trachymyrmex*); *Gnamptogenys* Roger, 1863 (Teixeira et al., 2020, 2021); *Crematogaster* Lundi, 1831; *Gigantiops* Roger, 1863; *Myrmicocrypta* Smith, F., 1860; *Odontomachus* Latreille, 1804; *Pheidole* Westwood, 1839; *Pseudoponera* Emery, 1900; *Solenopsis* Westwood, 1840 (Teixeira et al., 2021) e *Strumigenys* Smith, F., 1860; (Teixeira et al., 2021; Barros et al., 2021).

Dados citogenéticos disponíveis na literatura relacionados ao mapeamento de genes de rDNA, mostram que para todas a formigas neotropicais que tiveram seus genes ribossomais mapeados, foi observado a presença de apenas um único par de cromossomos portador de genes rRNA 18S (Mariano et al. 2008; Santos et al. 2010, 2016; Barros et al. 2012, 2015, 2016, 2018, 2020, 2021a, b; Teixeira et al., 2017, 2020, 2021, Aguiar, 2017, 2020), com exceção de *Dinoponera gigantea* Perty, 1833 e *Camponotus renggeri* Emery, 1894 (Aguiar et al., 2011, 2017) respectivamente.

Estudos citogenéticos moleculares sobre genes de rDNA e a utilização de microssatélites em formigas têm auxiliado na compreensão da evolução cromossômica, filogenia e resoluções taxonômicas fornecidas para diferentes grupos de formigas (Hirai et al., 1994, 1996; Santos et al., 2010, 2016), pois os rDNA são utilizadas como marcadores genéticos moleculares, permitindo comparações entre táxons distantes (Teixeira et al., 2021), assim como auxiliam na compreensão de problemáticas envolvendo complexos de espécies (Teixeira et al., 2017, Barros et al., 2021b).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abad, A. C. A.; Araújo, L. F.; Junior, J. W. P.; Mota, R. A. (2014). Marcadores moleculares e suas aplicações nas pesquisas com animais. *Acta Veterinaria Brasilica*, 8: 10-18.
- Adgaba, N.; Shenkute, A. G.; Al-Ghamdi, A. A.; Assefa, A.; Ansari, M. J.; Taylor, B.; Radloff, S. (2014). *Crematogaster chiarinii* ants as a potential biological control agent for protecting honeybee colonies from attack by *Dorylus quadratus* driver ants in E thiopia (Hymenoptera: Formicidae). *Agricultural and Forest Entomology*, 16: 302-313.
- Aguiar, H. J. A. C., Barros, L. A. C., Silveira, L. I., Petitclerc, F., Etienne, S.; Orivel, J. (2020). Cytogenetic data for sixteen ant species from North-eastern Amazonia with phylogenetic insights into three subfamilies. *Comparative Cytogenetics*, 14: 43.
- 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: e0177702.
- 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* with evolutionary inferences for the *Dinoponera* genus (Formicidae: Ponerinae). *Sociobiology*, 57: 607-620.
- Alberts, B.; Bray, D.; Hopkin, K.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Walter, P. (2011). *Fundamentos da biologia celular*. 3ª edição. Porto Alegre: Artmed Editora.
- Anne, C. (2006). Choosing the right molecular genetic markers for studying biodiversity: from molecular evolution to practical aspects. *Genetica*, 127: 101-120.
- Baccaro, F. B.; Feitosa, R. M.; Fernández, F.; Fernandes, I. O.; Izzo, T. J.; Souza, J. D.; Solar, R. (2015). Guia para os gêneros de formigas do Brasil. *Manaus: Editora INPA*, 388.
- Barros, L. A. C., De Aguiar, H. J. A. C., Andrade-Souza, V., Mariano, C. D. S. F., Delabie, J. H. C., & Pompolo, S. D. G. (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.; Andrade-Souza, V.; Costa, M. A.; Delabie, J. H.C. (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.; Aguiar, H. J. A. C.; Teixeira, G. A.; Mariano, C. D. S. F.; Cunha Teixeira, M.; Delabie, J. H. C.; Pompolo, S.G. (2015). Cytogenetic data on the threatened leafcutter ant *Atta robusta* Borgmeier, 1939 (Formicidae: Myrmicinae: Attini). *Comptes Rendus Biologies*, 338: 660-665.
- Barros, L. A. C.; Aguiar, H. J. A. C.; Teixeira, G. A.; Souza, D. J.; Delabie, J. H. C.; Mariano, C. D. S. F. (2021a). Cytogenetic studies on the social parasite *Acromyrmex ameliae* (Formicidae: Myrmicinae: Attini) and its hosts reveal chromosome fusion in *Acromyrmex*. *Zoologischer Anzeiger*, 293: 273-281.
- Barros, L. A. C.; Chaul, J. C. M.; Orivel, J.; Aguiar, H. J. A. C. (2021b). Cytogenetics of *Strumigenys louisianae* Roger, 1863 (Formicidae: Myrmicinae) from North-eastern Amazonia shed light on a difficult species complex. *Zoologischer Anzeiger*, 294:100-105.
- Barros, L. A. C.; Teixeira, G. A.; Aguiar, H. J. A. C.; Lopes, D. M.; Pompolo, S. G. (2018). Cytogenetic studies in *Trachymyrmex holmgreni* Wheeler, 1925 (Formicidae: Myrmicinae) by conventional and molecular methods. *Sociobiology*, 65: 185-190.
- 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.; 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.
- Blaimer, B. B. (2010). Taxonomy and Natural History of the *Crematogaster* (*Decacrema*) group (Hymenoptera: Formicidae) in Madagascar. *Zootaxa*, 2714: 1–39.

- Blaimer, B. B. (2012). Acrobat ants go global—Origin, evolution and systematics of the genus *Crematogaster* (Hymenoptera: Formicidae). *Molecular phylogenetics and evolution*, 65: 421-436.
- Blaimer, B. B. (2012b). Taxonomic revision and species-groups of the subgenus *Crematogaster* (*Orthocrema*) in the Malagasy region (Hymenoptera, Formicidae). *Zookeys*, 199:23–70.
- Blaimer, B. B. (2012c). A subgeneric revision of *Crematogaster* and discussion of regional species-groups (Hymenoptera: Formicidae). *Zootaxa*, 3482: 47-67.
- Blaimer, B. B. (2012d). Untangling complex morphological variation: taxonomic revision of the subgenus *Crematogaster* (*Oxygyne*) in Madagascar, with insight into the evolution and biogeography of this enigmatic ant clade (Hymenoptera: Formicidae). *Systematic Entomology*, 37: 240-260.
- Blaimer, B. B.; Ward, P. S.; Schultz, T. R.; Fisher, B. L.; Brady, S. G. (2018). A diversificação paleotropical domina a evolução da tribo de formigas hiperdiversas Crematogastrini (Hymenoptera: Formicidae). *Insect Systematics and Diversity*, 2: 1 - 14.
- Bolton, B. 2021. An online catalog of the ants of the world. Disponível em <http://antcat.org>. (acesso em 15 janeiro 2021).
- Britten, R. J.; Kohne, D. E. (1968). Repeated sequences in DNA. *Science*, 161: 529-540.
- Buren, W. F. (1959). (A review of the species of *Crematogaster* sensu stricto, in North America (Hymenoptera: Formicidae), part I. *Journal of the New York Entomological Society*, 66:119-134.
- 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: e87473.
- Casevitz-Weulersse, J. (1972). Habitats et comportement nidificateur de *Crematogaster Scutellaris* Oliver. *Bulletin de la Societe Entomologique de France*, 77:12-19.
- Chauffaille, M. D. L. L. (2005). Citogenética e biologia molecular em leucemia linfocítica crônica. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 27: 247-252.

- 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: e59784.
- Cuadrado, A.; Jouve, N. (2002). Evolutionary trends of different repetitive DNA sequences during speciation in the genus *Secale*. *Journal of Heredity*, 93: 339-345.
- Cunha, M. S.; Reis, V. J. C.; Dergam, J. A. (2016). Closely related syntopic cytotypes of *Astyanax taeniatus* (Jenyns, 1842) from the upper Piranga River, upper Doce Basin in southeastern Brazil. *Zebrafish*, 13(2), 112-117.
- Della Lucia, T. M.; Gandra, L. C.; Guedes, R. N. (2014). Managing leaf-cutting ants: peculiarities, trends and challenges. *Pest management science*, 70: 14-23.
- Estoup, A.; Solignac, M.; Harry, M.; Cornuet, J. M. (1993). Characterization of (GT) n and (CT) n microsatellites in two insect species: *Apis mellifera* and *Bombus terrestris*. *Nucleic Acids Research*, 21: 1427-1431.
- Feldhaar, H.; Fiala, B.; Maschwitz, U. (2003). Patterns of the *Crematogaster-Macaranga* association: The ant partner makes the difference. *Insectes Sociaux*, 50: 9-19.
- Fernández, F. (2003). Subfamilia Myrmicinae. In: Fernández, F. *Introducción a las Hormigas de la región neotropical*. 1. ed. Bogotá: Acta Nocturna, 2003. Cap. 22, p. 307-330.
- Gemayel, R.; Vences, M. D.; Legendre, M.; Verstrepen, K. J. (2010). Variable tandem repeats accelerate evolution of coding and regulatory sequences. *Annual review of genetics*, 44: 445-477.
- Gokhman, V. E.; Kuznetsova, V. G. (2018). Parthenogenesis in Hexapoda: holometabolous insects. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 56: 23-34.
- Guerra, M. (1988). *Introdução a citogenética*. Pernambuco: Ganabara Koogan. 139.
- Guerra, M. (2004). Hybridization in situ: princípios Básicos. FISH–Conceitos e Aplicações na Citogenética. Edited by M. Guerra. *Sociedade Brasileira de Genética*. Ribeirão Preto, 1-32.
- Gullan, P. J.; Cranston, P. S. (2012). *Os Insetos: um Resumo de Entomologia* 4.ed. Davis, USA: Roca.

- Hadjiolov, A. A. (2012). *The nucleolus and ribosome biogenesis* (Vol. 12). Springer Science & Business Media.
- Hatanaka, T.; Henrique-Silva, F.; Galetti, J. r.; P. M. (2002). A polymorphic, telomeric-like sequence microsatellite in the neotropical fish *Prochilodus*. *Cytogenetic and Genome Research*, 98: 308-310.
- Heinze, J.; Foitzik, S.; Oberstadt, B.; Rueppell, O.; Hölldobler, B. (1999). A female caste specialized for the production of unfertilized eggs in the ant *Crematogaster smithi*. *Naturwissenschaften*, 86: 93-95.
- Hillis, D. M.; Dixon, M. T. (1991). Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *The Quarterly review of biology*, 66: 411-453.
- Hirai, H.; Yamamoto, M.T.; Ogura, K.; Satta, Y.; Yamada, M.; Taylor, R. W. (1994). Multiplication of 28S rDNA and NOR activity in chromosome evolution among ants of the *Myrmecia pilosula* species complex. *Chromosoma*, 103:171–178.
- Hirai, H.; Yamamoto, M.T.; Taylor, R. W.; Imai, H.T. (1996) Genomic dispersion of 28S rDNA during karyotypic evolution in the ant genus *Myrmecia* (Formicidae). *Chromosoma*, 105: 190–196.
- Hölldobler, B.; Wilson, E. O. (1990). *The Ants* (Harvard Univ. Press, Cambridge. MA.
- Hölldobler, B.; Wilson, E. O. The super-organism. New York. ww norton & co. (2009).
- Hosoishi, S.; Ogata, K. (2010). On the identity of *Crematogaster schimmeri* Forel, 1912 and the distribution of subgenus *Decacrema* in Asia (Hymenoptera: Formicidae). *Asian Myrmecology*, 3:1–3.
- Hosoishi, S.; Ogata, K. (2010). On the identity of *Crematogaster schimmeri* Forel, 1912 and the distribution of subgenus *Decacrema* in Asia (Hymenoptera: Formicidae). *Asian Myrmecology*, 3:1–3.
- Howell, W. T.; Black, D. A. (1980). Coloração de prata controlada de regiões organizadoras de nucléolos com um revelador coloidal protetor: um método de 1 etapa. *Experientia*, 36:1014-1015.
- Imai, H. T.; Taylor, R. W.; Crozier, R. H. (1994). Experimentais bases for the minimum interaction theory. I. Chromosome evolution in ants of the *Myrmecia pilosula* species complex (Hymenoptera: Formicidae: Myrmeciinae). *The Japanese Journal of Genetics*, 69:137-182.
- Jentsch, I. M. V.; Bagshaw, A.; Buschiazzi, E.; Merkel, A.; Gemmell, J. E. (2008). Evolution of microsatellite DNA. *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*, 1-12.

- Kamiyama, M. T.; Matsuura, K.; Yoshimura, T.; Yang, C. C. S. (2021). Predation of the brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys* by the Japanese acrobat ants, *Crematogaster matsumurai* and *Crematogaster osakensis*. *Biological Control*, 157: 104570.
- Kocher, T. D.; Thomas, W. K.; Meyer, A.; Edwards, S. V.; Pääbo, S.; Villablanca, F. X.; Wilson, A. C. (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86: 6196-6200.
- Lach, L.; Parr, C.; Abbott, K. (Eds.). (2010). *Ant ecology*. Oxford university press.
- Levsky, J. M.; Singer, R. H. (2003). Fluorescence *in situ* hybridization: past, present and future. *Journal of cell science*, 116: 2833-2838.
- Li, Y. C.; Korol, A. B.; Fahima, T.; Nevo, E. (2004). Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. *Molecular biology and evolution*, 21: 991-1007.
- Loiselle, R.; Francoeur, A.; Fischer, K.; Buschinger, A. (1990). Variations and taxonomic significance of the chromosome numbers in the Nearctic species of the genus *Leptothorax* (ss) (Formicidae: Hymenoptera). *Caryologia*, 43(3-4), 321-334.
- Longino, J. T. (2003). The *Crematogaster* (Hymenoptera, Formicidae, Myrmicinae) of Costa Rica. *Zootaxa*. 151: 1-150.
- López-Flores, I.; Garrido-Ramos, M. A. (2012). The repetitive DNA content of eukaryotic genomes. *Repetitive DNA*, 7:1-28.
- Lorite, P.; Aránega, A. E.; Luque, F.; Palomeque, T. (1997). Analysis of the nucleolar organizing regions in the ant *Tapinoma nigerrimum* (Hymenoptera, Formicidae). *Heredity*, 78: 578–582.
- Lorite, P.; Palomeque, T. (2010). Karyotype evolution in ants (Hymenoptera: Formicidae), with a review of the known ant chromosome numbers. *Myrmecological News*. 13: 89–102.
- Mariano, C. S. F. (2004). *Evolucao cariotipica em diferentes grupos de Formicidae*. 2004. 205 f. Tese (Doutorado em Entomologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

- Mariano, C. S. F.; Pompolo, S. G.; Barros, L. A. C.; Mariano-Neto, E.; Campiolo, S.; Delabie, J. C. H. (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. D. S. F.; Pompolo, S. G.; Silva, J. G.; Delabie, J. H. C. (2012). Contribution of cytogenetics to the debate on the paraphyly of *Pachycondyla* spp. (Hymenoptera, Formicidae, Ponerinae). *Psyche*, 2012.
- Mariano, C. S.; Santos, I. S.; Silva, J. D.; Costa, M. A.; Pompolo, S. G.; Delabie, J. H. C.; Majer, J. (2015). Citogenética e evolução do cariótipo em formigas poneromorfas. In.: *As formigas poneromorfas do Brasil. Ilhéus: Editus. Editora da Universidade Estadual de Santa Cruz.* (2015). Cap. 10, 102-125.
- Mariano, C. S. F.; Barros, L. A. C.; Velasco, Y. M.; Guimarães. (2019) In: Pompolo S. G.; Delabie JHC. Citogenética de hormigas de la región neotropical. In: Fernández F, Guerrero R, Delsinne T (Eds) Hormigas de Colombia. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 131–157, 2019.
- Marlier, J. F.; Quinet, Y.; De Biseau, J. C. Defensive behaviour and biological. (2004). activities of the abdominal secretion in the ant *Crematogaster scutellaris* (Hymenoptera: Myrmicinae). *Behavioural Processes*, 67: 427–440.
- Martins, D. J.; Collins, S. C.; Congdon, C.; Pierce, N. E. (2013). Association between the African lycaenid, *Anthene usamba*, and an obligate acacia ant, *Crematogaster mimosae*. *Biological Journal of the Linnean Society*, 109: 302-312.
- Meyer, A.; Todt, C.; Mikkelsen, N. T.; Lieb, B. (2010). Fast evolving 18S rRNA sequences from Solenogastres (Mollusca) resist standard PCR amplification and give new insights into mollusk substitution rate heterogeneity. *BMC evolutionary biology*, 10: 1-12.
- Micolino, R.; Cristiano, M.P.; Travenzoli, N.M.; Lopes, D. M.; Cardoso, D.C. (2019). Chromosomal dynamics in space and time: evolutionary history of *Mycetophylax* ants across past climatic changes in the Brazilian Atlantic coast. *Scientific Reports*, 9: 1–13.

- Milani, D.; Cabral-de-Mello, D. C. (2014). Microsatellite organization in the grasshopper *Abracris flavolineata* (Orthoptera: Acrididae) revealed by FISH mapping: remarkable spreading in the A and B chromosomes. *PLoS One*, 5:1-6.
- Moreau, C. S.; Bell, C. D.; Vila, R.; Archibald, S. B.; Pierce, N. E. (2006). Phylogeny of the Ants: *Diversification in the Age of Angiosperms*. *Science* 312: 101-103.
- Naciri, S. Vigouroux, S.; Dallas J.; Desmarais, E.; Deserto, C., 1995.
- Naciri, S. Vigouroux, S.; Dallas J.; Desmarais, E.; Deserto, C., 1995. Identification and inheritance of (GA/TC)_n and (AC/GT)_n repeats in the European flat oyster *Ostrea edulis* (L.). *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 4: 83-89.
- Nei, M.; Rooney, A. P. (2005). Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. *Annual Review of Genetics*, 39: 121-152.
- Palacios-Gimenez, O. M.; Cabral-de-Mello, D. C. (2015). Repetitive DNA chromosomal organization in the cricket *Cycloptiloides americanus*: a case of the unusual X1X20 sex chromosome system in Orthoptera. *Molecular Genetics and Genomics*, 290: 623-631.
- Palomeque, T.; Cano, M. A.; Chica, E.; Díaz De La Guardia, R. (1990). Spermatogenesis in *Tapinoma nigerrimum* (Hymenoptera, Formicidae). *Cytobios*, 62: 71-79.
- Peeters, C.; Lin, C. C.; Quinet, Y.; Segundo, G. M.; Billen, J. (2013). Evolution of a soldier caste specialized to lay unfertilized eggs in the ant genus *Crematogaster* (subgenus *Orthocrema*). *Arthropod Structure & Development*, 42: 257-264.
- Peixoto, M. A. A.; Oliveira, M. P.; Feio, R. N.; Dergam, J. A. (2016). Karyological study of *Ololygon tripui* (Loureço, Nascimento and Pires, 2009), (Anura, Hylidae) with comments on chromosomal traits among populations. *Comparative cytogenetics*, 10: 505.
- Quinet, Y.; Hamidi, R.; Ruiz-Gonzalez, M. X.; Biseau, J. C.; Longino, J. T. (2009). *Crematogaster pygmaea* (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae), a highly polygynous and polydomous *Crematogaster* from northeastern Brazil. *Zootaxa*, 2075: 45-54.
- Raška, I.; Koberna, K.; Malínský, J.; Fidlerová, H.; Mašata, M. (2004). The nucleolus and transcription of ribosomal genes. *Biology of the Cell*, 96: 579-594.

- Richard, F. J.; Fabre, A.; Dejean, A. (2001). Predatory behavior in dominant arboreal ant species: the case of *Crematogaster* sp. (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Insect Behavior*, 14: 271-282.
- Ross, L.; Davies, N. G.; Gardner, A. (2019). How to make a haploid male. *Evolution letters*, 3: 173-184.
- Roussel, P.; André, C.; Comai, L.; Hernandez-Verdun, D. (1996). The rDNA transcription machinery is assembled during mitosis in active NORs and absent in inactive NORs. *Journal of Cell Biology*, 133: 235-246.
- Ruiz-Ruano, F. J.; Cuadrado, Á.; Montiel, E. E.; Camacho, J. P. M.; López-León, M. D. (2014). Next generation sequencing and FISH reveal uneven and nonrandom microsatellite distribution in two grasshopper genomes. *Chromosoma*, 124: 221-234.
- Santini, G. R.; Amsay, P. M.; Tucci, L.; Ottonetti, L.; Frizzi, F. (2011). Spatial patterns of the ant *Crematogaster scutellaris* in a model ecosystem. *Ecological Entomology*. 36: 625-634.
- Santini, G.; Tucci, L.; Ottonetti, L.; Frizzi, F. (2007). Competition trade-offs in the organisation of a Mediterranean ant assemblage. *Ecological Entomology*. 32: 319-326.
- Santos, I. S.; Mariano, C. S. F.; Andrade, V.; Costa, M. A.; Delabie, J. H. C.; 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: 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.
- Schemberger, M. O.; Oliveira, J. I. N.; Nogaroto, V.; Almeida, M. C.; Artoni, R. F.; Cestari, M. M.; Vicari, M. R. (2014). Construction and characterization of a repetitive DNA library in *Parodontidae* (Actinopterygii: Characiformes): A genomic and evolutionary approach to the degeneration of the W sex chromosome. *Zebrafish*, 11: 517-527.

- Schneider, C. H.; Gross, M. C.; Terencio, M. L.; Tavares, É. S. G. M.; Martins, C.; Feldberg, E. (2015). Chromosomal distribution of microsatellite repeats in Amazon cichlids genome (Pisces, Cichlidae). *Comparative cytogenetics*, 9: 595.
- Schultz, T. R. (2000). In search of ant ancestors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97: 14028-14029.
- Sumner, A. T. (2003). Chromosomes organization and function. by Blackwell Science Ltd. a Blackwell Publishing company. United Kingdom, 1: 143-153.
- Taylor, R. W. (1991). *Myrmecia croslandi* sp. n., a karyologically remarkable new Australian Jack-Jumper ant (Hymenoptera: Formicidae: Myrmeciinae). *Australian Journal of Entomology*, 30: 288-288.
- Teixeira, G. A.; Aguiar, H. J. A. C.; Petitclerc, F.; Orivel, J.; Lopes, D. M.; Barros, L. A. C. 2021. Evolutionary insights into the genomic organization of major ribosomal DNA in ant chromosomes. *Insect Mol. Biol.* 30: 340-354.
- Teixeira, G. A.; Barros, L. A. C.; Lopes, D. M.; Aguiar, H. J. A. C. (2020) Cytogenetic variability in four species of *Gnamptogenys* Roger, 1863 (Formicidae: Ectatomminae) showing chromosomal polymorphisms, species complex, and cryptic species. *Protoplasma*, 257: 549–560.
- 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.
- Travenzoli, N. M.; Lima, B. A.; Cardoso, D. C.; Dergam, J. A.; Fernandes-Salomão, T. M.; Lopes, D. M. (2019a). Cytogenetic analysis and chromosomal mapping of repetitive DNA in *Melipona* species (Hymenoptera, Meliponini). *Cytogenetic and Genome Research*, 158: 213-224.
- Ward, P. S. (2007). Phylogeny, classification, and species-level taxonomy of ants (Hymenoptera: Formicidae). *Zootaxa*. 1668: 549–563.
- Ward, P. S. (2010). *Taxonomy, Phylogenetics and Evolution*. In: L. Lach, C. L.; Parr, K. L. Abott (Eds), *Ant Ecology*. Oxford University Press, Oxford, 402 pp.
- Ward, P. S. (2014). The Phylogeny and Evolution of Ants. *The Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, California, 45: 2.1–2.21, 2014.

- Warner, J. R. (1990). The nucleolus and ribosome formation. *Current Opinion in Cell Biology*, 2: 521-527.
- Wheeler D. E. (1986). *Ectatomma tuberculatum*: biologia de forrageamento e of the associação com *Crematogaster*. *Ann Entomol Soc Am* 79: 300-302.
- Wilson, E. O.; Hölldobler, B. (2005). A ascensão das formigas: uma explicação filogenética e ecológica. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102: 7411-7414.
- Xue, S.; Barna, M. (2012). Specialized ribosomes: a new frontier in gene regulation and organismal biology. *Nature reviews molecular cell biology*, 13(6), 355-369.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Mapear citogeneticamente a configuração de regiões específicas de DNA no genoma de espécies de formigas do gênero *Crematogaster*, buscando padrões e insights que indiquem mecanismos recorrentes de rearranjos cromossômicos entre as espécies desse gênero.

2.2 Objetivos específicos

I. Caracterizar citogeneticamente cinco espécies amazônicas do gênero *Crematogaster*, com relação ao número e morfologia dos cromossomos;

II. Mapear fisicamente os clusters de genes rDNA 18S nos cromossomos de cinco espécies de *Crematogaster* amazônicas;

III. Mapear fisicamente os cromossomos de cinco espécies do gênero *Crematogaster* com microssatélites (GA)₁₅, (CA)₁₅, (CAA)₁₀, (CAG)₁₀, (CGG)₁₀, (GAG)₁₀, (TAT)₁₀, (TTAGG)₆ e (TCAGG)₆.

ARTIGO**CITOGENÉTICA CLÁSSICA E MOLECULAR EM FORMIGAS DO GÊNERO
CREMATOGASTER LUND 1831 (FORMICIDAE: HYMENOPTERA) COM SONDAS
ESPECÍFICAS E DE DNA REPETITIVO**

Linda Inês Silveira

Laboratório de Sistemática Molecular – Beagle, Departamento de Biologia Animal,
Universidade Federal de Viçosa, Av. P. H. Rolfs, s/n, Centro, Viçosa, 36570-900,
Minas Gerais, Brasil.

1. INTRODUÇÃO

As formigas são as espécies mais ricas e ecologicamente dominantes de todos os insetos eusociais (Hölldobler & Wilson, 1990), e sua diversidade varia entre os continentes e as regiões biogeográficas (Lach et al., 2009). São facilmente encontradas por todos os ambientes terrestres, com exceção dos pólos (Hölldobler & Wilson, 1990), com maior abundância e diversidade em regiões tropicais, como a Amazônia (Oliveira et al., 1995). Atualmente há 14.064 espécies de formigas descritas, distribuídas em 345 gêneros (Bolton, 2022). Todas as formigas são eusociais (Hölldobler & Wilson, 2009; Ward, 2014) e possuem sistema genético de determinação sexual é haplodiploide, com fêmeas diploides e machos haploides (Gokhman & Kuznetsova, 2017).

Atualmente 515 espécies válidas pertencem ao gênero *Crematogaster* (Bolton, 2022), o qual está inserido na subfamília Myrmicinae, (Hölldobler & Wilson, 1990; Blaimer, 2012a; Blaimer 2012c). A sua capacidade de flexionar o gáster sobre o mesossoma em uma postura defensiva (Blaimer, 2012a, 2012c) deu a essas espécies o apelido de “formigas acrobatas”. As espécies desse gênero possuem distribuição global e estão presentes na maioria dos habitats, desde savanas até florestas úmidas, mas atingem maior diversidade e abundância nos trópicos e subtropicais (Wheeler, 1906; Blaimer, 2012b; Peeters et al., 2013). Embora a maioria das espécies do gênero nos trópicos e subtropicais seja arbórea, algumas espécies tropicais e de zonas temperadas nidificam no solo (Longino, 2003; Hosoi et al., 2010). O gênero *Crematogaster* é monofilético (Longino, 2003; Blaimer, 2012a) e reconhecível pela configuração apomórfica do pós-pecíolo e gáster (Longino, 2003; Blaimer, 2012a). Porém, há problemas na identificação taxonômica das espécies desse gênero (Ward, 2007; Blaimer, 2010) devido à alta variação intraespecífica (Longino, 2003; Blaimer, 2010).

Citogeneticamente já foram estudadas mais de 800 espécies de formigas (Lorite & Palomeque, 2010; Aguiar et al., 2020; Teixeira et al., 2021; Barros et al., 2021a, 2021b). Há dados citogenéticos a respeito de 18 morfoespécies de *Crematogaster* da Malásia, Indonésia, Índia, Japão, Austrália, e Guiana Francesa com variação cromossômica de $2n= 24-58$ (revisado em Lorite & Palomeque 2010; Aguiar et al., 2020, Teixeira et al., 2021). Imai et al. (1984) analisaram citogeneticamente

quatro espécies do gênero, da Índia, *C. biroi* $2n=24$, *C. brunnea* $2n=36$, *C. rothneyi* $2n=50$ e *C. subnuda* $2n=36$ e relacionaram *C. biroi* com *C. rothneyi* devido a ocorrências de rearranjos robertsonianos específicos. No Novo Mundo, informações citogenéticas do gênero são restritas à *C. (Orthocrema) longispina*, coletada no Escudo das Guianas, com $2n=24$ cromossomos (Aguiar et al., 2020; Teixeira et al., 2021).

Uma das técnicas da citogenética molecular é a hibridização *in situ* fluorescente (FISH), e o mapeamento físico dos cromossomos por FISH constitui uma estratégia rápida e fácil para determinar a abundância e distribuição de sequências repetitivas específicas capazes de permitir discussões a respeito da evolução do cariótipo de um dado grupo (Guerra, 2004). O uso da técnica de FISH associado a sondas baseadas em sequências microssatélites e outras sequências repetitivas são úteis pois podem fornecer meios para compreender a disposição de grupamentos de genes no cariótipo (Ruiz-Ruano et al., 2014). Dessa forma, o uso de microssatélites por meio do FISH fornece dados relacionados à organização cromossômica, sua estrutura e função (Ruiz-Ruano et al., 2014). Essa abordagem pode ser utilizada para a compreensão da evolução de diferentes grupos (Schemberger et al., 2014) sendo inclusive aplicável em um contexto populacional (Goldstein & Schlötterer, 1999) (Schneider et al., 2015; Cunha et al., 2016; Peixoto et al., 2016).

Estudos relacionados a detecção de microssatélites em insetos já foi conduzidos em ortópteros (Milani & Cabral-de-Mello, 2014; Palacios-Gimenez & Cabral-de-Mello, 2015), abelhas (Travenzoli et al., 2019) e formigas (Barros et al., 2018). Para Formicidae estes estudos são conhecidos até o momento apenas para três espécies da subtribo *Attina* [*Mycetomoellerius holmgreni* (publicada como *Trachymyrmex holmgreni*) foi estudada através de sondas $(GA)_{15}$ e *Acromyrmex ameliae* e *Ac. striatus* estudadas com sondas teloméricas $(TTAGG)_6$ (Barros et al., 2021a; Pereira et al., 2018) respectivamente.

Sob o aspecto biogeográfico há hipóteses que sugerem que as espécies de *Crematogaster* da América do Sul são resultado de mais de uma onda migratória de populações de outras localidades (Blaimer et al., 2012a), podendo apresentar variações citogenéticas. As sequências repetitivas permitem a detecção de variações em cariótipos conservados e assim auxiliam na compreensão da evolução do genoma de Formicidae, incluindo aquelas localizadas na região do escudo das Guianas

Brasileiro, que ainda são pouco conhecidas. Assim, a análise citogenética por meio do mapeamento físico dos cromossomos é uma ferramenta útil para a detecção de padrões abordagens moleculares.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Seis colônias de *Crematogaster* foram coletadas no município de Oiapoque-Amapá, Brasil, (3°50'31.5"n 51°50'05.9"w) localizada no escudo das Guianas, de acordo com a licença de coleta sisbio/ibama n°62598: *Crematogaster erecta* (mayr, 1866), *Crematogaster limata* (smith, f., 1858), *Crematogaster tenuicula* (forel, 1904), *Crematogaster* aff. *erecta*, *Crematogaster* sp. (grupo *limata*), por meio do método de busca ativa. Para a identificação, indivíduos adultos de cada espécie fixados em álcool pa foram enviados para análises taxonômicas e identificação pelo dr. Jacques h. C. Delabie, e conseqüente depósito e tombamento na coleção do laboratório de mirmecologia do centro de pesquisas do cacau (cpdc/brasil), em ilhéus, na bahia.

2.1 Análise citogenética clássica

As metáfases mitóticas foram obtidas de gânglios cerebrais de larvas pós-defecantes, extraídos com o auxílio de estiletes sob lupa estereoscópio LEICA KL 300 LED. Os gânglios cerebrais foram submetidos a tratamento com 1% de citrato de sódio contendo 0,005% de colchicina por 90 minutos, de acordo com protocolo descrito por Imai et al. (1988). A coloração foi realizada com Giemsa 4%, por 20 minutos. Para a visualização das metáfases, as lâminas foram fotografadas fazendo uso do microscópio Olympus BX53, com câmera DP73F Olympus, utilizando-se o software CellSens Imaging.

Para a determinação do cariótipo, foram analisados pelo menos três indivíduos por espécie e pelo menos dez metáfases por lâmina, totalizando 30 metáfases por espécie. Os cromossomos foram medidos e classificados em metacêntricos (1,00–1,70), submetacêntricos (1,71–3,00), subtelocêntricos (3,01–7,00) e acrocêntricos (a partir de 7,01) de acordo com 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.

2.2 Análise de citogenética molecular

Para detecção de regiões repetitivas *in tandem* (microssatélites) foi aplicada a técnica de Pinkel et al. (1986), com modificações de Cioffi et al. (2010). Através da técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH), foram utilizadas as sondas (GA)₁₅, (CA)₁₅, (CAA)₁₅, (CAG)₁₅, (CGG)₁₅, (GAG)₁₅, (TAT)₁₅, (TTAGG)₆, (TCAGG)₆, marcadas com Cianina 3 (Cy3) na extremidade 5' terminal na sua síntese conforme sugestão da Sigma (St. Louis, MO, USA). A detecção dos genes rDNA 18S, as lâminas foram submetidas a marcação indireta de acordo com o protocolo de (Pinkel et al., 1986). A sonda para a região rDNA 18S foram obtidas através de amplificação do DNA total por PCR utilizando *primers* rDNA 18SF1 (5' GTC ATA GCT TTG TCT CAA AGA-3') e 8SR1.1 (5'-CGC AAA TGA AAC TTT TTT AAT CT-3') construídos para a abelha *Melipona quinquefasciata* (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 a detecção de regiões ricas em AT, as metáfases foram tratadas com fluorocromo DAPI de acordo com Schweizer (1980).

Para todas as detecções de genes rDNA e microssatélites foram utilizadas pelo menos três lâminas de cada uma das espécies estudadas. As lâminas submetidas às técnicas de FISH para mapeamento de microssatélites, foram submetidas a um passo extra para permitir sua reutilização. Esse protocolo de reutilização consiste no aquecimento da lâmina (utilizada previamente para marcação com outra sonda) por 5 minutos a 80 °C com 1xPBS. Após esse tempo a lâmina foi lavada com Tween e 1xPBS por 5 minutos cada, e posteriormente desidratada em série alcoólica de 50%, 70% e 100% por 2 minutos. Após esse procedimento as lâminas foram submetidas à técnica de FISH. Esse protocolo permite que os cromossomos de uma mesma metáfase sejam marcados por diferentes marcadores reduzindo variáveis como a compactação dos cromossomos ou eventuais sobreposições. Essa técnica facilita as

comparações dos mapas físicos obtidos das diferentes espécies analisadas. É fundamental observar que em todos os casos foram analisadas também lâminas não reaproveitadas (virgens) para o controle dos resultados obtidos.

3. RESULTADOS

Este é o primeiro registro da ocorrência de *C. erecta*, *C. limata* e *C. tenuicula* no estado do Amapá. Há o registro dessas espécies na Guiana Francesa (Franco et al. 2019) e no estado do Pará (Albuquerque et al. 2021), evidenciando a escassez de dados mirmecológicos no Amapá.

Os dados cromossômicos obtidos para as espécies de *Crematogaster* estudadas estão resumidos na tabela 1. Foram analisadas seis colônias do gênero *Crematogaster*. Destas, duas colônias pertencem à *C. erecta* Mayr, 1866. Essas duas colônias possuem o mesmo número cromossômico $2n=22$, porém fórmulas cariotípicas distintas, aqui consideradas como citótipos diferentes. A fórmula cariotípica diploide de *C. erecta* citótipo I tem configuração cariotípica igual a $2n=18m+4sm$ (figura 1a), o citótipo II tem $2n=20m+2sm$ (figura 1b). A *C. aff. erecta* apresentou $2n=28$ ($24m+4sm$) (figura 1c).

As três espécies pertencentes ao grupo *limata* apresentaram o mesmo número cromossômico ($2n=38$). *C. limata* Smith, F., 1858, $2n=6m+14sm+16st+2a$ (figura 1d), *C. tenuicula* Forel, 1904 $2n=22m+14sm+2st$ (figura 1e), *C. Crematogaster* sp.1 (figura 1f) $2n=22m+14sm+2st$.

As cinco espécies estudadas apresentam os genes rDNA 18S restritos a região intracromossômica (intersticial/pericentromérica) de um único par de cromossomos homólogos (figura 2). Em *C. erecta* citótipo I ($2n=22$) a marcação de rDNA 18S foi observada na região intersticial do braço longo do par cromossômico subteloentrico 11 (figura 2a). Foi observado também uma diferença no tamanho das bandas entre os homólogos. A localização dos genes ribossomais 18S em *C. erecta* citótipo II ($2n=22$), foi observada na região pericentromérica do braço curto do terceiro par metacêntrico (figura 2b); nesta espécie as bandas eram do mesmo tamanho. Em *C. aff. erecta* ($2n=28$) os genes ribossomais foram observados no quarto par metacêntrico na região pericentromérica do braço longo (figura 2c). Em *C. limata* ($2n=38$) os genes ribossomais foram observados na região pericentromérica no braço curto do primeiro

par metacêntrico (figura 2d). Em *C. tenuicula* ($2n=38$) os genes rDNA 18S foram observados na região intersticial, com o mesmo tamanho das bandas entre os homólogos ocupando quase todo o braço cromossômico longo (figura 2e). Em *Crematogaster* sp. (grupo *limata*) ($2n=38$) a marcação dos genes 18S foi observada no quinto par metacêntrico, na região intersticial, ocupando quase todo o braço longo (figura 2f). Foi observado em *C. tenuicula* blocos de AT-positivos (DAPI+) em regiões pericentroméricas (figura 6).

Foram mapeados nove microssatélites nos cromossomos de *Crematogaster* incluindo, di, trinucleotídeos e motifs teloméricos. Os microssatélites (CA)₁₅, (CAA)₁₀, (CAG)₁₀, (CGG)₁₀, (GAG)₁₀, (TAT)₁₀, não foram detectados nos cromossomos das espécies analisadas. A sonda repetitiva (GA)₁₅ apresentou distribuição dispersa nos cromossomos de todas as espécies estudadas (figura 3). Em *C. erecta* citótipo I, a sonda (GA)₁₅ revelou além da distribuição dispersa, sinais específicos em região centromérica, chamada aqui de clusterização evidente (CE) (figura 3a).

O microssatélite (TTAGG)₆ foi observado em regiões teloméricas de todas as espécies analisadas (figura 4). Em *C. aff. erecta* e *C. limata* a sonda (TCAGG)₆ marcou as regiões teloméricas (figura 5b e 5c), mas em *C. erecta* citótipo I, este microssatélite foi observado nas regiões centroméricas dos cromossomos (figura 5a). Não foi observado em *C. erecta* citótipo II, *C. tenuicula* e *Crematogaster* sp. (grupo *limata*) a presença de microssatélites com essas sequências.

Tabela 1. Resumo das espécies de *Crematogaster* coletadas em Oiapoque-AP e analisadas por meio da citogenética clássica e molecular. Número cromossômico diploide (2n), fórmula cariotípica de acordo com Levan *et al.* (1964).

Espécie de <i>Crematogaster</i>	2n	Fórmula cariotípica	Padrões gerais de bandeamento pelas sondas em FISH			
			18S	(GA) ₁₅ disp, CE	Microssatélites (TTAGG) ₆	(TCAGG) ₆
<i>C. erecta</i> citótipo I	22	18m+4sm	int (q)	disp, CE	tel	cent
<i>C. erecta</i> citótipo II	22	20m+2sm	peri (p)	disp	tel	_____
<i>Crematogaster</i> aff. <i>erecta</i>	28	24m+4sm	peri (q)	disp	tel	tel
<i>C. limata</i>	38	6m+14sm+16 st+2a	peri (p)	disp	tel	tel
<i>C. tenuicula</i>	38	22m+14sm+2 st	int (q)	disp	tel	_____
<i>Crematogaster</i> sp. (grupo <i>limata</i>)	38	22m+14sm+2 st	int (q)	disp	tel	_____

= braço curto; q = braço longo; m = metacêntrico; sm = submetacêntrico; st = subtlocêntrico; a = acrocêntrico; peri = pericentromérica; int= intersticial; subt subterminal; tel = telomérico; ter = terminal; disp = disperso; cent = centromérica; CE = clusterização evidente na região pericentromérica do braço longo do segundo par metacêntrico.

C. erecta (citótipo I)

Fonte: Antweb

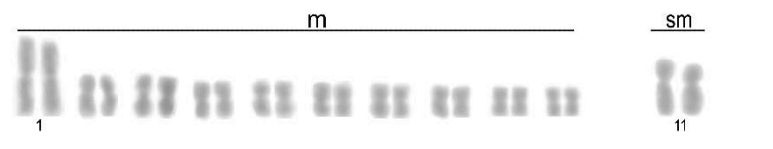
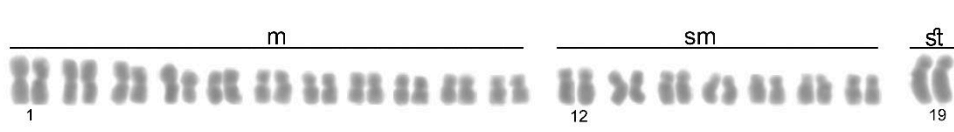
*C. erecta* (citótipo II)*C. aff. erecta**C. limata**C. tenuicula**Crematogaster* sp.
(grupo *limata*)

Figura 1 –Cariótipo de *Crematogaster*. (a) e (b) *C. erecta* citótipo I e citótipo II respectivamente ($2n= 22$), (c) *C. aff. erecta* ($2n= 28$), (d) *C. limata* ($2n= 38$), (e) *C. tenuicula* ($2n=38$), (f) *Crematogaster* sp. (grupo *limata*) ($2n= 38$). Barra: 5µm.

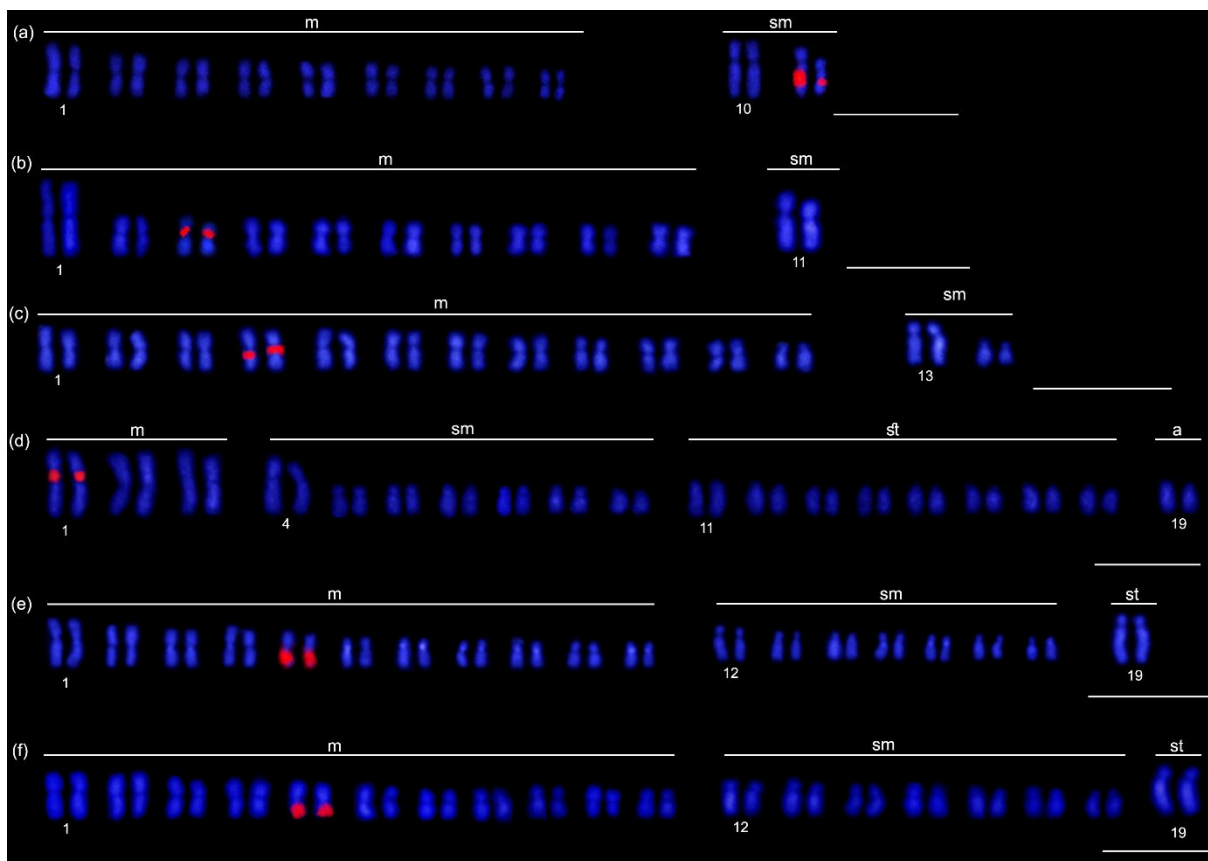


Figura 2 – Detecção de rDNA 18S (blocos vermelhos) nos cromossomos de *Chromatogaster*. (a) e (b) *C. erecta* citótipo I e citótipo II respectivamente (2n= 22), (c) *C. aff. erecta* (2n= 28), (d) *C. limata* (2n= 38), (e) *C. tenuicula* (2n=38), (f) *Chromatogaster* sp. (grupo *limata*) (2n= 38). Barra: 5μm.

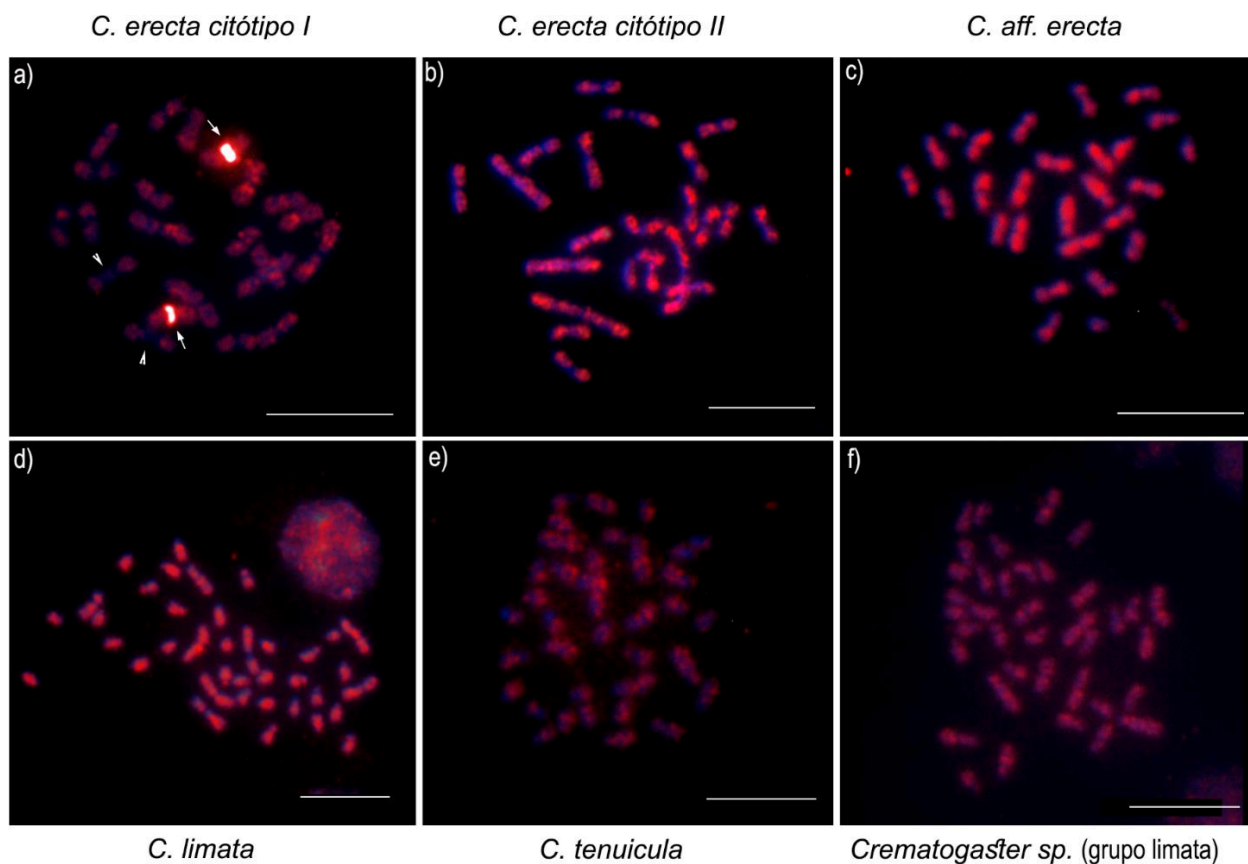


Figura 3. Metáfases de fêmeas de *Crematogaster* submetidas ao microssatélite (GA)₁₅. As setas indicam a região de clusterização evidente e as cabeças de setas indicam o par cromossômico carreador do gene rDNA 18S. Os cromossomos são corados com DAPI (azul) e os sinais da sonda hibridizada estão em vermelho. Barra: 5µm.

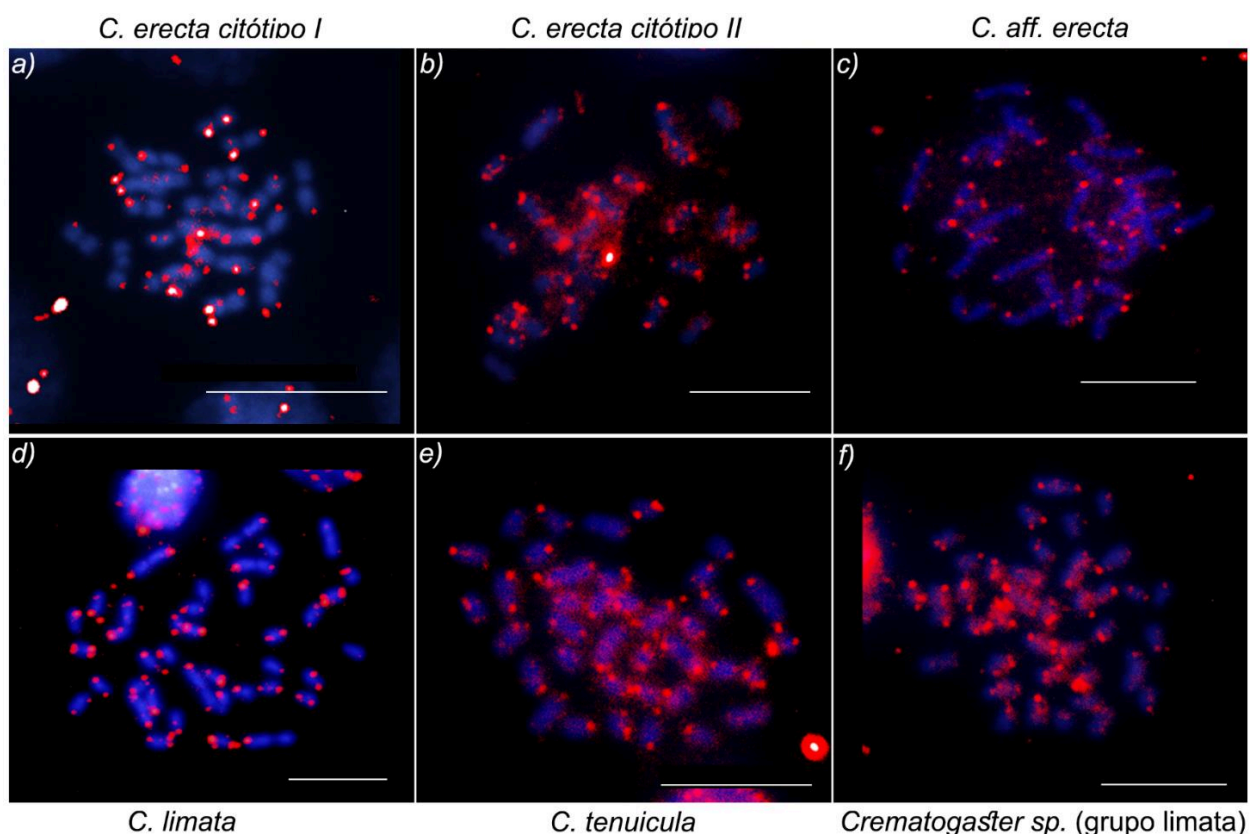


Figura 4 - Metáfases de fêmeas de *Crematogaster* submetidas ao microsatélite (TTAGG)₆. Os cromossomos são corados com DAPI (azul) e os sinais da sonda hibridizada estão em vermelho. Barra: 5µm.

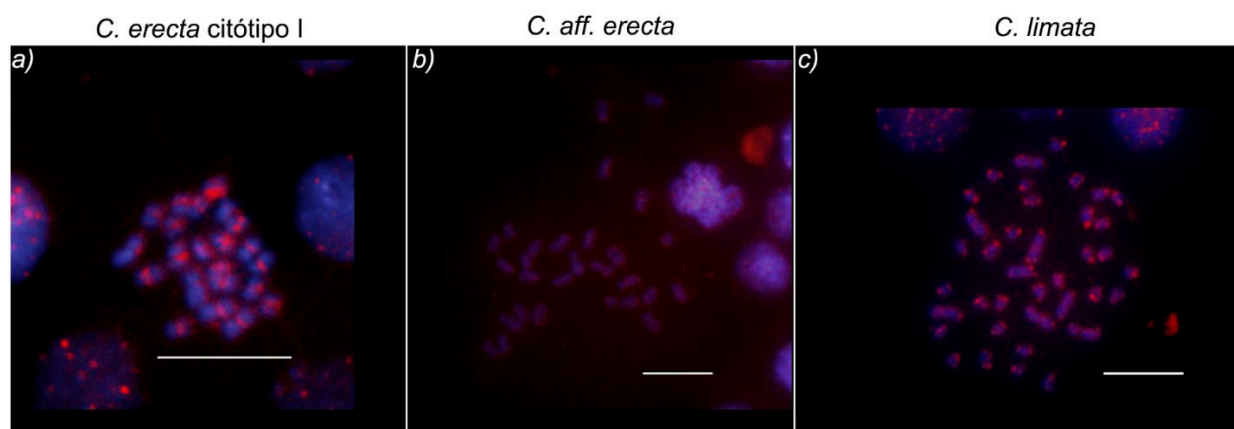


Figura 5 - Metáfases de fêmeas de *Crematogaster* submetidas ao microsatélite (TCAGG)₆. Os cromossomos são corados com DAPI (azul) e os sinais da sonda hibridizada estão em vermelho. Barra: 5µm.

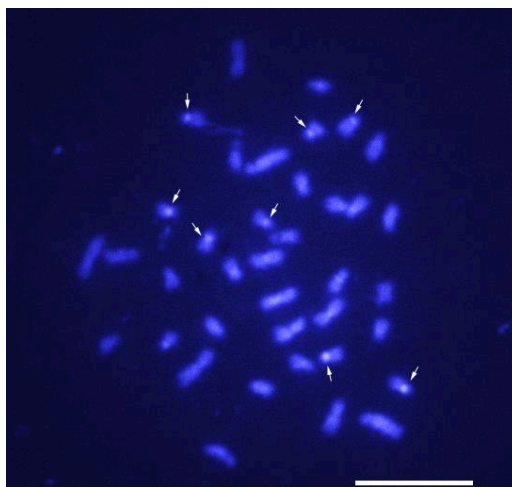


Figura 6. Metáfase *Crematogaster tenuicula* ($2n=38$) corada com fluorocromo (DAPI). As setas brancas indicam a coloração positiva para regiões ricas em AT. Barra = 5 μm

4. DISCUSSÃO

Todas as espécies analisadas no presente estudo foram encontradas em simpatria e estão incluídas no subgênero *Crematogaster* (*Orthocrema*). Os resultados mostraram que *C. erecta* ($2n=22$) possui o menor número cromossômico entre as espécies do gênero, sendo que o maior número cromossômico já observado pertence a *Crematogaster*. sp 2 da Indonésia, com $2n=58$ (Imai et al. 1985). Assim como observado em *Crematogaster*, outras formigas também exibem variação interespecífica no número de cromossomos como observada em *Gnamptogenys* Roger, 1863 ($2n=16-68$) (revisado em Mariano et al., 2019), *Cyphomyrmex* Mayr, 1862 ($2n=20-64$) (revisado em Mariano et al., 2019), *Mycetophylax* Emery, 1913 (Cardoso et al., 2014), *Dolichoderus* Lund, 1831 ($2n=10-38$) (Santos et al., 2016).

As variações cariotípicas podem indicar altas taxas de reorganização genômica durante a evolução (Menezes et al., 2014), contudo, em *Crematogaster* a maior parte dessas variações envolvem o número dos cromossomos e não sua morfologia, pois o cariótipo das diferentes espécies de *Crematogaster* aqui estudadas e outras espécies já analisadas citogeneticamente por Imai et al. (1984) e Aguiar et al. (2020) são ricos em cromossomos metacêntricos e submetacêntricos. Considerando a variação no número cromossômico observado em *Crematogaster* ($2n=22-58$) fissões cêntrica e/ou translocações (fusões) robertsonianas provavelmente desempenham papel central nessa variação.

Os genes ribossomais 18S nas espécies de *Crematogaster* analisadas foram detectados em apenas um par de cromossomos e localizados em regiões intracromossômicas (intersticial/pericentromérica) (figura 2). Tanto o número como a localização desses genes ribossomais seguem o padrão observado na maioria das espécies de formigas que tiveram seus genes ribossomais mapeados (revisado em Teixeira et al., 2021). Essas regiões provavelmente correspondem à NOR (ver discussão em Teixeira et al., 2021). Em *C. erecta* (citótipo I) foi possível observar uma constrição secundária que coincidiu com a localização dos genes rDNA 18S (figura 1a, 2a respectivamente). A presença de um único sítio de rDNA é considerada uma característica plesiomórfica em Formicidae (Teixeira et al., 2021a).

Análises citogenéticas realizadas em diferentes espécies animais e vegetais apontam que as NORs estão usualmente localizadas na heterocromatina em posição terminal, frequentemente nos braços curtos de cromossomos acrocêntricos (Hall & Parker, 1995; Dutrillaux et al., 2016). Embora em muitos organismos essa posição terminal seja comum, como insetos da ordem Orthoptera, esses genes são encontrados preferencialmente nas posições pericentroméricas (Sochorová et al., 2018). Em Formicidae clusters de rDNA em posições terminais são menos abundantes como revisado em Teixeira et al. (2020).

Variações numéricas de NORs dependem principalmente de sua localização, pois as NORs múltiplas estão frequentemente em posições terminais e subterminais, que favorecem rearranjos, podendo aumentar o número de rDNA no genoma, devido a proximidade das regiões terminais dentro do núcleo interfásico (Martins & Wasko, 2004; Roa & Guerra, 2012; Hirai, 2020). As espécies de *Crematogaster* aqui estudadas apresentaram NOR simples em regiões intersticiais e pericentroméricas. NORs simples já foram observadas em diferentes grupos animais entre eles: Primatas (Gerbault et al., 2017), Coleoptera (Dutrillaux et al., 2016), Lepidoptera (Nguyen et al., 2010), Formicidae (Teixeira et al., 2020; Teixeira et al., 2021, Barros et al., 2021a, b). NORs simples, geralmente estão em posição intersticial e tendem a permanecer únicas no mesmo cromossomo, e podem eventualmente mudar de posição em diferentes espécies (Gerbault et al., 2017, Dutrillaux et al., 2016; Nguyen et al., 2010). Os mecanismos que levam a dispersão de NORs no genoma, são pouco comuns em regiões intracromossômicas, visto que recombinações ectópicas, translocações, trocas desiguais, podem resultar em gametas desequilibrados, e por tanto seriam

fortemente contra selecionados durante a evolução (Martins & Wasko, 2004; Dutrillaux et al., 2016; Gerbault-Seureau et al., 2017, Hirai, 2020).

Os resultados observados sugerem que a evolução dos genes de rDNA nos cromossomos das espécies de *Crematogaster*, incluindo *C. longispina* estudada por Teixeira et al. (2021), está de acordo com a hipótese proposta por Teixeira et al. (2020) que discute a dispersão e localização das NOR, pois os clusters únicos de rDNA das espécies estudadas são intersticiais ou pericentroméricos.

Heteromorfismos de tamanho de NOR intersticiais como os observados em *C. erecta* citótipo I (figura 2a) já foram relatados em posições terminais nos cromossomos de cigarras, besouros, abelhas (Maryanska-Nadachowska et al., 2016; Cabral-de-Mello et al., 2011; Andrade-Souza et al., 2018) e em algumas formigas *Azteca trigona* (Cardoso et al., 2012), *Camponotus cingulatus* (Aguiar et al., 2017), *Camponotus atriceps*, *Gnamptogenys tortuolosa* (Teixeira et al., 2021). Heteromorfismos envolvendo regiões terminais podem ser consequência de variações no número de cópias de rDNA, devido a ocorrência de duplicações/exclusões, como resultado de crossing-over desigual (Sumner, 2003, Schubert & Lysack, 2011). Destaca-se inclusive que a ocorrência de trocas em regiões intracromossômicas são pouco comuns, pois essas regiões têm poucas chances de entrar em contato com outras regiões durante a meiose (Hirai et al., 2020).

Em *C. erecta* citótipo I foram observadas variações de tamanho nos sítios de rDNA em regiões intracromossômicas (intersticial/pericentromérica). Esse padrão já foi observado em espécies de formigas como em *Gnamptogenys regularis*, *Odontomachus bauri* (Teixeira et al., 2020; 2021) *Anochetus* spp. (Santos et al., 2010). O mecanismo envolvido no heteromorfismo de rDNA em regiões intracromossômicas pode estar associado a formação de DNA circular extracromossômico (eccDNAs), que provavelmente formariam sequências repetitivas *in tandem* (repetições em sequencia) semelhantes aos genes do rDNA (Cohen & Segal, 2009). Acredita-se que DNAs repetitivos desempenhem um papel significativo na formação de eccDNA (Gaubatz, 1990). Estudos mostram que a maioria dos eccDNA consistem em repetições cromossômicas *in tandem*, como DNA ribossômico e DNA telomérico (Cohen & Segal, 2009; Moller, et al., 2015; Paulsen et al., 2018).

O microssatélite (GA)₁₅ mostrou sinal disperso nas espécies de *Crematogaster*, o qual é semelhante ao observado em formigas cultivadoras de fungos (Teixeira et al.,

2021), na vespa *Polybia fastidiosuscula* (Marchioro et al., 2021) e em abelhas do gênero *Melipona* (Santos et al., 2018; Travenzoli et al., 2019a). O microssatélite (GA)_n é um dos dinucleotídeos mais comuns em invertebrados (Estoup et al., 1993; Naciri et al., 1995), e representam as repetições de microssatélites mais abundantes, após os mononucleotídeos para muitas espécies (Jentzsch et al., 2008; Lopez-Florez & Garrido-Ramos, 2012). A presença do microssatélite (GA)₁₅ disperso nos cromossomos de *Crematogaster*, os quais são em sua maioria metacêntricos, permite alguns *insights* sobre a evolução cromossômica do grupo. O grande número de cromossomos metacêntricos poderia ser explicado pelo crescimento de heterocromatina nos braços curtos após as fissões cêntricas, o que estabilizaria os cromossomos rearranjados de acordo com a teoria da interação mínima (ver mais detalhes em Imai et al., 1988). Porém, ao observar o padrão do microssatélite (GA)₁₅ disperso pelos dois braços cromossômicos é possível inferir ausência de crescimento de heterocromatina, após as fissões cêntricas, pois em cromossomos de Hymenoptera, os microssatélites (GA)₁₅ têm sido observados em regiões eucromáticas como em abelhas (Piccoli et al., 2018; Santos et al., 2018; Travenzoli et al., 2019) e formigas (Barros et al., 2018; Teixeira et al., 2021). Dessa forma, rearranjos do tipo fissão cêntrica, seguidos por inversões poderiam explicar o padrão de cromossomos metacêntricos nas espécies do gênero *Crematogaster* e assim desempenham importante papel na evolução dos seus cariótipos.

Além da distribuição dispersa, foi observado em *C. erecta* citótipo I clusterização evidente na região centromérica de um par de cromossomos metacêntricos. O acúmulo de microssatélites em algumas regiões cromossômicas já foi observado em diferentes espécies como plantas, peixes, abelhas (Kubat et al., 2008; Poltronieri et al., 2013; Santos et al., 2018). Esses resultados são consistentes com aqueles observados em diferentes espécies, que indicam que os microssatélites podem se acumular em telômeros e centrômeros (Martins, 2007; Kubat et al., 2008; Poltronieri et al., 2013). Estudos apontam que sequências repetitivas tendem a se acumular em áreas sujeitas à baixa recombinação (Charlesworth et al., 1994; Stephan & Cho, 1994).

A sequência canônica (TTAGG)_n é parte do telômero de muitos insetos (Vítková et al., 2005; revisão em Kuznetsova et al., 2019). Os telômeros protegem os cromossomos de fusões com outros cromossomos e estabilizam sua estrutura

(Zakian, 1995, 2012; Jentzsch et al., 2008), além da interação com a membrana nuclear (Hirai et al., 2020). Em Formicidae, a sequência repetitiva (TTAGG)_n parece ser o principal componente dos telômeros e além disso essa sequência é considerada conservada entre diferentes linhagens de formigas (revisão em Kuznetsova et al., 2019). A sequência telomérica (TTAGG)_n já foi observada em formigas cortadeiras como as *Acromyrmex* (Pereira et al., 2018, Barros et al., 2011a, Castro et al., 2020) e *Atta* (Castro et al., 2020), e em outros gêneros *Manica yessensis* (Okazaki et al., 1993), *Myrmecia* (Meyne et al., 1995), *Tapinoma nigerrimum* (Lorite et al., 2002).

A composição dos telômeros das espécies estudadas de *Crematogaster* se mostrou rica com a sequência canônica (TTAGG)_n em ambas as extremidades dos cromossomos. Esse padrão é o mesmo daquele observado em Formicidae. Embora a sequência telomérica (TTAGG)_n, seja a mais comum em Insecta, alguns grupos possuem telômeros com repetições diferentes (Kuznetsova et al., 2019) como alguns besouros das famílias Tenebrionidae, Mycetophagidae e Meloidae (Mravinac et al., 2011), que apresentam sequências teloméricas alternativas com repetição (TCAGG)_n. Em duas das cinco espécies de *Crematogaster* analisadas, essa sequência "alternativa" esteve restrita às regiões teloméricas. Contudo, em *C. erecta* citótipo I essa sequência foi detectada nas regiões centroméricas da maioria dos cromossomos (figura 5a).

Embora usualmente regiões teloméricas em Formicidae sejam ricas em repetições (TTAGG)_n, variações podem ser observadas como sequências (TTAGGG)_n em algumas espécies de *Myrmecia* (Meyne et al., 1995). As espécies de *Crematogaster* estudadas aqui apresentaram repetições (TCAGG)₆ nas regiões teloméricas, um registro inédito em cromossomos de formigas. Os microssatélites (TCAGG)₆ e (TTAGG)₆ foram observadas em regiões centroméricas de cromossomos de *Polybia fastidiosuscula* Saussure (Marchioro et al., 2021). Hipotetiza-se que a repetição telomérica (TTAGG)₆ teria sido perdida no ancestral de Apocrita e reaparecido em Formicidae e Apidae (Menezes et al. 2017). Buscando explicar os padrões observados para as repetições teloméricas alternativas (TCAGG)₆ e (TTAGG)₆ em *P. fastidiosuscula*, os autores assumiram que essas na verdade não seriam repetições teloméricas, mas resquícios não perdidos/modificados de eventuais ancestrais e, por meio de rearranjos, restritas nas regiões centroméricas nos grupos recentes. Para *C. erecta* citótipo I, a hipótese de fusão explica de forma mais

adequada a variação observada visto que há redução do número cromossômico para $2n=22$ e além disso os cromossomos de *C. limata* e *C. aff. Erecta* ainda retêm repetições (TCAGG)₆ nas suas regiões teloméricas e todas as espécies apresentam a repetição (TTAGG)₆ nos telômeros. Desse modo, através de eventos de fusão esses sítios até então terminais seriam observados na região centromérica.

A maioria dos cromossomos de *Crematogaster* são metacêntricos. Dessa forma, o mecanismo sugerido para a redução do número cromossômico no gênero e a presença de cromossomos meta/submetacêntricos seria a fusão robertsoniana. Resultados semelhantes foram observados por Travenzoli et al. (2019b), em que as fusões foram hipotetizadas para explicar a redução do número cromossômico nas abelhas do gênero *Melipona*.

Crematogaster tenuicula apresentou blocos AT-positivos, em regiões pericentroméricas dos cromossomos (figura 6). Outras espécies como *Wasmannia auropunctata* (Souza et al., 2011), *Mycetophylax conformis* e *Mycetophylax simplex* (Cardoso et al., 2014, 2021) também mostraram regiões ricas em AT em regiões heterocromáticas dos seus genomas. Blocos cromossômicos ricos em AT são raros nos genomas de espécies de formigas e podem eventualmente ser úteis na compreensão taxonômica e na construção de hipóteses sobre a evolução cromossômica de diferentes grupos de Formicidae.

Duas colônias de *C. erecta* apresentaram citótipos distintos (figura 1a, 1b). Embora os dois citótipos tenham apresentado $2n=22$ cromossomos, o citótipo I possui fórmula cariotípica $2n=18m+4sm$ e o citótipo II $2n=20m+2sm$. Nota-se que essa variação é resultado de alterações cromossômicas capazes de afetar o tamanho dos braços dos cromossomos e assim a posição do centrômero. Não foram detectados indivíduos heterozigotos, ou seja, com um par de cromossomos homeólogos com morfologia distinta. Uma segunda característica é a posição da NOR em que o citótipo I mostrou clusters de rDNA restritos ao braço longo do último par submetacêntrico, enquanto que no citótipo II, esses genes estavam presentes no braço curto do terceiro par metacêntrico (figura 2a, 2b). Alguns indivíduos do citótipo I apresentaram um heteromorfismo de tamanho dos sítios de NOR (figura 2a) e não foram detectados heteromorfismos no citótipo II. Não foram observados indivíduos com caracteres intermediários ou combinados, o que sugere ausência de fluxo gênico entre esses dois grupos, ou seleção contra eventuais caracteres intermediários. Embora as

operárias tenham caracteres morfológicos semelhantes, as diferenças cariotípicas observadas entre os dois citótipos de *C. erecta* corroboram a hipótese da existência de espécies crípticas nesse táxon .

Cada espécie caracteriza-se por apresentar um cariótipo cujo número e morfologia dos cromossomos usualmente são conservados entre diferentes populações, independentemente de sua distribuição geográfica (Guerra,1988; Mariano et al., 2015). Embora cada espécie tenha um número cromossômico característico, rearranjos cromossômicos causam mudanças no cariótipo, que podem alterar o número e a morfologia dos cromossomos, ocasionando diferenças a níveis inter e intrapopulacional e, entre espécies irmãs ou espécies crípticas (Lorite & Palomeque, 2010).

A maioria das descrições de espécies está de acordo com o que pode ser considerado como o conceito morfológico de espécie, mas a especiação nem sempre é acompanhada por mudança morfológica (Bickford et al., 2006) uma vez que, modificações numéricas ou alterações morfológicas nos cromossomos podem resultar em especiação (Lorite & Palomeque, 2010). Os espécimes de *C. erecta* estudados são morfológicamente indistinguíveis, porém apresentam variações citogenéticas complexas (número, morfologia, padrão de microssatélites e NOR) sugerindo a possibilidade de existência de citótipos distintos, e potencialmente de espécies crípticas.

Para a delimitação das espécies de *Crematogaster* há problemas taxonômicos, desde a desorganização na nomenclatura das espécies até o excesso de sinonimizicações (Blaimer, 2012d; Hosoishi e Ogata, 2009). É possível hipotetizar que o número real de espécies do gênero provavelmente seja maior do que aquele atualmente reconhecido. Estudos citogenéticos têm auxiliado na resolução de problemas taxonômicos em espécies de formigas pertencentes a grupos taxonômicos complexos (Aguiar et al., 2017; Teixeira et al., 2020; Barros et al., 2021b). Associar informações citogenéticas com dados morfológicos e ecológicos mostra-se uma poderosa abordagem para ajudar na na delimitação de táxons de taxonomia complexa

5. CONCLUSÕES

Dados citogenéticos inéditos para cinco espécies de formigas do gênero *Crematogaster* são apresentados. Além disso, há o primeiro registro da ocorrência de *C. erecta*, *C. limata* e *C. tenuicula* no estado do Amapá, extremo norte do Brasil, a qual é uma região cujos dados mirmecológicos e, conseqüentemente, muitas espécies ainda permanecem desconhecidos, sem qualquer informação citogenética disponível. Dados a respeito do mapeamento físicos de regiões repetitivas de DNA nos cromossomos mostraram seu grande potencial auxiliando a compreender padrões de evolução cariotípica, eventuais rearranjos e detecção de espécies crípticas. As cinco espécies de *Crematogaster* apresentaram apenas um par cromossômico portador dos genes ribossomais 18S localizados em região intracromossômica. Um heteromorfismo de tamanho de NOR na região intracromossômica em *C. erecta* citótipo I foi detectado. A distribuição dispersa dos microssatélites (GA)₁₅ e as características dos cariótipos de *Crematogaster*, sugerem que rearranjos do tipo fissões cêntricas, com sucessivas inversões têm grande importância na evolução dos cromossomos das espécies desse gênero. Padrões potencialmente relevantes para a compreensão evolutiva do grupo foram obtidos observando o padrão de distribuição de sequências teloméricas TCAGG₍₆₎ em *C. erecta* citótipo I. Seu padrão centromérico sugere que fusões cromossômicas também possuem seu papel no processo de evolução dos cariótipos dessas formigas.

Dois citótipos para *C. erecta* foram detectados através da análise morfológica dos seus cromossomos, do par portador de genes 18S e de um heteromorfismo de tamanho de NOR. através do estudo citogenético realizado foi possível relacionar esses citótipos a potenciais espécies crípticas.

Crematogaster é reconhecidamente um gênero de formigas extremamente complexo, com distribuição cosmopolita. A história natural das espécies desse gênero é intimamente relacionada ao seu padrão biogeográfico e, desse modo, não necessariamente seguem um único padrão. Investigações citogenéticas de *Crematogaster* na Amazônia através do mapeamento físico de regiões repetitivas de DNA contribuirão com as futuras discussões da evolução das espécies do gênero e enriquecerão a compreensão taxonômica de outras espécies desse gênero localizadas em outras regiões.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abad, A. C. A., de Araújo Lopes, F., Junior, J. W. P., & Mota, R. A. (2014). Marcadores moleculares e suas aplicações nas pesquisas com animais. *Acta Veterinaria Brasilica*, 8:10-18.
- Aguiar, H. J. A. C.; Barros, L. A. C.; dos Santos Ferreira Mariano, C.; Delabie, J. H. C.; Pompolo, G. S. (2011). 45S rDNA localization for the giant ant *Dinoponera gigantea* with evolutionary inferences for the *Dinoponera* genus (Formicidae: Ponerinae). *Sociobiology*, 57: 607-620.
- Aguiar, H. J. A. C.; Barros, L. A. C.; Alves, D. R.; Mariano, C. D. 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: e0177702.
- Aguiar H. J. A. C.; Barros, L. A. C.; Silveira, L. I.; Petitclerc, F.; Tienne, S.; Orivel, J. (2020). Cytogenetic data for sixteen ant species from North-eastern Amazonia with phylogenetic insights into three subfamilies. *Comparative Cytogenetics*, 1: 43-60.
- Andrade-Souza, V.; Duarte, O. M. P.; Martins, C. C. C.; Santos, I. S.; Costa, M. G.C.; Costa, M.A. (2018) Comparative molecular cytogenetics of *Melipona Illiger* species (Hymenoptera: Apidae). *Sociobiology*, 65: 696-70.
- Albuquerque, E. Z., et al. (2021). Ants of the State of Pará, Brazil: a historical and comprehensive dataset of a key biodiversity hotspot in the Amazon Basin. *Zootaxa*, 5001:1-83.
- Baccaro, F. B. *Guia para os gêneros de formigas do Brasil*. Manaus. INPA, 2015.
- Barros, L. A. C.; Teixeira, G. A.; Aguiar, H. J. A. C.; Lopes, D. M.; Pompolo, S. G. (2018). Cytogenetic studies in *Trachymyrmex holmgreni* Wheeler, 1925 (Formicidae: Myrmicinae) by conventional and molecular methods. *Sociobiology*, 65: 185-190.
- Barros, L. A. C.; Aguiar, H. J. A. C.; Teixeira, G. A.; Souza, D. J.; Delabie, J. H. C.; Mariano, C. S. F. (2021a). Cytogenetic studies on the social parasite *Acromyrmex ameliae* (Formicidae: Myrmicinae: Attini) and its hosts reveal chromosome fusion in *Acromyrmex*. *Zoologischer Anzeiger*, 293: 273-281.

- Barros, L. A. C.; Chaul, J. C. M.; Orivel, J.; Aguiar, H. J. A. C. (2021b). Cytogenetics of *Strumigenys louisianae* Roger, 1863 (Formicidae: Myrmicinae) from North eastern Amazonia shed light on a difficult species complex. *Zoologischer Anzeiger*, 294: 100-105.
- Blaimer, B. B. (2010). Taxonomy and Natural History of the *Crematogaster* (*Decacrema*) group (Hymenoptera: Formicidae) in Madagascar. *Zootaxa*, 2714: 1-39.
- Blaimer B. B. (2012a). *Crematogaster* (Hymenoptera: Formicidae). *Molecular phylogenetics and Evolution*, 65: 421-436.
- Blaimer, B. B. (2012b). Taxonomic revision and species-groups of the subgenus *Crematogaster* (*Orthocrema*) in the Malagasy region (Hymenoptera, Formicidae). *Zookeys*, 199: 23-70.
- Blaimer, B. B. (2012c). A subgeneric revision of *Crematogaster* and discussion of regional species-groups (Hymenoptera: Formicidae). *Zootaxa*, 3482: 47-67.
- Blaimer, B. B. (2012). Acrobat ants go global—Origin, evolution and systematics of the genus *Crematogaster* (Hymenoptera: Formicidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 65: 421-436.
- Bolton, B. Online Catalog of the Ants of the World. (2021). Disponível em: <https://antwiki.org/wiki/Crematogaster> (acesso em: 03 setembro 2021).
- Bolton B. 2021. An online catalog of the ants of the world <http://antcat.org>. (Accessed 15 January 2021).
- Bond, J. (2000). Microsatellites: Evolution and Applications. In: Bond, J Edited DB Goldstein and C. Schlötterer, Oxford University Press, 1999. 368 pages. *Genetics Research*, 75: 123-125.
- Buren, W.F. (1959). (A review of the species of *Crematogaster* sensu stricto, in North America (Hymenoptera: Formicidae), part I. *Journal of the New York Entomological Society*, 66: 119-134.
- Cardoso, D. C.; Cristiano, M. P.; Barros, L. A. C.; Lopes, D. M., Pompolo, S. G. (2012). First cytogenetic characterization of a species of the arboreal ant genus *Azteca* Forel, 1978 (Dolichoderinae, Formicidae). *Comparative Cytogenetics*, 6:107.
- 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: e87473.
- Cardoso, D. C.; Santos, H. G.; Cristiano, M. P. (2018). The Ant Chromosome database-ACdb: an online resource for ant (Hymenoptera: Formicidae) chromosome researchers. *Myrmecological News*, 27: 87-91.
- Cardoso, D. C.; Moura, M. N.; Cristiano, M. P. (2022). Dynamic development of AT-rich heterochromatin has followed diversification and genome expansion of psammophilous *Mycetophylax* (Formicidae: Attini: Attina). *Insect Molecular Biology*, 1:11.
- Casevitz-Weulersse, J. (1972). Habitats et comportement nidificateur de *Crematogaster Scutellaris* Oliver. *Bulletin de la Societe Entomologique de France*, 77: 12-19.
- Cabral-de-Mello, D. C.; Oliveira, S. G.; Moura, R. C.; Martins, C. (2011) Chromosomal organization of the 18S and 5S rRNAs and histone H3 genes in Scarabaeinae coleopterans: insights into the evolutionary dynamics of multigene families and heterochromatin. *BMC Genetics*, 12; 8.
- Castro, C. P. M.; Cardoso, D. C.; Micolino, R.; Cristiano, M. P. (2020). Comparative FISH-mapping of TTAGG telomeric sequences to the chromosomes of leafcutter ants (Formicidae, Myrmicinae): is the insect canonical sequence conserved? *Comparative Cytogenetics*, 14: 369.
- Charlesworth, B.; Sniegowski, P.; Stephan, W. (1994). The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature*, 371: 215-220.
- Cioffi M. B.; Kejnovsky E.; Bertollo L. A. C. (2010). The Chromosomal Distribution of Microsatellite Repeats in the Genome of the Wolf Fish *Hoplias malabaricus*, Focusing on the Sex Chromosomes. *Cytogenetic and Genome Research*, 132: 289-296.
- Cohen, S.; Segal, D. (2009). Extrachromosomal Circular DNA in Eukaryotes: possible involvement in the plasticity of tandem repeats. *Cytogenetic and Genome Research*, 124: 327–338.
- Cuadrado, A.; Jouve, N. (2002) Evolutionary trends of different repetitive DNA sequences during speciation in genus *Secale*. *Journal Heredity*, 93: 339-345.

- Cunha, M. S.; Reis, V. J. C.; Dergam, J. A. (2016). Closely related syntopic cytotypes of *Astyanax taeniatus* (Jenyns, 1842) from the upper Piranga River, upper Doce Basin in southeastern Brazil. *Zebrafish*, 13: 112-117.
- Estoup, A.; Solignac, M.; Harry, M.; Cornuet, J. M. (1993). Characterization of (GT)_n and (CT)_n microsatellites in two insect species: *Apis mellifera* and *Bombus terrestris*. *Nucleic Acids Research*, 21: 1427-1431.
- Dutrillaux, A. M.; Carton, B.; Cacheux, L.; Dutrillaux, B. (2016). Interstitial NORs, fragile sites, and chromosome evolution: a not so simple relationship-the example of *Melolontha melolontha* and genus *Protaetia* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Cytogenetic and Genome Research*, 149: 304-311.
- Franco, W.; Ladino, N.; Delabie, J. H.; Dejean, A.; Orivel, J.; Fichaux, M.; Feitosa, R. M. (2019). First checklist of the ants (Hymenoptera: Formicidae) of French Guiana. *Zootaxa*, 4674:509-543.
- Gaubatz, J. W. (1990). Extrachromosomal circular DNAs and genomic sequence plasticity in eukaryotic cells. *Mutation Research/DNAging*, 237: 271-292.
- Gerbault-Seureau, M.; Cacheux, L.; Dutrillaux, B. (2017) The relationship between the (In) stability of NORs and their chromosomal location: the example of Cercopithecidae and a short review of other primates. *Cytogenetic and Genome Research*, 153: 138-146.
- Gokhman, V. E.; Kuznetsova, V. G. (2018). Parthenogenesis in Hexapoda: holometabolous insects. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 56: 23-34.
- Guerra, M. (2004). Hybridization in situ: princípios Básicos. FISH–Conceitos e Aplicações na Citogenética. Edited by M. Guerra. *Sociedade Brasileira de Genética*. Ribeirão Preto, 1-32.
- Gullan, P. J., & Cranston, P. S. (2012). *Os Insetos: um Resumo de Entomologia* (4 ed). Davis, USA: Roca.
- Hall, K. J.; Parker, J. S. (1995). Stable chromosome fission associated with rDNA mobility. *Chromosome Research*, 3: 417-422.
- Hatanaka, T.; Henrique-Silva, F.; Galetti Jr, P. M. (2002). A polymorphic, telomeric like sequence microsatellite in the neotropical fish *Prochilodus*. *Cytogenetic and Genome Research*, 98: 308-310.

- Hirai, H. Yamamoto, M.T.; Ogura, K.; Satta, Y.; Yamada, M.; Taylor, R. W.; Imai H. T. (1994) Multiplication of 28S rDNA and NOR activity in chromosome evolution among ants of the *Myrmecia pilosula* species complex. *Chromosoma*, 103:171–178.
- Hirai, H.; Yamamoto, M. T.; Taylor, R. W.; Imai, H. T. (1996). Genomic dispersion of 28S rDNA during karyotypic evolution in the ant genus *Myrmecia* (Formicidae). *Chromosoma*, 105: 190-196.
- Hirai, H. (2020). Chromosome dynamics regulating genomic dispersion and alteration of nucleolus organizer regions (NORs). *Cells*, 9: 971.
- Hölldobler, B.; Wilson, E. O. (1990). *The Ants* (Harvard Univ. Press, Cambridge. MA.
- Hölldobler, B.; Wilson, E. O. *The super-organism*. New York. ww norton & co, 2009.
- Hosoishi, S.; Ogata, K. (2010). On the identity of *Crematogaster schimmeri* Forel, 1912 and the distribution of subgenus *Decacrema* in Asia (Hymenoptera: Formicidae). *Asian Myrmecology*, 3: 1-3.
- Imai, H. T.; Urbani, C. B.; Kubota, M.; Sharma, G. P.; Narasimhanna, M. N.; Das, B. C.; Rajasekarasetty, M. R. (1984). Karyological survey of Indian ants. *The Japanese Journal of Genetics*, 59: 1-32.
- Imai, H. T.; Kubota, M.; Brown J. r.; W. L.; Ihara, M.; Tohari, M.; Pranata, R. I. (1985). Chromosome observations on tropical ants from Indonesia. *Annual Report of National Institute Genetics. (Japan)*, 35: 46-48.
- Imai, H. T.; Taylor, R. W.; Crosland, M. W. J.; 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.
- Jentzsch, I. M. V.; Bagshaw, A.; Buschiazzo, E., Merkel, A.; Gemmell, J. E. (2008). Evolution of microsatellite DNA. *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*, 1: 12.
- Kubat, Z.; Hobza, R.; Vyskot, B.; Kejnovsky, E. (2008). Microsatellite accumulation on the Y chromosome in *Silene latifolia*. *Genome*, 51: 350-356.
- Kuznetsova, V.; Grozeva, S.; Gokhman, V. (2019). Telomere structure in insects: A review. *Journal of Zoological Systematics of Evolutionary Research* 58: 127-58.
- Lach, L.; Parr, C.; Abbott, K. (Eds.). (2010). *Ant ecology*. Oxford university press.
- Levan, A.; Fredga, K.; Sandberg, A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 201- 220.

- Li, Y. C.; Korol, A. B.; Fahima, T.; Nevo, E. (2004). Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 21: 991-1007.
- Longino. J. T. (2003). The *Crematogaster* (Hymenoptera, Formicidae, Myrmicinae) of Costa Rica. *Zootaxa*, 151: 1-150.
- López-Flores, I., & Garrido-Ramos, M. A. (2012). The repetitive DNA content of eukaryotic genomes. *Repetitive DNA*, 7:1-28.
- Lorite, P.; Carrillo, J. A.; Palomeque, T. (2002). Conservação de (TTAGG) n sequências teloméricas entre formigas (Hymenoptera, Formicidae). *Journal of Heredity*, 93: 282-285.
- 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.
- Marchioro, P.; Campos, L. A.; Lopes, D. M. (2020). First Record of a B Chromosome in *Polybia fastidiosuscula* Saussure (Vespidae) and Investigation of Chromatin Composition Through Microsatellite Mapping. *Cytogenetic and Genome Research*, 160: 711-718.
- Mariano, C. S. F.; Pompolo, S. G.; Barros, L. A. C.; Mariano-Neto, E.; Campiolo, S.; Delabie, J. C. H. (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. D. G.; Silva, J. G.; Delabie, J. H. C. (2012). Contribution of cytogenetics to the debate on the paraphyly of *Pachycondyla* spp. (Hymenoptera, Formicidae, Ponerinae). *Psyche*, 2012: 10.
- Mariano, C. S.; Santos, I. S.; Silva, J. D.; Costa, M. A.; Pompolo, S. G.; Delabie, J. H. C.; Majer, J. (2015). Citogenética e evolução do cariótipo em formigas poneromorfas. As formigas poneromorfas do Brasil. Ilhéus: Editus. Editora da Universidade Estadual de Santa Cruz, 103-125, 2015.
- Mariano, C. S. F.; Barros, L. A. C.; Velasco, Y. M.; Guimarães. (2019) In:., Pompolo S. G.; Delabie JHC. Citogenética de hormigas de la región neotropical. In: Fernández F, Guerrero R, Delsinne T (Eds) Hormigas de Colombia. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 131-157, 2019.

- Marlier, J. F.; Quinet, Y.; de Biseau, J.C. Defensive behaviour and biological. (2004). Activities of the abdominal secretion in the ant *Crematogaster scutellaris* (Hymenoptera: Myrmicinae). *Behavioural Processes*, 67:427-440.
- Martins, C.; Wasko, A. P. (2004). Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. *Focus on genome research*, 289: 318.
- Martins, C. (2007). Cromossomos e DNAs repetitivos: uma contribuição para o conhecimento do genoma de peixes. *Citogenética de peixes*, 421: 452.
- Maryanska-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 8S rDNA probes. *Comparative Cytogenetics*, 10: 347-369.
- 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: 385-393.
- Menezes, R. S.; Bardella, V. B.; Cabral-de-Mello, D. C.; Lucena, D. A.; Almeida, E. A. (2017). Are the TTAGG and TTAGGG telomeric repeats phylogenetically conserved in aculeate Hymenoptera? *The Science of Nature*, 104(9), 1-7.
- Meyne, J.; Hirai, H.; Imai, H. T. (1995). Análise FISH das seqüências de telômeros de formigas bulldog (Myrmecia: Formicidae). *Chromosoma*, 104: 14-18.
- Milani, D.; Cabral-de-Mello, D.C. (2014). Microsatellite organization in the grasshopper *Abracris flavolineata* (Orthoptera: Acrididae) revealed by FISH mapping: remarkable spreading in the A and B chromosomes. *PLoS ONE* 5:1-6.
- Moller, H. D.; Mohiyuddin, M.; Prada-Luengo, I.; Sailani, M. R.; Halling, J. F.; Plomgaard, P.; Regenberg, B. (2018). Circular DNA elements of chromosomal origin are common in healthy human somatic tissue. *Nature Communications*, 9: 1-12.
- Mravinac, B.; Mestrovic, N.; Cavrak, V. V.; Plohl, M. (2011). TCAGG, an alternative telomeric sequence in insects. *Chromosoma*, 120: 367-376.
- Naciri, S. Vigouroux, S.; Dallas J.; Desmarais, E.; Deserto, C., 1995. Identification and inheritance of (GA/TC)_n and (AC/GT)_n repeats in the European flat oyster *Ostrea edulis* (L.). *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 4: 83-89.

- Nguyen, P.; Sahara, K.; Yoshido, A.; Marec, F. (2010) Evolutionary dynamics of rDNA clusters on chromosomes of moths and butterflies (Lepidoptera). *Genetica*, 138: 343–354.
- Okazaki S, Tsuchida K, Maekawa H, Ishikawa H, Fujiwara H (1993) Identification of a pentanucleotide telomeric sequence, (TTAGG)_n, in the silkworm *Bombyx mori* and in other insects. *Molecular and Cellular Biology* 13: 1424-1432.
- Oliveira, M. A. D.; Della Lucia, T.; Araújo, M. D. S.; Cruz, A. P. D. (1995). A fauna de formigas em povoamentos de eucalipto e mata nativa no estado do Amapá. *Acta Amazonica*, 25: 117-126.
- Palacios-Gimenez, O. M.; Cabral-de-Mello, D. C. (2015). Repetitive DNA chromosomal organization in the cricket *Cycloptiloides americanus*: a case of the unusual X1X20 sex chromosome system in Orthoptera. *Molecular Genetics and Genomics*, 290: 623-631.
- Paulsen, T.; Kumar, P.; Koseoglu, M. M.; Dutta, A. (2018). Discoveries of extrachromosomal circles of DNA in normal and tumor cells. *Trends in Genetics*, 34: 270-278.
- Peeters. C.; Chung-Chi lin, C. C.; Quinet., Y.; Segundo, G. M.; Billen, J. Evolution of a (2013). Soldier caste specialized to lay unfertilized eggs in the ant genus *Crematogaster* (subgenus *Orthocrema*). *Arthropod Structure & Development*. 42: 257-264.
- Peixoto, M. A. A.; Oliveira, M. P.; Feio, R. N.; Dergam, J. A. (2016). Karyological study of *Ololygon tripui* (Loureço, Nascimento and Pires, 2009), (Anura, Hylidae) with comments on chromosomal traits among populations. *Comparative Cytogenetics*, 10: 505.
- 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.
- Pereira, T. T. P., Dos Reis, A. C. C. C.; Cardoso, D. C.; Cristiano, M. P. (2018). Molecular phylogenetic reconstruction and localization of the (TTAGG)_n telomeric repeats in the chromosomes of *Acromyrmex striatus* (Roger, 1863) suggests a lower ancestral karyotype for leafcutter ants (Hymenoptera). *Comparative Cytogenetics* 12: 13–26.

- Piccoli, M. C. A.; Bardella, V. B.; Cabral-de-Mello, D. C. (2018). Repetitive DNAs in *Melipona scutellaris* (Hymenoptera: Apidae: Meliponidae): chromosomal distribution and test of multiple heterochromatin amplification in the genus. *Apidologie*, 49: 497-504.
- Pinkel, D.; Straume, T.; Gray, J. W. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83: 2934-2938.
- Poltronieri, J.; Marquioni, V.; Bertollo, L. A. C.; Kejnovsky, E.; Molina, W. F.; Liehr, T.; Cioffi, M. B. (2014). Comparative chromosomal mapping of microsatellites in *Leporinus* species (Characiformes, Anostomidae): unequal accumulation on the W chromosomes. *Cytogenetic and Genome Research*, 142:40-45.
- Roa, F.; Guerra, M. (2012) Distribution of 45S rDNA sites in chromosomes of plants: structural and evolutionary implications. *BMC Evolutionary Biology*, 12: 1-13.
- Ruiz-Ruano, F. J.; Cuadrado, Á.; Montiel, E. E.; Camacho, J. P. M.; López-León, M. D. (2014). Next generation sequencing and FISH reveal uneven and nonrandom microsatellite distribution in two grasshopper genomes. *Chromosoma*, 124: 221-234.
- Santini, G.; Tucci, L.; Ottonetti, L.; Frizzi, F. (2007). Competition trade-offs in the organisation of a Mediterranean ant assemblage. *Ecological Entomology* 32:319-326.
- Santini, G. R.; Amsay, P. M.; Tucci, L.; Ottonetti, L.; Frizzi, F. (2011). Spatial patterns of the ant *Crematogaster scutellaris* in a model ecosystem. *Ecological Entomology*. 36: 625-634.
- Santos, I. S. Mariano, C. S. F.; Andrade, V.; Costa, M. A.; Delabie, J. H. C.; 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: 424-429.
- Santos, J. M.; Diniz, D.; Rodrigues, T. A. S.; Cioffi, M.; Waldschmidt, A. M. (2018). Heterochromatin distribution and chromosomal mapping of microsatellite repeats in the genome of *Frieseomelitta* stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Florida Entomologist*, 101(1), 33-39.
- Schemberger, M. O.; Oliveira, J. I. N.; Nogaroto, V.; Almeida, M. C.; Artoni, R. F.; Cestari, M. M.; Vicari, M. R. (2014). Construction and characterization of a

- repetitive DNA library in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes): A genomic and evolutionary approach to the degeneration of the W sex chromosome. *Zebrafish*, 11: 517-527.
- Schubert, I.; Lysak, M. A. (2011). Interpretation of karyotype evolution should consider chromosome structural constraints. *Trends in Genetics*, 27: 207-216.
- Schults. T. R. In search of ant ancestors. (2000). Commentary PNAS. Washington. 26:14028-14029.
- Schneider, C. H.; Gross, M. C.; Terencio, M. L.; Tavares, É. S. G. M.; Martins, C.; Feldberg, E. (2015). Chromosomal distribution of microsatellite repeats in *Amazon cichlids genome* (Pisces, Cichlidae). *Comparative Cytogenetics*, 9: 595.
- Schweizer, D. (1980) Simultaneous fluorescent staining of R bands in a specific heterochromatin region (DA/DAPI-bands) in human chromosomes. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 27: 190-193.
- Souza, A. L. B.; Mariano, C. D. S. F.; Delabie, J. H. C.; Pompolo, S. D. G.; Serrão, J. E. (2011, January). 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.
- Stephan, W.; Cho, S. (1994). Possible role of natural selection in the formation of tandem-repetitive noncoding DNA. *Genetics*, 136:333-341.
- Sumner, A. T. (2003). Chromosomes organization and function. By Blackwell Science Ltd. *a Blackwell Publishing company. United Kingdom*, 1: 143-153.
- Teixeira, G. A.; Barros, L. A. C.; Lopes, D. M.; Aguiar, H. J. A. C. (2020) Cytogenetic variability in four species of *Gnamptogenys* Roger, 1863 (Formicidae: Ectatomminae) showing chromosomal polymorphisms, species complex, and cryptic species. *Protoplasma*, 257: 549–560.
- Teixeira, G.A., Aguiar, H.J.A.C., Petitclerc, F., Orivel, J., Lopes, D.M., Barros, L.A.C., (2021). Evolutionary insights into the genomic organization of major ribosomal DNA in ant chromosomes. *Insect Molecular Biology* 30: 340-354.
- Travenzoli, N. M.; Lima, B. A.; Cardoso, D. C.; Dergam, J. A.; Fernandes-Salomão, T. M.; Lopes, D. M. (2019a). Cytogenetic analysis and chromosomal mapping of repetitive DNA in *Melipona* species (Hymenoptera, Meliponini). *Cytogenetic and Genome Research*, 158: 213-224.

- Travenzoli, N. M., Cardoso, D. C., Werneck, H. D. A., Fernandes-Salomão, T. M., Tavares, M. G., & Lopes, D. M. (2019b). The evolution of haploid chromosome numbers in Meliponini. *PLoS ONE*, *14*: e0224463.
- Charlesworth, B.; Sniegowski, P.; Stephan, W. (1994). The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature*, *371*: 215-220.
- Ward, P. S. (2007). Phylogeny, classification, and species-level taxonomy of ants (Hymenoptera: Formicidae). *Zootaxa*. 1668: 549–563.
- Ward, P. S. (2014). The Phylogeny and Evolution of Ants. *The Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, California, *45*: 2.1-2.21.
- Wheeler, D. E. (1986). *Ectatomma tuberculatum*: Foraging biology and association with *Crematogaster* (Hymenoptera: Formicidae). *Annals of the Entomological Society of America*, *79*: 300-303.
- Zakian, V. A. (1995). Telomeres: beginning to understand the end. *Science*, *270*: 1601-1607.
- Zakian, V. A. (2012). Telomeres: the beginnings and ends of eukaryotic chromosomes. *Experimental Cell Research*, *318*: 1456-1460.