UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ- UESC

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR- PPGM

MARIA LUIZA DE SOUSA NETA

# CITOGENÉTICA DE FORMIGAS DO GÊNERO *Azteca*, FOREL 1878

ILHÉUS- BAHIA- BRASIL
2023

**MARIA LUIZA DE SOUSA NETA**

# CITOGENÉTICA DE FORMIGAS DO GÊNERO *Azteca,* FOREL 1878

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como exigência para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientador: Dr. Marco Antonio Costa
Co-orientadora: Drª Cléa dos Santos F. Mariano

ILHÉUS- BAHIA- BRASIL
2023

**MARIA LUIZA DE SOUSA NETA**

# CITOGENÉTICA DE FORMIGAS DO GÊNERO *Azteca,* FOREL 1878

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como exigência para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientador: Dr. Marco Antonio Costa
Co-orientadora: Drª Cléa dos Santos F. Mariano

APROVADA: 27 de fevereiro de 2023

Prof. Dr. Paulo Roberto Antunes de Mello Affonso
(UESB)

Prof. Dr. Elder Assis Miranda
(IFBA)

Prof. Dr. Juvenal Cordeiro
(UESB)

Prof. Dr. Marco Antonio Costa
(UESC – Orientador)

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Santa Cruz e Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular pela oportunidade de cursar o mestrado em Genética e Biologia Molecular.

À CAPES pela concessão da bolsa.

*"Até aqui tem me ajudado o Senhor" (1Sm 7, 12)*

*Agradeço à Deus, por todas as oportunidades que me foram concedidas , e pela graça de poder chegar até aqui.*

Aos meus pais que sempre me incentivaram e batalharam muito para que eu “tivesse um estudo”, como assim o dizem. Aos meus avós que sempre acreditaram no meu potencial e sempre me incentivaram. Aos meus irmãos, por todo cuidado, toda preocupação e apoio enquanto tive que sair de casa para estudar. E assim, a todos os meus familiares que me incentivaram e sempre se alegraram a cada etapa que consegui avançar através dos estudos.

Ao meu orientador, professor dr. Marco Antônio pelas orientações, por todo acolhimento e apoio. Sempre se mostrou compreensível, dedicado e esforçado em ajudar e a guiar na tomada de decisões. À minha co-orientadora, Cléa Mariano, por fazer parte dessa trajetória, me orientando e aconselhando. Sempre esteve disponível nos momentos que dela precisei, sendo muito solicita. Agradeço a ela e ao professor dr. Jacques Delabie pelo material cedido. Ao professor Jacques pela identificação das espécies e por todo incentivo.

Aos meus colegas de laboratório Juliana e João Vitor, por sempre alegrar mais o ambiente, por partilhar os momentos e dar uma palavra de ânimo quando as coisas não davam certo.

Às colegas de coletas: Érica, Josy, Laís, Mariane e Rebeca. Por tornarem divertido cada coleta, por sempre me ajudarem e me acolherem como se acolhe um membro da família. À vocês, minha gratidão!

**RESUMO**

A Citogenética é o estudo dos cromossomos e cariótipos, tanto no que diz respeito à sua morfologia, organização, função, quanto a sua variação e evolução. Esses estudos podem ser realizados tanto utilizando a citogenética clássica, como a citogenética molecular. Em formigas, há registro de dados citogenéticos para mais de 750 espécies, que apontam uma variação de número diplóide entre 2n=2, a 2n=120. Para o gênero *Azteca* (subfamília Dolichoderinae) estudos citogenéticos ainda são incipientes quando se compara à diversidade de espécies do gênero. Com isso, este estudo buscou caracterizar os cariótipos de formigas do gênero *Azteca*, utilizando técnicas de citogenética clássica e molecular, com o intuito de verificar as diferenças cariotípicas, em relação a estrutura dos cromossomos, localização das segmentos ricos em pares de bases Adenina-Timina, Citosina-Guanina e dos clusters de genes ribossomais, conciliando os resultados obtidos com conhecimento dos processos evolutivos em Formicidae. Foram analisadas diferentes espécies do gênero *Azteca*, Forel, 1878, de diferentes localidades. A análise convencional de coloração com Giemsa revelou uma variação numérica e estrutural cromossômica entre as espécies variando de 2n= 18 a 2n= 28. A coloração com fluorocromos revelou múltiplas marcações CMA3+ nos cariótipos das espécies que foram submetidos à essa técnica. Foi realizado o bandeamento NOR em uma espécie de *Azteca* (*Azteca* sp 2), resultando na marcação do 5º par cromossômico. Quanto ao padrão de hibridização do DNA (GA)15, a sonda estava presente ao longo de todos os pares cromossômicos, Utilizando a técnica de FISH, foi possível observar que *Azteca alfari* e *Azteca chartifex spiriti* apresentaram diversidade nas marcações de CMA3+, porém na localização de genes ribossomais 18S marcou positivo para o 5º par cromossômico, coincidindo com a banda NOR. Com este estudo foi possível observar variações dentro do gênero *Azteca*, que podem ser úteis em análises filogenéticas.

Palavras-chave: cromossomos; citogenética; formigas; FISH.

**Abstract**

Cytogenetics is the study of chromosomes and karyotypes, with regard to their morphology, organization, function, and their variation and evolution. These studies can be performed either using classical cytogenetics or molecular cytogenetics. In ants, there are records of cytogenetic data for more than 750 species, which show a diploid number variation between 2n=2, to 2n=120. For the genus *Azteca* (subfamily Dolichoderinae) cytogenetic studies are still incipient when considering the diversity of species of the genus. Thus, this study sought to characterize the karyotypes of *Azteca* ants, using classical and molecular cytogenetic techniques, with the aim of verifying karyotypic differences in chromosome structure, location of segments rich in A-T and C-G base pairs and of the ribosomal gene clusters, reconciling the results obtained with knowledge of evolutionary processes in Formicidae. Different species of the genus *Azteca*, Forel, 1878 from different locations were analyzed. Conventional Giemsa staining analysis revealed numerical and structural chromosomal variation between species ranging from 2n=18 to 2n=28. Fluorochrome staining revealed multiple CMA3+ markings in the karyotypes of the analyzed species. NOR banding was performed in an *Azteca* species (*Azteca* sp 2), resulting in the marking of the 5th chromosome pair. As for the hybridization pattern of the DNA probe (GA)15, the probe hybridized along all chromosome pairs. It was possible to observe that *Azteca alfari* and *Azteca chartifex spiriti*, despite presenting diversity in the CMA3+ markings, revealed localization of ribosomal genes only in the 5th chromosome pair, coinciding with the NOR band. With this study it was possible to observe a variation within the genus *Azteca*, which may be useful in phylogenetic analyses.

Keywords: chromosomes; cytogenetics; ants; FISH.

**ÍNDICE**

1. Introdução ..... 6
2. Fundamentação teórica ..... 7
2.1 O gênero *Azteca* ..... 7
2.2 Citogenética clássica e molecular ..... 9
2.2.1 Citogenética e suas aplicações ..... 9
2.2.2 Regiões Organizadoras de Nucléolo ..... 12
2. 3 Rearranjos cromossômicos ..... 14
2.4 Citogenética em Formicidae ..... 16
2. Objetivos ..... 19
3. Material e metodos ..... 20
4. Resultados ..... 22
5. Discussão ..... 28
6. Conclusão ..... 30
7. Referências ..... 32

# 1. INTRODUÇÃO

A ordem Hymenoptera é considerada um dos maiores grupos dentre os insetos, compreendendo as vespas, abelhas e formigas (HANSON; GAULD, 1995). As formigas constituem um grupo bastante diverso, com 347 gêneros válidos que agrupam mais de 14.087 espécies descritas, incluídas na família Formicidae. Representam de 15 a 20% da biomassa animal terrestre e são abundantes especialmente, nas regiões tropicais (SCHULTZ, 2000; BOLTON, 2022). As formigas surgiram durante o período Cretáceo, há pouco mais de 100 milhões de anos (WILSON; HOLLDOBLER, 2005). O grupo ancestral conhecido (Sphecomyrminae) viveu no hemisfério norte, entre 139 a 158 milhões de anos atrás. Porém, somente a partir de 60 a 50 milhões de anos atrás, as formigas se tornaram insetos dominantes nas savanas, florestas e outros ambientes (GRIMALDI; AGOSTI; CARPENTER, 1997). As formigas possuem uma grande importância ecológica, com papéis essenciais em muitos ecossistemas terrestres. Algumas espécies chegam a ser consideradas pragas em diferentes regiões do mundo, como por exemplo, as formigas do gênero Atta, Acromyrmex, (FERREIRA, 2010; PICANÇO, 2010; AGUIAR, et al. 2020).

Todas as formigas são eusociais, ou seja, vivem em colônias em que as gerações se sobrepõem, com cuidado cooperativo à prole e divisão de trabalho reprodutivo (HOLLDOBLER; WILSON, 1990). O sistema reprodutivo observado nas formigas é por partenogênese arrenótoca, em que os machos são produzidos a partir de ovos não fertilizados e as fêmeas a partir de ovos fertilizados. Sendo assim, os machos são haplóides e as fêmeas diplóides (GOKHMAN; KUSNETSOVA, 2017). A organização complexa desses insetos é possível devido ao elevado grau de adaptação das castas (WILSON, 1971).

A subfamília Dolichoderinae é a quarta subfamília em diversidade de espécies das constituída por quatro tribos (Dolichoderini, Leptomyrmecini, Bothriomyrmecini e Tapinomini), 28 gêneros válidos e 713 espécies válidas (WARD et al., 2010; BOLTON, 2022). As espécies estão distribuídas desde o Paleártico, Neártico, região afrotropical e Malásia, até o Oriente Médio, regiões australianas e neotropicais (BOLTON, 1994). Essas formigas normalmente têm hábitos arborícolas e uma ampla distribuição geográfica, sendo encontradas

principalmente em florestas tropicais úmidas (SANTOS et al. 2016; FERNANDEZ; GERRERO; DELSINNE, 2019).

Estudos de taxonomia integrativa são úteis para a compreensão das espécies (SCHLIC-STEINER et al. 2010). Os estudos citogenéticos contribuem para a biologia e taxonomia, tendo um valor significativo por permitirem a diferenciação entre espécies crípticas e/ou morfologicamente parecidas (SRIVASTAVA et. al., 2012; CHIRINO et. al., 2015). Em insetos, os estudos citogenéticos se mostraram úteis em muitas espécies, como por exemplo, em abelhas (TAVARES et al. 2017; BARBOZA, 2021), gafanhotos (BIDAU; MARTINI, 2010) e em .formigas (LORITE, PALOMEQUE, 2010).

Com isso, este estudo buscou caracterizar os cariótipos de formigas do gênero *Azteca*, utilizando técnicas de citogenética clássica e molecular, com o intuito de verificar as diferenças cariotípicas e conciliar os resultados obtidos com conhecimento dos processos evolutivos em Formicidae.

## 2. Fundamentação teórica

### 2.1 O gênero *Azteca*

*Azteca* pertence à subfamília Dolichoderinae, e é endêmico dos trópicos americanos onde são abundantes no estrato arbóreo (LONGINO, 2007). O gênero possui 84 espécies e 29 subespécies válidas (BOLTON, 2022). Essas formigas exibem uma variedade de hábitos de nidificação, construindo seus ninhos em copas das árvores e em cavidades de madeiras “vivas” ou “mortas”, bem como a formação de jardins de formigas. Jardins de formigas são ninhos de formigas arbóreas que brotam epífitas de material de ninho de “papelão”. Algumas espécies constroem seus ninhos a base de fibras processadas e celulose, podendo abrigar milhares de indivíduos. (EMERY, 1913; AYALA et al., 1996). Os ninhos de “cartão” encostados a troncos ou grandes ramos, têm uma superfície curiosamente esculpida, ou seja, o cartão forma relevos em forma de lágrimas gigantes, achatadas e arredondadas em baixo. Estes ninhos são geralmente alargados e arredondados no fundo (LONGINO, 1986).

As colônias de *Azteca* possuem operárias polimórficas, sendo que as maiores possuem grandes cabeças em forma de coração. As formigas desse gênero são facilmente reconhecidas pelo seu odor característico, quando perturbadas, pois ao se sentirem ameaçadas, essas formigas liberam um composto defensivo, que é produzido por uma glândula localizada na região anal (FOREL, 1878; CARROLL, 1983; FOWLER et al. 1998).

A polidomia está relacionada ao fato de uma colônia estar socialmente conectada em ninhos separados. Para se dizer que uma colônia está socialmente conectada, mas em ninhos separados, é importante observar as seguintes características: compartilhamento de recursos, de espaço e de genes. A polidomia está presente nas subfamílias Ponerinae, Myrmecinae, Pseudomymercinae, Dolichoderinae, Formicinae e Aneuretinae (DEBOUT et al., 2007; ELLIS et al., 2017) e facilita o deslocamento das formigas ao longo dos galhos das árvores e permite uma ampla defesa do território (SOARES et al. 2022).

Formigas do gênero *Azteca* são potenciais agentes de controle biológico (VANDERMEER, et al., 2002), possuem um hábito alimentar generalista e podem apresentar associações com hemípteros (por exemplo, cuidado com Coccidae), vespas e plantas. As espécies têm um comportamento agressivo e assim, acabam fornecendo defesa aos organismos associados (BACARO et al., 2015; JARDINE et al., 2020). As operárias auxiliam na remoção de vegetação competidora da planta associada, como lianas, epífitas, arbustos vizinhos à sua árvore hospedeira. Também podem ser consideradas pragas (MELO, 2018).

Existem casos de simbiose ocorrem entre formigas do gênero *Azteca* e plantas mirmecófitas especializadas, sendo o caso mais notável a relação entre *Azteca* e Cecropia (LONGINO, 1991). As espécies que nidificam em caules vivos e as paredes internas do ninho são frequentemente incrustadas com cochonilhas e escamas (LONGINO, 2007). Nesta associação, as formigas defendem a planta de potenciais herbívoros, e a planta por sua vez, fornece alimento e abrigo para nidificação (GARFINK, 2019; JARDINE et al., 2020; WCISLO et al., 2021). O alimento ofertado pela planta é representado pela secreção constante de corpúsculos ricos em albumina, os corpúsculos müllerianos (corpúsculos de

Muller), uma secreção que compõe o principal alimento para a formiga associada (FOREL, 1985). Numa mesma planta podem ser encontradas várias colônias de *Azteca spp.* cada uma com uma rainha, separada por septos não perfurados (HARADA, 1989). Dentre outras associações, *Aztecas* operárias já foram observadas cuidando de cochonilhas (Coccidae). Devido à riqueza de interações ecológicas entre *Azteca*, hemípteros e plantas, as espécies de formigas deste gênero também são objetos de estudos de adaptação e coevolução (LONGINO, 2007).

Apesar da dificuldade taxonômica na identificação das espécies de *Azteca* (a presença da rainha é essencial para a identidade da espécie) (LONGINO, 1991; LONGINO 2007)., estas espécies são objetos de estudos de adaptação e coevolução devido à riqueza de interações ecológicas entre *Azteca*, hemípteros e plantas, as (LONGINO, 2007).

## 2.2 Citogenética clássica e molecular

### 2.2.1 Citogenética e suas aplicações

A Citogenética enfoca o estudo dos cromossomos e cariótipos, tanto no que diz respeito à sua morfologia, organização, função, quanto a sua variação e evolução (GUERRA, 1988). A citogenética clássica está relacionada à análise dos cromossomos da célula em divisão, especialmente na mitose, onde os cromossomos encontram-se mais condensados e são mais facilmente visualizados graças à substâncias antimitóticas utilizadas, como a colchicina, por exemplo, um alcalóide que se liga às proteínas que formam as fibras do fuso mitótico, impedindo sua segregação anafásica. A citogenética molecular compreende as técnicas de hibridação *in situ* por fluorescência (FISH), hibridação genômica comparativa (CGH) e cariotipagem espectral (SKY), dentre outras (CHAUFFAILLE, 2005; KASAHARA, 2009).

Diferentes organismos apresentam conjuntos cromossômicos diferentes. Geralmente o cariótipo de espécies relacionadas entre si são mais semelhantes do que entre espécies filogeneticamente distantes, isso pelo fato de que as alterações no tamanho e estrutura dos cromossomos são características do

processo evolutivo, assim, faz-se possível descrever diversas maneiras pelas quais os cromossomos mudam durante a evolução (SUMNER, 2003).

Apesar da identificação de espécies ser feita comumente por meio da taxonomia clássica, com base em caracteres morfológicos externos, há existem limitações na aplicação desse método. Na tentativa de solucionar esse problema, é feito uma integração de várias áreas de conhecimento: ecologia, genética, comportamento, biogeografia, e outras áreas, formando a chamada “taxonomia integrativa” (SCHLICK-STEINER et al., 2010).

A expansão dos estudos citogenéticos permitiu que informações a respeito dos cromossomos fossem aplicados em estudos taxonômicos, evolutivos e na medicina humana (MARIANO et al., 2015). A citogenética pode contribuir para confirmar a validade de uma espécie, bem como para o entendimento da evolução dos organismos (MARIANO et al., 2012).

A partir da década de 50, várias técnicas para análise cromossômica foram desenvolvidas. Os primeiros estudos citogenéticos estavam mais voltados à determinação do número e da morfologia dos cromossomos, utilizando coloração convencional (ex: coloração com Giemsa). A coloração convencional, além de permitir a contagem dos cromossomos, auxilia na observação de características como alterações cromossômicas numéricas e estruturais, padrão de distribuição de heterocromatina, constrições secundárias, presença de cromossomo B, par heteromórfico sexual (GUERRA, 2000; GUERRA; SOUZA, 2002; PEÑAZOLA, 2005). A década de 1970 é considerada um período muito importante para a citogenética, pois devido ao avanço das análises dos cromossomos, foram desenvolvidas novas técnicas e metodologias que promovem o aparecimento de marcações específicas ao longo do cromossomo. Essas técnicas são referidas como métodos de bandeamento cromossômico (KASAHARA, 2009). As técnicas de bandeamento ampliaram os estudos de citogenética e possibilitaram um melhor entendimento das alterações cromossômicas. Também evidenciam regiões específicas dos cromossomos que não podem ser vistas utilizando apenas a coloração convencional (GUERRA, 1988; SUMNER, 2003).

Alguns corantes possuem propriedades fluorescentes e de ligação

especifica em determinadas regiões do cromossomo. A utilização de corantes fluorocromos na citogenética foi muito intensa no final da década de 70. As preparações citogenéticas com fluorocromos base-específicos são analisadas sob luz UV e com filtros adequados, onde certas regiões emitem padrão fluorescente que, de acordo com a composição de bases nucleotidicas, podem aparecer mais ou menos brilhantes. Os fluorocromos podem ser utilizados na caracterização das espécies, sendo úteis na comparação interespecíficas (SUMNER, 2003; KASAHARA, 2009). Na dupla coloração dois fluorocromos se ligam simultaneamente a determinadas sequências de base nos ácidos nucléicos e emitem fluorescência. Como por exemplo, o 4-6-diamidino2-phenylindole (DAPI), que tem afinidade pelas bases adenina e timina, logo, evidencia as regiões ricas em AT, são utilizados em combinação com aCromomicina A3 (CMA3), que evidencia as regiões ricas em pares de base citosina e guanina (SCHWEIZER, 1980; ROCHA, 2007).

Outra técnica da citogenética, a hibridização fluorescente *in situ* (FISH) tem aprofundado o entendimento sobre a estrutura, função, organização e evolução dos genes. Essa técnica possibilita a identificação de sequências específicas de DNA ou RNA diretamente sobre os cromossomos ou em tecidos e organelas resultantes de corte anatômico (LEITCH *et al.* 2004). Inicialmente, as sondas eram marcadas radioativamente. Porém, devido a toxicidade, os métodos radioativos foram substituídos por marcadores fluorescentes e a técnica passou-se a denominar fluorescent *in situ* hybridization - FISH (Hibridização *In Situ* por Fluorescência) (GUERRA, 2004).

A hibridização *in situ* vem sendo utilizada para localizar diversas sequências de nucleotídeos e se baseia no fato de que o DNA é formado por fitas complementares, que podem ser facilmente desnaturadas e posteriormente renaturadas e se, durante a renaturação do DNA cromossômico houver sonda disponível, as sondas competem com as fitas de DNA e poderão ser hibridizadas *in situ* ao DNA alvo (GUERRA, 2004). As sondas são sequências de DNA ou RNA que foram isoladas, purificadas e amplificadas. As sequências de DNA podem estar organizadas em blocos de cópias no cromossomo . A FISH requer a utilização de uma sonda particular que servirá para a identificação do DNA alvo

no material em estudo. A sonda de DNA pode ser DNA altamente repetitivo ou satélite, genes ribossomais, sequências teloméricas e centroméricas ou braços cromossômicos (KASAHARA, 2009). A grande diversidade de sondas utilizadas em FISH permitiu que esta fosse aplicada em diversas áreas da ciência (GUERRA, 2012).

A localização física de diversas sondas, a exemplo do DNA microssatélite usando a técnica de FISH vem crescendo nos últimos anos, ajudando na caracterização de diferentes espécies e mesmo populações (MARTINS et al., 2011). Podem ser marcadores úteis em estudos evolutivos, tendo uma distribuição altamente variável, podendo ser encontrados em regiões específicas do cromossomo, ou disperso em todo o cromossomo (SUMNER, 2003). Vale lembrar que genoma dos eucariotos é composto por um grande número de sequências repetitivas, e o mapeamento físico e oconhecimento da organização molecular dessas sequências contribui significativamente para um melhor entendimento das diferenças estruturais que ocorrem nos cariótipos de muitas espécies (CIOFFI; BERTOLLO, 2012; LÓPEZ-FLORES; GARRIDO-RAMOS, 2012). O acúmulo das sequências de DNA repetitivos no genoma pode alterar a estrutura dos cromossomos, como gerar quebras, inversões, deleções e amplificações nos cromossomos (RUIZ-RUANO et al 2014).

A utilização das técnicas de citogenética clássica e molecular, auxilia na identificação de marcadores cromossômicos e na compreensão da evolução cariotípica (SCHWARZACHER; HARRISON, 2000). Diferentes tipos de técnicas são conhecidas, baseando-se na metodologia do FISH, como a GISH, M-FISH, SKY e SPRINS, e são utilizados com finalidades distintas (KASAHARA, 2009).

### 2.2.2 Regiões Organizadoras de Nucléolo

O nucléolo é uma região específica no núcleo interfásico das células eucarióticas. Geralmente os nucléolos estão associados a um cromossomo, chamado de cromossomo organizador do nucléolo e nesse cromossomo se encontra uma constrição secundária, relacionada à Região Organizadora de Nucléolo (KASAHARA, 2009). É comum se observar o cromossomo organizador associado às células em metáfase, por terem se envolvido anteriormente em

uma atividade de transcrição do RNAr (LIMA, et al. 2005; KASAHARA, 2009). As células em crescimento requerem uma grande síntese de ribossomos, para que seja garantida à geração futura ribossomos suficientes para a síntese de proteínas. A transcrição de DNAr gera precursores de RNAr e consequente são clivados e processados em RNArs 28S, 18S e 5.8S (S de Svedberg é uma unidade que expressa a densidade da molécula). As Regiões Organizadoras de Nucléolo correspondem às regiões do DNA, que possuem genes que são responsáveis pela transcrição de RNAr. Essas regiões têm uma grande afinidade com a prata, devido à presença de proteínas não-histonas associadas ao RNAr, e por isso são chamadas de AgNORs (LIMA, et al., 2005). Estudos com genes ribossomais têm sido bastante utilizados em análises citogenéticas. Esses genes são organizados repetidos em *tandem*, compostos por milhares de cópias, sendo representadopelo 45S DNAr, unidade transcricional que codifica o 18S, 5,8S e 28S RNArs, e um espaçador intergênico não transcrito (IGS) (PAULS; BERTOLLO, 1990; SANTORO, 2005). A localização dos sítios de DNAr pode ser realizado por hibridação *in situ* de fluorescência . Uma característica importante dos DNAr 5S e 45S é que a sequência de nucleotídeos desses genes é bastante conservada evolutivamente, logo, são muitos similares em todos os eucariotas ( FUJIWARA et al., 1988; GUERRA, 2004).

## 2. 3 Rearranjos cromossômicos

As alterações no número e morfologia dos cromossomos são conhecidas como rearranjos cromossômicos (MARIANO et al., 2015). Os rearranjos envolvem diferentes eventos, como por exemplo, a deleção quando um segmento cromossômico pode ser perdido, ou inversão, quando a orientação de um segmento cromossômico é invertida (GRIFFITHS et al., 2016). Quando um segmento cromossômico é movido para um cromossomo diferente, ocorre o que se conhece por translocação. Os rearranjos cromossômicos podem originar polimorfismos em diferentes populações (KASAHARA, 2009).

As alterações numéricas estão relacionadas à rearranjos do tipo translocação robertsoniana: fissão e fusão cêntrica (IMAI; MARUYAMA, 1978). A fusão cêntrica é a união de um segmento cromossômico a uma região de outro cromossomo originando um cromossomo metacêntrico ou submetacêntrico

(PIRES et al., 1985). Já a fissão cêntrica acontece quando um cromossomo sofre uma quebra à altura do centrômero, originando dois cromossomos telocêntricos (GUERRA, 1988). Estudos do cariótipo de formigas sugerem que cariótipos com baixo número de cromossômico e cromossomos grandes têm características basais e cariótipos com maior número cromossômico e cromossomos pequenos apresentam estados derivados (IMAI, et al., 1994).

Para explicar a variação cromossômica observada em eucariotas, a Teoria da Interação Mínima (TIM) foi proposta por Imai et al., (1988). Essa teoria propõe que os cariótipos podem ter evoluído devido à ocorrência de fissões cêntricas, aumento do número e redução do tamanho cromossômicominimizando riscos genéticos (translocação cromossômica) pela diminuição da interação física pelo menor tamanho. Incorporação de heterocromatina nas extremidades que sofreram fissão cêntrica, podem ocorrem para recuperar e manter a estabilidade telomérica.

Além das formigas, essa teoria tem sido abordada para explicar a evolução cariotípica em outros himenópteros (MARIANO et al., 2015).

## 2.4 Citogenética em Formicidae

Em Formicidae, os estudos citogenéticos já foram realizados em mais de 750 espécies e apontam uma variação de número diplóide entre 2n=2, a 2n=120 (CROSLAND; CROZIER, 1986; MARIANO et al., 2008; LORITE; PALAMOQUE, 2010; CORREIA et al., 2016).

Praticamente todas as subfamílias da região neotropical apresentam algum dado cromossômico. Grupos que provavelmente tiveram radiação recente apresentam número cromossômico menos variável, como por exemplo, Dolichoderinae com n = 5 a 16, Formicinae n = 8 a 28 e Myrmicinae n = 4 a 35, enquanto grupos basais apresentam conjunto cromossômico mais variável, como por exemplo, Myrmeciinae n =1 a 47 e a subfamília Ponerinae, que apresenta maior variação no número cromossômico em Formicidae na região neotropical, com n= 3-60. A subfamília Ponerinae também contém um dos

gêneros mais variáveis em cromossomos: *Pachycondyla*, com n = 6 a n=52 (MARIANO, et al., 2007; LORITE; PALOMEQUE, 2010; FERNANDEZ, et al., 2019).

A ocorrência de cariótipos com poucos cromossomos é baixa, pois quase todas as subfamílias de formigas exibem um gradiente de número crescente de cromossomos, consequência de rearranjos como fissões cêntricas que modulam a evolução dos cariótipos nas espécies (VELASCO et al., 2019).

Estudos moleculares empregando a técnica de FISH estão disponíveis para espécies que incluem o gênero *Acromyrmex* (BARROS et al. 2016, TEIXEIRA et al. 2017), *Anochetus* (SANTOS et al. 2010), *Camponotus* (AGUIAR et al. 2017), *Dinoponera* (MARIANO et al. 2008), *Dolichoderus* (SANTOS et al. 2016), *Mycocepurus* (BARROS et al. 2012). Esses estudos dão embasamento para hipóteses sobre a evolução cromossômica, filogenia e taxonomia de diferentes espécies de formigas (AGUIAR, 2017; TEIXEIRA, 2017).

Estudos citogenéticos em *Azteca* são incipientes quando se compara a diversidade de espécies do gênero: a primeira caracterização cariotípica detalhada foi realizada por Cardoso et al. (2012). Neste trabalho, a espécie em estudo foi *Azteca trigona* (Emery, 1893) e os autores apresentaram resultados relativos a coloração convencional com Giemsa, fluorocromos, banda C e coloração com nitrato de prata (AgNOR): *Azteca trigona* apresenta um número diplóide de 2n=28, com fórmula cariotípica 2K= 10M+14A+4AM. Além de serem analisadas com coloração convencional (Giemsa), os autores apresentaram resultados com fluorocromos sequenciais base-específico, coloração com nitrato de prata e banda C, revelando uma marcação positiva na região do braço curto do quarto par metacêntrico, que foi coincidente com a banda Ag-NOR e coloração com fluorocromo CMA. E o bandeamento C marcou braços curtos de outros cromossomos, indicando fissões cêntricas seguidas de crescimento de heterocromatina. Nesse trabalho os autores chegaram à conclusão de que as sequências de DNAr são intercaladas por sequências de pares de bases ricas em GC. E o bandeamento C marcou braços curtos de outros cromossomos, indicando fissões cêntricas seguidas de crescimento de heterocromatina (CARDOSOS et al., 2012).

No presente estudo, novas espécies de *Azteca* foram estudadas, sendo submetidas à técnicas citogenéticas, visando uma compreensão da diversidade e evolução cariotípica entre as espécies do gênero.

# 2. OBJETIVOS

## 2.1 Objetivos gerais

- Caracterizar o citogeneticamente espécies de formigas do gênero *Azteca*, a fim de avaliar sua diversidade cariotípica e estabelecer caracteres úteis na compreensão de sua citotaxonomia e evolução.

## 2.2 Objetivos específicos

- Realizar uma análise citogenética com formigas do gênero *Azteca* de diferentes espécies e localidades geográficas;
- Inferir sobre as possíveis variações numéricas e morfológicas observadas no gênero;
- Comparar as espécies e populações de *Azteca* e conciliar os resultados obtidos com conhecimento dos processos evolutivos em Formicidae.

## 3. MATERIAL E METODOS

Foram analisadas amostras Azteca de diferentes localidades (Tabela 1). Cerca de 15-25 amostras coletadas por ninho. As espécies analisadas estão listadas na Tabela 1, foram identificadas pelo Prof. Dr. Jacques Hubert Charles Delabie.

| Localidade | Coordenadas |
|---|---|
| Ilhéus – Bahia | -39.0673828125 - 14.788315408939589 |
| Guiana Francesa | -58.779885050438274 4.341629955307054 |
| Minas Gerais | -44.38262107683823 - 18.25205871539568 |
| Redenção- Piauí | -44.58878817076547 - 9.499552473657623 |
| Uruçuca- Bahia | -39.10229803183082 - 14.579580348681349 |

Tabela 1- locais de coleta.

A preparação das lâminas foi feita utilizando o gânglio cerebral na fase de pré-pupa, seguindo o protocolo de Imai et al. (1988), deixando este por 1h 30 min na colchicina. Para análise do número e morfologia dos cromossomos, foi realizada a coloração convencional com Giemsa 5% em tampão Sorensen e as metáfases com melhor espalhamento selecionadas e fotografadas usando um microscópio OlympusCX-41 com câmera digital Olympus C7070 acoplada. Foram analisadas para cada ninho, no mínimo cinco lâminas, com mais de dez metáfases com bom espalhamento.

A coloração com os fluorocromos base-específicos, cromomicina A3 (CMA3) e 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) foi realizada de acordo com Schweizer (1980). As lâminas foram montadas com antifading Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, EUA) e cobertas com uma lamínula. As metáfases foram analisadas e registradas no microscópio de epifluorescência

OLYMPUS BX51, acoplado a uma câmera OLYMPUS DP-72 utilizando o programa de captura de imagem Image Pro Plus R, versão 4.1.

Para localização dos *clusters* ribossomais por hibridização fluorescente *in situ* (FISH) utilizamos sondas DNAr 18S, obtidas por amplificação em PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) utilizando os primers 18S-629F (5′-AGTTGAAAAGCTCGTATCGTGT-3′) e 18S-1300R (5′-CTGTTTCCCAGGGTGGTGTTG-3′) (WARD; DOWNIW, 2005). A sonda DNAr 18S foi preparada seguindo o protocolo Pinkel et al. (1986) e marcada com o kit Bionick (Invitrogen®), seguindo as especificações do fabricante. Para detecção do sinal, foi utilizada a Estreptoavidina-FITC (VECTOR). A sonda microssatélite $(GA)_{15}$ foi marcada com Cy3 durante sua síntese, conforme Kubat et al. (2008) e após a hibridização, seguiu-se o protocolo de Cioffi et al. (2011). Tanto para a sonda DNAr 18S e a sonda microssatélite $(GA)_{15}$, as lâminas foram montadas com Antifading Vectashield (Vector Laboratories) contendo DAPI. O bandeamento NOR foi obtido na espécie *Azteca* sp 2 seguindo o protocolo de Howell e Black (1980).

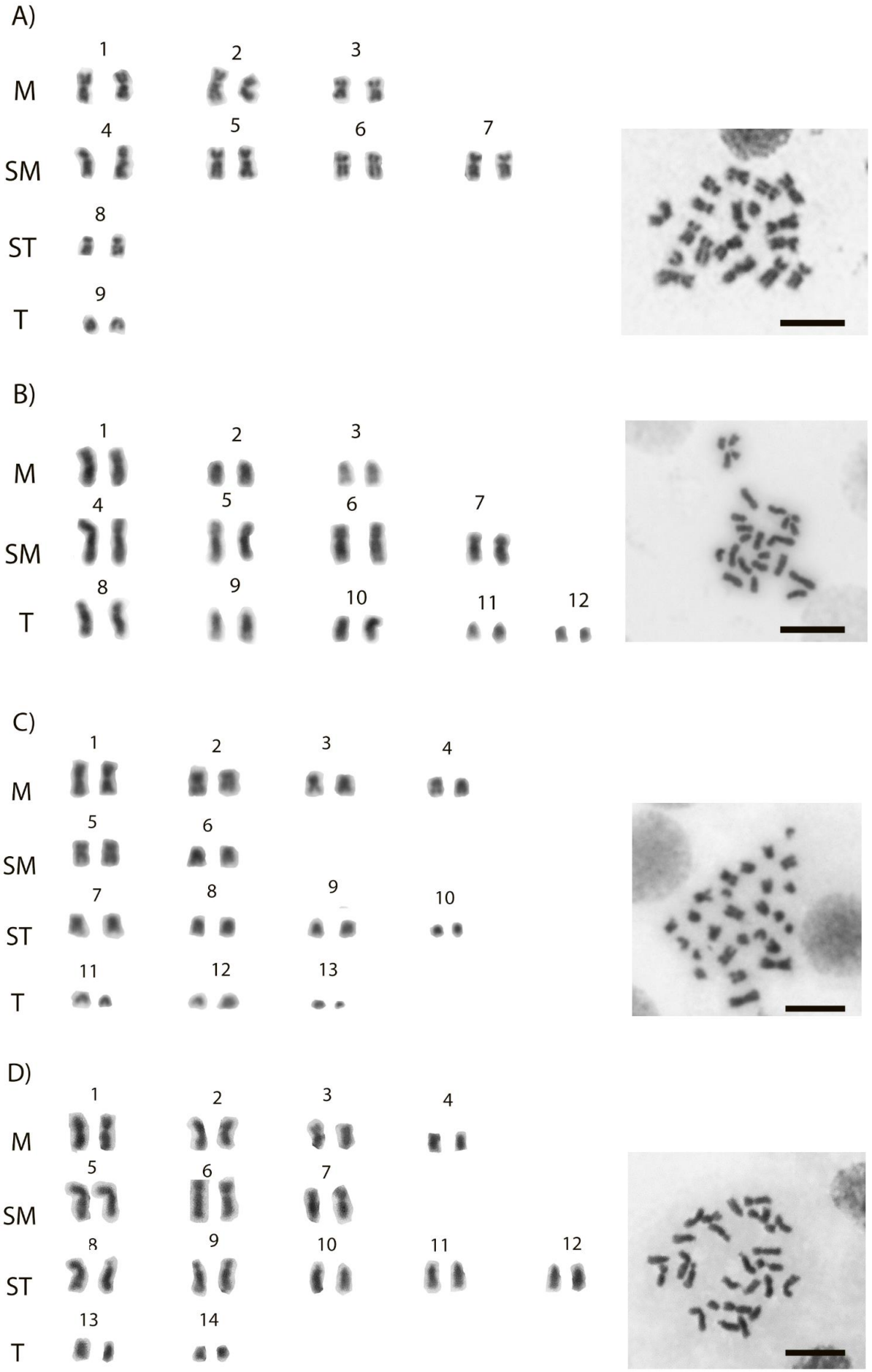
Os cariogramas foram organizados utilizando-se o software Adobe Photoshop® CS6 1. A morfologia foi definida de acordo com Levan et al. (1964).

## 4. RESULTADOS

A coloração com Giemsa revelou uma diversidade numérica e morfológica cromossômica entre generosas espécies de formigas encontradas, variando de 2n= 18 a 2n= 28 (Tabela 02).

Tabela 02. Origem, número cromossômico, coordenadas geográficas e fórmulas cariotípicas espécies analisadas,

| **Espécie** | **Nº cromossomico 2n (n)** | **Fórmula cariotípica** | **Origem** |
|---|---|---|---|
| *Azteca alfari* | 18 | 2k=10M+6S M+2ST | Ilhéus- Bahia |
| *Azteca alfari* | 18 | 2k=10M+6S M+2ST | Redenção – Piauí |
| *Azteca sp 1 (*próximo de *Azteca* D.JTL-002 (LONGINO, 1996 p. 152)) | 24 | 2k=10M+4S M+6ST=4T | Guiana Francesa |
| *Azteca* sp 2 | 26 | 2k=8M+4S M+8ST+6T | Ilhéus- Bahia |
| *Azteca chartifex spiriti* | 28 (14) | 2k=10M+4S M+10ST+4T | Ilhéus- Bahia |
| *Azteca* sp (do grupo *chartifex*) | 28 | 2k=10M+4S M+10ST+4T | Uruçuca– Bahia |
| *Azteca schimperi* | 28 | 2k=8M+6S M+10ST+4T | Guiana Francesa |
| *Azteca trigona* | 28 | 2K=10M+4ST+14T | Minas Gerais |


A)
M
SM
ST
T
1
2
3
4
5
6
7
8
9
B)
M
SM
T
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
C)
M
SM
ST
T
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
D)
M
SM
ST
T
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14

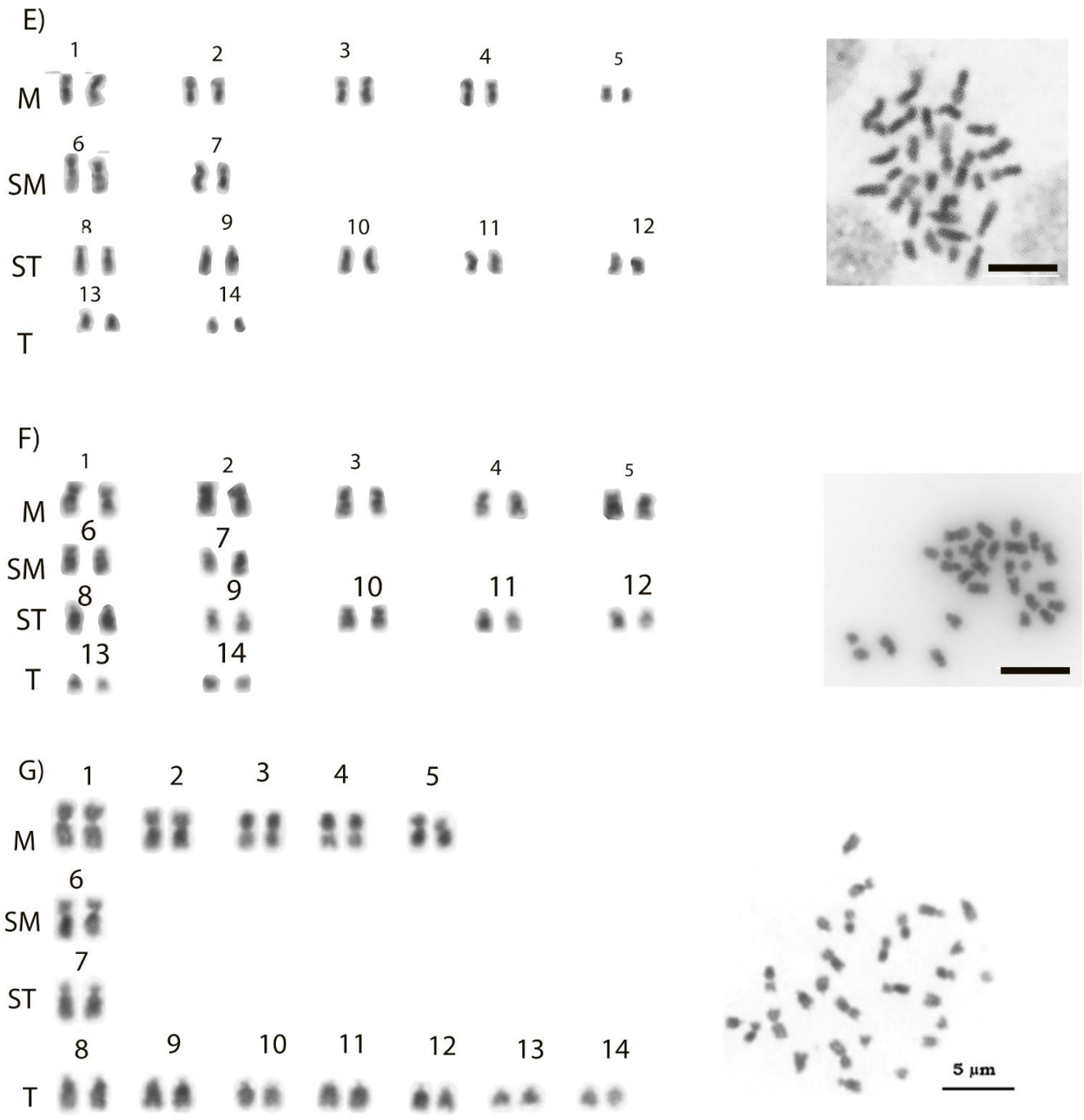



Figura 02. Cariogramas de A- *Azteca alfari*; B- *Azteca* sp1; C- *Azteca* sp2*;* D- *Azteca chartifex spiriti;* E- *Azteca schimperi;* F- *Azteca* sp do grupo *chartifex;* G- *Azteca trigona.* Barra: 5 µm.

A coloração com fluorocromos revelou múltiplas marcações $CMA_3^+$ nos cariótipos. Nos indivíduos de *Azteca alfari*, coletadas em localidades distintas, apresentaram as mesmas marcações, no 4º par cromossômico, na região centromérica.

Em *Azteca* sp do grupo chartifex, a marcação de $CMA_3^+$ foi no 5º par cromossômico, enquanto em *Azteca chartifex spiriti* apresentou marcações $CMA_3^+$ nos 2º, 6º, 9º, 10º e 13º pares cromossômicos (Figura 03, D). Um heteromorfismo foi observado no 2º par, onde apenas um dos cromossomos apresentou marcação para $CMA_3^+$(Figura 03, E). Foi possível observar o cariótipo haploide de *Azteca chartifex spiriti* numa lâmina de coloração com fluorocromos $CMA_3$ e DAPI. Por sua vez*, Azteca schimperi* apresentou marcações para $CMA_3^+$ no quinto par cromossômico. (Figura 03, G).

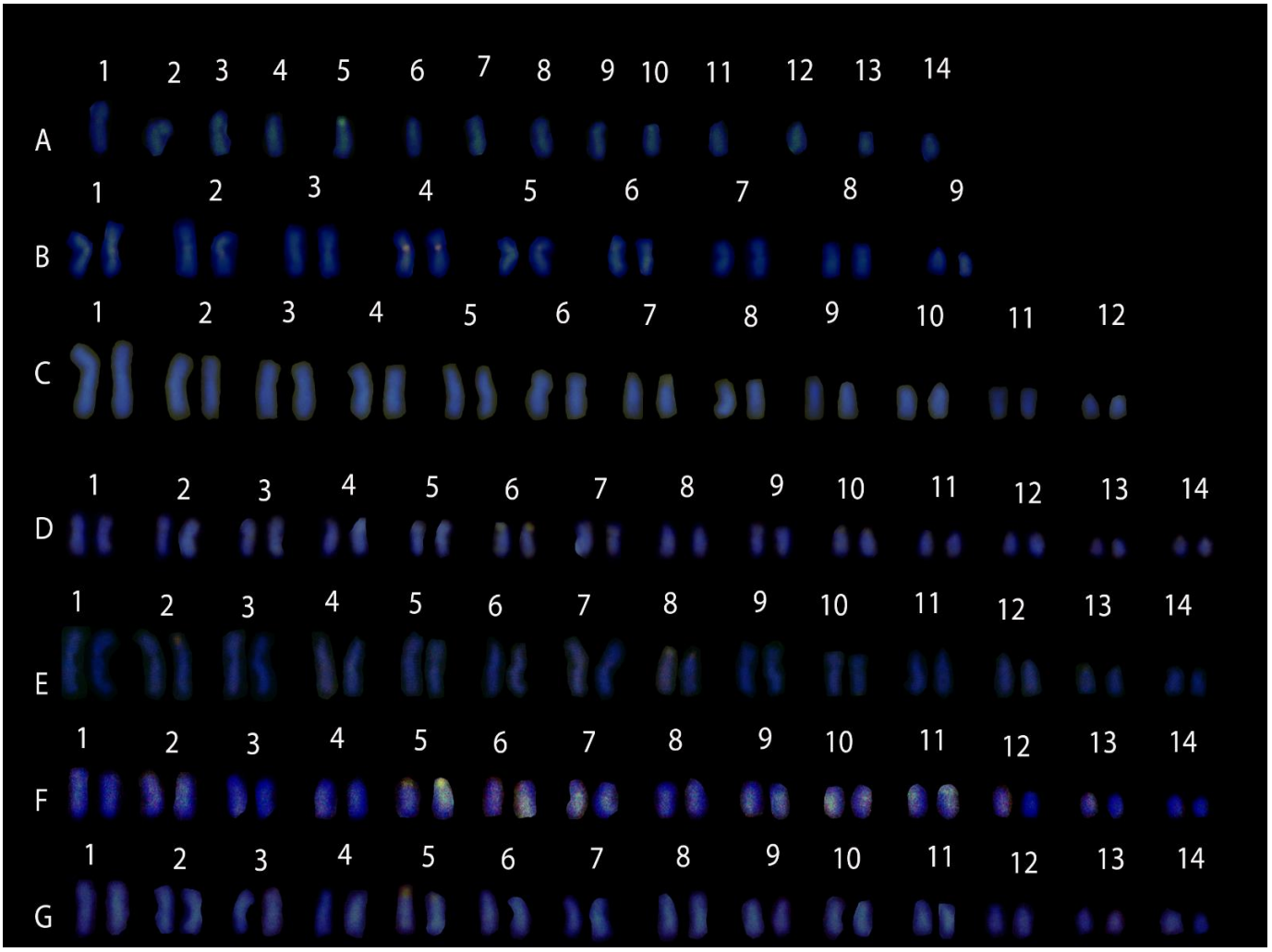



Figura 03. Coloração por fluorocromos em A, D e E - *Azteca chartifex spiriti*; B- *Azteca alfari*; C- *Azteca* sp1; -; F- *Azteca* s do grupo *chartifex*; G- *Azteca schimperi.*

Em *Azteca* sp2 o bandeamento de Ag-NOR resultou na marcação indicando a localização de genes ribossomais no 5º par cromossômico, como

ilustra a figura 04.

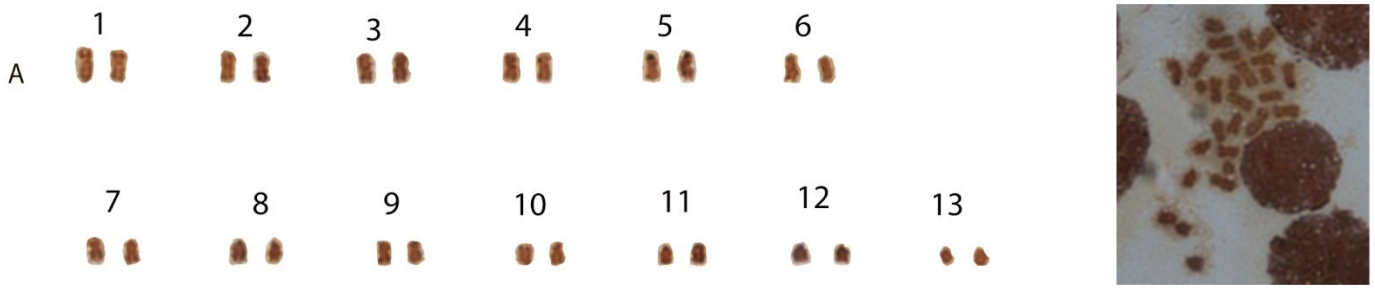



Figura 04. Bandeamento NOR em *Azteca* sp 2.

Os resultados de FISH com sonda de DNA ribossomal em *Azteca alfari* e *Azteca chartifex spiriti* revelaram a localização de genes ribossomais no braço curto, sendo que *A. alfari* apresentou localização no 4º par cromossômico e *A. chartifex spiriti* no 5º par cromossômico (Figura 05).

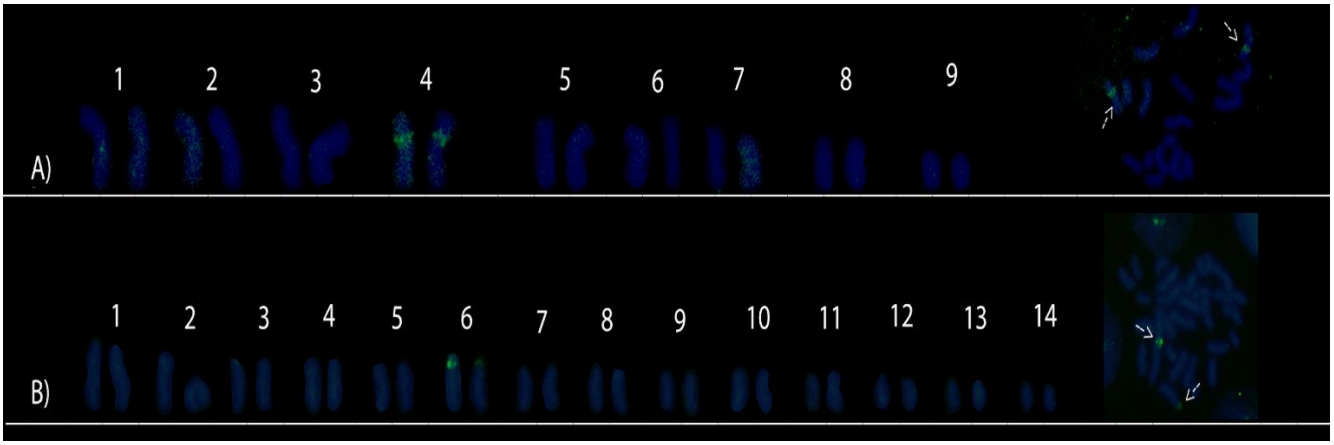



Figura 05. Localização dos sítios ribossomais obtida por FISH em A- *Azteca alfari*, B- *Azteca chartifex spiriti*.

Quanto ao padrão de hibridização da sonda microssatélite (GA)15, esta ocorreu de maneira espalhada ao longo de todos os pares cromossômicos, como ilustra a figura 06.

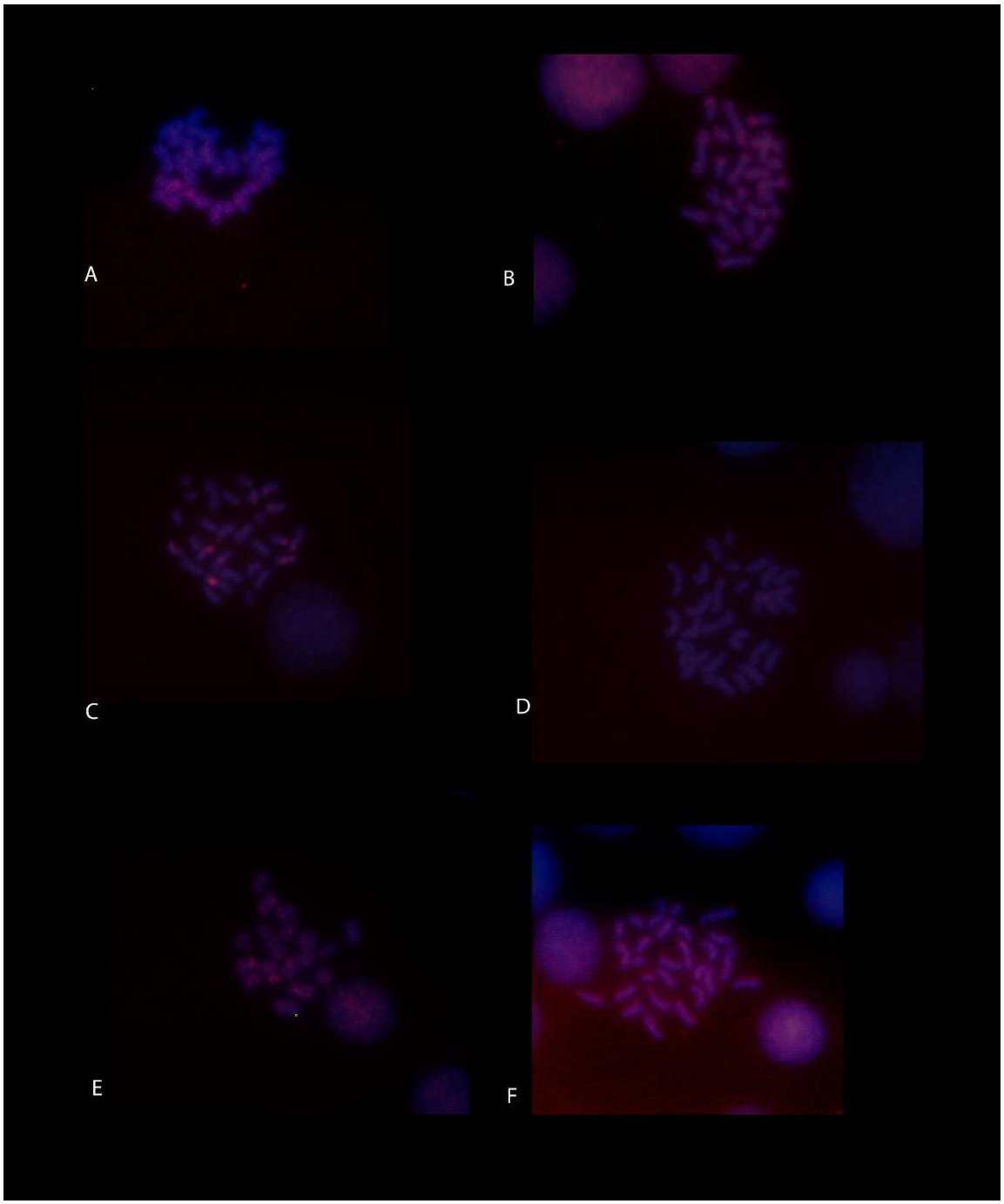



Figura 06. a- *Azteca alfari*; B- *Azteca* sp1; C- *Azteca schimperi*; D- *Azteca chartifex spiriti;* E- *Azteca alfari;* D- *Azteca* do grupo *chartifex*

## 5. DISCUSSÃO

Dados citogenéticos estão disponíveis no gênero *Azteca* para *Azteca trigona (*Cardoso et al. 2012), com 2n=28 2K= 10M+4SM+14ST; *Azteca chartifex Emery,* 1986, que apresenta 2n= 28, com formula 2K= 10M+18A (Mariano et al. 2019) e para *Azteca* sp do grupo *chartifex,* que possui 2n= 28, com formula 2K= 10M+4SM+6ST+8A (BARROS et al. 2021).

Em relação a *Azteca alfari*, nossos resultados mostraram um número diplóide de cromossomos 2n= 18, enquanto nas amostras analisadas por Mariano et al. (2019) foi encontrado 2n=26. Levando em consideração que as coletas foram realizadas na mesma localidade, que essas espécies habitam em árvores de *Cecropia* e apresentam uma grande semelhança morfológica (LONGINO, 2007). Existe a possibilidade que a colônia coletada por Mariano et al. (2019) seja referente a espécie *Azteca ovaticeps* ou *Azteca coeruleipennis*, Estudos filogenéticos revelam que *Azteca alfari* tem proximidade filogenética com *A. ovaticeps* e que *Azteca alfari* pode representar uma linhagem basal e pode ter surgido de um ancestral que se aninhava em caules vivos de árvores. (LONGINO, 1991; AYALA et al., 1997). Os resultados mostram um estudo citogenético ampliado neste grupo, com reamostragens e comparação morfológica dos espécimes adultos para uma identificação e separação mais precisa destas espécies será de grande relevância para avançar na compreensão evolutiva e na citotaxonomia deste grupo.

Variações no cariótipo em Formicidae são amplamente registradas, com números cromossômicos variando de 2n= 2 a 2n = 120 (CARDOSO, et al. 2018). Na subfamilia Dolichoderinae, por exemplo, o número de cromossomos varia de n = 5 a n= 16 (LORITE; PALOMEQUE 2010). O gênero *Dorymyrmex* apresenta uma variação numérica de cromossomos semelhante à *Azteca*: *Dorymyrmex bicolor, Dorymyrmex flavus,* com 2n=26 (CROZIER 1970B, COKENDOLPHER; FRANCKE, 1984) e *Dorymyrmex torácico,* com 2n= 18. Astranslocações robertsonianas podem explicar as diferenças cariotípicas em Dorymyrmex (CROZIER, 1970B).

O fluorocromo $CMA3^+$ evidencia regiões ricas em pares de bases GC e, pelo fato das regiões de genes ribossomais (DNAr) possuírem alta frequência desses pares de bases, normalmente as marcações de $CMA3^+$ e FISH coincidem (SUMNER 2003). Nossos resultados apontam marcações positivas para CMA3 no quarto par cromossômico para *Azteca*, em *Azteca* sp do grupo *chartifex* e *Azteca schimperi* foi no quinto par , enquanto que em *Azteca chartifex spiriti* houve múltiplas marcações. Com essas informações, pode-se observar diferenças nos padrões de bandas tanto em relação à localização quanto em relação a quantidade de marcações, o que permite a diferenciação entre as populações (PADRE, 2019).

Em *Azteca* sp2 o bandeamento de Ag-NOR resultou na marcação do 5º par cromossômico, indicando que esta região é rica em heterocromatina e possivelmente corresponde à região organizadora do nucléolo (NOR). *Azteca alfari* e *Azteca chartifex spiriti* apresentaram diversidade nas marcações de $CMA3^+$, e na localização de genes ribossomais 18S marcou positivo para o 5º par cromossômico, coincidindo com a banda NOR.

Nossos resultados mostraram que *Azteca alfari* teve a presença de clusters de DNAr no 4º par cromossômico, na região pericentromérica, coincidindo com as marcações de $CMA_3$ positivas, porém em *Azteca chartifex spiriti* houveram múltiplas marcações para $CMA3^+$, mas somente em *Azteca* sp do grupo *chartifex* o 5º par cromossômico coincidiu regiões ricas em GC e de DNAr 18S. Apesar que normalmente as marcações de $CMA_3^+$ e FISH coincidam, nem sempre as regiões ricas em GC evidenciadas com o $CMA_3^+$ correspondem aos genes DNAr, pois apesar de que a correspondência de regiões ricas em GC e de DNAr 45S/18S tenha sido observada em grande parte das formigas neotropicais que foram estudadas (MARIANO et al. 2008; SANTOS et al .2016) nas formigas neotropicais *Dolichoderus lutosus*, *Dolichoderus diversus* e *Dolichoderus bidens* (SANTOS et al. 2016), *Acromyrmex niger e Acromyrmex striatus* (BARROS et al, 2016; TEIXEIRA et al. 2017), por exemplo, apresentaram várias bandas ricas em GC e apenas um par de bandas 18S DNAr foram observadas. Em *Azteca chartifex spiriti* nenhuma das marcações $CMA3^+$ marcou o 5º par, somente DNAr 18S, levando a entender que nesse caso, essas bandas adicionais de $CMA3^+$ não têm relação com os genes ribossomais.

A sonda repetitiva GA (15) apresentou uma distribuição dispersa nas regiões eucromáticas ao longo de todo o cromossomo, distribuição similar ao resultado encontrado por Barros et al. 2018, em formigas cultivadoras de fungos do gênero *Trachymyrmex.* Em formigas são poucos os dados de localização física cromossômica usando sequências de DNA repetitivas, dificultando a comparação. O trabalho realizado no gênero de abelha sem ferrão *Frieseomelitta* (Meliponini) revelou que a sonda microssatélite estava disperso ao longo dos pares cromossômicos (SANTOS et al. 2018), indicando variação na composição da heterocromatina. Esse comportamento já foi relatado em outros organismos, determinando padrões de distribuição espécie-específicos para cada sequência repetitiva (KUBAT et al. 2008; LOPES et al. 2014) mas normalmente os microssatélites têm sido encontrados nas regiões eucromáticas dos cromossomos de insetos (RUIZ-RUANO et al 2015; CAPOCO, 2018; PICCOLI et al, 2018; TRAVEZOLI et al. 2018; BARBOSA et al. 2021; BARBOZA, COSTA, 2021; TAVARES et al. 2023). Sugere-se então, que os microssatélites podem ser encontrados na cromatina como um todo, dependendo da espécie (MILANI, CABRAL-de-MELO, 2014). Os resultados em *Azteca*, portanto, mostraram como padrão, uma tendência de dispersão destas sequencias ao longo dos cromossomos. Considerando os dados obtidos nesse trabalho com os estudos citogenéticos anteriores no gênenero *Azteca*, o número elevado de cromossomos telocêntricos e subtelocêntricos pode ser explicado pela Teoria da Interação Mínima de Imai et al. (1988). Os cariótipos com baixo número cromossômico, com sua maioria sendo metacêntrico podem indicar estágios intermediários da evolução cariotípica.

## 6. CONCLUSÃO

Neste estudo foi possível observar uma variação dentro do gênero *Azteca*, que podem ser úteis para fins citotaxonômicos e em análises filogenéticas. Foi possível observar que espécies do gênero são diferentes entre si com relação ao seu cariótipo, mesmo apresentando muitas semelhanças morfológicas. Todas as espécies estudadas submetidas à técnica de FISH apresentaram um par portador dos genes ribossomais 18S. Os dados citogenéticos moleculares referentes à utilização da técnica de FISH para mapeamento dos genes DNAr

18S obtidos neste estudo é o primeiro para o gênero *Azteca.* Os nossos resultados reforçam a importância de estudos integrados utilizando dados morfológicos e citogenéticos para auxiliar na delimitação de táxons semelhantes. Nesse caso, pode-se perceber a importância da taxonomia integrativa, na utilização de dados de áreas distintas da ciência para auxiliar na delimitação de espécies.

## 7. REFERÊNCIAS


- AGUIAR H.J.A.C.; BARROS L.A.C.; ALVES D.R.; MARIANO C.S.F., DELABIE J.H.C., POMPOLO S.G. Cytogenetic studies on populations of Camponotus rufipes (Fabricius, 1775) and Camponotus renggeri Emery, 1894 (Formicidae: Formicinae). **PLoS ONE**, v. 12 n. 5. 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0177702
- AGUIAR, H. J. S. A. C.; BARROS, L. A. C.; SILVEIRA, L. I.; PETITCLERC, F.; ETIENNE, S.; ORIVEL, J. Cytogenetic data for sixteen ant species from northeastern Amazon with phylogenetic insights in three subfamilies. **Comparative Cytogenetics**. v. 14, p. 42-60, 2020. DOI: https://doi.org/10.3897/CompCytogen.v14i1.46692
- AYALA, F. J.; WETTERER, J. K.; LLONGINO, J. T.; HARTL, D. L. Molecular phylogeny of Azteca ants (Hymenoptera:Formicidae) and the colonization of Cecropia trees. **Mol Phylogenet Evol.** v. 5 n. 2 p.423-428. 1996. doi: 10.1006/mpev.1996.0037.
- BACARO, F. B.; FEITOSA, R. M.; FERNANDEZ, F.; FERNANDEZ, I. O.; IZZO, T, J.; SOUZA, J. L. P.; SOLAR, R. **Guia para Gêneros de Formigas no Brasil.** Editora Inpa. Manaus, 2015 DOI: 10.5281/zenodo.32912
- BARBOSA, ICO; SCHNEIDER; CH; GOLL, LG; FELDBERG, E; CARVALHO-ZILSE, GA. Chromosomal mapping of repetitive DNA in *Melipona seminigra merrillae* Cockerell, 1919 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). **Comp Cytogenet.** v. 15 n.1 p.77-87. 2021 doi: 10.3897/CompCytogen.v15i1.56430.
- BARBOZA, VP, COSTA, MA. Cytogenetic Analysis in Trigona spinipes Fabricius (Hymenoptera, Meliponina) Reveals Intraspecific Variation. Neotrop Entomol. 2021 Oct; v. 50 n.5 p. 846-849. 2021 doi: 10.1007/s13744-021-00853-7.
- BARROS, L.A.C.; AGUIAR H.JA.C.; ANDRADE-SOUZA V.; Mariano C.S.F.; DELABIE J.H.C.; POMPOLO SG. Occurrence of pre-nucleolar bodies and 45S rDNA location on the chromosomes of the ant Mycocepurus goeldii (Forel) (Formicidae, Myrmicinae, Attini). **Hereditas,** v.149 p. 50-54. 2012. DOI: 10.1111/j.1601-5223.2011.02237.x
- BARROS, L. A. C.; TEIXEIRA, G. A., de AGUIAR, H. J. A. C., LOPES, D. M., & POMPOLO, S. das G. Cytogenetic studies in Trachymyrmex holmgreni

Wheeler, 1925 (Formicidae: Myrmicinae) by conventional and molecular methods. ***Sociobiology***, v. *65* n. 2 p. 185–190. 2012 DOI: https://doi.org/10.13102/sociobiology.v65i2.2214

- BARROS, L.A.C.; AGUIAR, H.J.A.C.; MARIANO, C.S.F.; ANDRADE-SOUZA, V.; COSTA, M.A.; DELABIE, J.H.C., POMPOLO, S.G. Cytogenetic data on six leafcutter ants of the genus Acromyrmex Mayr, 1865 (Hymenoptera, Formicidae, Myrmicinae): insights into chromosome evolution and taxonomic implications. **Comparative Cytogenetics**, v. 10, p. 229-243. 2016. DOI: 10.3897/CompCytogen.v10i2.7612
- BARROS, L. A. C.; TEIXEIRA, G., FERREIRA, P. .; LOD, R., SILVEIRA, L.; PETITCLERC, F.; ORIVEL, J. ., & AGUIAR; H.. Cytogenetic survey of eight ant species from the Amazon rainforest. **Caryologia**, v. 74, p. 29-38. 2021 DOI: https://doi.org/10.36253/caryologia-1106
- BIDAU, C.J.; MARTÍ, D. A. 110 years of orthopteran cytogenetics, the chromosomal evolutionary viewpoint, and Michael White's signal contributions to the field. **J Orthoptera Res** v. 19, p. 165–182. 2010. doi:10.1665/034.019.0202.
- BOLTON B. **Indentification guide to the ant genera of the world.** Harvard University Press, Cambridge, 1994.
- BOLTON, B. **An online catalog of the ants of the world.** Disponível em: < http://antcat.org.> Acesso em: 07 de fev. 2022
- CAPOCO, M. M. **Mapeamento de DNA repetitivo na abelha sem ferrão Tetragonisca fiebrigi (Schwarz, 1938) com ênfase nos cromossomos Bs.** Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de Magister Scientiae. Viçosa, 2016.
- CARDOSO, D. C.; CRISTIANO, M. P.; BARROS, L. A.; LOPES, D. M.;POMPOLO, S. D. First cytogenetic characterization of a species of genus of tree ants *Azteca* Forel, 1978 (Dolichoderinae, Formicidae). **Comparative Cytogenetics**. p. 107-114, 2012. DOI: 10.3897/CompCytogen.v6i2.2397
- CARROLL, C. R. Azteca (Hormiga Azteca, Azteca ants, Cecropia ants). Species acousts. p. 691-693
- CHAUFAILLE, M. L. L. F. Citogenética e biologia molecular em leucemia linfocítica crônica. **Revista Brasileira de Hematologia** e **Hemoterapia**. v. 27. p. 247-252, 2005.
- CHIRINO, M.G.; ROSSI, L.F.; BRESSA, M.J.; LUACES, J.P.; MERANI, M. S.

Comparative study of mitotic chromosomes in two blowflies, Lucilia sericata and L. cluvia (Diptera, Calliphoridae), by C- and G-like banding patterns and rRNA loci, and implications for karyotype evolution. **Comparative Cytogenetics**. v. 9 p. 103-118. 2015.

- CIOFFI, M, B.; BERTOLLO, L A C. **Chromosomal Distribution and Evolution of Repetitive DNAs in Fish.** s. In: Garrido R, editor. ADN repetitivo. Dinâmica do Genoma. Basileia: Karger; 2012. https://doi.org/10.1159/000337950
- COKENDOLPHER, J. C.; FRANCKE, O. F. Karyotype of Conomyrma flava (MCCOOK) (Hymenoptera: Formicidae). **New York Entomological Society**, v.94, p. 349-351. 1984
- CORREIA, J. P. S. O.; MARIANO, C. S. F.; DELABIE, J. H. C.; LACAU, S.; COSTA, M. A. Cytogenetic Analysis of Pseudoponera Stigma and Pseudoponera Gilberti (Hymenoptera: Formicidae: Ponerinae): A Taxonomic Approach. **The Florida Entomologist,** vol. 99, no. 4, p. 718–21, 2016. DOI: https://doi.org/10.1653/024.099.0422
- CROSLAND, M. W.; CROZIER, R. H. Myrmecia pilosula, an Ant with Only One Pair of Chromosomes. **Science.** v. 14, 1986. DOI: 10.1126/science.231.4743.1278. PMID: 17839565.
- CROZIER, R.H. Karyotypes of twenty-one ant species (Hymenoptera; Formicidae), with reviews of the known ant karyotypes. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, v.12 p.109-128. 1970b
- DEBOUT, G. SCHATZ, B., ELIAS, M., MCKEY, D. Polydomy in ants: What we know, what we think we know, and what remains to be done. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 90, n. 2, p. 319–348, fev. 2007. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2007.00728.x
- ELLIS, S.; PROCTER, D. S., BUCKHAM_BONNET, P. *et al.* Inferring polydomy: a review of functional, spatial and genetic methods for identifying colony boundaries. ***Insect. Soc.*** v. 64, p. 19–37, 2017. DOOI: https://doi.org/10.1007/s00040-016-0534-7
- EMERY, C. Hymenoptera fam. Formicidae subfam. Dolichoderinie. 1913. Disponível em: https://antcat.s3.amazonaws.com/5706/emery1913genera_insectorumdolichoderinae.pdf?X-Amz-Algorithm=AWS4-HMAC-SHA256&X-Amz Credential=AKIAJJR3DGROFMVL2FBQ%2F20230110%2Fus-east-1%2Fs3%2Faws4_request&X-Amz-Date=20230110T184722Z&X-Amz-Expires=86400&X-Amz-SignedHeaders=host&X-Amz-

Signature=7b26e9e9e49245ebdd5ce74cf7d61567611435cd4099b5d29723a71dbb5340b9

- FERNANDEZ. F.; GERRERO. R. J.; DELSINNE, T. **Hormigas de Colombia**. 1 ed. Instituto de Ciencias Naturales, 2019.
- FERREIRA, R. Formigas cortadeiras: biologia, danos e métodos de controle. **Revista Plantio Direto**. p. 23-32. 2010.
- FOREL, A**. Études Myrmécologiques En 1878 (Première Partie) Avec L'Anatomie Du Gésier Des Fourmis. Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences naturalles,** v. 15, n. 80, p. 337–392, 1878.
- FOREL, A. **A fauna das formigas do Brasil**. Extraído do Boletim do Museu Paraense. 1985. Disponível em: <https://repositorio.museu-goeldi.br/bitstream/mgoeldi/1060/1/007%20A%20Fauna%20das%20formigas%20ri.PDF> Acesso em: 28 de jul. 2022
- FOWLER, H. G.; DELABIE, J. H. C.; MEDEIROS, M. A. de. O mosaico de formigas nos cacauais bahianos: implicações para o manejo de pragas e conservação da Mata Atlântica. **Rev. Bioikos**, PUC-Campinas, v. 12 n. I p.63-68, 1998
- FUJIWARA, A.; ABE, S.; YAMAHA, E.; YAMAZAKI, F.; YOSHIDA, M. S. Chromosomal localization and heterochromatin association of ribosomal RNA genes loci and silver stained nucleolar organizer regions in salmonid fishes. **Chromosome Research**, v. 6, p. 463-471, 1998. DOI: 10.1023/a:1009200428369.
- GARFINK, M. R**. *Azteca* ants inhabiting Cecropia trees are moving up in elevation in Monteverde.** Department of Environmental Science and Policy. 2019
- GOKHMAN V.E.; KUZNETSOVA V.G. Parthenogenesis in Hexapoda: holometabolous insects**. Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**. v. 56. ed.1 p. 23–34, 2017 DOI: https://doi.org/10.1111/jzs.12183
- GRIFFTIS et al. **Introdução à genética**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabarra Koogan, 2016
- GRIMALDE, D.; AGOSTI, D.; CARPENTER, J. M. **New and Rediscovered Primitive Ants (Hymenoptera: Formicidae) in Cretaceous Amber from New Jersey, and Their Phylogenetic Relationships.** American Museum of Natural History Research Library. 1997
- GUERRA, M. **Introdução à Citogenética Geral.** Rio de Janeiro: Guanabara, 1988

- GUERRA, M. Chromosome number variation and evolution in monocots. In: Monocots: Systematics and Evolution (K.L. Wilson & D.A. Morrison, eds.). **CSIRO publishing, Collingwood**, p.127-136, 2000.
- GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. Ribeirão Preto: Ed. FUNPEC, 2002.
- GUERRA, M. **FISH: Conceitos e aplicações na citogenética**. Sociedade Brasileira de Genética. Ribeirão Preto: 2004.
- GUERRA, M. **Citogenética molecular**: protocolos comentados. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2012
- HANSON, P.E. GAULD, I.D. **The Hymenoptera of Costa Rica**. Oxford: Oxford University Press. 1995.
- HARADA, A. Y. Estrutura de colônias de Azteca alfari Emery (Hymenoptera, Formicidade, Dolichoderinae), em plantas de Cecropia concolor (Moraceae). **Revista Bras.** Ent. v. 32, n. 2. p. 169-182. 1989.
- HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. (1980) Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia** v. 36, p. 1014-1015. doi: 10.1007/BF01953855
- IMAI, H. T.; ROBERT, H. T; CROZIER, R. H. Experimental bases for the minimum interaction theory. I. Chromosome evolution in ants of the *Myrmecia pilosula* species complex (Hymenoptera: Formicidae: Myrmeciinae). **Japanese Journal of Genetics.** v. 69 p. 137–182, 1994
- IMAI, H.T.; MARUYAMA, T. Karyotype evolution by pericentric inversion as a stochastic process. **Journal of Theoretical Biology**, v.70, p. 253-261, 1978. DOI: 10.1016/0022-5193(78)90375-2
- IMAI, H. T. Modes of spontaneous chromosomal mutation and karyotype evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis. **The Japanese journal of genetics**. p. 159-185, 1988. DOI: 10.1266/jjg.63.159. PMID: 3273765.
- JARDINE K. J. et al. Volatiles defenses of Amazon Azteca ants (repellent ants). bioRxiv. Abr, 2020. DOI: https://doi.org/10.1101/2020.04.15.043547
- KASAHARA, S. **Introdução à pesquisa em Citogenética de Vertebrados.** 1ª ed. Sociedade Brasileira Genética. Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil, 2009.
- KIROV, I.; KHRUSTALEVA, L.; LAERE, K.V.; SOLOVIEV, A.; SOFIE, M.;, ROMANOV, D.; FESENKO, I. DRAWID: user-friendly java software for chromosome measurements and idiogram drawing. **Comp Cytogenet.** v. 11(4) p. 747-757, 2017. DOI: 10.3897/CompCytogen.v11i4.20830.

- KUBAT, Z.; HOBZA, R.; VYSKOT, B.; KEJNOVSKY, E. Microsatellite accumulation in the Y chromosome of Silene latifolia. **Genome,** 51:350– 356, 2008 DOI: https://doi.org/10.1139/G08-024
- KUBAT Z; HOBZA, R; VYSKOT, B; KEJNOVSKY, E.. Microsatellite accumulation in the Y chromosome of *Silene latifolia*. **Genome** v. 51 p. 350–356. 2008 DOI: https://doi.org/10.1139/g08-024
- LEITCH, A. R. et al. **In situ hybridization: a practical guide**. BIOS Scientific Publishers Ltd, 1994.
- LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A. A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas.** v. 52 p. 201–220, 1964. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1964.tb01953.x
- LIMA, F. O. CATARINO, R. M.; OSHIMA, C. T. F.; FIGUEIREDO, M. T. A. Regiões organizadoras nucleolares argirofílicas no sarcoma sinovial. **Bras Patol Med Lab**. v. 41, n. 5, p. 347-52. Outubro, 2005
- LONGINO, J. T. Ants provide substrate for epiphytes. Selbyana. v. 9, n. 1. p. 100-103. 1986
- LONGINO J. T. *Azteca* ants in *Cecropia* trees: Taxonomy, colony structure, and behaviour. In: Huxley CR, Cutler DF (Eds). Ant-Plant Interactions. Oxford University Press, Oxford: 271-288, 1991.
- LONGINO, JOHN T. Taxonomic characterization of some live-stem inhabiting Azteca (Hymenoptera: Formicidae) in Costa Rica, with special reference to the ants of Cordia (Boraginaceae) and Triplaris (Polygonaceae). **Journal of Hymenoptera Research**, v. 5, p. 131-156, 1996.
- LONGINO, J. T. A taxonomic review of the genus Azteca (Hymenoptera: Formicidae) in Costa Rica and a review global doaurita group. **Zootaxa**. v. 1491 n. 1. Mai, 2007
- LOPES, DM; POMPOLO, SG; CAMPOS, LAO; TAVARES, MG. Cytogenetic characterization of *Melipona rufiventris* Lepeletier 1836 and *Melipona mondury* Smith 1863 (Hymenoptera, Apidae) by C banding and fluorochromes staining. **Genetics and Molecular Biology** v. 31 p. 49–52. 2008 https://doi.org/10.1590/s1415-47572008000100010
- LOPEZ-FLORES I, GARRIDO-RAMOS MA. The repetitive DNA content in eukaryotesgenomes. In: Garrido-Ramos MA, editors. Repetitive DNA. Genome dynamics. Karger, Basel; 2012. p.1–28

- LORITE, P. PALAMOQUE, T. Karyotype evolution in ants (Hymenoptera: Formicidae), with a review of the known ant chromosome numbers. Myrmecological News. v. 13 p. 89-102. 2010
- MARIANO, C. S. F.; . Delabie, J.R.M. Santos, S.G. Pompolo. Evolução cariotípica em Pachycondyla spp. (Ponerinae) Neotropicais. **Biológico**. v. 69, p. 409-412. São Paulo: 2007
- MARIANO, C. S. F.; POMPOLO, S.; BARROS, L.; MARIANO-NETO, E.; CAMPIOLO, S.; DELABIE, J. A biogeographic study of the endangered ant Dinoponera lucida Emery (Hymenoptera: Formicidae: Ponerinae) using a cytogenetic appro conservation and Insect diversity. **Royal entomological Society.** v. 1. p. 161-168. 2008
- MARIANO, C. S. F. et al**.** Contribution of Cytogenetics to the Debate on the Paraphyly of Pachycondyla spp. (Hymenoptera, Formicidae, Ponerinae). **Psyche: A Journal of Entomology**. 2012 DOI: https://doi.org/10.1155/2012/973897
- MARIANO, C. S. F. et al. **Citogenética e evolução do cariótipo em formigas Poneromorfas**. Scielo. 2015 DOI: 10.7476/9788574554419.0010
- MARTINS, C; CABRAL-de-MELO, D.C; VALENTE, G.T; MAZZUCHELI, J; OLIVEIRA, S.G. Cytogenetic mapping and its contribution to the knowledge of animal genomes. **Advances in Genetics Research.** Volume 4, Cap 1: 1-81. 2011.
- MELO, J. T. Infestação por lianas e comportamento de poda por formigas em Cecropia (Urticaceae). Ecologia da Mata Atlântica, 2018.
- MILANI, D.; & CABRAL-de-MELO, 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,** v. 9 n. 5 , 2014.
- PAULS, E.; BERTOLLO, L. A. C. Distribution of a supernumerary chromosome system and aspect of karyotypic evolution in the genus Prochilodus (Pisces, Prochilodontidae). **Genetica**, v. 81, p. 117-123, 1990. DOI: https://doi.org/10.1007/BF00226450
- PEDRITO, E. New method of applying BHC for control of the "gardener ant" (*Azteca paraensis bondari Borg.)* a cocoa pest in Bahia. In. Conferencia Internaciona de Pesquisas em Cacau. **Impres**. p. 291-295. 1969

- PEÑAZOLA, A. D. P.S. II Curso de Citogenética aplicada a recursos genéticos vegetais. **EMBRAPA**. Brasília, DF. 2005
- PICANÇO, M. C. Manejo integrado de pragas.Universidade Federal de Viçosa. Disponível em: <https://www.ica.ufmg.br/wp-content/uploads/2017/06/apostila_entomologia_2010.pdf> Acesso em 15/04/2023.
- PICOLI, MCA; BARDELLA, VB, CABRAL-de-MELO, DC. Repetitive DNAs in *Melipona scutellaris* (Hymenoptera: Apidae: Meliponidae): Chromosomal distribution and test of multiple heterochromatin amplification in the genus. ***Apidologie*** 49: 497–504. 2018 DOI: 10.1007/s13592-018-0577-z
- PINKEL, D. STRAUME, T. GRAY, JW. Cytogenetic analysis using quantitative, highsensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS), USA.** v. 83: 2934–2938, 1986. DOI: https://doi.org/10.1073/pnas.83.9.2934
- PIRES, et al. Translocação robertsoniana 1/29 e quimerismo em bovinos da raça sufça parda. **Boletim De Indústria Animal**, v. 42, p. 107-113, 1985 Disponível em: <http://iz.agricultura.sp.gov.br/bia/index.php/bia/article/view/637/628> Acesso em: 01 de mar. 2022
- ROCHA, M. P. et al. Melipona, Seis décadas de citogenética. (Melipona, six decades of cytogenetics). **Bioscience Journal**, 23: 111-117, 2007.
- RUIZ-RUANO, FJ; CUADRADO, Á; MONTIEL, EE; CAMACHO J. P. M; LOPES-LEON, M. D. Next generation sequencing and FISH reveal uneven and nonrandom microsatellite distribution in two grasshopper genomes ***Cromossoma*** v. 124 , p. 221-234 (2015). https://doi.org/10.1007/s00412-014-0492-7
- SAHARA, K. MAREC, F. TRAUT, W. TTAGG telomeric repeats in chromosomes of some insects and other arthropods**. Chromosom Res** 7:449–460, 1999. DOI: https://doi.org/10.1023/A:1009297729547
- SANTORO, R. The silence of the ribosomal RNA genes. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, p. 2067-2079, 2005. DOI: I 10.1007 / s00018-005–5110-7
- SANTOS, I.S.; COSTA, M.A.; MARIANO, C.S.F.; DELABIE, J.H.C.; ANDRADE-SOUZA, V., SILVA, J.G. A cytogenetic approach to the study of Neotropical Odontomachus and Anochetus ants (Hymenoptera: Formicidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 103 n.3. p. 424-429. 2010. DOI:

https://doi.org/10.1603/AN09101

- SANTOS et al. "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.** v. 23 p. 61-69, 2016
- SANTOS, J. M.; DINIZ, D.; RODRIGUES T> A. S.; CIOFFI, M. B.; WALDSMICHIT, A, M. Heterochromatin Distribution and Chromosomal Mapping of Microsatellite Repeats in the Genome of *Frieseomelitta* Stingless Bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini)," **Florida Entomologist,** v. 101 n.1, p. 33-39, 2018
- SCHLICK-STEINER, B.C.; STEINER, F. M.; SEIFERT, B.; STAUFFER, C.; CHRISTIAN, E.; CROZIER, R. H. Integrative taxonomy: a multisource approach to exploring biodiversity. **Annu Rev Entomol**. v. 55, p.421-38, 2010. doi: 10.1146/annurev-ento-112408-085432. SCHULTZ, T. R. In search of ant ancestors. **PNAS**- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Dez. 2000 DOI: https://doi.org/10.1073/pnas.011513798
- SCHWARZACHER, T.; HARRISON, P. H. **Practical In Situ Hybridization**. Heredity, 2000
- SCHWEIZER, D. Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA-DAPI bands) in human chromosomes. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 27 190-193, 1980. DOI: 10.1159/000131482
- SOARES, G. R.; LOURENÇO, G. M.; COSTA, F. V.; LOPES, I.; FELISBERTO, B. H.; PINTO, V. D.; CAMPOS, R. I.; RIBEIRO, S. P. Territory and trophic cascading effects of the ant Azteca chartifex (Hymenoptera: Formicidae) in a tropical canopy. **Myrmecol. News** v. 32 p. 103-113. 2022
- SRIVASTA, R.; DABAS, A.; GAUR, P. Qualitative analysis of chromosome from neural ganglia of flesh-flies Sarcophaga. **Biochemical and Cellular Archives** . v.12, p. 149-152. 2012.
- SUMNER A.T. **Chromosomes: Organization and Function**. Blackwell Bublishing. North Berwick – United Kingdom. 2003
- TAVARES, M.G.; LOPES, D.M.; CAMPOS, L. A. O. An overview of cytogenetics of the tribe Meliponini (Hymenoptera: Apidae). **Genetica** v. 145, p. 241–258. 2017. doi:10.1007/s10709-017-9961-2.
- TAVARES, M. G.; OLIVEIRA, E. R de.; ELIZEU, A. M.;NOVAES, C. M.;

TRAVENZOLI, N. M; LOPES, D. M. Comparative molecular cytogenetics in five species of stingless bees (Hymenoptera, Apidae), **Zoologischer Anzeiger**, v. 302, p. 37-42, 2023. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jcz.2022.11.008.

- TEIXEIRA, G.A.; BARROS, L.A.C.; AGUIAR, H.J.A.C.; POMPOLO, S.G. Comparative physical mapping of 18S rDNA in the karyotypes of six leafcutter ant species of the genera Atta and Acromyrmex (Formicidae: Myrmicinae). **Genetica,** v. 145 p. 351- 357. 2017
- TRAVENZOLI NM; BARBOSA IC de O; CARVALHO-ZILSE GA; SALOMÂO TMF; LOPES DM. Karyotypic description and repetitive DNA chromosome mapping of *Melipona interrupta* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Meliponini). Caryologia. *International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics* 72(2): 91–95. (2019a) DOI: 10.13128/cayologia-239
- VANDERMEER, J. P.; IVETTE P.; GUILLERMO I. N.; STACY P. ALVARO, G. B. **Ants ( Azteca sp.) as potential biological control agents in shade coffee production in Chiapas, Mexico.** Agroforestry Systems. v. 56. 2002 DOI: 10.1023/A:1021328820123.
- VELASCO, M.; ARLEY, M.; MARIANO, C. F. S.; BARROS, L. **Citogenética de las hormigas de la región neotropical.** Universidad Nacional da Colômbia. 2019
- WARD, P.S.; DOWNIE, D. A. The ant subfamily Pseudomyrmecinae (Hymenoptera: Formicidae): phylogeny and evolution of big-eyed arboreal ants. **Syst Entomol.** 30:310–335. 2005. DOI: https://doi.org/10.1111/j. 1365-3113.2004.00281.x
- WARD, P.S. et al. Phylogeny and Biogeography of Dolichoderine Ants: Effects of Data Partitioning and Relict Taxa on Historical Inference**. Systematic Biology**, v. 59. P.342-362. 2010 DOI: https://doi.org/10.1093/sysbio/syq012
- WCISLO, A. et al. Azteca ants repair damage to their Cecropia host plants. **Journal of Hymenoptera Research.** v. 88 p. 61–70. DOI: https://doi.org/10.3897/jhr.88.75855
- WILSON, E. O**. The insects societies**. Cambridge, Belnap press of Havard niversity Press. 1971.
- WILSON, E. O.; HOLLDOBLER, B. The rise of the ants: a phylogenetic and ecological explanation**. Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 24 n. 102(21). Epub, 2005. doi: DOI: 10.1073/pnas.0502264102.