

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA
(Associação Ampla entre a UEPG e a UNICENTRO)

BÁRBARA GARDIM DE MELO

ANÁLISE CITOGENÉTICA E MOLECULAR EM ESPÉCIES DA SUBFAMÍLIA
ALTICINAE (COLEOPTERA: CHRYSOMELIDAE)

Ponta Grossa

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA
(Associação Ampla entre a UEPG e a UNICENTRO)

ANÁLISE CITOGENÉTICA E MOLECULAR EM ESPÉCIES DA SUBFAMÍLIA
ALTICINAE (COLEOPTERA: CHRYSOMELIDAE)

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa em associação com a Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Biologia Evolutiva)

Orientadora: Prof. Dra. Mara Cristina de Almeida
Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari

Ponta Grossa
2013

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

M528 Melo, Bárbara Gardim de
 Análise citogenética e molecular em
 espécies da Subfamília Alticinae
 (Coleoptera: Chrysomelidae)/ Bárbara
 Gardim de Melo. Ponta Grossa, 2013.
 78f.

 Dissertação (Mestrado em Ciências
 Biológicas - Área de Concentração:
 Biologia Evolutiva), Universidade Estadual
 de Ponta Grossa.

 Orientadora: Prof^a Dr^a Mara Cristina de
 Almeida.

 Coorientador: Prof. Dr. Marcelo Ricardo
 Vicari.

 1.Meiose. 2.rDNA. 3.Fiber FISH. 4.GISH.
 5.Cariótipo. I.Almeida, Mara Cristina de.
 II. Vicari, Marcelo Ricardo. III.
 Universidade Estadual de Ponta Grossa.
 Mestrado em Ciências Biológicas. IV. T.

CDD: 576



Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva

Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa (Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética) e a Universidade Estadual do Centro Oeste (Departamento de Ciências Biológicas)



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº. 09/2013

Ata referente à Defesa de Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, uma Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa e a Universidade Estadual do Centro-Oeste, pela candidata **BARBARA GARDIM DE MELO**.

Aos vinte e oito dias do mês de fevereiro de dois mil e treze, no Auditório do Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, da Universidade Estadual de Ponta Grossa sob a presidência da Dr^a Mara Cristina de Almeida Matiello, em sessão pública, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação do (a) aluno (a) **BARBARA GARDIM DE MELO**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-área de concentração Biologia Evolutiva, visando o título de Mestre, constituída pelos: Dr^a Mara Cristina de Almeida Matiello (Orientadora UEPG), Dr. Edison Zefa (UFPEL) Dr. José Raulindo Gardingo (UEPG). Atestada pela colenda Congregação do Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva. Iniciados os trabalhos a presidência deu conhecimento aos membros da Comissão e ao (a) candidato (a) das normas que regem a defesa de dissertação. A seguir a candidata passou a defesa de sua dissertação intitulada: "**Análise Citogenética e Molecular em Espécies da Subfamília *Alticinae* (Coleoptera: Chrysomelidae)**". Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento e a Comissão Examinadora considerou o (a) candidato (a) **APROVADA**. A Presidência ressaltou que a obtenção do título de Mestre está condicionada ao disposto da atual aprovação de outorga do Título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração em Biologia Evolutiva, com validade de trinta dias; assim como comprovante de envio de um artigo científico proveniente de seu trabalho de dissertação a revista com Qualis igual ou superior a B1 (Biodiversidade – Capes) até o prazo máximo de 60 dias após a defesa; o não depósito da versão definitiva de Dissertação, bem como as cópias em CD(PDF) com todas as correções feitas e atestadas pelo (a) orientador (a) assim como o comprovante de envio do artigo nestes prazos anulará toda possibilidade de outorga definitiva do Título, recebimento de Certidão e outros documentos, bem como a solicitação do Diploma. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Observação (se necessário)

Alteração de Título: sim ☐ não ☒

Novo título: _____

Ponta Grossa, 28 de fevereiro de dois mil e treze.

Prof^a Dr^a Mara Cristina de Almeida Matiello

Prof. Dr. Edison Zefa

Prof. Dr. José Raulindo Gardingo

AGRADECIMENTO

Eu agradeço especialmente a minha orientadora Mara Cristina de Almeida por todo o conhecimento transmitido, paciência que demonstrou, pelas críticas e pelos seis anos de convivência e aprendizagem.

Agradeço ao melhor amigo e namorado Ivan Taype de Carvalho pelo apoio, pela parceria, pela paciência que teve comigo nos momentos difíceis e pelas coletas que você fez, embora não tenho usado nenhum dos animais coletados.

Agradeço aos professores que fazem parte da equipe do laboratório de Citogenética e Evolução Viviane Nogaroto, Marcelo Ricardo Vicari e Roberto Ferreira Artoni pelo apoio, pelas boas discussões e dicas, e pela ajuda na realização das técnicas laboratoriais.

Não tenho palavras suficientes para agradecer meu “irmão científico” Leonardo Gusso Goll pela parceria, pelos ensinamentos no laboratório e pelas boas discussões.

Agradeço as minhas grandes amigas Michele Andressa Vier Wolski e Karina Coelho pela amizade e pelas nossas maravilhosas reuniões. Agradeço também as minhas colegas Kaline Ziemniczak, Diana Cornelio, Jordana Oliveira e Michele Orane.

As minhas amigas Umuaramenses não tenho palavras para agradecer pelos 24 anos de amizade e pelo grande incentivo com os meus estudos Débora Jacomine, Nádia Bortolato, Caroline Regina Galvão e Camila Galvão.

Agradeço à Universidade Estadual de Ponta Grossa, ao programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva e ao Laboratório de Citogenética Evolutiva por fornecerem todo o apoio para realização dessa pesquisa.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida.

RESUMO

A subfamília Alticinae é considerada moderna com grande variação de número diplóide e sistema de determinação sexual. Considerando a tribo Systemini apenas seis espécies foram analisadas citogeneticamente e essas espécies possuem grande variação no número cromossômico e no sistema de determinação do sexo. Oedionychina, por outro lado, apresenta espécies com número diploide e sistema de determinação sexual conservados de $2n=22=20+X+y$ com cromossomos sexuais gigantes e assinápticos. A análise das Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs) tem sido realizada principalmente através de Impregnação pelo Íon Prata, poucas espécies de Alticinae têm sido analisadas através de Hibridação *in situ* Fluorescente até o presente momento. O mapeamento do gene ribossomal 5S foi analisado apenas em espécies de Scarabaeidae. Com relação ao cístron 45S somente 3 espécies de Alticinae foram descritas. Assim, o objetivo desse trabalho foi caracterizar citogeneticamente seis espécies de Alticinae (*Omophoita octoguttata*, *Omophoita personata*, *Omophoita magniguttis*, *Alagoasa coccinelloide*, *Alagoasa florigera* e *Systema tenuis*), visando estabelecer as diferenças cariotípicas e as estratégias de diferenciação cromossômicas, para compreender as relações evolutivas entre as espécies. A análise citogenética das espécies *A. coccinelloide*, *A. florigera* e *S. tenuis* estão concordantes com os dados da literatura. O número diploide das espécies do gênero *Alagoasa* é de $2n=22=20+X+y$ com cromossomos sexuais gigantes e assinápticos que segregam corretamente na anáfase I. *S. tenuis* apresentou o número diplóide de $2n=32=15II+neoXY$. O uso de fluorocromo em *S. tenuis* mostrou a presença de regiões pericentrométicas ricas em repetições AT. A Hibridação *in situ* do Genoma confirmou o mecanismo cromossômico neoXY. A realização da FISH com sonda de 18S e 5S evidenciou que em *O. octoguttata*, *O. personata* e *A. coccinelloide* ocorre a presença de um par autossômico portador dos genes ribossomais. *O. magniguttis* e *A. florigera* mostraram uma derivação no cariótipo apresentando dois e três pares de cromossomos portadores dos genes ribossomais respectivamente. A dupla FISH mostra que, nas 5 espécies os genes estão colocalizados. *S. tenuis* evidenciou múltiplos sítios desses genes, e a dupla FISH mostrou os genes estão em cromossomos separados ou colocalizados. A FISH com fibras estendidas mostrou que em todos os casos os genes estão dispostos de forma interespaçada.

Palavras-chave: meiose, rDNA, fiber FISH, GISH, cariótipo, evolução

ABSTRACT

The Alticinae subfamily is considered modern with wide variation of the diploid number and sex determination system. Considering the Systemini tribe only 6 species were cytogenetically analyzed and these species exhibit wide variation in the chromosome number and the system of sex determination. Oedionychina, on the other hand, present species with diploid number and sex determination system conserved of $2n=22=20+X+y$, with extremely large and asynaptic sex chromosomes. The analysis of Nucleolus Organizer Regions (NORs) has been attempted mainly by impregnation of the Ag-NOR, and a few species of Alticinae have been examined by using Fluorescent *in situ* Hybridization to date. The mapping of 5S ribosomal gene was analyzed only in Scarabaeidae species. In relation to the 45S cistron only three species of Alticinae have been described. The aim of the present study was characterize cytogenetically 6 species of Alticinae (*Omophoita octoguttata*, *Omophoita personata*, *Omophoita magniguttis*, *Alagoasa coccinelloide*, *Alagoasa florigera* e *Systema tenuis*), in order to determine the karyotype differentiation and the strategies of chromosome differentiation to understand the evolutionary relation among the species. The cytogenetic analysis of *A. coccinelloide*, *A. florigera* and *S. tenuis* are in accordance with the literature data. The diploid number of the *Alagoasa* species is $2n=22=20+X+y$ with large sex chromosomes, which are asynaptic although have regular segregation in anaphase I. *Systema tenuis* presented the diploid number of $2n=32=15II+neoXY$. The fluorochrome analysis in *S. tenuis* showed the presence of pericentromeric region rich in AT repetitions. The Genome *In situ* Hybridization confirmed the system of sex determination of the type neoXY. Performing FISH with 18S and 5S probe revealed the presence of one autosomal pair carrier the ribosomal genes in *O. octoguttata*, *O. personata* and *A. coccinelloide*. Derivations on karyotype showing two or three pairs of chromosomes carrying of the ribosomal genes have been observed in *O. magniguttis* and *A. florigera*, respectively. The double FISH showed that genes are colocalized in the five species. *S. tenuis* showed multiple sites of these genes, and the double FISH showed the genes are in separate chromosomes or colocalized. The extended fiber FISH showed that in all cases the genes are interspersed arranged.

Keywords: meiosis, rDNA, fiber FISH, GISH, karyotype evolution

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo I

- Figura 1 – Células em metáfase I de *Omophoita octoguttata* com $2n=10II+X+y$ submetidas a dupla FISH com sondas de rDNA 5S (vermelho) e 18S (verde) contra coradas com DAPI (azul), mostrando a presença de cístrons 5S (setas) associado a um bivalente autossômico (**A.**) e a localização do cístrons 45S (**B.** - setas), os quais são colocalizados (**C.**) as figuras **D.**, **E.** e **F.** mostram a colocalização dos cístrons 5S e 45S e o heteromorfismo dos cístrons (setas) entre os elementos cromossômicos em exemplares da população de Nonoai – RS. Escala= 10 μ m.....34
- Figura 2 – Células meióticas de *Omophoita personata* (**A.** – **C.**) e *Omophoita magniguttis* (**D.** – **F.**), com $2n=22=10II+X+y$ submetidas a FISH com sonda de rDNA 5S (vermelho) e 18S (verde) e contra coradas com DAPI (azul). **A.** metáfase II mostrando o cístrons 5S (seta) associado a um autossomo. **B.** a mesma células mostrando o cístrons 45S (verde) associado a um autossomo (seta). **C.** Sobreposição das imagens mostrando a colocalização dos cístrons ribossomais. **F.** sobreposição das imagens evidenciando a colocalização dos cístrons (setas). Escala= 10 μ m.....35
- Figura 3 – Células meióticas de *Omophoita octoguttata* (**A.**, **B.** e **C.**), *Omophoita personata* (**D.**, **E.** e **F.**), *Omophoita magniguttis* (**G.**, **H.** e **I.**) e submetidas a FISH com sondas de rDNA de 5S (vermelho) e 18S (verde) e contra coradas com DAPI (azul). Em **A.**, **D.** e **G.** mostrando os sítios de 5S e 18S colocalizados. **B.** e **C.**, **E.** e **F.**, **H.** e **I.** evidenciando que os sítios colocalizados são interespaçados nas três espécies. Escala= 10 μ m.....35

Capítulo II

Figura 1 - Exemplares de Alticinae do gênero *Alagoasa*. **A.** exemplar macho de *Alagoasa coccinelloide*. **B.** exemplar macho de *Alagoasa florigera*. Escala = 1 cm.....45

Figura 2 – Células mitóticas e meióticas de *Alagoasa coccinelloide*. **A.** Cariótipo espermatoγονial com $2n=22$ cromossomos. A seta esta evidenciando a constrição secundária. **B.** Metáfase I, presença de $2n=10II+X+y$. **C.** metáfase II evidenciando a presença do complemento haplóide $n=10+y$ cromossomos. Escala = $10\mu m$45

Figura 3 – Células meióticas de *Alagoasa florigera* **A.** Cariótipo de metáfase II com $n=10+y$. Contrição secundária (seta). **B.** Metáfase I com $2n=10II=X+y$; Contrição no cromossomo y (seta). **C.** Metáfase II com $n=10+y$. Escala = $10\mu m$46

Figura 4 – Células meióticas de *A. coccinelloide* submetidas à técnica de Hibridação *in situ* fluorescente com sonda de rDNA 18S (verde) e 5S (vermelho) e contracoradas com DAPI (azul). **A.** e **B.** Metáfase espermatoγονial mostrando a marcação em um par autossômico (setas). **C.** Sobreposição das imagens vistas em **A.** e **B.** mostrando que os cístrons ribossomais são sintênicos (setas). **D.** e **E.** Metáfase II evidenciando a hibridação associada a um cromossomo autossômico (setas). **F.** sobreposição das imagens vistas em **D.** e **E.** confirmando a colocação dos cístrons (setas). Escala = $10\mu m$47

Figura 5 – Células meióticas de *A. florigera* submetidas à técnica de Hibridação *in situ* fluorescente com sonda de rDNA 18S (verde) e 5S (vermelho) e contracoradas com DAPI (azul). **A.** e **B.** Metáfase I evidenciando a marcação em três bivalentes autossômicos (setas). **C.** Sobreposição das imagens vistas em **A.** e **B.** mostrando que os cístrons ribossomais são sintênicos (setas). **D.** e **E.** Metáfase II mostrando a hibridação associada a três cromossomos (setas). **F.** sobreposição das imagens vistas em **D.** e **E.** confirmando a colocação dos cístrons (setas). **G.** e **H.** Fibras de cromatina estendidas mostrando que os cístrons de 18S e 5S colocados estão dispostos de forma intercalar.

Capítulo III

Figura 1 – Exemplar fêmea de *Systema tenuis*, Alticinae.....58

Figura 2 – Células meióticas de *Systema tenuis*. **A.** metáfase espermatogonial evidenciando $2n=32$ cromossomos, a presença de constrição secundária (cabeça da seta) e dos braços curtos heteropicnóticos positivos (seta). **B.** Paquíteno, com 16 bivalentes, mostrando os braços curtos heteropicnóticos positivos (setas). **C.** Metáfase meiótica I evidenciando $2n=15II+neoXY$ e a presença de cromossomos B (seta) **D.** Metáfase meiótica II evidenciando $n=16$ e a presença de um cromossomo B (seta).....59

Figura 3 – Células paquiténicas de *Systema tenuis* submetidas à coloração com fluorocromo DAPI (**A.**) e CMA3 (**B.**), evidenciando as regiões DAPI positivas (setas) e as CMA3 negativas (cabeça de seta). **C.** sobreposição das imagens ressaltando as regiões centroméricas ricas em repetições AT (setas). Barra = 10µm.....59

Figura 4 - Células meióticas de macho de *Systema tenuis* submetidas a técnica de GISH utilizando sonda de DNA total de fêmea da mesma espécie. A técnica evidencia a presença dos cromossomos sexuais do tipo neoXY, com o neoY não marcado pela sonda em paquíteno (seta) em **A.**, pré-metáfase I (seta) em **B.**, e em metáfase I em **C.**.....60

Figura 5 - Figura 5 - Células meióticas de macho de *Systema tenuis* submetidas à FISH utilizando sonda de rDNA 18S (verde) e 5S (vermelho) e contracoradas com DAPI (azul). Pré metáfase evidenciando os cromossomos portadores do gene 18S em A. (setas) e 5S em B. (setas). C. Sobreposição das imagens vistas em A. e B. evidenciando a colocalização de alguns cístrons ribossomais (setas) e cromossomo portador somente do gene 5S (cabeça da seta).....60

LISTA DE TABELAS

Material e Métodos

Tabela 1 - Espécies de Alticinae analisadas citogeneticamente com seus respectivos locais de coleta e coordenadas geográficas.....	19
--	----

Capítulo I

Tabela 1 - Percentagem de identidade da sequência do gene rDNA 5S de <i>O. octoguttata</i> com outras espécies depositadas no <i>GenBank</i> . Acesso: 2- GQ443312, 3- XR049459, 4- XR046672, 5- NR001881.....	34
--	----

Capítulo II

Tabela 1 – Espécies pertencentes ao gênero <i>Alagoasa</i> analisadas citogeneticamente. B = cromossomos supranumerários ou cromossomos B. fr=fragmentos....	44
--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A ORDEM COLEOPTERA.....	12
1.2	CITOGENÉTICA DE ALTICINAE.....	13
1.3	GENES RIBOSSOMAIS EM COLEOPTERA.....	15
2	JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	18
3	MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1	MATERIAL	19
3.2	MÉTODOS.....	19
3.2.1	Obtenção das preparações cromossômicas.....	19
3.2.2	Fluorocromo.....	20
3.2.3	Obtenção da sonda do gene ribossomal rDNA 5s para <i>O. octoguttata</i>	20
3.2.4	Hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH).....	21
3.2.5	Fiber FISH.....	21
3.2.6	Hibridação <i>in situ</i> do Genoma (GISH).....	22
3.2.7	Análise Cromossômica.....	22
4	RESULTADOS	23
4.1	Capítulo I - Mapeamento Cromossômico do DNA ribossômico 5S em espécies do gênero <i>Omophoita</i> (Coleoptera, Chrysomelidae, Alticinae) através de Hibridação <i>in situ</i> fluorescente.....	24
4.2	Capítulo II - Análise citogenética e mapeamento físico de rDNA 18S e 5S em espécies do gênero <i>Alagoasa</i> (Coleoptera: Chrysomelidae: Alticinae).....	36
4.3	Capítulo III - Estudo citogenético, mapeamento de rDNA 18S e 5S e Hibridação <i>in situ</i> do Genoma (GISH) em <i>Systema tenuis</i> (Coleoptera: Chrysomelidae: Alticinae).....	49

5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	61
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
7	ANEXOS.....	72

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A ORDEM COLEOPTERA

A classe Insecta é o grupo dominante de animais na terra, incluindo a ordem Coleoptera que possui o maior número e a maior diversidade de espécies, com cerca de 350.000 descritas até o momento. Esse número de espécies representa cerca de 40% de todos os hexápodes e 30% de todos os animais (BORROR; DELONG'S, 2005; COSTA, 2000; GILLOTT, 2005; VANIN; IDE, 2002).

Os insetos da ordem Coleoptera podem ser encontrados em quase todos os tipos de habitat, com exceção do oceano e regiões polares. A maioria, cerca de 98%, vive em ambiente terrestre; no entanto, algumas espécies vivem em água doce ou em região costeira (BORROR; DELONG'S, 2005; GILLOTT, 2005). Esses animais possuem diversos hábitos alimentares, a maioria das espécies é fitófaga, tanto na fase larval quanto adulta; entretanto outras espécies também podem se alimentar de plantas, madeira e fungos. No entanto, alguns Coleoptera podem viver em simbiose com outros insetos e raramente são parasitas (BORROR; DELONG'S, 2005; GILLOTT, 2005; LAWRENCE; BRITON, 1964).

O sucesso e a diversidade desse grupo se devem principalmente a um de seus pares de asas, o qual é modificado em élitro o que permite sua ocupação em espaços fechados e crípticos; enquanto, ainda mantém sua capacidade de voar (BORROR; DELONG'S, 2005; GILLOTT, 2005; GRIMALDI; ENGEL, 2005; LAWRENCE; BRITON, 1964).

Os besouros possuem grande importância econômica, pois, frequentemente estão associados a danos em materiais vegetais. Por exemplo, danos na agricultura como tabaco, frutas secas, cereais, mostarda, batata e tomate. Por outro lado, existem espécies que são importantes agentes de controle biológico (GILLOTT, 2005; LAWRENCE; BRITON, 1964).

A ordem Coleoptera agrupa quatro subordens: Archostemata, Myxophaga, Adephaga e Polyphaga. A subordem Archostemata é composta por 35 espécies e é considerada o grupo mais basal entre os Coleoptera. Os Myxophaga possuem 65 espécies de besouros pequenos especializados em ambiente aquático e semiaquático (COSTA, 2000; GILLOTT, 2005; GRIMALDI; ENGEL, 2005; LAWRENCE; BRITON, 1964; VANIN; IDE, 2002). Aproximadamente 10% de todas as espécies de besouros

pertencem à subordem Adephaga, a qual agrupa 12 famílias viventes e cinco extintas. A maioria das espécies pertencente a essa subordem é predadora, tanto na forma adulta quanto na larval (COSTA, 2000; GRIMALDI; ENGEL, 2005).

A subordem Polyphaga é a que possui o maior número e diversidade, incluindo mais de 80% das espécies de Coleoptera (COSTA, 2000; GILLOTT, 2005; LAWRENCE; BRITON, 1964; VANIN; IDE, 2002). Dentro dessa subordem está localizada a família Chrysomelidae, cujos os animais são conhecidos como besouros folha. Nessa família existem cerca de 40.000 espécies agrupadas em 2.500 gêneros e 15 subfamílias. Entre essas, 4.362 espécies e 356 gêneros são encontradas no Brasil (COSTA, 2000; GILLOTT, 2005).

Alticinae pertence a uma das 15 subfamílias de Chrysomelidae e possui cerca de 2.200 espécies descritas. Os indivíduos pertencentes a esse grupo são conhecidos como besouros pulga devido sua habilidade de saltar, relacionada aos seus fêmures posteriores consideravelmente dilatados (GILLOTT, 2005; GRIMALDI; ENGEL, 2005).

1.2 CITOGENÉTICA DE ALTICINAE

Alticinae possuem características cromossômicas muito interessantes para estudos evolutivos, como, por exemplo, as irregularidades no comportamento, tamanho e morfologia dos cromossomos sexuais, variação do número cromossômico e do sistema de determinação sexual (VIRKKI, 1968, 1970, 1988; VIRKKI; MAZZELLA; DENTON, 1991; PETITPIERRE, 1988). Considerando a diversidade e o número de espécies dessa subfamília, poucas foram analisadas do ponto de vista citogenético (aproximadamente 290, das 2200 descritas).

Dentre as espécies de Alticinae estudadas citogeneticamente o número cromossômico mais frequente é de 11 ou 12 pares (PETITPIERRE, 1988, 2006; VIRKKI, 1970). No entanto, esse número pode variar de $2n=2+neoXY$, em *Homoschema latitarsum* até $2n=64$, em *Disonycha bicarianata* (PETITPIERRE, 1988, 2006; VIRKKI, 1970; VIRKKI; SANTIAGO BLAY, 1996). Alguns gêneros como *Systema*, *Phyllotreta*, *Longitarsus* e *Cyrsylus* apresentam aumento em seu número diplóide. Esse aumento do número cromossômico é comum em Alticinae e poderia ter ocorrido por fissões cêntricas ou até mesmo por um acréscimo de DNA (PETITPIERRE, 1988; PETITPIERRE; SEGARRA; JUAN, 1993; VIRKKI, 1988).

Considerando a tribo Systemini, seis espécies foram analisadas do ponto de vista citogenético. *Phyllotrupes rudibus* e *Platyprosopus (Phyllotrupes) rudibus* possuem $2n=10II+Xyp$ (VIRKKI, 1970; VIRKKI; SANTIAGO BLAY, 1996). No entanto, *Stenophyma* sp. possui $2n=15II+Xy$ (VIRKKI, 1970), e *Phyllotrupes* sp. (próximo de *P. acutangula*) $2n=17II+Xy$, com até 12 cromossomos supranumerários (VIRKKI; SANTIAGO BLAY, 1996). Os indivíduos de *Systema basalis* possuem $2n=5II+neoXy$. Além disso, em *Cyrslus volkamerir* ocorre um sistema de determinação sexual múltiplo, com $2n=13II+X_1X_2y_1y_2$ (VIRKKI, 1970, 1988).

A tribo Oedionychini agrupa duas subtribos: Disonychina e Oedionychina (PETITPIERRE, 1988; VIRKKI 1970; VIRKKI; SANTIAGO-BLAY; CLARK, 1991). As análises cromossômicas evidenciam uma grande diferença entre as duas subtribos. Oedionychina possui número cromossômico constante de $2n=22$, sendo, $10II+X+y$ com os cromossomos sexuais grandes. Por outro lado, a subtribo Disonychina é mais variável mostrando cromossomos sexuais pequenos com diferentes associações, além de uma tendência de aumentar o seu número cromossômico (PETITPIERRE, 1988; VIRKKI, 1988).

Considerando a subtribo Oedionychina o cariótipo básico $2n=20=10II+X+y$ é encontrado em várias espécies como, por exemplo, em *Alagoasa extrema*, *A. cerracollis*, *Omophoita cyanipennis cyanipennis*, *Omophoita albicollis*, *Omophoita octoguttata* e *Paranaita opima* (ALMEIDA; CAMPANER; CELLA, 2009; VIRKKI, 1970; VIRKKI; SANTIAGO-BLAY; CLARK, 1991). Por outro lado, existem variações cariotípicas como àquelas descritas para *Omophoita clerica* (Erichson) com o cariótipo de $2n=7II+X+y_1+y_2$, *Asphaera daniela* com $2n=20+X_1X_2X_3X_4X_5X_6Y$ (VIRKKI, 1970, VIRKKI; SANTIAGO BLAY, 1993).

A subtribo Oedionychina possui características cromossômicas interessantes para serem estudadas, como o comportamento assináptico dos cromossomos sexuais e seu tamanho aumentado em relação aos cromossomos autossômicos (VIRKKI, 1988, 1970). Esses cromossomos sexuais grandes são encontrados principalmente nos gêneros *Oedionychus*, *Alagoasa*, *Walterianella*, *Omophoita*, *Paranaita* e *Pedema* (VIRKKI, 1970; VIRKKI; SANTIAGO-BLAY; CLARK, 1991; ALMEIDA, 2006). Acredita-se que durante a evolução os cromossomos sexuais devem ter aumentado de tamanho até se tornarem os típicos cromossomos sexuais gigantes e assinápticos de Oedionychina (VIRKKI, 1968, 1970). No entanto, não existem muitos dados sobre evolução dos cromossomos sexuais nesse grupo. Virkki (1970) propõe que esse

aumento ocorreu por translocação de heterocromatina dos cromossomos autossômicos para os sexuais, seguido de duplicações. Por outro lado, alguns autores acreditam que o aumento no tamanho dos cromossomos sexuais ocorreu por um acréscimo de eucromatina (PETITPIERRE, 1988; VIRKKI, 1988).

A heterocromatina constitutiva nos Coleoptera localiza-se preferencialmente na região centromérica e menos frequente nas regiões intersticiais e telomérica de todos os cromossomos autossômicos (SMITH; VIRKKI, 1978). Com relação aos cromossomos sexuais a ocorrência da heterocromatina é variável, podendo estar presente somente na região pericentromérica ou ao longo de todo o comprimento cromossômico dependendo do grau de diferenciação das espécies (ALMEIDA; ZACARO; CELLA, 2000; JUAN; PETITPIERRE, 1990; VIRKKI, 1983).

Rozek et al. (2004) estudaram as regiões de heterocromatina através da técnica de obtenção de bandas C em 32 espécies de Coleoptera das famílias Elateridae, Cantharidae, Oedemeridae, Cerambycidae, Anthicidae, Chrysomelidae, Attelabidae e Curculionidae, evidenciando que a maioria dos Coleoptera possui pequena quantidade de heterocromatina. Por outro lado, algumas famílias apresentam grande quantidade de heterocromatina, como Elateridae, Cantharidae e Tenebrionidae.

1.3 GENES RIBOSSOMAIS EM COLEOPTERA

As sequências repetidas de DNA fazem parte do genoma inclusive das regiões eucromáticas, e essas sequências são de grande importância para a citogenética molecular e vem sendo uma ferramenta muito útil para entender os processos evolutivos das espécies (ALMEIDA et al., 2010; BARCISZEWSKA et al., 1995; CABRAL-DE-MELLO; MOURA; MARTINS, 2010; CABRAL-DE-MELLO et al., 2011b ; MARTINS et al., 2006). Grande parte dos estudos dessas sequências em vertebrados e invertebrados tem foco na análise de DNA satélite e de genes ribossomais (rDNA).

A Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH) tem sido uma ferramenta importante para a localização das sequências repetidas de DNA; entretanto, poucas espécies de Coleoptera foram analisadas com essa técnica. A maioria dos trabalhos em relação à localização das Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONS) é baseada em técnica de Impregnação pelo íon prata (ALMEIDA et al., 2010; CABRAL-DE-MELLO; MOURA; MARTINS, 2010; CABRAL-DE-MELLO et al., 2011b; SCHNEIDER et al., 2007;

VIRKKI; MAZELLA; DENTON, 1991). Nesse sentido, Schneider et al. (2007) realizaram uma extensa revisão sobre a localização das RONS em Coleoptera e observaram que, na maioria das espécies, estas se localizam nos cromossomos autossômicos (82% em Adephaga e 63% em Polyphaga). Além disso, os autores inferem que um par autossômico representa a condição ancestral e/ou mais estável. Contudo, Dutrillaux; Dutrillaux (2009) propõem que para Scarabaeiidea a situação ancestral é a RON localizada no braço curto do X.

O cluster ribossomal 45S foi amplamente estudado em vários grupos de eucariotos, nos últimos anos, através da FISH. Em Coleoptera, as famílias estudadas são, por exemplo, Tenebrionidae (GOLL et al., 2012a; JUAN; PONS; PETITPIERRE, 1993), Cicindelidae (GALIÁN et al., 1995; GALIÁN; HUDSON, 1999; PROENÇA; SERRANO; COLLARES-PEREIRA, 2002a, 2002b), Scarabaeidae (BIONE et al., 2005a; BIONE; CAMPAROTO; SIMÕES, 2005b; CABRAL-DE-MELLO; MOURA; MARTINS, 2010; CABRAL-DE-MELLO; MOURA; MARTINS 2011a), Carabidae (DE LA RÚA et al., 1996; GALIÁN; HUDSON, 1999) e Alticinae (ALMEIDA et al., 2010). Em relação aos estudos em Alticinae, o cluster está associado a um par autossômico em *Omophoita octoguttata* e *Omophoita personata* e a dois pares autossômicos em *Omophoita magniguttis*. Desta forma, Almeida et al. (2010) propõem que o rDNA 18S através da FISH poderia ser um marcador importante para evidenciar a diferenciação cariotípica principalmente nesse grupo, no qual diferenciações não são observadas com citogenética convencional.

O cluster de rDNA 5S é um constituinte essencial em uma das subunidades do ribossomo e sua análise é uma ferramenta interessante para o estudo da evolução dos insetos (BARCISZEWSKA et al., 1995). O rDNA 5S foi intensivamente mapeado em peixes; entretanto, é raramente estudado em outros grupos (BARCISZEWSKA et al., 1995; CABRAL-DE-MELLO et al., 2011b). Recentemente o gene rDNA 5S tem sido mapeado em algumas espécies de insetos como Orthoptera (CABRAL-DE-MELLO et al., 2011b; CABRERO; CAMACHO, 2008; OLIVEIRA et al., 2011), e em algumas espécies de Coleoptera da família Scarabaeidae (CABRAL-DE-MELLO; MOURA; MARTINS, 2010, 2011a; OLIVEIRA et al., 2012). Esses trabalhos mostraram que a localização desse gene é muito variável podendo ser encontrado em apenas um par, vários pares ou até mesmo em todos os pares do complemento cromossômico (CABRAL-DE-MELLO; MOURA; MARTINS, 2010; CABRAL-DE-MELLO et al., 2011b; MARTINS et al., 2006).

Existe grande variação na localização do rDNA 45S e 5S, algumas espécies podem portar um pequeno número de rDNA; enquanto outras possuem os clusters em todos os cromossomos; no entanto, é provável que a maioria desses clusters não sejam funcionais (CABRAL-DE-MELLO et al., 2011b; MARTINS et al., 2006). Vários autores concordam que essa dispersão dos genes rDNA está associada com a presença de elementos transponíveis (CABRAL-DE-MELLO et al., 2011b; GILLESPIE, et al., 2006; YE, et al., 2005).

A associação entre famílias gênicas já foi descrita em alguns grupos como Orthoptera (CABRAL-DE-MELLO; MOURA; MARTINS, 2010; CABRAL-DE-MELLO et al., 2011b; OLIVEIRA et al., 2011), Coleoptera (CABRAL-DE-MELLO; MOURA; MARTINS, 2010, 2011a; GOLL et al. 2012; ROEHRDANZ et al. 2010) e Mollusca (COLUMBA et al., 2002; VITTURI et al., 2004). Segundo Kaplan et al. (1993) essas associações entre diferentes famílias gênicas pode ter uma função importante na organização celular. Para esclarecer a real distribuição desses genes é necessário realizar técnicas com maior poder de resolução como, por exemplo, a Fiber FISH. Essa técnica estende a cromatina em forma de fibra de uma maneira que aumenta a resolução do mapeamento dos genes (BARROS et al., 2011). Em insetos essa técnica tem sido utilizada em gafanhotos (CABRAL-DE-MELLO et al., 2011b) e em Coleoptera (GOLL et al., 2012b).

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A subfamília Alticinae possui grande diversidade cariotípica como o número diploide e os sistemas cromossômicos de determinação sexual. Considerando o pequeno número de espécies analisadas citogeneticamente, esse trabalho tem como objetivo caracterizar seis espécies de Alticinae (*Omophoita octoguttata*, *Omophoita personata*, *Omophoita magniguttis*, *Alagoasa florigera*, *Alagoasa coccinelloide* e *Systema tenuis*), visando estabelecer as diferenças cariotípicas e as estratégias de diferenciação cromossômicas, para compreender as relações evolutivas entre as espécies. Para efetuar essa análise pretendeu-se:

1. Estudar células meióticas e mitóticas visando determinar o número haplóide e diplóide de cromossomos, a morfologia cromossômica e o tipo de sistema de determinação sexual.
2. Determinar os cromossomos portadores das Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs) e do gene ribossomal 5S.
3. Estabelecer as possíveis relações evolutivas entre as espécies.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

Os exemplares foram coletados em localidades da região Sul (Tabela 1). Os machos foram dissecados e as gônadas utilizadas para as preparações citogenéticas. O pronoto e o terceiro par de pernas de machos e fêmeas foram retirados e estocados em álcool 98% para a extração de DNA.

Tabela 1 - Espécies de Alticinae analisadas citogeneticamente com seus respectivos locais de coleta e coordenadas geográficas.

Espécie	Local de Coleta	Latitude	Longitude
<i>Systema tenuis</i>	Ponta Grossa - PR	S25°05'49''	W50°06'32''
<i>Omophoita octoguttata</i>	Ponta Grossa – PR	S25° 07' 10''	W49° 56' 24''
	Nonoai – RS	S27° 23' 25''	W52° 44' 10''
<i>Omophoita magnigutis</i>	Ponta Grossa – PR	S25° 07' 10''	W49° 56' 24''
<i>Omophoita personata</i>	Ponta Grossa – PR	S25° 07' 10''	W49° 56' 24''
<i>Omophoita sexnottata</i>	Ponta Grossa - PR	S25° 07' 10''	W49° 56' 24''
<i>Alagoasa florigera</i>	Ponta Grossa – PR	S25° 07' 10''	W49° 56' 24''
<i>Alagoasa coccinelloide</i>	Ponta Grossa – PR	S25° 07' 10''	W49° 56' 24''

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Obtenção das preparações cromossômicas

A obtenção das gônadas foi realizada segundo a técnica descrita por Almeida; Zacaro e Cella (2000). Os indivíduos foram dissecados em solução fisiológica, as gônadas foram transferidas para uma placa de Petri contendo solução hipotônica (água de torneira) durante 5 minutos. Na sequência, as gônadas foram transferidas para outra placa de Petri contendo fixador Carnoy I (metanol – ácido acético, na proporção 3:1) durante 30 minutos. As gônadas foram armazenadas em tubos eppendorf contendo fixador Carnoy I em geladeira. Posteriormente, as gônadas foram maceradas em ácido acético 60% sobre lâmina de vidro e, na sequência, essas foram secas em placa de metal a temperatura de 35° a 40 °C (Anexo 7.1.1). Em seguida, coradas com Giemsa 3% (Anexo 7.1.2).

3.2.2 Fluorocromo

A técnica de fluorocromo utilizada foi segundo Schweizer (1980), com algumas modificações, a qual consistiu em colocar 80 µl de solução de cromomicina sobre cada lâmina, cobrir com uma lamínula e deixar por 1 hora. A lâmina foi limpa com água destilada e deixada para secar levemente. Para montar a lâmina foram adicionados 40 µl de DAPI/Antifading e retirado o excesso em papel filtro (Anexo 7.1.3).

3.2.3 Obtenção da sonda do gene ribossomal rDNA 5S para *O. octoguttata*

O DNA genômico de *O. octoguttata* foi extraído segundo a técnica descrita por Murray; Thompson (1980) com algumas modificações (Anexo 7.2.1). A sequência de oligonucleotídeo utilizada para a amplificação do gene rDNA 5S em *O. octoguttata* (5S_F:5'-AACGNCCATANCACGCTGNA-3'; 5S_R:5'-AGCGGTCNCNCATCNANGTA C -3') foi desenhada a partir das sequências conservadas das espécies *Dichotomius semisquamosus*, *Drosophila obscura*, *Drosophila tristes* e *Harpalus rufipes* depositadas no *GenBank* (Número de acesso: GQ443312, U58720, U58709 e X83208, respectivamente).

A reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) para o gene rDNA 5S foi realizada com um volume total de 50µL, contendo 20 ng de DNA genômico, 1x tampão, 0,75U de *Taq* polimerase (Invitrogen®), 1 pmol de cada primer, 3,75mM MgCl₂ e 0,2mM de dNTP. A amplificação foi realizada em um termociclador (*Biocycler*) programado para um ciclo de 5 minutos a 94°C e, 35 ciclos por 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 58°C, 1 minuto a 72°C e para a extensão final 5 minutos a 72°C. O produto da amplificação foi observado em gel de agarose 1% e fotografado sob luz UV.

Os fragmentos obtidos foram purificados e clonados usando o vetor pTZ57R/T (Fermentas®) e transformados em *Escherichia coli* DH5/CaCl₂ (Gibco GBRL) competentes (Anexo 7.2.2). Os plasmídeos recombinantes foram sequenciados através de um sequenciador automático (ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer) com capilares de 50 cm e polímero POP6 (Applied Biosystems). A sequência encontrada foi submetida ao software *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*) (ZHANG et al., 2000). As sequências homólogas de rDNA 5S de outras espécies de insetos

encontradas juntamente com a sequência obtida para *O. octoguttata* foram submetidas a alinhamento de nucleotídeos com o software ClustalW v1.6 (THOMPSON et al., 1994).

3.2.4 Hibridação *in situ* fluorescente (FISH)

A reação para a marcação das sondas de rDNA utilizou digoxigenina para 5S e biotina para 18S (Fornecido por Almeida et al., 2010) foi feita com um volume final de 50 µL. A solução continha os seguintes componentes: Tampão de reação 1x, 2mM MgCl₂, 400 µM de dCTP, dGTP e dTTP, 200µM de dATP, 200µM de Digoxigenina 11 dUTP ou Biotina 16 dUTP (Roche®), 0,2µM de cada primer M13 e 2U de Taq DNA polimerase.

A FISH foi realizada de acordo com Pinkel; Straume; Gray (1986), com algumas modificações (Anexo 7.2.3). As lâminas foram tratadas previamente com RNase 0,4% (RNase/2xSSC) a 37°C durante uma hora, pepsina 0,005% (em 10mM HCl) a 37°C por 10 minutos e fixadas com paraformaldeído 4% por 10 minutos. Os cromossomos foram desnaturados em formamida 70% a 70°C, por quatro minutos para a adição da solução de hibridação. Essa solução de hibridação continha formamida a 50%, sulfato de dextrano a 10%, 20xSSC, as sondas desnaturadas com uma concentração de 400ng e água em um total de 40 µL por lâmina.

As lâminas ficaram hibridando *overnight* a uma temperatura de 37°C. No outro dia, as mesmas foram lavadas com formamida 15% a 42°C em quatro banhos de cinco minutos cada e Tween 0,5% (4xSSC). O sinal foi detectado por antidigoxigenina-rodamina (Roche®) ou streptavidina (Roche®). Os cromossomos foram contracorados com DAPI.

3.2.5 Fiber FISH

A técnica de Fiber FISH foi realizada segundo Barros et al. (2010). As lâminas foram lavadas com tampão salino fosfatado (PBS) por dois minutos a temperatura ambiente e em seguida secas. As mesmas foram colocadas em posição horizontal e na sequência foi adicionada uma solução de 200 µl de hidróxido de sódio (NaOH) 0,2 M diluída em álcool 30% em um dos cantos da lâmina.

Posteriormente foi realizado um esfregaço contínuo sobre a preparação a partir

do topo para baixo com o auxílio de outra lâmina, de tal forma a cobrir toda a superfície. Em seguida 500µL de etanol 100% foi imediatamente aplicado na lâmina que foi mantida inclinada até completa evaporação.

3.2.6 Hibridação *in situ* do genoma (GISH)

A extração de DNA foi realizada segundo Murray e Thompson (1980), com modificações (Anexo 7.2.1). As sondas para DNA genômico foram marcadas pelo Kit Nick Translation (Biotin ou digoxigenin – Roche®). O DNA de macho foi marcado com biotina e o DNA de fêmea foi marcado com digoxigenina. A hibridação *in situ* fluorescente (FISH) foi realizada segundo Pinkel; Straume; Gray (1986), (Anexo 7.2.3). Para o reconhecimento do sinal foi utilizado streptavidina (Roche®) e antidigoxigenina-rodamina (Roche®), respectivamente. Os cromossomos foram contracorados com DAPI.

3.2.7 Análise cromossômica

As células mitóticas e meióticas foram analisadas em um microscópio de epifluorescência Olympus BX41. As imagens foram obtidas por meio de um sistema de captura em tempo real CCD Olympus DP 71. Para análise da fluorescência foram utilizados filtros específicos.

4 RESULTADOS

Os resultados estão organizados em três capítulos correspondentes aos artigos científicos:

4.1 Capítulo I

Mapeamento cromossômico do DNA ribossomal 5S e diferenciação cariotípica em espécies do gênero *Omophoita* (Coleoptera, Chrysomelidae, Alticinae)

4.2 Capítulo II

Análise citogenética e mapeamento físico de rDNA 18S e 5S em espécies do gênero *Alagoasa* (Coleoptera: Chrysomelidae: Alticinae)

4.3 Capítulo III

Estudo citogenético, mapeamento de rDNA 18S e 5S e Hibridação *in situ* do Genoma (GISH) em *Systema tenuis* (Coleoptera: Chrysomelidae: Alticinae)

4.1. Capítulo I

Mapeamento cromossômico do DNA ribossomal 5S e diferenciação cariotípica em espécies do gênero *Omophoita* (Coleoptera, Chrysomelidae, Alticinae)

RESUMO

Omophoita pertencente à tribo Oedionychini, é o segundo gênero de Alticinae com o maior número de espécies analisadas do ponto de vista citogenético, totalizando 17 espécies. A maioria das espécies analisadas possui um cariótipo uniforme de $2n=22=20+X+y$ com cromossomos sexuais gigantes e assinápticos. A análise das Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs) em Coleoptera tem sido realizada principalmente através de Impregnação pelo Íon Prata e, na maioria, está associada a um par cromossômico autossômico. No entanto, o mapeamento desse gene através de Hibridação *in situ* Fluorescente foi realizado em poucas espécies de Coleoptera. O gene rDNA 5S em Coleoptera foi mapeado apenas em algumas espécies da família Scarabaeidae. O objetivo deste trabalho foi caracterizar citogeneticamente três espécies do gênero *Omophoita* por meio do mapeamento dos genes ribossomais, visando estabelecer as diferenças cariotípicas e as estratégias de diferenciação cromossômica entre as espécies. A amplificação do gene rDNA ribossômico 5S gerou um fragmento de aproximadamente 95 pares de base e revelou similaridade entre 84% à 89% com as sequências de rDNA 5S de outras espécies de insetos depositadas no *GenBank*. O mapeamento cromossômico do rDNA 5S mostrou a presença de um par cromossômico autossômico em *Omophoita octoguttata* e *Omophoita personata*. Para *Omophoita magniguttis* foi possível observar a presença de dois pares cromossômicos portadores do códon de 5S. A realização da FISH utilizando sonda de rDNA ribossômico 5S e 18S mostrou a colocalização desses clusters, nas três espécies analisadas e a Fiber FISH evidenciou que os clusters estão dispostos de maneira interespçada com quantidade variável das classes de DNA ribossômico.

Palavras-chave: Meiose, rDNA, Fiber-FISH, evolução cariotípica, variabilidade

INTRODUÇÃO

O gênero *Omophoita*, pertencente à subtribo Oedionychina, tribo Oedionychini, é o segundo maior em número de espécies analisadas sob o ponto de vista citogenético, totalizando 17 espécies. A maioria das espécies analisadas possui um cariótipo uniforme com $2n=22$ cromossomos e fórmula meiótica $2n=10II+X+y$, com predominância de cromossomos metacêntricos (ALMEIDA; CAMPANER; CELLA, 2009; PETITPIERRE et al. 1988; SMITH; VIRKKI, 1978; VIRKKI, 1967, 1970, 1973, 1976, 1983, 1989; VIRKKI; SANTIAGO-BLAY; CLARK, 1991; VIRKKI; SANTIAGO-BLAY, 1996). Uma característica das espécies da subtribo Oedionychina é a presença de cromossomos sexuais extremamente grande e assinápticos, que difere da maioria dos Coleoptera (SMITH; VIRKKI, 1978; VIRKKI, 1968, 1970, 1988; VIRKKI; SANTIAGO-BLAY; CLARK, 1991).

A maior parte dos estudos sobre localização das Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONS) em Coleoptera foi realizada através de Impregnação pelo Íon Prata (ALMEIDA; ZACARO; CELLA, 2000; ALMEIDA; CAMPANER; CELLA, 2006; DUTRILLAUX; DUTRILLAUX, 2012; SCHNEIDER et al., 2007; SMITH; VIRKKI, 1978). Schneider et al. (2007) realizaram uma extensa revisão sobre a localização das RONS em Coleoptera e observaram que na maioria das espécies esse cluster está associado a apenas um par, principalmente autossômico.

O mapeamento das RONS através de Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH) foi amplamente estudado em alguns grupos de invertebrados como, por exemplo, em Orthoptera (CABRAL- DE-MELO et al., 2011b; CABRERO; CAMACHO, 2008; OLIVEIRA et al., 2011), Mollusca (VITURRI et al., 2004), Annelida (VITURRI, et al., 2002), Prosobranchia (COLOMBA et al., 2002). Em Coleoptera algumas famílias foram estudadas (BIONE et al., 2005; BIONE; CAMPAROTO; SIMOES, 2005; CABRAL-DE-MELLO; MOURA; MARTINS, 2010, 2011a; DE LA RÚA et al., 1996; GALIÁN et al., 1995; GOLL et al., 2012a; OLIVEIRA et al., 2012; PROENÇA; SERRANO; COLLARES-PEREIRA, 2002a, 2002b). No entanto, em Alticinae existe apenas o mapeamento do cluster 45S através da FISH para quatro espécies do gênero *Omophoita* (ALMEIDA et al., 2010). De acordo com esses autores, o cluster está associado a um par autossômico em *Omophoita octoguttata*, *Omophoita personata* e *Omophoita sexnottata* e a dois pares autossômicos *Omophoita magniguttis*. Desta forma, Almeida et al. (2010) propõem que o rDNA 18S através da

FISH poderia ser um marcador importante para evidenciar a diferenciação cariotípica não observada com citogenética convencional.

O cluster do rDNA 5S é altamente conservado, possui 120 pb separados por sequências não transcritas de DNA (LONG; DAWID, 1980). Esse gene tem sido raramente estudado em insetos. Recentemente o gene rDNA 5S tem sido mapeado em algumas espécies de insetos como Orthoptera (CABRAL-DE-MELLO et al., 2011b; CABRERO; CAMACHO, 2008; OLIVEIRA et al., 2011), e em algumas espécies de Coleoptera da família Scarabaeidae (CABRAL-DE-MELLO; MOURA; MARTINS, 2010, 2011a; OLIVEIRA et al., 2012). Esses trabalhos mostraram que a localização desse gene é muito variável, mesmo dentro do mesmo grupo, podendo ser encontrado em apenas um par, vários pares ou até mesmo em todos os pares do complemento cromossômico (CABRAL-DE-MELLO; MOURA; MARTINS, 2010, 2012a; CABRAL-DE-MELLO et al., 2011b).

As famílias gênicas podem estar localizadas em cromossomos diferentes, como ocorre na maioria das espécies, podem estar em sintenia, e nesse caso adjacentes ou colocalizadas. Diversos tipos de associações entre diferentes famílias gênicas foram descritas em alguns grupos de animais, sendo um assunto promissor no estudo na citogenética evolutiva. A associação entre o rDNA 5S e o gene H3 da histona foi descrito em Coleoptera (CABRAL-DE-MELLO; MOURA; MARTINS, 2010, 2011a) e Orthoptera (CABRAL-DE-MELLO et al., 2011b; OLIVEIRA et al., 2011). Adicionalmente, a associação entre os dois cístrons ribossomais 5S e 45S foi descrito para Coleoptera (CABRAL-DE-MELLO; MOURA; MARTINS, 2010, 2011a; GOLL et al., 2012a), Orthoptera (OLIVEIRA et al. 2011), Annelida (VITTURI, et al., 2002), Mollusca (VITURRI, et al., 2004) e em Prosobranchia (COLOMBA et al., 2002). E, além disso, colocalização da histona H3 e 45S foi descrita em Coleoptera (ROEHRDANZ et al., 2010).

O avanço na técnica de Hibridação *in situ* Fluorescente utilizando fibras cromatínicas estendidas tem possibilitado um aumento na resolução dos estudos de diferenciação estrutural, principalmente devido a acúmulo ou associações de classes de DNAs repetitivos. Além disso, obter um padrão mais claro sobre a organização estrutural dessas associações entre as classes de DNAs. Em insetos essa técnica já foi utilizada para estudar a associação entre o 5S e o gene H3 da histona em gafanhotos (CABRAL-DE-MELLO et al., 2011b, MUÑOZ-PAJARES et al., 2011) e associação entre os cístrons 45S e 5S em Coleoptera (GOLL et al., 2012b). Em

ambos os trabalhos os autores observaram que as classes de DNAs estão associadas de forma interespaçadas em quantidades variáveis.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar citogeneticamente três espécies do gênero *Omophoita* por meio do mapeamento dos genes ribossomais, visando estabelecer as diferenças cariotípicas e as estratégias de diferenciação cromossômica entre as espécies.

Material e Métodos

Locais de Coleta

Os machos adultos de *Omophoita octoguttata* (nove indivíduos), *Omophoita personata* (seis indivíduos) e *Omophoita magnigutis* (cinco indivíduos) foram coletados em populações naturais na região do Passo do Pupo, Itaiacoca distrito do município de Ponta Grossa, Paraná, Brasil (S25° 07'10'' W49° 56'24'' e S25° 07'20'' W49° 56'04''). Três indivíduos de *O. octoguttata* foram coletados na cidade de Nonoai, Rio Grande do Sul, Brasil (S27° 23' 25'' W52° 44' 10'').

Preparações cromossômicas

Os indivíduos foram dissecados em solução fisiológica para insetos (7,5g de NaCl, 2,38g de Na₂HPO₄, 2,72g de KH₂PO₄, dissolvido em um litro de água destilada) e as preparações foram realizadas de acordo com métodos descritos por Almeida; Zacaro e Cella (2000). Essas preparações foram submetidas à Hibridação *in situ* fluorescente (FISH).

Obtenção da sonda do gene ribossomal rDNA 5S para O. octoguttata

O DNA genômico de *O. octoguttata* foi extraído segundo Murray e Thompson (1980) com algumas modificações. A sequência de oligonucleotídeo utilizada para a amplificação do gene rDNA 5S em *O. octoguttata* (5S_F: 5'-AACGNCCATANCACGCTGNA-3'; 5S_R: 5'-AGCGGTCNCNCATCNANGTAC-3') foi desenhada a partir das sequências conservadas das espécies *Dichotomius semisquamosus*, *Drosophila obscura*, *Drosophila tristis* e *Harpalus rufipes*.

depositadas no *GenBank* (Número de acesso: GQ443312, U58720, U58709 e X83208 respectivamente).

A reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) para o gene rDNA 5S foi realizada em um volume total de 50µL, contendo 20 ng de DNA genômico, 1x tampão, 0,75U de *Taq* polimerase (Invitrogen®), 1 pmol de cada primer, 3,75mM MgCl₂ e 0,2mM de dNTP. A amplificação foi realizada em um termociclador (*Biocycler*) programado para um ciclo de 5 minutos a 94°C e 35 ciclos por 1minuto a 94°C, 1 minuto a 58°C, 1minuto a 72°C e para a extensão final 5 minutos a 72°C. O produto da amplificação foi observado em gel de agarose 1% e fotografado sob luz UV.

Os fragmentos obtidos foram purificados e clonados usando o vetor pTZ57R/T (Fermentas®) e transformados em *Escherichia coli* DH5/CaCl₂ (Gibco GBRL) competentes. Os plasmídeos recombinantes foram sequenciados através de um sequenciador automático (ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer) com capilares de 50 cm e polímero POP6 (Applied Biosystems). A sequencia consenso encontrada foi submetida ao software *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*) (ZHANG et al., 2000). As sequencias homólogas de rDNA 5S de outras espécies de insetos encontradas juntamente com a sequencia obtida para *O. octoguttata* foram submetidas ao alinhamento de nucleotídeos com o software *ClustalW* v1.6 (THOMPSON et al., 1994).

Localização in situ dos cístons de rDNA 5S e 18S

A FISH foi realizada utilizando a sonda de rDNA 5S obtida por PCR marcado com digoxigenina (11 dUTP Roche®) e a sonda de rDNA 18S clonada de *O. octoguttata* (Almeida et al., 2010) marcada com adenina biotinilada (16 dUTP Roche®). As reações foram realizadas em um volume final de 50 µL, contendo tampão 1x, 2mM MgCl₂, 400 µM de dCTP, dGTP e dTTP, 200µM de dATP, 200µM de Digoxigenina 11 dUTP (Roche®) ou Biotina 16 dUTP (Roche®), 0,2µM de cada primer M13 e 2U de *Taq* DNA polimerase.

A FISH foi realizada de acordo com Pinkel; Straume e Gray (1986), com algumas modificações. As lâminas foram tratadas previamente com RNase 0,4% (RNase/2xSSC) a 37° durante uma hora, pepsina 0,005% (em 10mM HCl) a 37° C por 10 minutos e fixadas com paraformaldeído 4% por 10 minutos. Os cromossomos

foram desnaturados em formamida 70% a 70°C, por quatro minutos para a adição da solução de hibridação. Essa solução continha formamida a 50%, sulfato de dextrano a 10%, 20xSSC, as sondas desnaturadas com uma concentração de 400ng e água q.s.p. 40 µL por lâmina. As lâminas ficaram hibridando *overnight* a uma temperatura de 37°C. No dia seguinte as mesmas foram lavadas com formamida 15% a 42°C em quatro banhos de cinco minutos cada e Tween 0,5% (4xSSC). O sinal foi detectado por antidigoxigenina-rodamina (Roche®) e streptavidina (Roche®). Os cromossomos foram contracorados com DAPI.

A análise foi realizada em microscópio de epifluorescência Olympus BX41. As imagens foram capturadas com a utilização do sistema de captura de Imagem em tempo real CCD Olympus DP 71.

Fiber FISH

A técnica de Fiber FISH foi realizada segundo Barros et al. (2011). As lâminas foram lavadas com tampão salino fosfatado (PBS) por dois minutos a temperatura ambiente e secadas em seguida. As mesmas foram colocadas em posição horizontal e em seguida foi adicionado uma solução de 200 µl de hidróxido de sódio (NaOH) 0,2M diluída em álcool 30% em um dos cantos da lâmina. Posteriormente foi realizado um esfregaço contínuo sobre a preparação com o auxílio de outra lâmina, de tal forma a cobrir toda a superfície. Em seguida 500µL de etanol 100% foi imediatamente aplicado na lâmina que foi mantida inclinada até completa evaporação.

Resultados

Obtenção e descrição da sonda de rDNA 5S

A amplificação do gene rDNA 5S de *O. octoguttata* gerou um fragmento de aproximadamente 95 pares de base, o qual foi clonado, sequenciado e denominado pTZ_Ooct_5S. O estudo da sequência consenso obtida mostra uma composição de 21,28% de A, 20,21% de T, 29,79% de C e 28,72% de G. A comparação dessa sequência com a de outras espécies de insetos depositadas no GenBank mostrou uma identidade entre 84% à 89% (Tabela 1), com pequenas diferenças quando alinhadas utilizando o software Clustal W.

Localização in situ dos genes rDNA 5S e 18S

O cariótipo, a morfologia cromossômica e a fórmula meiótica obtida para as três espécies do gênero *Omophoita* são concordantes com a descrição previa de Almeida; Campaner e Cella (2009), sendo observado $2n=22$ cromossomos, fórmula meiótica de $2n=10II+Xy$ em todas as espécies analisadas. A morfologia dos autossomos é acrocêntrica em *O. octoguttata* e *O. magniguttis* e metacêntrica em *O. personata*. Os cromossomos sexuais X e y são metacêntricos e assinápticos nas três espécies, porém segregam corretamente em anáfase.

A análise de células meióticas das três espécies do gênero *Omophoita* submetidas a FISH com sonda de rDNA 5S mostrou a presença de um cluster associado a um par autossômico em *O. octoguttata* e *O. personata* (Figuras 1A e 2A) e dois clusters em dois pares autossômicos em *O. magniguttis* (Figura 2D). O número de pares portadores do gene rDNA 5S e a localização para as três espécies mostraram ser coincidentes com a localização do cístron 45S, descrita anteriormente por Almeida et al. (2010) (Figuras 1B, 2B e 2E). Para testar a sintonia entre os genes rDNA 5S e 18S realizou-se a dupla-FISH a qual evidenciou que esses genes estão colocalizados nos pares cromossômicos (Figuras 1C, 2C e 2F).

Desta forma, para investigar a organização estrutural da associação entre as duas famílias gênicas nos cromossomos realizou-se a técnica de FISH em fibras estendidas com ambas as sondas. A Fiber-FISH mostrou que os genes ribossomais colocalizados estão intercalados com quantidades variáveis das classes de DNA ribossomal nas três espécies estudadas (Figura 3).

Adicionalmente, o estudo de células meióticas I submetidas à FISH com sonda de rDNA 5S em indivíduos de *O. octoguttata*, coletados na população do Rio Grande do Sul, mostrou a ocorrência de heteromorfismo de tamanho dos cístrons 5S e 18S entre os elementos cromossômicos do par (Figuras 1D, 1E e 1F).

Discussão

Os indivíduos da subfamília Alticinae são de grande interesse para o estudo da citogenética e evolução, pois apresentam características conservadas e derivadas em relação àsquelas descritas para a maioria das espécies de Coleoptera. A grande maioria das espécies analisadas possui cariótipo uniforme com $2n=22=20+X+y$ (ALMEIDA et al., 2010, PETITPIERRE, 1988; SEGARA; PETITPIERRE, 1988, SMITH; VIRKKI, 1978). Entretanto, os dados obtidos com técnicas mais refinadas evidenciam que a composição molecular é diferente.

A comparação da sequência consenso obtida com àsquelas de outras espécies depositadas no Genbank mostrou identidade com o gene rDNA 5S entre 84% e 89%, desta forma validando a sonda.

O mapeamento do cístron de rDNA 5S em Coleoptera foi descrito somente para espécies de Scarabeidae e Tenebrionidae, as quais possuem apenas um par cromossômico portador do cístron (CABRAL-DE-MELLO; MOURA; MARTINS, 2010, 2011a, GOLL et al., 2012b; OLIVEIRA et al., 2012). Desta forma, o mapeamento de rDNA 5S em Chrysomelidae foi realizado pela primeira vez e o resultado obtido de um par autossômico portador do gene em *O. ctoguttata* e *O. personata* está de acordo com o padrão descrito até o presente momento para Coleoptera (CABRAL-DE-MELLO; MOURA; MARTINS, 2010, 2011a; GOLL et al., 2012b; OLIVEIRA et al., 2012). Assim, a presença de um segundo par em *O. magniguttis* representa possivelmente uma derivação no cariótipo.

Os estudos de mapeamento de 5S rDNA em gafanhotos mostrou grande variação no número de sítios desse cluster, variando de 1 a 12 pares cromossômicos em algumas espécies (CABRAL-DE-MELLO et al., 2011b; OLIVEIRA et al., 2011). Nestes trabalhos os autores relacionaram a dispersão dos genes ribossomais com elementos de transposição. Outros autores também propõem que a dispersão dos genes rDNA está associada, na maioria dos casos, com a presença de elementos transponíveis (CABRAL-DE-MELLO et al., 2011b; GILLESPIE, et al., 200; YE, et al., 2005).

A dispersão do cístron 5S rDNA tem sido descrita em algumas espécies de insetos, e além disso, algumas análises tem proposto a ocorrência de co-dispersão quando há ocorrência de associação com outras famílias gênicas nas espécies (CABRAL-DE-MELLO; MOURA; MARTINS, 2010; CABRAL-DE-MELLO et al. 2011c,

2011d). Assim, de maneira semelhante poderia ter ocorrido no cariótipo de *O. magniguttis*, o qual apresenta um cístron de rDNA 5S adicional, o qual também está associado ao 45S.

Outro modelo de dispersão dos genes ribossomais proposto para vários organismos é através de DNA circular extracromossômico (Ecc DNA), o qual consiste de DNA repetido *in tandem* (COHEN; MENUT; ME´CHALI, 1999; COHEN; YACOBI; SEGAL, 2003; COHEN; HOUBEN; SEGAL, 2008; COHEN et al., 2010; DEGROOTE et al., 1989; PONT; DEGROOTE; PICARD, 1987).

A associação entre as famílias gênicas foi descrita para vários organismos, como Orthoptera (CABRAL-DE-MELLO et al., 2011b; OLIVEIRA et al., 2011), Coleoptera (CABRAL-DE-MELLO; MOURA; MARTINS, 2010, 2011a; ROEHRDANZ et al. 2010) e Mollusca (VITTURI et al., 2004). No entanto, em vertebrados as duas famílias gênicas geralmente são encontradas em cromossomos diferentes (SRIKULNATH et al., 2009). Segundo Kaplan et al., (1993) essas associações entre famílias gênicas pode ter função importante na organização celular.

No entanto, essa associação pode variar entre as famílias, em Coleoptera mais comumente encontra entre rDNA 5S e o gene da histona H3 (CABRAL-DE-MELLO; MOURA; MARTINS, 2010, 2011a), sendo descrita entre 45S e histona para uma espécie de Curculionidae (ROEHRDANZ et al., 2010). Além disso, a associação entre 5S e 45S foi descrita para uma espécie de Scarabaeidae (CABRAL-DE-MELLO et al. 2011d) e Tenebrionidae (GOLL et al., 2012b). No que se refere à organização estrutural, somente o trabalho de Goll et al. (2012b) descreve a associação entre 5S e 18S através de fiber FISH como sendo interespaçada.

Para analisar a real localização das famílias gênicas na cromatina foi realizada a técnica de Fiber FISH que evidenciou a presença dos genes rDNA 5S e 45S interespaçados na fibra de cromatina. Considerando que as duas famílias gênicas estão associadas nas três espécies analisadas é necessário que esses genes estejam ativos por mais que ambos utilizem DNA polimerases diferentes. Nesse sentido, Roehrdanz et al. (2010) analisando a associação entre os cluster 45S e histona em Curculionidade, comprovaram que é possível que famílias gênicas diferentes associadas sejam funcionais.

Adicionalmente o significado dessa associação ainda não foi esclarecido, alguns autores acreditam que a associação pode ter uma importante função na organização do núcleo ou na manutenção de regiões conservadas (KAPLAN et al.,

1993; LIU; FREDGA, 1999). No entanto, segundo CABRAL-DE-MELLO; MOURA, MARTINS, (2010) a associação entre famílias transcritas por polimerases diferentes não poderia ser considerada uma vantagem.

Os espécimes de *O. octoguttata* coletados na região de Nonoai, no Rio Grande do Sul, possuem heteromorfismo de tamanho dos clusters rDNA 5S e 45S entre os elementos do par cromossômico. A variação no tamanho do cluster de rDNA entre cromossomos homólogos pode ser originada por diversos mecanismos, entre eles, transposição entre outros rearranjos envolvendo os segmentos homólogos (GOLD et al., 1990; PENDÁS; MORÁN; GARCÍA-VÁZQUEZ, 1993). Nesse sentido, essa diferença poderia representar processos de diferenciação cariotípica entre as duas populações as quais estão isoladas, considerando a distribuição e a ausência de uma vegetação contínua entre as áreas. Na literatura existem relatos apenas heteromorfismo de presença do cluster 5S ou 45S em invertebrados (CABRAL-DE-MELLO; MOURA; MARTINS, 2010; SCHNEIDER; CELLA, 2010).

Agradecimento

Esse trabalho teve o apoio da Fundação Araucária de Apoio do Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná, Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq. Os autores são gratos ao Senhor Carlos Campaner pela identificação das espécies.

Referências

As referências citadas nesse capítulo estão listadas no final da dissertação em um único tópico com as demais referencias.

Tabela 1 - Percentagem de identidade da sequência do gene rDNA 5S de *O. octoguttata* com outras espécies depositadas no GenBank. Acesso: 2- GQ443312, 3- XR049459, 4- XR046672, 5- NR001881

	1	2	3	4	5
1 - <i>Omophoita octoguttata</i>	-	0,89	0,84	0,84	0,84
2- <i>Harpalus rufipes</i>		-	0,86	-	-
3- <i>Drosophila virilis</i>			-	1	1
4- <i>Drosophila erecta</i>				-	1
5- <i>Drosophila melanogaster</i>					-

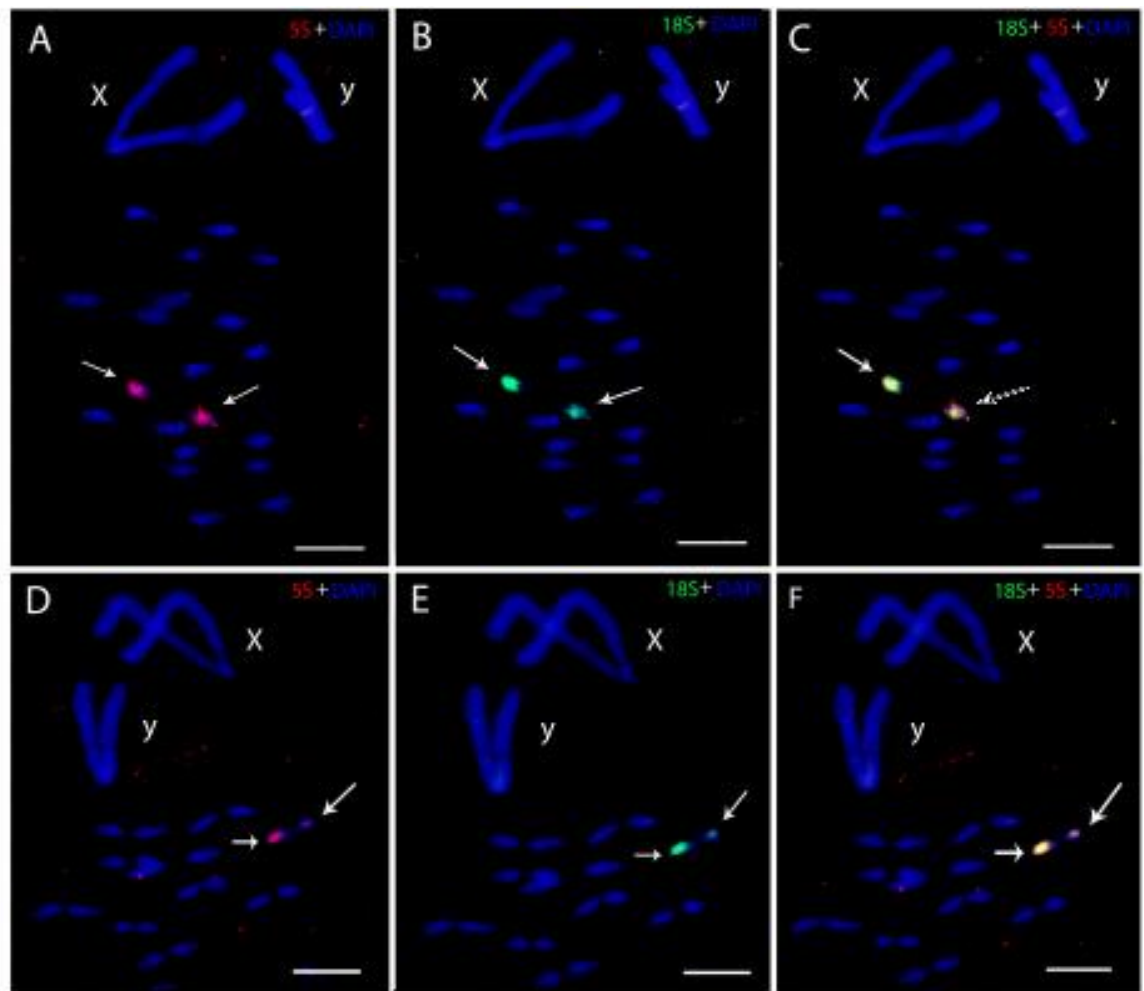


Figura 1 – Células em metáfase I de *Omophoita octoguttata* com $2n=10II+X+y$ submetidas a dupla FISH com sondas de rDNA 5S (vermelho) e 18S (verde) contra coradas com DAPI (azul), mostrando a presença de cístrons 5S (setas) associado a um bivalente autossômico (A.) e a localização do cístrons 45S (B. - setas), os quais são colocalizados (C.) as figuras D., E. e F. mostram a colocalização dos cístrons 5S e 45S e o heteromorfismo dos cístrons (setas) entre os elementos cromossômicos em exemplares da população de Nonoai – RS. Escala = 10µm.

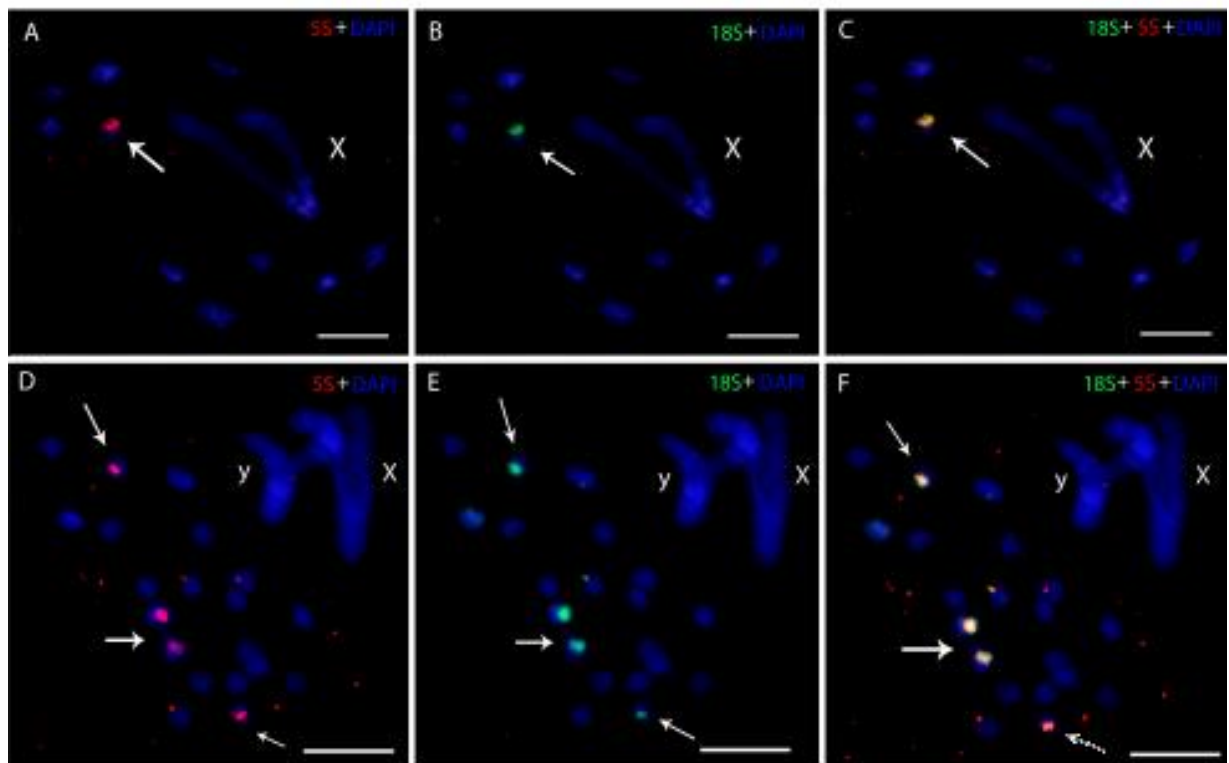


Figura 2 – Células meióticas de *O. personata* (A. – C.) e *O. magniguttis* (D. – F.), com $2n=22=10II+X+y$ submetidas a FISH com sonda de rDNA 5S (vermelho) e 18S (verde) e contra coradas com DAPI (azul). A. metáfase II mostrando o cístron 5S (seta) associado a um autossomo. B. a mesma células mostrando o cístron 45S (verde) associado a um autossomo (seta). C. Sobreposição das imagens mostrando a colocalização dos cístrons ribossomais (seta). D. e E., metáfase espermatogonial, mostrando os cístrons 5S (setas) e 45S (setas) associados a quatro cromossomos. F. sobreposição das imagens evidenciando a colocalização dos cístrons (setas). Escala = $10\mu m$.

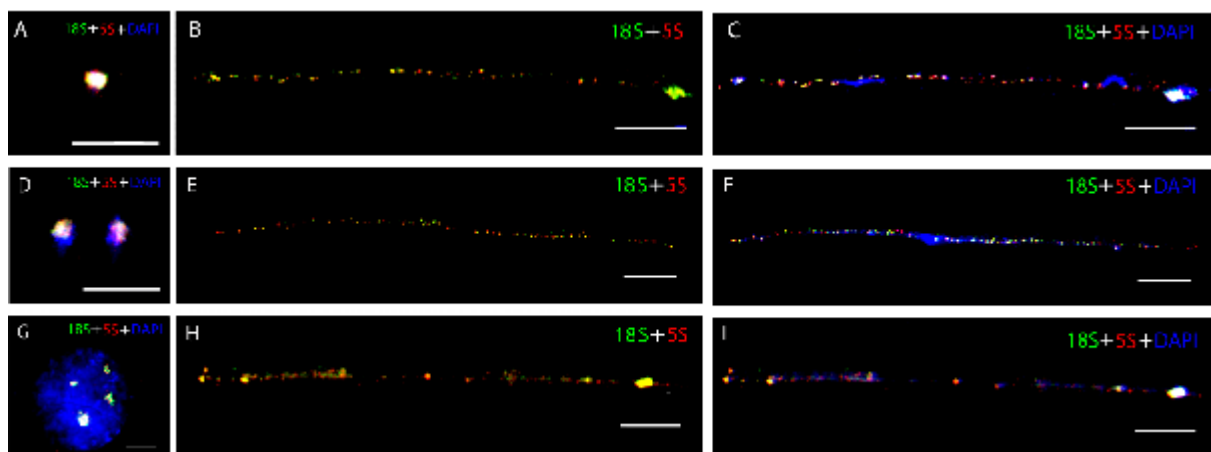


Figura 3 – Células meióticas de *O. octoguttata* (A., B. e C.), *O. personata* (D., E. e F.), *O. magniguttis* (G., H. e I.) e submetidas a FISH com sondas de rDNA de 5S (vermelho) e 18S (verde) e contra coradas com DAPI (azul). Em A., D. e G. mostrando os sítios de 5S e 18S colocalizados. B. e C., E. e F., H. e I., evidenciando que os sítios colocalizados são interespaçados nas três espécies. Escala = $10\mu m$

4.2 Capítulo II

Análise citogenética e mapeamento físico de rDNA 18S e 5S em espécies do gênero *Alagoasa* (Coleoptera: Chrysomelidae: Alticinae)

Alagoasa é o gênero de Alticinae mais estudado do ponto de vista citogenético com 33 espécies analisadas. A maioria das espécies possui um número diploide conservado de $2n=22=20+X+y$ com cromossomos sexuais gigantes e assinápticos. A análise das Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs) em Coleoptera tem sido descrita principalmente através de Impregnação pelo Íon Prata e na maioria dos casos a RON está associada a um par de cromossomos autossômicos. No entanto, o mapeamento desse gene através de Hibridação *in situ* Fluorescente foi realizado em poucas espécies de Coleoptera. O gene ribossomal 5S foi descrito apenas para espécies da família Scarabaeidae e da subfamília Alticinae. O objetivo desse trabalho foi caracterizar citogeneticamente as espécies *Alagoasa coccinelloide* e *Alagoasa florigera* e realizar o mapeamento físico dos genes ribossomais 18S e 5S. A análise citogenética evidenciou que ambas as espécies possuem um número diploide de $2n=22=20+X+y$ sendo os cromossomos sexuais gigantes e assinápticos com fórmula meiótica $2n=10II+X+y$. A análise das duas espécies mostrou a presença de constrição secundária no par 6. O mapeamento dos genes ribossomais 18S e 5S em *A. coccinelloide* através da FISH evidenciou que ambos os genes estão associados a um par de cromossomos autossômicos em metáfase espermatogonial e um cromossomo em metáfase II. A dupla FISH evidenciou a colocação dos genes. No entanto, a FISH em *A. florigera* mostrou a presença do rDNA 18S e 5S associado a três bivalentes autossômicos em metáfase I e em três cromossomos em metáfase II. A dupla FISH mostrou a colocação dos genes ribossomais. A técnica de FISH com fibras estendidas para *A. florigera* evidenciou que os genes ribossomais estão interespçados com quantidades variáveis das classes de DNA ribossômico.

Palavras-chave: Meiose, rDNA, Fiber-FISH, evolução cariotípica, variabilidade

Introdução

Alagoasa pertencente à subtribo Oedionychina é o gênero mais estudado do ponto de vista citogenético, com, 33 espécies analisadas (Tabela 1). A maioria das espécies possui número diplóide igual a 22 cromossomos e fórmula meiótica $2n=10II+X+y$, sendo essas características conservadas na subtribo (SMITH; VIRKKI, 1978; VIRKKI, 1968, 1970, 1988; VIRKKI; SANTIAGO-BLAY; CLARK, 1991). No entanto, variações do número diploide ocorrem no gênero devido principalmente à fusões cêtricas, diminuindo o número diploide e/ou à presença de cromossomos B, desta forma, aumentando o número cromossômico. Na literatura existem descrições da ocorrência de 1 a 15 cromossomos extras nas espécies desse gênero (PETITPIERRE et al., 1988; VIRKKI; SANTIAGO-BLAY, 1993). Redução no número diplóide foi descrita em *Alagoasa parana*, com $2n=16=7II+X+y$ e *Alagoasa equestris* com $2n=12=10+X+y$ (VIRKKI, 1978; VIRKKI; SANTIAGO-BLAY, 1993). A variação do número diplóide em função da presença de cromossomos B foi descrita em *Alagoasa oblecta*, com $2n=37=10II+15B+X+y$. Em *A. equestris* além da redução do número ocorre a presença de cromossomos B, sendo observado $2n=5II+1B+X+y$. Variações devido a fragmentos cromossômicos foram descritas em *Alagoasa arcifera*, os quais variaram de 0 a 3 fragmentos, sendo $2n=16$ ou $19=7II+0-3fr.+X+y$ (PETITPIERRE et al., 1988; VIRKKI; SANTIAGO-BLAY, 1993).

Recentemente a utilização da técnica de Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH) utilizando sondas de genes ribossomais (45S e 5S) e/ou histona tem evidenciado outros tipos de variações cariotípicas em Coleoptera. Essas variações referem-se à dispersão de famílias gênicas, ressaltando diferentes padrões de evolução cariotípica durante os processos de diferenciação dos gêneros e/ou espécies (Artigo 1 do presente estudo; CABRAL-DE-MELLO, 2011a, 2011b).

Em Alticinae os trabalhos iniciais com FISH mostram uma variação no número de cromossomos portadores das Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs) dentro do gênero *Omophoita* e a ocorrência de variação interpopulacional no tamanho dos cístrons 45S em *Omophoita octoguttata* (ALMEIDA et al, 2010; Artigo 1 do Presente estudo). Somando-se a isso, a FISH com sonda de rDNA 5S em espécies do gênero *Omophoita*, mostrou que esse cístron está associado com o cístron 45S e, além disso, eventos de co-dispersão para um ou dois cromossomos tem sido observado nesse gênero (Artigo 1 do presente estudo).

Adicionalmente, diversos tipos de associações entre diferentes famílias gênicas foram descritas em alguns grupos de animais, sendo um assunto promissor no estudo na citogenética evolutiva. Em outros grupos de Coleoptera foram descritas associações entre os genes ribossomais 45S e 5S (CABRAL-DE-MELLO; MOURA; MARTINS, 2011d; GOLL et al., 2012a), entre o gene ribossomal 5S e os genes da histona (CABRAL-DE-MELLO; MOURA; MARTINS, 2010, 2011a), e também entre 45S e os cístrons dos genes da histona (ROEHRDANZ et al., 2010).

Somando-se a isso, estudos mais refinados utilizando FISH sobre fibras estendidas, têm mostrado que as associações entre os cístrons 45S e 5S ocorrem de forma interespaçada com quantidades variáveis desses cístrons em Tenebrionidae (GOLL et al., 2012b) e em Alticinae (Artigo 1 do presente trabalho).

O objetivo deste trabalho foi descrever citogeneticamente as espécies *Alagoasa coccinelloide* e *Alagoasa florigera*, com relação ao número diploide, haploide, morfologia cromossômica, tipo de sistema de determinação sexual e realizar o mapeamento físico dos genes ribossomais 45S e 5S, visando estabelecer as diferenças cariotípicas e as estratégias de diferenciação cromossômica entre as espécies.

Material e Métodos

Locais de Coleta

Os machos adultos de *Alagoasa coccinelloide* (quatro indivíduos – Figura 1A) e *Alagoasa florigera* (sete indivíduos – Figura 1B) foram coletados em populações naturais na região do Passo do Pupo, Itaiacoca distrito do município de Ponta Grossa, Paraná, Brasil (S25° 07'10'' W49° 56'24'' e S25° 07'20'' W49 56'04'') e na Fazenda Escola Capão da Onça-UEPG (S25°05'04'' e W50°05'03'').

Preparações cromossômicas

Os indivíduos foram dissecados em solução fisiológica para insetos (7,5g de NaCl, 2,38g de Na₂HPO₄, 2,72g de KH₂PO₄, dissolvido em um litro de água destilada) e as preparações foram realizadas de acordo com métodos descritos por Almeida; Zacaro e Cella (2000).

Localização in situ dos cístrons de rDNA 45S e 5S

A FISH foi realizada utilizando a sonda de rDNA 18S clonada de *O. octoguttata* (Almeida et al., 2010) marcada com adenina biotinilada (16 dUTP Roche®) e sonda de rDNA 5S clonada de *O. octoguttata* (Artigo 1 do presente trabalho) obtida por PCR marcado com digoxigenina (11 dUTP Roche®). As reações foram realizadas em um volume final de 50 µL, contendo tampão 1x, 2mM MgCl₂, 400 µM de cada nucleotídeo (dCTP, dGTP e dTTP), 200µM de dATP, 200µM de Digoxigenina 11 dUTP (Roche®) ou Biotina 16 dUTP (Roche®), 0,2µM de cada primer M13 e 2U de Taq DNA polimerase.

A FISH foi realizada de acordo com Pinkel; Straume e Gray (1986), com algumas modificações. As lâminas foram tratadas previamente com RNase 0,4% (RNase/2xSSC) a 37° durante uma hora, pepsina 0,005% (em 10mM HCl) a 37° C por 10 minutos e fixadas com paraformaldeído 4% por 10 minutos. Os cromossomos foram desnaturados em formamida 70% a 70°C, por quatro minutos para a adição da solução de hibridação. Essa solução continha formamida a 50%, sulfato de dextrano a 10%, 20xSSC, as sondas desnaturadas com uma concentração de 400ng e água q.s.p. 40 µL por lâmina. A hibridação foi *overnight* a uma temperatura de 37°C. No dia seguinte as lâminas foram lavadas com formamida 15% a 42°C em quatro banhos de cinco minutos cada e Tween 0,5% (4xSSC). O sinal foi detectado por streptavidina (Roche®) e antidigoxigenina-rodamina (Roche®). Os cromossomos foram contracorados com DAPI.

FISH em fibras estendidas (fiber-FISH)

A técnica de Fiber FISH foi realizada segundo Barros et al. (2011). As lâminas foram lavadas com tampão salino fosfatado (PBS), por dois minutos a temperatura ambiente e, posteriormente secas. As mesmas foram colocadas em posição horizontal e em seguida uma solução de 200 µl de hidróxido de sódio (NaOH) 0,2 M diluídos em álcool 30% foi adicionado em um dos cantos da lâmina. Na sequência foi realizado um esfregaço contínuo sobre a preparação com o auxílio de outra lâmina, de tal forma a cobrir toda a superfície. Em seguida 500µL de etanol 100% foi

imediatamente aplicado na lâmina a qual foi mantida inclinada até completa evaporação.

As células foram analisadas em microscópio de epifluorescência Olympus BX41. As imagens foram obtidas com a utilização do sistema de captura de Imagem em tempo real CCD Olympus DP 71.

Resultados

Coloração Convencional

A análise de metáfases espermatogoniais de *Alagoasa coccinelloide* (Figura 2A) e metáfase II de *A. florigera* (Figura 3A) mostrou que ambas as espécies possuem um cariótipo com $2n=22$ cromossomos, sendo os cromossomos sexuais gigantes. O estudo do cariótipo das duas espécies do gênero *Alagoasa* evidenciou a predominância de cromossomos metacêntricos e a presença de uma constrição secundária no braço curto do par seis (Figuras 2A e 3A). O estudo de células em metáfase I mostrou a fórmula meiótica $2n=10II+X+y$ com cromossomos sexuais assinápticos em ambas as espécies (Figuras 2B e 3B). A análise de metáfase II evidenciou o complemento haploide de $n=10+X$ e $n=10+y$ (Figuras 2C e 3C).

Localização *in situ* dos clusters rDNA 45S e 5S

O estudo de células submetidas à FISH com sonda de rDNA 18S mostrou a presença de dois clusters associados a um par autossômico, em metáfase espermatogonial (Figura 4A) e a um cromossomo em metáfase II (Figura 4D), em *A. coccinelloide*. Em *A. florigera* foram observados três clusters em três bivalentes autossômicos em metáfase I (Figura 5A) e a três cromossomos em metáfase II (Figura 5D).

As células de *A. coccinelloide* submetidas à FISH com sonda de rDNA 5S evidenciou a presença de um par de homólogos portadores do gene em metáfase espermatogonial (Figura 4B) e em um cromossomo em metáfase II (Figura 4E). A espécie *A. florigera* mostrou a presença de três clusters associados a três bivalentes autossômicos em metáfase I (Figura 5B) e três clusters associados a três cromossomos em metáfase II (Figura 5E).

Adicionalmente, a análise da sobreposição das imagens com as sondas de rDNA 18S e 5S em *A. coccinelloide* e *A. florigera*, para investigar uma possível associação entre os genes ribossomais, mostrou que esses genes estão colocalizados em um par autossômico em *A. coccinelloide* (Figuras 4C e 4F) e em três pares cromossômicos em *A. florigera* (Figura 5C e 5F). Além disso, o estudo da distribuição desses genes na fibra de cromatina em *A. florigera* mostrou que os genes ribossomais 45S e 5S estão inter espaçados com quantidades variáveis de cada gene (Figuras 5G e 5H).

Discussão

As análises citogenéticas para as duas espécies estudadas mostram duas tendências: 1 – manutenção do número diploide, do sistema de determinação sexual, morfologia cromossômica e constrição secundária; 2- variação no número de cromossomos portadores das RONS e do cístron 5S.

As análises das células meióticas mostraram que as duas espécies possuem o mesmo número diploide com $2n=22$ e mesma fórmula meiótica $2n=10II+X+y$. Ambas as espécies possuem o sistema de determinação sexual do tipo $X+y$ com cromossomos grandes, assinápticos e com segregação regular na Anáfase I. Adicionalmente a morfologia dos cromossomos autossômicos é predominantemente metacêntrica em ambas as espécies analisadas. As características cariotípicas observadas para *A. coccinelloide* e *A. florigera* estão de acordo com aquelas descritas na literatura para outras espécies do gênero *Alagoasa* (VIRKKI, 1961, 1970; VIRKKI et al. 1991; VIRKKI; SANTIAGO-BLAY, 1993).

A região de constrição secundária que ocorre no braço curto do par cromossômico seis, em ambas as espécies, provavelmente corresponde a RON, pois, considerando os resultados obtidos através de FISH o gene 45S em *A. coccinelloide* se localiza em um cromossomo de tamanho equivalente ao par seis. Desta forma esses resultados estão de acordo com as descrições de Almeida; Campaner e Cella (2006, 2009) para espécies de Alticinae como *Paranaia opima*, e espécies do gênero *Omophoita*. No entanto, para a espécie *A. florigera* ocorre à presença de três pares portadores da RON, um par se localiza no cromossomo seis e dois pares se localizam em cromossomos sem a constrição secundaria aparente.

Nesse sentido, considerando a proposta de Scheneider et al. (2007) que possivelmente um par portador de RON corresponderia a situação basal para Coleoptera, a presença de dois sítios adicionais corresponderia a uma derivação no cariótipo.

Na literatura, a presença de um par portador da RON associada a constrição secundária do par seis foi descrita para outras espécies relacionadas, como *Alagoasa blanda* (VIRKKI, 1985), *Paranaita opima* (ALMEIDA et al., 2006) e *Omophoita personata* (ALMEIDA et al., 2010). Esses dados estão de acordo com aqueles descritos para espécies da família Chrysomelidae, na qual a maioria das espécies possui um par autossômico organizador nucleolar, sendo provável o par quatro ou cinco (MAFFEI; GASPARINO; POMPOLO, 2000; PETITPIERRE, 1996; POSTIGLIONI; BRUM-ZORRILLA, 1988; POSTIGLIONI et al., 1990; POSTIGLIONI; STOLL; BRUMZORRILLA, 1991). Por outro lado, em Chrysomelidae, a dispersão do cístron 45S foi descrita para *Omophoita magniguttis*, a qual possui dois pares autossômicos portadores da RON.

A utilização do gene rDNA 5S em mapeamento cromossômico é recente em Coleoptera. Na espécie *A. coccinelloide* a presença de um par autossômico portador no gene ribossomal 5S está de acordo com as descrições para alguns Coleoptera. Por outro lado, em *A. florigera* ocorre a presença de três cromossomos portadores do cístron de rDNA 5S que difere do padrão de apenas um ou dois cromossomos portadores do gene rDNA 5S descrito até o presente momento para Coleoptera (Artigo 1 do presente trabalho; CABRAL-DE-MELLO; MOURA; MARTINS, 2010, 2011a; GOLL et al., 2012b; OLIVEIRA et al., 2012).

Recentemente, associações entre famílias gênicas foram descritas em Coleoptera, como, por exemplo, a associação entre os genes ribossomais 45S e 5S como observado nas espécies *A. coccinelloide* e *A. florigera* do presente estudo. Em Alticinae, associações entre 45S e 5S já foram descritas para outras espécie do gênero *Omophoita* (Artigo 1 do presente trabalho), Scarabaeidae (CABRAL-DE-MELLO et al. 2011d) e Tenebrionidae (GOLL et al., 2012b). Adicionalmente, associações entre rDNA 5S e o gene da histona H3 foram descritas para Scarabaeidae (CABRAL-DE-MELLO; MOURA; MARTINS, 2010, 2011a). Outra associação descrita em apenas uma espécie Curculionidae é aquela entre 45S e histona (ROEHRDANZ et al., 2010).

O significado das associações entre diferentes famílias gênicas ainda não foi

completamente esclarecido, alguns autores acreditam que essas associações podem ter funções importantes como na organização no núcleo e na manutenção de sequências conservadas (KAPLAN et al., 1993; LIU; FREDGA, 1999).

Além disso, associação entre 45S e 5S foi corroborada pela utilização da técnica de FISH sobre a fibra de cromatina, mostrando que as famílias gênicas estão interespaçada na fibra. O primeiro estudo a descrever a ocorrência de interespaçamento entre as famílias gênicas em Coleoptera foi o trabalho de Goll et al. (2012b) e, recentemente, em Alticinae o trabalho de Melo et al. (Artigo 1 do presente trabalho).

Considerando a condição basal para Coleoptera, como um par de cromossomos portadores dos cístrons ribossômicos e que ambos os clusters de rDNA estão associados e intercalados nos três cromossomos em *A. florigera* é possível inferir que ocorreu uma co-dispersão desses genes, como observado em outras espécies de Coleoptera (CABRAL-DE-MELLO; MOURA; MARTINS, 2010; CABRAL-DE-MELLO et al. 2011c, 2011d). Um modelo para explicar essa co-dispersão de genes ribossomais é através de DNA circular extracromossômico (Ecc DNA) (COHEN; MENUT; ME´CHALI, 1999; COHEN; YACOBI; SEGAL, 2003; COHEN; HOUBEN; SEGAL, 2008; COHEN et al., 2010; DEGROOTE et al., 1989; PONT; DEGROOTE; PICARD, 1987). Por outro lado, a dispersão poderia ocorrer através de elementos de transposição (TE), os quais preferencialmente invadem regiões de rDNA (CABRAL-DE-MELLO et al., 2011b; GILLESPIE, et al., 2006; YE, et al., 2005).

Agradecimento

Esse trabalho teve o apoio da Fundação Araucária de Apoio do Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná, Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq.

Referências

As referências citadas nesse capítulo estão listadas no final da dissertação em um único tópico com as demais referências.

Tabela 1 – Espécies pertencentes ao gênero *Alagoasa* analisadas citogeneticamente. B = cromossomos supranumerários ou cromossomos B. fr = fragmentos.

ESPÉCIE	FÓRMULA MEIÓTICA	PROCEDÊNCIA	REFERÊNCIA
<i>Alagoasa acutangula</i> (Jac)	2n= 10II +X+Y	El Salvador	VIRKKI 1961, 1970
<i>Alagoasa apicata</i> (Csiki)	2n= 10II +X+y		PETITPIERRE et al., 1988
<i>Alagoasa arcifera</i> (Harold)	2n= 7II +0-3fr+X+y +X+y		PETITPIERRE et al., 1988
<i>Alagoasa bicolor</i> (L.)	2n= 10II +X+y	Porto Rico	VIRKKI 1970, 1985; VIRKKI et al., 1991
<i>Alagoasa bipunctata</i> (Chevrolet)	2n= 10II +X+y	El Salvador	VIRKKI, 1961
<i>Alagoasa burmeisteri</i> (Harold)	2n= 10II +X+y		PETITPIERRE et al., 1988
<i>Alagoasa b. gounellei</i> (Bechyné)	2n= 10II +X+y		PETITPIERRE et al., 1988
<i>Alagoasa b. maculatissima</i> (Jac)	2n= 10II +X+y		PETITPIERRE et al., 1988
<i>Alagoasa cercarollis</i> (Say)	2n= 10II +X+Y	El Salvador	VIRKKI 1961, 1970
<i>Alagoasa crux-nigra</i> (Jac)	2n= 10II +X+y		PETITPIERRE et al., 1988
<i>Alagoasa coccinelloide</i>	2n= 10II +X+y		Presente trabalho
<i>Alagoasa decemguttata</i> (Fabricius)	2n= 10II +X+y		PETITPIERRE et al., 1988
<i>Alagoasa dipus</i> ill.	2n= 10II +X+y	Brasil, Peru	SMITH & VIRKKI, 1978
<i>Alagoasa dissepata cyaneofasciata</i> (Jac).	2n= 10II +X+y	Brasil	SMITH & VIRKKI, 1978
<i>Alagoasa equestris</i>	2n= 10II +X+y	Brasil	VIRKKI & SANTIAGO-BLAY, 1993
“	2n=5II+1B+X+y	Brasil	VIRKKI & SANTIAGO-BLAY, 1993
<i>Alagoasa extrema</i> (Harold)	2n= 5II +1B+X+Y	El Salvador	VIRKKI, 1961, 1970
<i>Alagoasa fasciaticollis</i> (Jac)	2n= 10II +X+y		PETITPIERRE et al., 1988
“	2n= 10II +fr+X+y		PETITPIERRE et al., 1988
<i>Alagoasa florigera</i>	2n= 10II +X+y		Presente trabalho
<i>Alagoasa illustris</i> (Jac)	2n= 10II +X+y	Brasil	SMITH & VIRKKI, 1978
<i>Alagoasa januaria</i>	2n= 10II +X+y	Brasil	VIRKKI, 1985; VIRKKI & SANTIAGO-BLAY, 1993
<i>Alagoasa libentina</i> (Germ)	2n= 10II +X+y		PETITPIERRE et al., 1988
<i>Alagoasa l. tetraspilota</i> (Baly)	2n= 10II +X+y		PETITPIERRE et al., 1988
<i>Alagoasa mella commutate</i> (Bechyné & bechyné)	2n= 10II +X+y	Brasil	SMITH & VIRKKI, 1978
<i>Alagoasa oblecta</i>	2n= 10II +15B+X+y	Bolivia	VIRKKI & SANTIAGO-BLAY, 1993
<i>Alagoasa parana</i> (Samuelson)	2n= 7II +X+y	Brasil	VIRKKI, 1988 ^a
<i>Alagoasa posticalis</i> (Kirsch)	2n= 10II +X+y	Peru	SMITH & VIRKKI, 1978
<i>Alagoasa rotundicollis</i> (Jac)	2n= 10II +X+y		PETITPIERRE et al., 1988
<i>Alagoasa rufina</i> ill	2n= 10II +X+y	Peru	SMITH & VIRKKI, 1978
<i>Alagoasa sp. 1</i>	2n= 10II +X+y	El Salvador	VIRKKI, 1961
<i>Alagoasa sp. 2</i>	2n= 10II +X+y	El Salvador	VIRKKI, 1961
<i>Alagoasa transparente</i>	2n= 10II+2B+X+y	Brasil	VIRKKI & SANTIAGO-BLAY, 1993
<i>Alagoasa trifasciata</i> (Fabricius)	2n= 10II +X+y	Peru	SMITH & VIRKKI, 1978
“	2n= 10II +X+y	Brasil	VIRKKI, 1988b
<i>Alagoasa trifasciata trifasciata</i> (Bechyné)	2n= 10II +X+y	Brasil	VIRKKI, 1971
<i>Alagoasa trifasciata vulgatissima</i>	2n= 10II +X+y	Peru	VIRKKI, 1971
<i>Alagoasa umbratica</i> (Ol.)	2n= 10II +X+y		PETITPIERRE et al., 1988

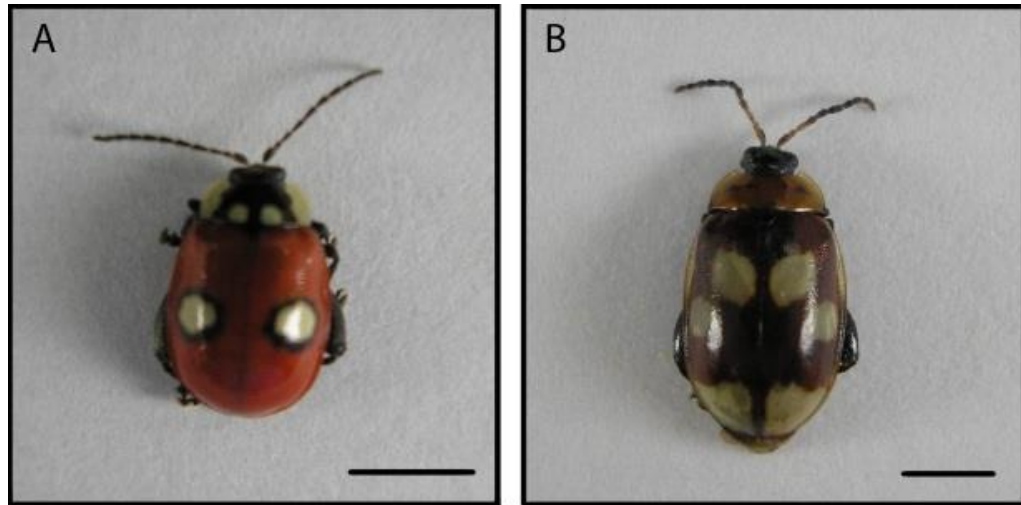


Figura 1 - Exemplares de Alticinae do gênero *Alagoasa*. **A.** exemplar macho de *Alagoasa coccinelloide*. **B.** exemplar macho de *Alagoasa florigera*. Escala = 1 cm.

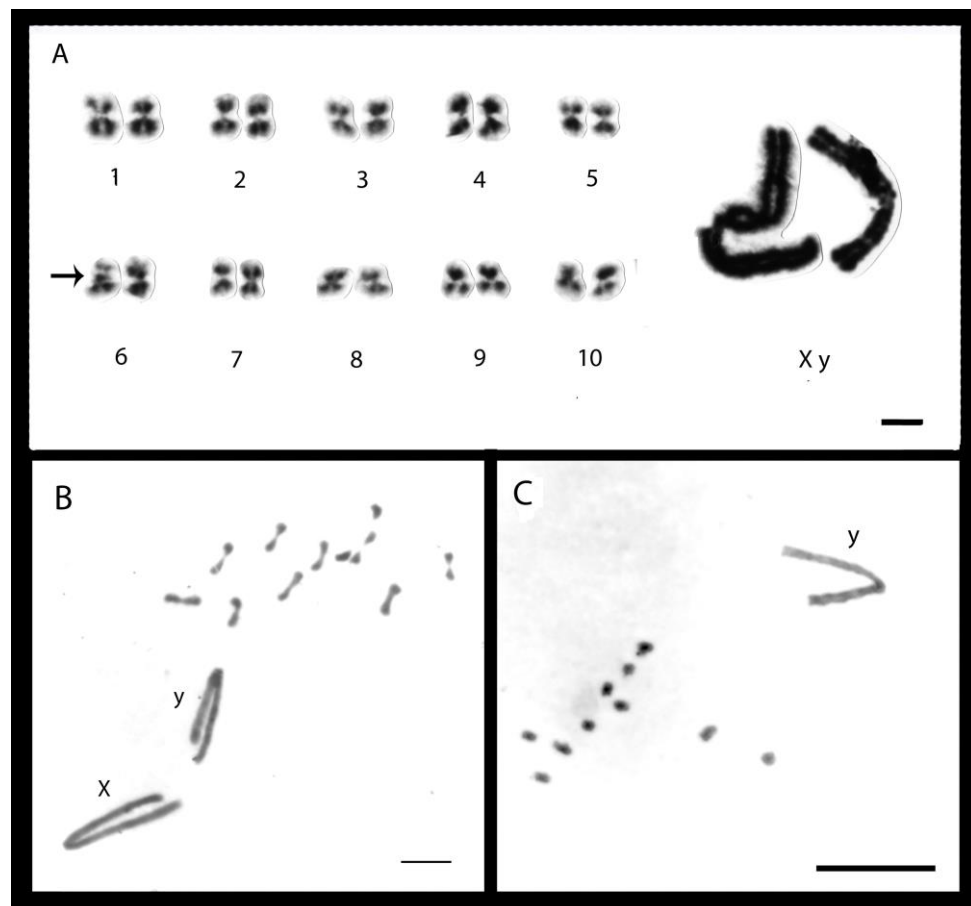


Figura 2 – Células mitóticas e meióticas de *Alagoasa coccinelloide*. **A.** Cariótipo espermatogonial com $2n=22$ cromossomos. A seta esta evidenciando a constrição secundária. **B.** Metáfase I, presença de $2n=10II+X+y$. **C.** metáfase II evidenciando a presença do complemento haplóide $n=10+y$ cromossomos. Escala = $10\mu m$.

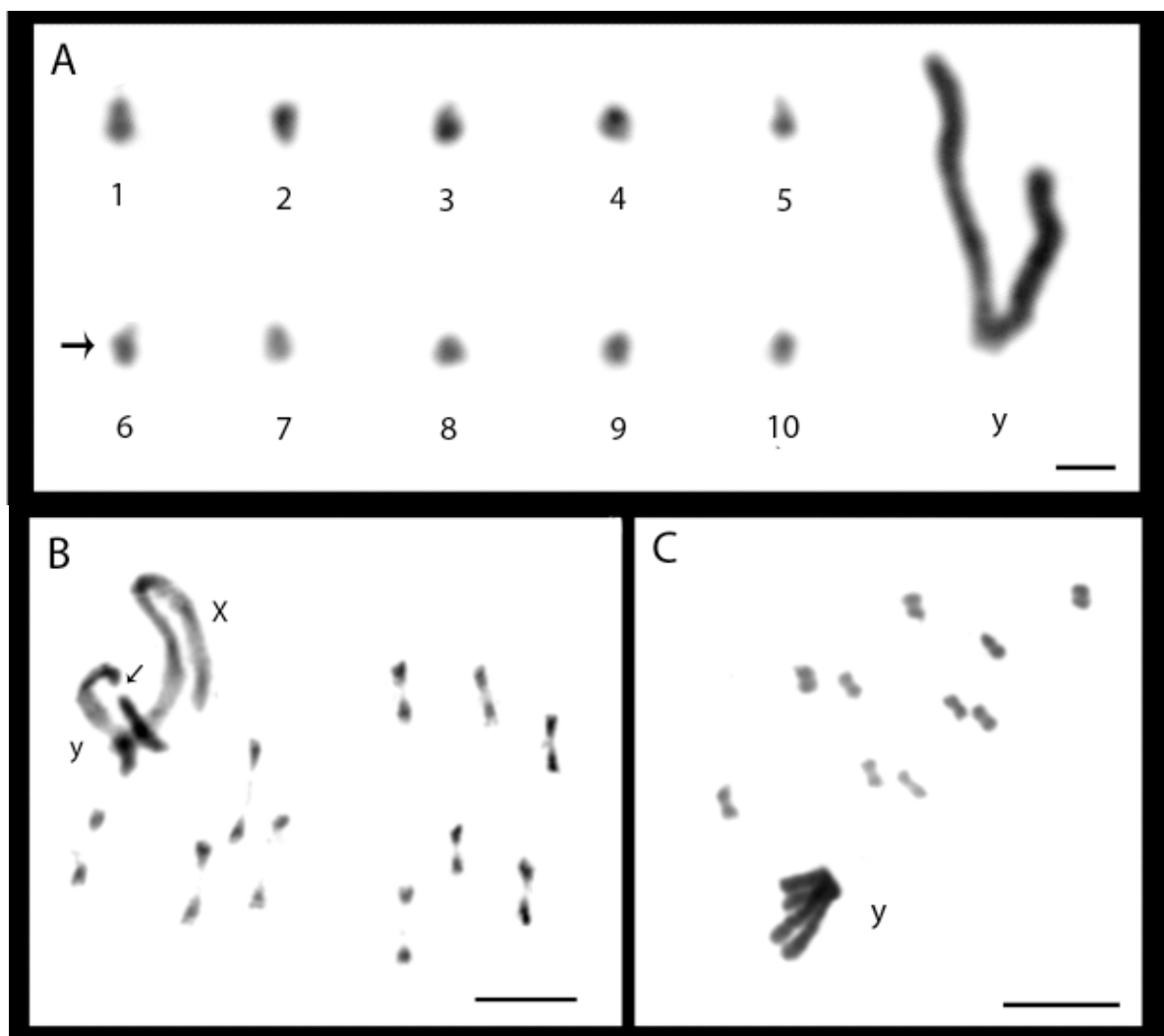


Figura 3 – Células meióticas de *Alagoasa florigera* **A.** Cariótipo de metáfase II com $n=10+y$. Contrição secundária (seta). **B.** Metáfase I com $2n=10II=X+y$; contrição no cromossomo y (seta). **C.** Metáfase II com de $n=10+y$. Escala = $10\mu m$

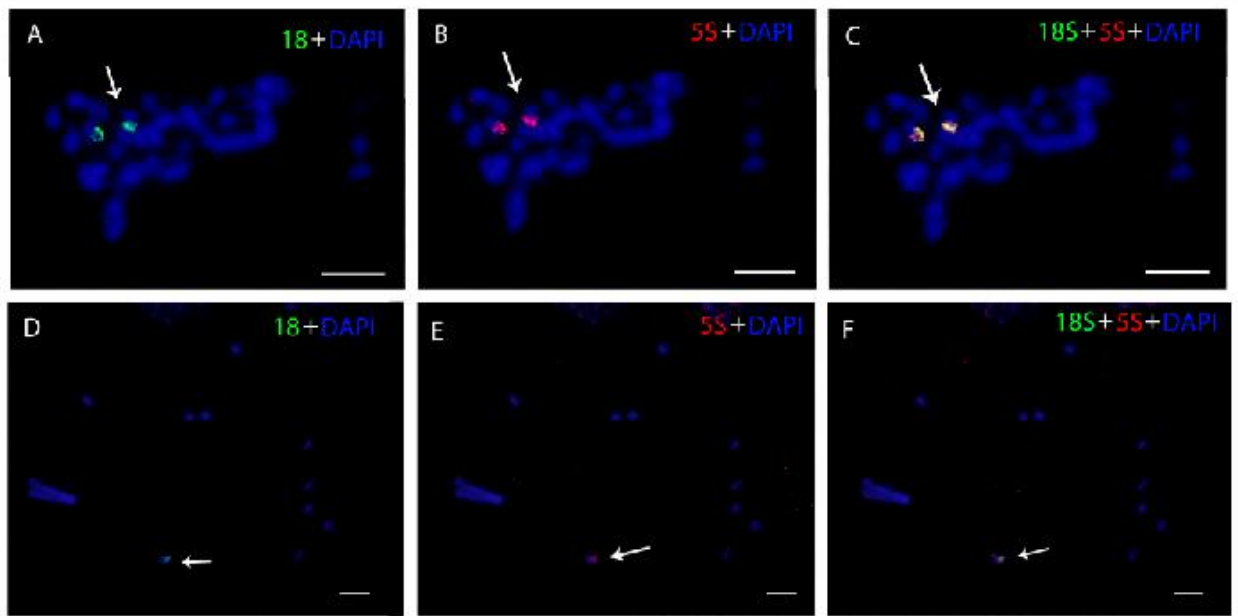


Figura 4 – Células meióticas de *A. coccinelloide* submetidas à técnica de Hibridação *in situ* fluorescente com sonda de rDNA 18S (verde) e 5S (vermelho) e contracoradas com DAPI (azul). **A.** e **B.** Metáfase espermatogonial mostrando a marcação em um par autossômico (setas). **C.** Sobreposição das imagens vistas em A. e B. mostrando que os cístrons ribossomais são sintênicos (setas). **D.** e **E.** Metáfase II evidenciando a hibridação associada a um cromossomo autossômico (setas). **F.** sobreposição das imagens vistas em **D.** e **E.** confirmando a colocalização dos cístrons (setas). Escala = 10 μ m

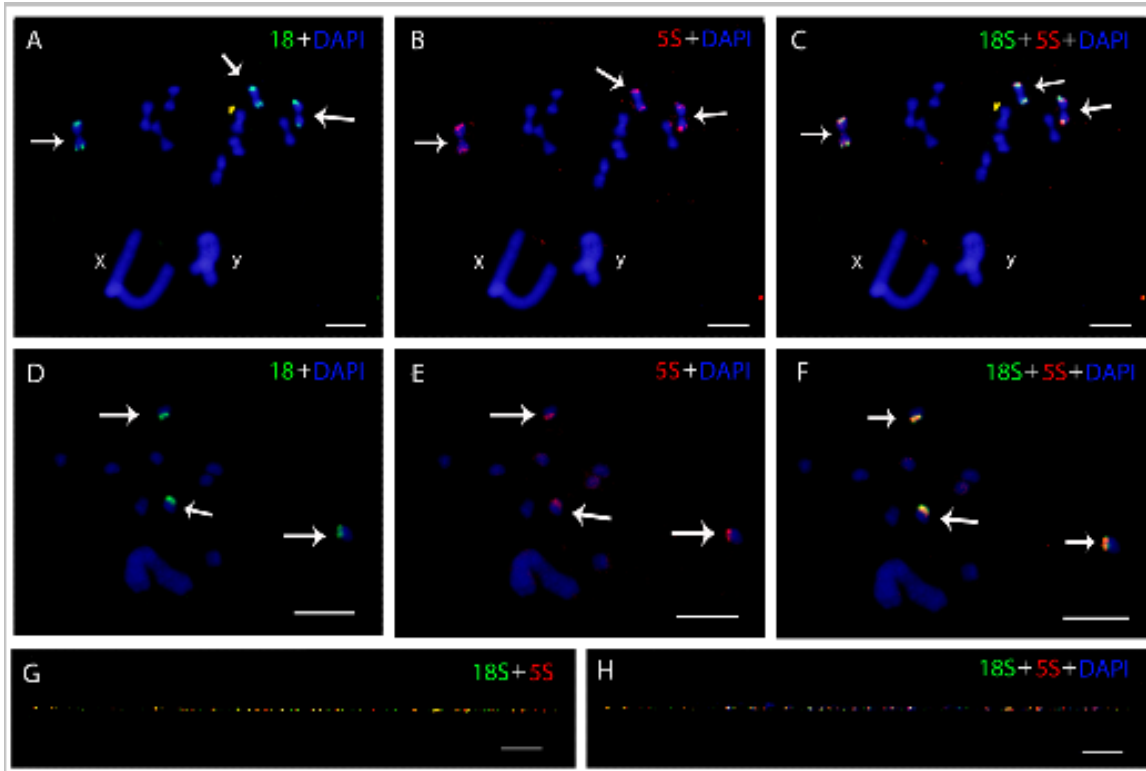


Figura 5 – Células meióticas de *A. florigera* submetidas à técnica de Híbridação *in situ* fluorescente com sonda de rDNA 18S (verde) e 5S (vermelho) e contracoradas com DAPI (azul). **A.** e **B.** Metáfase I evidenciando a marcação em três bivalentes autossômicos (setas). **C.** Sobreposição das imagens vistas em **A.** e **B.** mostrando que os cístrons ribossomais são sintênicos (setas). **D.** e **E.** Metáfase II mostrando a hibridação associada a três cromossomos (setas). **F.** sobreposição das imagens vistas em **D.** e **E.** confirmando a colocalização dos cístrons (setas). **G.** e **H.** Fibras de cromatina estendidas mostrando que os cístrons de 18S e 5S colocalizados estão dispostos de forma intercalar. Escala = 10µm

4.3 Capítulo III

Estudo citogenético, mapeamento de rDNA 18S e 5S e Hibridação *in situ* do Genoma (GISH) em *Systema tenuis* (Coleoptera: Chrysomelidae: Alticinae)

Systemini é caracterizada pelo aumento no tamanho dos cromossomos e pela variação no sistema de determinação sexual, a tribo possui apenas seis espécies analisadas do ponto de vista citogenético. O gênero *Systema* possui aproximadamente 100 espécies descritas taxonomicamente, no entanto, apenas *Systema basalis* foi analisada citogeneticamente e apresentou $2n=15II+neoXY$. O mapeamento das Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs) e do gene ribossomal 5S foi utilizado em apenas algumas espécies de Coleoptera. A comparação dos genomas de macho e fêmea tem sido uma importante ferramenta para a análise da diferenciação dos cromossomos sexuais. O objetivo desse trabalho foi caracterizar citogeneticamente *Systema tenuis*, realizar o mapeamento cromossômico dos genes ribossomais 18S e 5S e elucidar diferenciações moleculares entre os cromossomos sexuais. A análise de metáfase espermatogonial evidenciou um número diploide de $2n=32$ cromossomos com predominância de cromossomos submetacêntricos. Nas metáfases mitóticas os cromossomos apresentam os braços curtos heteropicnóticos positivos e um par possui uma constrição secundária. Células paquitênicas evidenciaram o complemento haploide de $n=16$ cromossomos. Células em Metáfase I mostraram um bivalente na forma de L, evidenciando o sistema neoXY. O uso de fluorocromo evidenciou que na maioria dos bivalentes a região pericentromérica é rica em repetição do tipo AT. Células meióticas de macho submetidas à Hibridação *in situ* do Genoma utilizando sonda de fêmea mostrou um bivalente que não hibridou em uma região, sendo interpretado como neo Y. A FISH com sonda de 18S e 5S evidenciou a presença dos genes ribossomais em vários cromossomos, esses genes estão dispostos de maneira colocalizada ou em cromossomos separados.

Palavras-chave: Meiose, evolução cariotípica, Systemini, cromossomos sexuais

Introdução

A subfamília Alticinae é considerada moderna com cariótipos variando quanto ao número e o tipo de sistema de determinação sexual (VIRKKI, 1964, 1967, 1968), nessa subfamília pode ser observado 19 tipos diferentes de sistema de determinação do sexo (SMITH; VIRKKI, 1978; VIRKKI, 1964, 1967, 1968). Os representantes dessa subfamília apresentam o comportamento dos cromossomos sexuais diferentes da maioria dos Coleoptera. Alguns gêneros como *Altica* possuem cromossomos assinápticos com segregação irregular (SMITH; VIRKKI, 1978). Outros grupos apresentam cromossomos sexuais grandes e assinápticos com segregação regular principalmente nas espécies da subtribo Oedionychina (SMITH; VIRKKI, 1978; VIRKKI, 1968). E, outra tribo, Systemini é caracterizada pelo aumento do número cromossômico, aumento no tamanho dos cromossomos autossômicos e variação no sistema de determinação do sexo (PETITPIERRE et al., 1988; SMITH; VIRKKI, 1978; VIRKKI, 1970; VIRKKI; SANTIAGO-BLAY, 1996).

Considerando a tribo Systemini, apenas seis espécies foram analisadas do ponto de vista citogenético. As espécies *Phyllotrupes rudibus* e *Platyprosopus (Phyllotrupes) rudibus* possuem fórmula meiótica igual a $2n=10II+Xyp$ (VIRKKI, 1970; VIRKKI; SANTIAGO BLAY, 1996). No entanto, *Stenophyma* sp. possui a fórmula meiótica $2n=15II+Xy$ (VIRKKI, 1970), e *Phyllotrupes* sp. (aff. *P. acutangula*) $2n=17II+Xy$, com até 12 cromossomos supranumerários (VIRKKI; SANTIAGO BLAY, 1996). Em *Cyrsylus volkameriae* ocorre um sistema de determinação sexual múltiplo, seu cariótipo é de $2n=13II+X_1X_2y_1y_2$ (VIRKKI, 1970, 1988).

O gênero *Systema* possui aproximadamente 100 espécies descritas taxonomicamente (JOLIVET; HAWKESWOOD, 1995); no entanto, somente *Systema basalis* foi estudada citogeneticamente. Virkki (1970) descreveu *S. basalis* com o sistema de determinação sexual do tipo neoXY, sendo a fórmula meiótica $2n=15II+neoXY$. Esse sistema de determinação sexual é encontrado em outras 13 espécies de Alticinae, *Aphthona* sp. com $2n=12+neoXY$, *Heikertingerella krugi* com $2n=4+neoXY$, *Heikertingerella* sp. 1 com $2n=9+neoXY$, *Homoschema latitarsum* com $2n=2+neoXY$ (Aphthonini) (VIRKKI; SANTIAGO-BLAY, 1996); *Dibolia penstemonis* $2n=15+neoXY$ (Dinollini) (SMITH; VIRKKI, 1978); *Longitarsus* sp. com $2n=12+neoXY$ (Longitarsini) (VIRKKI; SANTIAGO-BLAY, 1996); *Disonycha alternata* com $2n=24+neoXY$ e *Disonycha laevigata* com $2n=21+neoXY$ (Disonychina) (SMITH;

VIRKKI, 1978); *Hyphasoma* sp. com $2n=10+neoXY$ (Oedionychina) (SMITH; VIRKKI, 1978); *Psylliodes affinis* com $2n=9+neoXY$ (PETITPIERRE et al, 1988), *Psylliodes dulcamarea* com $2n=13+neoXY+0-2s$ (Psylliodini) (SEGARRA; PETITPIERRE, 1989) e *Monomacra caprai* com $2n=14+neoXY$ (PETITPIERRE et al, 1988).

A comparação dos genomas entre machos e fêmeas com o intuito de analisar a diferenciação dos cromossomos sexuais ou para o estudo de diferenciação molecular dos mesmos tem sido realizado com destaque em alguns grupos de insetos, como, *Drosophila melanogaster*, *Megaselia scaralis*, *Bombyx mori*, *Ephesia kuehniella* e *Galleria mellonella*; e de forma comparativa em *Mus musculus* e em seres humanos (TRAUT, 1999; TRAUT et al., 1999).

Os estudos de localização das Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONS), do gene ribossomal 5S e dos genes da histona mostram que esses genes são ótimos marcadores para estudos de comparação entre espécies e de evolução dos genomas. No entanto, poucas espécies de Coleoptera foram analisadas nesse contexto, como por exemplo, algumas espécies de Alticinae (Artigo 1 e 2 do presente trabalho; ALMEIDA et al., 2010), espécies de Tenebrionidae (GOLL et al., 2012a; JUAN; PONS; PETITPIERRE, 1993), de Cicindelidae (GALIÁN et al., 1995; GALIÁN; HUDSON, 1999; PROENÇA; SERRANO; COLLARES-PEREIRA, 2002a, 2002b), de Scarabaeidae (BIONE et al., 2005a; BIONE; CAMPAROTO; SIMÕES, 2005b; CABRAL-DE-MELLO; MOURA; MARTINS, 2010; CABRAL-DE-MELLO; MOURA; MARTINS 2011a) e de Carabidae (DE LA RÚA et al., 1996; GALIÁN; HUDSON, 1999).

O objetivo desse trabalho foi caracterizar citogeneticamente *Systema tenuis*, realizar o mapeamento cromossômico dos genes ribossomais 45S e 5S e elucidar as diferenciações moleculares entre os cromossomos sexuais.

Material e Métodos

Locais de Coleta

Os machos adultos de *Systema tenuis* (Figura 1) foram coletados em hortaliças no Colégio Estadual Agrícola Augusto Ribas no município de Ponta Grossa, Paraná, Brasil (S25°05'49'' e W50°06'32'').

Obtenção das preparações cromossômicas

As preparações das gônadas foram realizadas segundo a técnica descrita por Almeida; Zacaro; Cella (2000). Os indivíduos foram dissecados em solução fisiológica, as gônadas foram transferidas para uma placa de Petri contendo solução hipotônica (água de torneira) durante 5 minutos. Na sequência, as gônadas foram transferidas para outra placa de Petri contendo fixador Carnoy I (metanol – ácido acético, na proporção 3:1) durante 30 minutos. Posteriormente, as gônadas foram maceradas em ácido acético 60% sobre lâmina de vidro e, na sequência, foram secas em placa de metal a temperatura de 35° a 40° C, e coradas com Giemsa 3%.

Fluorocromo

A coloração com fluorocromo foi obtida segundo Schweizer (1980), com algumas modificações, a qual consistiu em colocar 80 µl de solução de cromomicina sobre cada lâmina, cobrir com uma lamínula e deixar por 1 hora. A lâmina foi limpa com água destilada e deixada para secar levemente. Para montar a lâmina foram adicionados 40 µl de DAPI/Antifading e retirado o excesso em papel filtro.

Hibridação in situ fluorescente (FISH)

A FISH foi realizada utilizando a sonda de rDNA 18S clonada de *Omophoita octoguttata* (Almeida et al., 2010) marcada com adenina biotinilada (16 dUTP Roche®) e sonda de rDNA 5S clonada de *O. octoguttata* (Artigo 1 do presente trabalho) obtida por PCR marcado com digoxigenina (11 dUTP Roche®). As reações foram realizadas em um volume final de 50 µL, contendo tampão 1x, 2mM MgCl₂, 400 µM de cada nucleotídeo (dCTP, dGTP e dTTP), 200µM de dATP, 200µM de Digoxigenina 11 dUTP (Roche®) ou Biotina 16 dUTP (Roche®), 0,2µM de cada primer M13 e 2U de Taq DNA polimerase.

A FISH foi realizada de acordo com Pinkel; Straume e Gray (1986), com algumas modificações. As lâminas foram tratadas com RNase 0,4% (RNase/2xSSC) a 37° durante uma hora, pepsina 0,005% (em 10mM HCl) a 37° C por 10 minutos e fixadas com paraformaldeído 4% por 10 minutos. Os cromossomos foram desnaturados em formamida 70% a 70°C, por quatro minutos para a adição da

solução de hibridação. Essa solução continha formamida a 50%, sulfato de dextrano a 10%, 20xSSC, as sondas desnaturadas com uma concentração de 400ng e água q.s.p. 40 µL por lâmina. As lâminas ficaram hibridando *overnight* a uma temperatura de 37°C. No dia seguinte as mesmas foram lavadas com formamida 15% a 42°C em quatro banhos de cinco minutos cada e Tween 0,5% (4xSSC). O sinal foi detectado por antidigoxigenina-rodamina (Roche®) e streptavidina (Roche®). Os cromossomos foram contracolorados com DAPI.

Hibridação in situ do genoma (GISH)

A extração de DNA foi realizada segundo Murray e Thompson (1980). A sonda para DNA genômico de fêmea foi marcada pelo Kit Nick Translation (Digoxigenin – Roche®). A hibridação *in situ* fluorescente (FISH) foi realizada segundo Pinkel; Straume; Gray (1986). Para o reconhecimento do sinal foi utilizado antidigoxigenina-rodamina (Roche®). Os cromossomos foram contracolorados com DAPI

Análise cromossômica

As células mitóticas e meióticas foram analisadas em um microscópio de epifluorescência Olympus BX41. As imagens foram obtidas com a utilização do sistema de captura de imagem em tempo real CCD Olympus DP 71.

Resultados

Coloração Convencional

A análise de células em metáfase espermatogonial de *Systema tenuis* evidenciou-se o número diplóide $2n=32$ cromossomos (Figuras 2A), com predominância de cromossomos submetacêntricos e a presença de cromossomos metacêntricos e acrocêntricos, os quais são cromossomos grandes e com pouca diferença de tamanho. Na maioria das metáfases mitóticas alguns cromossomos apresentam os braços curtos heteropicnóticos positivos e um par possui uma constrição secundária na região distal do braço curto (Figura 2A).

Nas células paquiténicas é possível observar 16 bivalentes com heteropicnose positiva no braço curto de quase todos os bivalentes (Figura 2B). As células metafásicas I, mostram a ocorrência de 15 bivalentes autossômicos e um bivalente na forma de L, evidenciando o sistema neoXY (Figura 2C). O estudo de células metafásicas II evidenciou o complemento haploide de $n=16$, não sendo possível identificar o neoX ou neoY (Figura 2D). Além disso, a análise das células meióticas evidenciou a presença de um cromossomo supranumerário em algumas células (Figuras 2C e 2D).

Coloração Diferencial

A análise das células através de coloração com fluorocromo evidenciou a presença de regiões DAPI positivas e CMA3 negativo na região centromérica de todos os bivalentes e na região pericentromética na maioria dos bivalentes, mostrando que essa região é rica em repetições do tipo AT (Figura 3).

Hibridação *in situ* do genoma (GISH)

As células meióticas de macho submetidas à Hibridação do Genoma *in situ* (GISH) utilizando sonda de fêmea mostraram os bivalentes autossômicos completamente corados em paquíteno e metáfase I. No entanto, um bivalente possui uma região não hibridada com a sonda de fêmea, sendo interpretado como região correspondente ao neoY (Figura 4).

Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH)

O mapeamento dos genes ribossomais 45S e 5S através da FISH evidenciou a presença dos genes ribossomais em vários cromossomos, aproximadamente 10 pares. Para confirmar a associação dos genes ribossomais foi realizada a dupla-FISH que mostrou a colocalização desses genes em alguns dos cístrons analisados. Por outro lado, alguns cístrons estavam em cromossomos separados (Figura 5).

Discussão

Os resultados obtidos para *Systema tenuis* com relação ao número diplóide, haplóide e sistema de determinação sexual são concordantes com dados descritos para *Systema basalis*. *Systema tenuis* possui de $2n=32$ cromossomos $2n=16II$, no entanto não foi possível identificar o neoX ou neoY em metáfase II.

Segundo Virkki (1970) as espécies do gênero *Systema* possuem um sistema de determinação sexual do tipo neo XY, o qual se apresenta em forma de L. No entanto, em *Systema tenuis* a visualização dos cromossomos sexuais é complicada. Assim, a técnica de GISH utilizando sonda de DNA total de fêmea em uma lâmina com cromossomos de macho auxiliou na visualização dos cromossomos sexuais e na comprovação do tipo de sistema de determinação sexual.

Duas tendências podem ser observadas com os dados obtidos; ocorre um aumento do número cromossômico comparado com outras espécies da subfamília Alticinae; e ocorre uma grande variação na distribuição dos genes ribossomais.

A heteropicnose positiva, que geralmente corresponde a região de heterocromatina, é observada nos cromossomos sexuais na maioria dos Coleoptera podendo variar entre os grupos (ALMEIDA; ZACARO; CELLA, 2000; FERREIRA; MESA, 1977; JUAN; PONS; PETITPIERRE, 1993; YADAV, KONDAL; YADAV, 1985). Por outro lado, em *Systema tenuis* ocorreu uma variação, pois, quase todos os cromossomos apresentam heteropicnose positiva no braço curto. As diferenças que envolvem heteropicnose podem ocorrer devido a condensação cromossômica diferencial e/ou a presença de um tipo especial de cromatina (ALMEIDA; ZACARO; CELLA, 2000; VIRKKI, 1967; YADAV; KONDAL; YADAV, 1985).

A região de constrição secundária ocorre em um par cromossômico e provavelmente corresponde a Região Organizadora de Nucléolo (RON). No entanto, os resultados para mapeamento das RON mostram a presença de múltiplas RONS nessa espécie. O mesmo ocorre para *Alagoasa florigera* e *Omophoita magniguttis* (Artigo 2, do presente trabalho) a que apresentam apenas uma região de constrição secundária, mas o mapeamento cromossômico evidencia três pares cromossômicos portadores da RON.

O uso de coloração diferencial DAPI e CMA3 evidenciou regiões ricas em repetições AT centroméricas em todos os cromossomos em região pericentromérica na maioria dos cromossomos, essas marcações são concordantes com aqueles

observados em Tenebrionidae (JUAN; PONS; PETITPIERRE, 1993; PLOHL, et al., 1993; PONS; PETITPIERRE; JUAN, 2002). Por outro lado, em algumas espécies como *Lagria vilosa* (Tenebrionidae), *Gymnopleurus sturni* (Scarabaeidae), *Thorectes intermedius* (Geotrupidae) e *Geniates borelli* (Scarabaeidae) (BIONE; CAMPAROTO; SIMÕES, 2005; COLOMBA; VITTURI; ZUNINO, 2000; GOLL et al. 2012a; VITTURI, et al., 1999) as regiões centroméricas e pericentroméricas são ricas em repetição CG.

O mapeamento do rDNA 5S é recente em Coleoptera. A presença de múltiplos clusters associados a vários pares cromossômicos difere da maioria das descrições até o presente momento para Coleoptera. Segundo Cabral-de-Mello; Moura; Martins (2010, 2011a) a condição ancestral para Coleoptera seria a presença de apenas um par cromossômico portador do gene 5S. No entanto, os trabalhos de Mello et al. (2012, Artigo 1 e 2 do presente trabalho), mostram presença de dois pares portadores o cluster 5S em *Omophoita magniguttis* e três em *Alagoasa florigera*.

A associação entre diferentes famílias gênicas foi descritas algumas vezes para Coleoptera. Até o presente momento existem três tipos de associações diferentes descritas: associações entre rDNA 5S e o gene da histona H3 descrito para Scarabaeidae (CABRAL-DE-MELLO; MOURA; MARTINS, 2010, 2011a). Uma segunda associação descrita em apenas uma espécie de Curculionidae entre 45S e histona (ROEHRDANZ et al., 2010). A associação entre os genes ribossomais 45S e 5S obtida para *Systema tenuis*, também foi descrita para espécie do gênero *Omophoita* e *Alagoasa* (Artigo 1 e 2 do presente trabalho), Scarabaeidae (CABRAL-DE-MELLO et al. 2011d) e Tenebrionidae (GOLL et al., 2012b).

O significado das associações entre diferentes famílias gênicas ainda não foi completamente esclarecido, alguns autores acreditam que essas associações podem ter funções importantes como na organização no núcleo e na manutenção de sequencias conservadas (KAPLAN et al., 1993; LIU; FREDGA, 1999).

Adicionalmente, no presente estudo observou-se também a presença do cluster de rDNA 45S e 5S em cromossomos separados, além dos cístron colocalizados, o qual difere dos resultados encontrados até o momento para Coleoptera. Desta forma, os presentes resultados mostram que espécies da tribo Systemini apresentam processos de diferenciação cariotípica diferente das outras tribos de Alticinae, corroborando a proposta de Virkki (1970). Segundo o autor, essa tribo possui sua própria linha evolutiva independente dos outros grupos, sendo considerado mais basal quando comparado a Oedionychini.

A associação entre os cístrons de rDNA 45S e 5S ocorreu em vários cromossomos. É provável que ocorreu uma co-dispersão, a qual, poderia ser explicada através de DNA circular extracromossômico (Ecc DNA) (COHEN; MENUT; ME´CHALI, 1999; COHEN; YACOBI; SEGAL, 2003; COHEN; HOUBEN; SEGAL, 2008; COHEN et al., 2010; DEGROOTE et al., 1989). Outro modelo de dispersão é através de elementos transponíveis (TE), o qual já foi encontrado associado à genes ribossomais (CABRAL-DE-MELLO et al., 2011b; GILLESPIE, et al., 2006; YE, et al., 2005).

Agradecimento

Esse trabalho teve o apoio da Fundação Araucária de Apoio do Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná, Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq. Os autores são gratos ao Senhor Carlos Campaner pela identificação das espécies.

Referências

As referências citadas nesse capítulo estão listadas no final da dissertação em um único tópico com as demais referencias.



Figura 1 – Exemplar fêmea de *Systema tenuis*, Alticinae

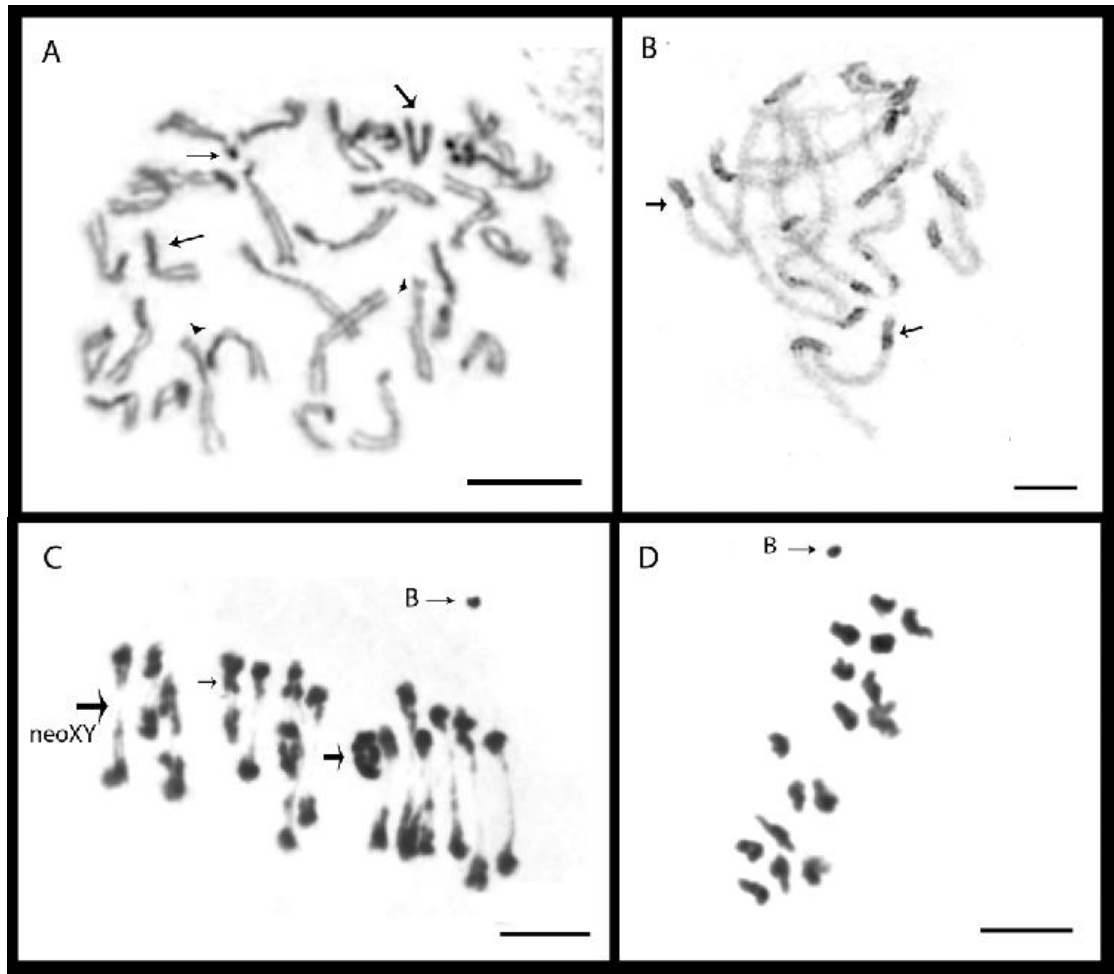


Figura 2 – Células meióticas de *Systena tenuis*. **A.** metáfase espermatogonial evidenciando $2n=32$ cromossomos, a presença de constrição secundária (cabeça da seta) e dos braços curtos heteropícnóticos positivos (seta). **B.** Paquíteno, com 16 bivalentes, mostrando os braços curtos heteropícnóticos positivos (setas). **C.** Metáfase meiótica I evidenciando $2n=15II+neoXY$ e a presença de cromossomos B (seta). **D.** Metáfase meiótica II evidenciando $n=16$ e a presença de um cromossomo B (seta).

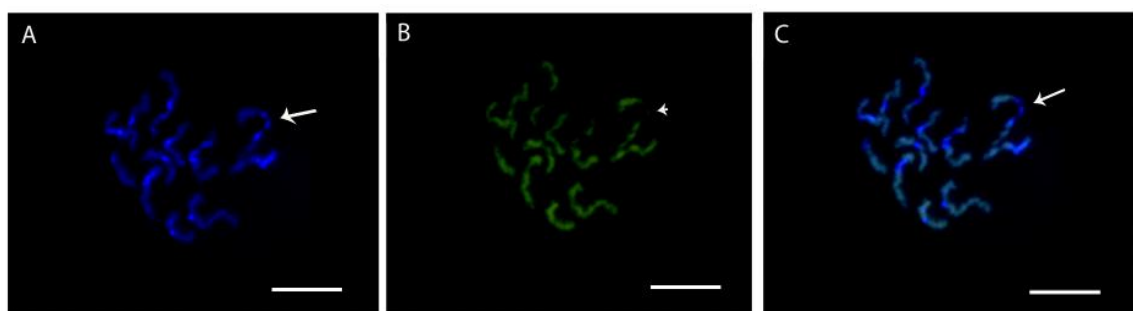


Figura 3 – Células paquítenicas de *Systena tenuis* submetidas à coloração com fluorocromo DAPI (**A.**) e CMA3 (**B.**), evidenciando as regiões DAPI positivas (setas) e as CMA3 negativas (cabeça de seta). **C.** sobreposição das imagens ressaltando as regiões centroméricas ricas em repetições AT (setas). Barra = $10\mu m$

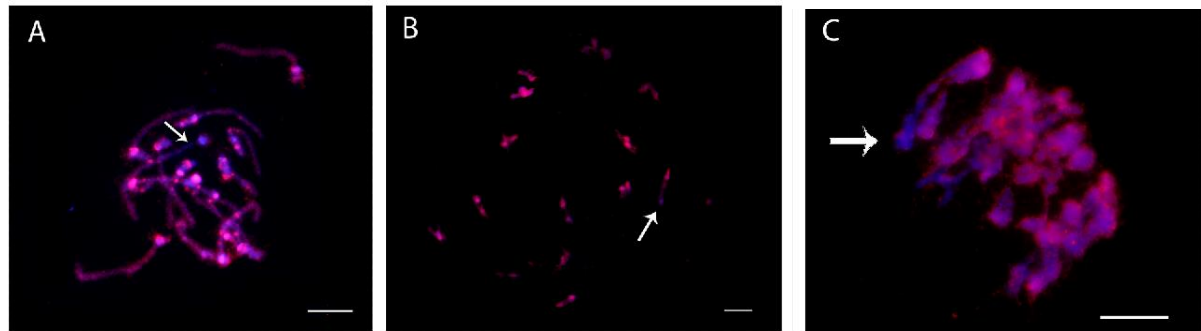


Figura 4 - Células meióticas de macho de *Systema tenuis* submetidas a técnica de GISH utilizando sonda de DNA total de fêmea da mesma espécie. A técnica evidencia a presença dos cromossomos sexuais do tipo neoXY, com o neoY não marcado pela sonda em paquíteno (seta) em **A.**, pré-metáfase I (seta) em **B.**, e em metáfase I em **C.**

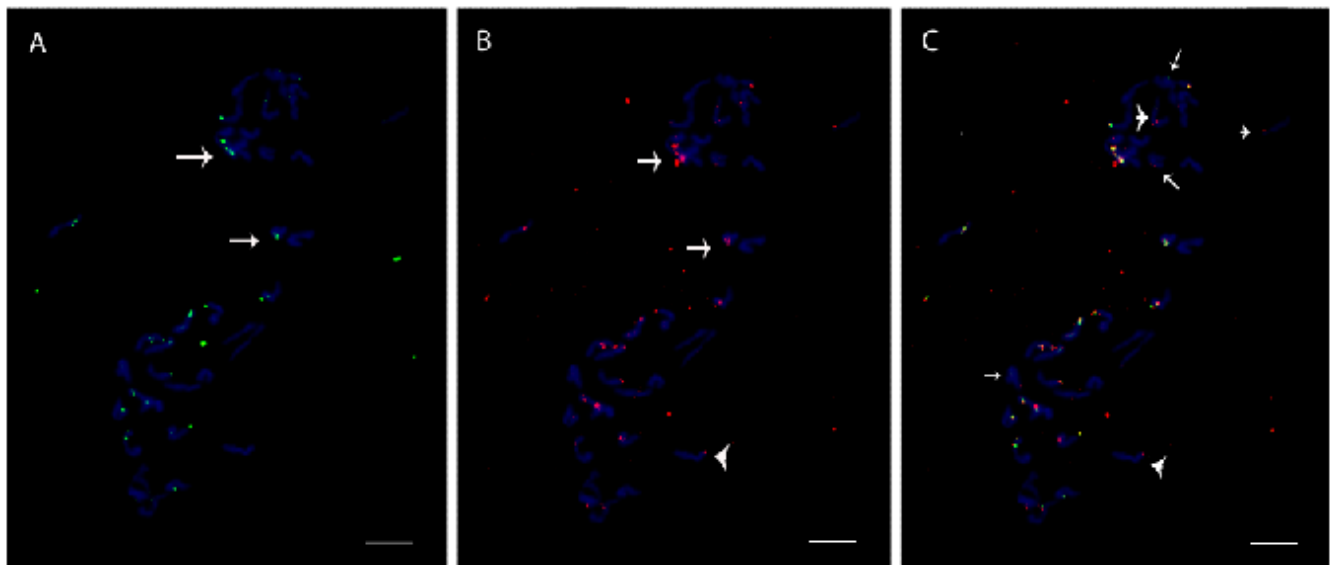


Figura 5 - Células meióticas de macho de *Systema tenuis* submetidas à FISH utilizando sonda de rDNA 18S (verde) e 5S (vermelho) e contracordadas com DAPI (azul). Pré metáfase evidenciando os cromossomos portadores do gene 18S em **A.** (setas) e 5S em **B.** (setas). **C.** Sobreposição das imagens vistas em **A.** e **B.** evidenciando a colocalização de alguns cistrons ribossomais (setas) e cromossomo portador somente do gene 5S (cabeça da seta).

5 Considerações finais

Nosso trabalho foi analisada a distribuição do DNA ribossômico ao nível citogenético em espécies dos gêneros *Omophoita*, *Alagoasa* e *Systema*, contribuindo para os estudos acerca da evolução cromossômica da subfamília Alticinae, além de contribuir com mais informações sobre o mapeamento dos genes ribossomais, o qual é escasso na literatura.

As características cariotípicas encontradas nas espécies do gênero *Omophoita* e *Alagoasa* são concordantes com as descritas anteriormente na literatura. As cinco espécies possuem um cariótipo uniforme de $2n=22=20+X+y$ com cromossomos sexuais gigantes e assinápticos. No entanto sua segregação ocorre corretamente na anáfase I. As espécies analisadas também possuem outra característica conservada que é a presença de constrição secundária no par cromossômico seis.

Os dados de *Systema tenuis* também são concordantes com aqueles descritos para a espécie *Systema basalis*, ambas possuem o mesmo número diploide e sistema de determinação sexual. Essas características são conservadas para a tribo, a qual se diferenciou no sentido de aumento do número cromossômico e derivação do sistema de determinação sexual, diferindo dos Oedionychina, os quais diferenciaram através do aumento do tamanho dos cromossomos sexuais.

Nosso trabalho foi o primeiro a mostrar o mapeamento do gene ribossomal 5S para as espécies da família Chrysomelidae. A presença de um par cromossômico portador do gene rDNA 5S em *O. octoguttata*, *O. personata* e *A. coccinelloide* são concordantes com outros resultados encontrados na literatura para Coleoptera. No entanto, os dois pares encontrados em *O. magniguttis* e os três pares em *A. florigera* mostram uma derivação no cariótipo das espécies desses gêneros. Por mais que os cariótipos sejam similares, sua composição pode variar entre as diferentes espécies.

Através da FISH em fibras cromáticas foi possível mostrar uma associação interespaçada entre os genes ribossomais rDNA 5S e 18S. Os dados disponíveis sobre esse tipo de associação ainda são escassos, porém já é possível notar interessantes padrões de organização molecular desses DNAs, sendo relatada na literatura a associação entre 45S/histona H3, 5S/histona H3 e, neste trabalho, a associação entre 5S e 45S.

A utilização da técnica de Fiber FISH mostrou ser um eficiente método para responder questões que envolvam associações entre diferentes classes de DNAs pois aumentou consideravelmente a resolução do mapeamento físico da dupla FISH, o que permitiu demonstrar que os genes ribossomais estão dispostos de maneira interespaçada no cromossomo.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, M.C.; ZACARO, A.A.; CELLA, D.M. Cytogenetic Analysis of *Epicauta atomaria* (Meloidae) and *Palembus dermestoides* (Tenebrionidae) with Xyp Sex Determination System Using Standard Staining, C-Bands, NOR and Synaptonemal Complex Microspreading Techniques. **Hereditas**, v.133, n. 2, p. 147–157, dec. 2000.
- ALMEIDA, M.C. ; CAMPANER, C. ; CELLA, D.M. Karyotype characterization, constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions of *Paranaita opima* (Coleoptera, Chrysomelidae, Alticinae). **Genetics And Molecular Biology**, v. 29, n. 3, p. 475-481, 2006.
- ALMEIDA, M.C.; CAMPANER, C.; CELLA, D.M. Cytogenetics of four *Omophoita* species (Coleoptera, Chrysomelidae, Alticinae): A comparative analysis using mitotic and meiotic cells submitted to the standard staining and C-banding technique. **Micron**, v. 40, n. 5-6, p. 586–596, jul./aug. 2009.
- ALMEIDA, M.C. et al. Physical mapping of 18S rDNA cistron in species of the *Omophoita* genus (Coleoptera, Alticinae) using fluorescent *in situ* hybridization. **Micron**, v. 41, n. 7, p. 729-734, oct. 2010.
- BARCISZEWSKA, M.Z. et al. The primary structure of *Harpalus rufipes* 5S ribosomal RNA - A contribution for understanding insect evolution. **Molecular Biology Reports**, v. 21, n. 3, p. 165-167, 1995.
- BARROS, A.V. et al. Fiber FISH reveals different patterns of high-resolution physical mapping for repetitive DNA in fish. **Aquaculture**, v. 322, n. 323, p.47-50, 2011.
- BIONE, E.; CAMPAROTO, M. L.; SIMOES, Z.L.P. A study of the constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions of *Isocoprís inhiata* and *Diabroctics mimas* (Coleoptera : Scarabaeidae, Scarabaeinae) using C-banding, AgNO₃, staining and FISH techniques. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, n. 1, p. 111-116, mar. 2005b.
- BIONE, E. et al. Karyotype, C-and fluorescence banding pattern, NOR location and FISH study of five Scarabaeidae (Coleoptera) species. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, n. 3, p. 376-381, sep. 2005a.
- BORROR, D.J.; DELONG, D.M. **Introduction to the Study of Insects**. 7. ed. Thomson Brooks/ Cole, 2005. 864 p.
- CABRAL-DE-MELLO, D.C.; MOURA, R.C.; MARTINS, C. Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the beetle *Dichotomius geminatus* provides the first evidence for an association of 5S rRNA and histone H3 genes in insects, and repetitive DNA similarity between the B chromosome and A complement. **Heredity**, v. 104, n. 4, p. 393–400, apr. 2010.

_____. A Cytogenetic Mapping of rRNAs and Histone H3 Genes in 14 Species of *Dichotomius* (Coleoptera, Scarabaeidae, Scarabaeinae) Beetles. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 134, n. 2, p. 127–135, 2011a.

_____. Evolutionary dynamics of 5S rDNA location in acridid grasshoppers and its relationship with H3 histone gene and 45S rDNA location. **Genetica**, v. 139, n. 7, p. 921–931, jul. 2011b.

_____. Cytogenetic Mapping of 5S and 18S rRNAs and H3 Histone Genes in 4 Ancient Proscopiidae Grasshopper Species: Contribution to Understanding the Evolutionary Dynamics of Multigene Families. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 132, n. 1-2, p. 89–93, 2011c.

_____. 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**, v. 12, n. 88, 2011d.

CABRERO, J. CAMACHO, J.P. Location and expression of ribosomal RNA genes in grasshoppers: abundance of silent and cryptic loci. **Chromosome Research**, v. 16, p. 595–607, 2008.

COHEN, S.; MENUT, S.; ME´CHALI, M. Regulated Formation of Extrachromosomal Circular DNA. Molecules during Development in *Xenopus laevis*. **Molecular and Cellular Biology**, v.19, n. 10, p. 6682–6689, 1999.

COHEN, S.; YACOBI, K.; SEGAL, D. Extrachromosomal Circular DNA of Tandemly Repeated Genomic Sequences in *Drosophila*. **Genome Research**, v. 3, p. 1133–1145, 2003

COHEN, S.; HOUBEN, A.; SEGAL, D. Extrachromosomal circular DNA derived from tandemly repeated genomic sequences in plants. **The Plant Journal**, v. 53, p. 1027–1034, 2008.

COHEN, S.; AGMON, N.; SOBOL, O.; SEGAL, D. Extra chromosomal circles of satellite repeats and 5S ribosomal DNA in human cells. **Mobile**, v.1, n.11, 2010.

COLOMBA, M.S.; VITTURI, R.; ZUNINO, M. Karyotype analysis, banding and fluorescent in situ hybridization in the scarab beetle *Gymnopleurus sturmi* McLeay (Coleoptera Scarabaeoidea: Scarabaeidae). **The Journal of Heredity**, v.31, p.260–264, 2000.

COLOMBA, M.S. et al. FISH mapping of 18S–28S and 5S ribosomal DNA, (GATA)_n and (TTAGGG)_n telomeric repeats in the periwinkle *Melarhaphe neritoides* (Prosobranchia, Gastropoda, Caenogastropoda). **Heredity**, v. 88, p. 381–384, 2002.

COSTA, C. Estado de Conocimiento de lo Coleoptera Neotropicales. **Pribes**, Zaragoza, v. 1, p. 99-114, 2000.

DEGROOTE, F; PONT G.; MICARD, D.; PICARD, G. Extraehromosomal circular DNAs in *Drosophila melanogaster*: Comparison between embryos and Kc0% cells. **Chromosoma**, v. 98, p. 201-206, 1989.

DE LA RÚA, P. et al. Physical mapping of rDNA genes in the ground beetle *Carabus* and related genera (Carabidae: Coleoptera) **Zoo. Syst. Evol. Research**, v. 34, p. 95-101, 1996.

DUTRILLAUX, A.M.; DUTRILLAUX, B. Sex chromosome rearrangements in Polyphaga beetles. **Sexual Development**, v. 3, p. 43-54, 2009.

FERREIRA, A.; MESA, A. Estudos citológicos em três espécies brasileiras de coleópteros (Chrysomelidae, Cerambycidae e Meloidae). **Revista Brasileira de Genética**, v. 37, p. 61-64, 1977.

GALIÁN, J. et al. Localization and activity of rDNA genes in tiger beetles (Coleoptera: Cicindelinae). **Heredity**, v. 74, p. 524-530, 1995.

GALIÁN, J. HUDSON, P. Cytogenetic analysis of Australian tiger beetles (Coleoptera: Cicindelidae): chromosome number, sex-determining system and localization of rDNA genes. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 1, p. 1-6, 1999.

GILLESPIE, J.J. et al. Characteristics of the nuclear (18S, 5.8S, 28S and 5S) and mitochondrial (12S and 16S) rRNA genes of *Apis mellifera* (Insecta: Hymenoptera): structure, organization, and retrotransposable elements. **Insect Molecular Biology**, v. 15, n. 5, p. 657–686, oct. 2006.

GILLOTT, C. **Entomology**. 3. ed. Netherlands: Springer, 2005. 834 p.

GRIMALDI D.; ENGEL, M.S. **Evolution of the insects**. 1. ed. New York: Cambridge University Press, 2005. 770 p.

GOLD, J. R.; SHIPLE, Y. C. LI. N. S.; POWERS, P. K. Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding. **Journal of Fish Biology**. v. 37, n. 4, p. 563-575, 1990.

GOLL, L.G. et al. Cytogenetic Analysis of *Lagria villosa* (Coleoptera, Tenebrionidae): Emphasis on the Mechanism of Association of the Xyp Sex Chromosomes. **Cytogenetic and Genome Research**, 2012a.

GOLL, L.G. et al. **Análise citogenética em *Lagria villosa* (Coleoptera, Tenebrionidae): ênfase na evolução cromossômica**. 2012, 99 f. Dissertação de mestrado (Biologia Evolutiva) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2012b.

JOLIVET, P; HAWKESWOOD, T. **Host-plants of Chrysomelidae of the World**. The Netherlands: Backhuys Publishers, 1995.

JUAN, C.; PETITPIERRE, E. Karyological differences among Tenebrionidae (Coleoptera). **Genetica**, v.80, p.101-108, 1990.

JUAN, C.; PONS, J.; PETITPIERRE, E. Localization of tandemly repeated DNA sequences in beetle chromosomes by fluorescent *in situ* hybridization. **Chromosome Research**, v. 1, p. 167-174, 1993.

JUAN, C.; VAZQUEZ, P.; RUBIO, J.M.; PETITPIERRE, E.; HEWITT, G.M. Presence of highly repetitive DNA sequences in *Tribolium* flour-beetles. **Heredity**, v.70, p.1-8, 1993.

KAPLAN F.S. et al. The topographic organization of repetitive DNA in the human nucleolus. **Genomics**, v. 15, p. 123-132, 1993.

LAWRENCE, J. F.; BRITON, E. B. **Australian Beetles**. Carlton: Melbourne University Press. 1994, 192p.

LIU, W.S.; FREDGA, K. Telomeric (TTAGGG)_N sequences are associated with nucleolus organizer regions (NORs) in the wood lemming. **Chromosome Research**, v. 7, p. 235-240, 1999.

LONG, E.O.; DAWID, I.B. Repeated genes in Eukaryotes. **Annual Reviews Biochemistry**, v. 49, p. 727-764, 1980.

MAFFEI, E.M.D. GASPARINO, E.; POMPOLO, S.G. Karyotypic characterization by mitosis, meiosis and C – banding of *Eriopsis connexa* Mulsant (Coccinellidae: Coleoptera: Polyphaga), a predator of insect pests. **Hereditas**, v. 132, p. 79 – 85, 2000.

MARTINS, C. et al. A tandemly repetitive centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) is derived from 5S rDNA. **Genetica**, v. 127, n. 1-3, p. 133–141, may. 2006.

MUÑOZ-PAJARES et al. A Single, Recent Origin of the Accessory B Chromosome of the Grasshopper *Eyrepocnemis plorans*. **Genetics**, v. 187, n. 3, p. 853-863, 2011.

MURRAY, M.G.; THOMPSON, W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 8, p. 4321 – 4326, 1980.

OLIVEIRA, N.L. et al. Chromosomal mapping of rDNAs and H3 histone sequences in the grasshopper *Rhammatocerus brasiliensis* (Acrididae, Gomphocerinae): extensive chromosomal dispersion and co-localization of 5S rDNA/H3 histone clusters in the A complement and B chromosome Molecular. **Cytogenetics**, v. 4, n. 24, 2011.

OLIVEIRA, S.G. et al. Heterochromatin, Sex Chromosomes and rRNA Gene Clusters in *Coprophanaeus* Beetles (Coleoptera, Scarabaeidae). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 138, p. 46-55, 2012.

PENDÁS, A. M.; MORÁN, P.; GARCÍA-VÁZQUEZ, E. Ribosomal RNA genes are interspaced throughout a heterochromatic chromosome arm in *Atlantic salmon*. **Cytogenet Cell Genet**, v. 63, p.128-130, 1993.

PETITPIERRE, E. Cytogenetics, cytotaxonomy and genetics of Chrysomelidae. In: JOLIVET, P.; PETITPIERRE, E.; HSIAO, T.S. **Biology of the Chrysomelidae**. Netherlands: Kluwer Acad. Publ. Dordrecht, 1988, cap. 9, p.131-159.

_____. Molecular cytogenetics and taxonomy of insects, with particular reference to the Coleoptera. **International Journal of Insect Morphology & Embryology**, v. 25, p. 115-134, 1996.

_____. A new contribution to the cytogenetic knowledge of Alticinae (Coleoptera, Chrysomelidae). **Hereditas**, v. 143, p. 58 – 61, 2006.

PETITPIERRE, E.; SEGARRA, C.; YADAV, J.S.; VIRKKI, N. Chromosomes numbers and meioformula of Chrysomelidae. In: JOLIVET, P.; PETITPIERRE, E.; HSIAO, T. S. **Biology of the Chrysomelidae**. Netherlands: Kluwer Acad. Publ. Dordrecht, 1988, cap. 11, p.187-203.

PETITPIERRE, E.; SEGARRA, C.; JUAN C. Genome size and chromosomal evolution in leaf beetles (Coleoptera: Chrysomelidae). **Hereditas**, v.119, p. 1-6,1993.

PINKEL D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic Analysis Using Quantitative, High- Sensitivity, Fluorescence Hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 83, n. 9, p. 2934–2938, 1986.

PLOHL, M.; LUCIJANIC-JUSTIC, V.; HUGARKOVIC, D.; PETITPEIRRE, E. JUAN, C. Satellite DNA and heterochromatin of the flour beetle *Tribolium confusum*. **Genome**, v.36, p. 467-75, 1993.

PONS, J.; PETITPIERRE, E.; JUAN, C. Evolutionary Dynamics of Satellite DNA Family PIM357 in Species of the Genus *Pimelia* (Tenebrionidae, Coleoptera). **Molecular Biology e Evolution**, v.19, p.1329-1340, 2002.

PONT, F.; DEGROOTE, G.; PICARD, G. Some Extrachromosomal Circular DNAs from *Drosophila* Embryos are Homologous to Tandemly Repeated Genes. **Journal Molecular Biological**, v. 195, 1987.

POSTIGLIONI, A.; BRUM-ZORRILLA, N. Non-relationship between nucleolus and sex chromosomes system Xyp in *Chelymorpha variabilis* boheman (Coleoptera: Chrysomelidae). **Genetica**, v. 77, p. 137-141, 1988.

POSTIGLIONI, A.; MAZZELLA, M.C.; PANZERA, F.; SILVA, A.; LEÓN, R.P.; KVASINA, L.; SCVORTZOFF. Sex chromosomes of neotropical coleoptera from Uruguay. The Nucleos, v. 33, p. 25 – 30, 1990.

POSTIGLIONI, A.; STOLL, M.; BRUMZORRILLA, N. Haploid karyotype analysis of *Chelymorpha-variabilis* boheman (Coleoptera-Chrysomelidae) with microspreading techniques. **Revista Brasileira de Genética**, v. 14, p. 653-660, 1991.

PROENÇA, S.J.R.; SERRANO A.R.M.; COLLARES-PEREIRA M.J. An unusual karyotype with low chromosome number in *Megacephalini*, a basal group of tiger beetles (Coleoptera, Cicindelidae): cytogenetic characterization by C-banding and location of rDNA genes. **Hereditas**, v. 137, p. 202–207, 2002a.

_____. Cytogenetic variability in genus *Odontocheila* (Coleoptera, Cicindelidae): karyotypes, C-banding, NORs and localization of ribosomal genes of *O. confusa* and *O. nodicornis*. **Genetica**, v. 114, p. 237–245, 2002b.

ROEHRDANZ, R. Histone and ribosomal RNA repetitive gene clusters of the boll weevil are kinked in a tandem array. **Insect Molecular Biology**, v. 19, n. 4, p. 463-471, 2010.

ROZEK, M.; LACHOWSKA, D.; PETITPIERRE, E.; HOLECOVÁ, M. C-bands on chromosomes of 32 beetle species (Coleoptera: Elateridae, Cantharidae, Oedemeridae, Cerambycidae, Chrysomelidae and Curculionidae). **Hereditas**, v.140, p. 1-10, 2004.

SEGARRA, C.; PETITPIERRE, E. Cytogenetic diversity of the European Psylliodes Flea-Beetles (Coleoptera, Chrysomelidae). **Hereditas**, v. 110, p. 169 – 74, 1989.

SCHNEIDER, M.C. et al. Chromosomal similarities and differences among four Neotropical Elateridae (*Conoderini* and *Pyrophorini*) and other related species, with comments on the NOR patterns in Coleoptera. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 45, n. 4, nov. 2007.

SCHNEIDER, M.C.; CELLA, M.D. Karyotype Conservation in 2 Populations of the Parthenogenetic Scorpion *Tityus serrulatus* (Buthidae): rDNA and Its Associated Heterochromatin Are Concentrated on Only One Chromosome. **Heredity**, 2010.

SCHWEIZER, D. Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatin regions (DA-DAPI bands) in human chromosomes. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v.27, p.190-3, 1980.

SEGARRA, C. PETITPIERRE, E. Chromosomes of sixteen European species of Longitarsus flea-beetles (Coleoptera, Chrysomelidae). **Genetica**, v. 76, p. 203-208, 1988.

SMITH, S.G. VIRKKI. **Animal cytogenetic**. 3. ed. Berlin: Gebruder Borntraeger 1978. 366 p.

SRIKULNATH K. et al., Karyological Characterization of the Butterfly Lizard (*Leiolepis reevesii rubritaeniata*, Agamidae, Squamata) by Molecular Cytogenetic Approach. **Cytogenetic and Genome Research**, v.125, p. 213-223, 2009.

TRAUT, W. et al., Molecular differentiation of sex chromosomes probed by comparative genomic hybridization. *Chromosoma*, v. 108, p. 173 – 180, 1999.

TRAUT, W. The evolution of sex chromosomes in insects: Differentiation of sex chromosomes in flies and moths. *European Journal of Entomology*, v. 96, p. 227 – 235, 1999.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J.; CLUSTAL W. Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment Through Sequence Weighting, Position-specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice. **Nucleic Acids Research**, n. 22, p. 4673 – 4680, 1994.

VANIN A.V; IDE I. Classificação Comentada de Coleoptera. **Pribes**, Zaragoza, v. 2, p. 193–205, jul. 2002.

VIRKKI, N. Non-conjugation and late conjugation of the sex cromossomes in the beetles of the genus *Alagoasa* (Chrysomelidae: Alticinae). **Annales Academiae Scientiarum Fennicae**. Series A IV – Biologia, v. 54, p. 1-22, 1961.

_____. Rapid allocyclic changes in the centric and arm segment of the X chromosome in the meiosis of male *Omophoita superba* Weise (Coleoptera, Alticidae). **Hereditas**, v. 262-264, 1967.

_____. Regular segregation of seven asynaptic sex chromosomes in the male of *Asphaera daniela* Bechyné (Coleoptera, Alticinae). **Caryologia**, v.21, n.1, p. 47-51, 1968.

_____. Sex cromossomes and karyotypes of the Alticidae (Coleoptera). **Hereditas**, v. 64, p. 267-282, 1970.

_____. Meiotic orientation and segregation of asynaptic Sex chromosomes in Alticidae (Coleoptera). *Anales de La Escuela Nacional de Ciencias Biologicas*, v.XX, p. 35-51, 1973.

_____. Prophase of spermatocytes I in Oedionychina (Coleoptera). **The journal of Agriculture oh the University of Puerto Rico**, v. LX, p. 661-674, 1976.

_____. Pre-reduction of the X-chromosome in Lycidae (Coleoptera: Cantharoidea). **Genética**, v.49, p. 229-232, 1798.

_____. Banding of Oedionychina (Coleoptera: Alticinae) cromossomes C- and Ag-bands. **journal of Agriculture oh the University of Puerto Rico**, v.67, p. 221-255, 1983.

_____. The cytogenetic system of Oedionychina (Alticinae). **First International Symposium on the Chrysomelidae**, v. 3, p. 489 – 497, 1985.

_____.1988. Cytotaxonomy of Alticinae. In: JOLIVET, P.; PETITPIERRE, E.; HSIAO, T. S. **Biology of the Chrysomelidae**. Netherlands: Kluwer Acad. Publ. Dordrecht, 1988, cap. 11, p. 187-203.

_____. Proximal vs. distal collochores in Coleopteran chromosomes. **Hereditas**, v. 110, p. 101-107, 1989.

VIRKKI, N. SANTIAGO-BLAY, J.A. CLARK, S.M. Chromosomes of some Puerto Rican Disonychina and Oedionychina (Coleoptera: Chrysomelidae: Alticinae: Oedionychini): evolutionary implications.ic **Psyche**, v. 98, p. 373-390, 1991.

VIRKKI, N.; MAZZELLA, C.; DENTON, A. Silver straining of the coleóptera Xyp sex bivalente. **Cytobios**, v. 67, p. 45-63, 1991.

VIRKKI, N. SANTIAGO-BLAY, J. A. Trends of karyotype evolution in neotropical Oedionychina (Coleoptera: Chrysomelidae: Alticinae). **Hereditas**, v. 119, p. 63-283, 1993.

_____. Chromosomes of some Puerto Rican flea beetles (Coleoptera: Chrysomelidae: Alticinae): multiple cytogenetic evolutionary tendencies in neotropics. **Journal Zoological Evolution Research**, v. 32, p. 113-119, 1996.

VITTURI, R.; COLOMBA, M.S.; BARBIERI, R.; ZUNINO, M. Ribosomal DNA location in the scarab beetle *Thorectes intermedius*(Costa) (Coleoptera: Geotrupidae) using banding and fluorescent in-situ hybridization. **Chromosome Research**, v.7, p. 255-260, 1999.

VITTURI, R. et al. rDNA (18S–28S and 5S) Colocalization and Linkage Between Ribosomal Genes and (TTAGGG)_n Telomeric Sequence in the Earthworm, *Octodrilus complanatus* (Annelida: Oligochaeta: Lumbricidae), Revealed by Single- and Double-Color FISH. **Heredity**, v. 93, n. 4, p. 279-282, 2002.

VITTURI, R. et al. Repetitive DNAs in the slug *Milax nigricans*: association of ribosomal (18S-28S and 5S rDNA) and (TTAGGG)_n telomeric sequences in the slug *M. nigricans* (Mollusca : Gastropoda : Pulmonata). **Micron**, v. 35, n. 4, p. 255-260, 2004.

ZHANG, Z.; SCHWARTZ, S.; WAGNER, L.; MILLER, W. A Greedy Algorithm for Aligning DNA Sequences. **Journal of Computational Biology**. v. 7, n.1–2, p. 203 – 514, 2000.

YADAV, J.S.; KONDAL, K.; YADAV, A.S. Karyotypic notes on 12 species of Carabid beetles (Caraboidea: Adephaga) from Haryana. **Zoologischer Anzeiger Jena**, v.215, n.5/6, p. 338-47, 1985.

YE, J. et al. Competition between R1 and R2 transposable elements in the 28S rRNA genes of insects. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 110, n. 1-4, p. 299–306, 2005.

7 Anexos

7.1 Citogenética Convencional

7.1.1 Metodologia para estudo de cromossomos obtidos a partir de gônadas descrita por Almeida; Zacaro; Cella (2000).

1. Dissecar o animal em solução fisiológica para insetos, retirar a gônada e transferi-la para uma placa de Petri contendo solução hipotônica (água de torneira), durante 5 minutos;
2. Fixar o órgão em Carnoy I (metanol-ácido acético na proporção 3:1), durante 30 minutos;
3. Macerar o órgão sobre uma placa de metal à temperatura média de 35 a 40°C.

7.1.2 Coloração Convencional Segundo Giemsa

Para análise das preparações citogenéticas as lâminas foram coradas, à temperatura ambiente, durante 10 minutos, com uma solução contendo 47 ml de água destilada, 1,5 ml de solução comercial de Giemsa (Merck) e 1,5 ml de tampão fosfato pH 6.8; então foram lavadas em água destilada e secas ao ar.

7.1.3 Coloração como fluorocromo Cromomicina (CMA3) contracorada com 4 6-Diamino-fenil-indol (DAPI), segundo Schweizer (1980), com algumas modificações.

1. seguir o procedimento para obtenção das preparações;
2. colocar sobre a lâmina, contendo o material, 100 µl de solução de Cromomicina A3 (5mg de Cromomicina A3 + 5ml de água destilada + 5 ml de tampão McIlvaine + 2,37mg de MgCl₂), cobrir com lamínula e deixar no escuro por 60 minutos;
3. a seguir, escorrer a lamínula e lavar com um jato de água corrente, para retirar o excesso do corante;
4. mergulhar a lâmina em uma cubeta contendo tampão McIlvaine deixar por 15 minutos e secar ao ar;
5. colocar a lâmina em uma cubeta contendo solução de DAPI (0,3 µl/ml), recém preparada, durante 15 minutos, no escuro;

6. lavar a lâmina com um jato de água corrente, para retirar o excesso do fluorocromo;
7. mergulhar a lâmina em uma cubeta contendo tampão McIlvaine, por 5 minutos e secar ao ar;
8. colocar sobre a lâmina uma gota de meio de montagem (25ml de tampão MacIlvaine

7.1.4 Análise Cromossômica

As melhores células mitóticas e meióticas, com coloração convencional e diferencial, foram fotografadas em um microscópio de epifluorescência Olympus BX41 com objetiva 100 de imersão, com filtros específicos e capturadas com câmera digital em tempo real CCD DP-71 (Olympus) e analisadas no software DP controller. A montagem dos cariótipos foi feita de acordo com o tamanho e a morfologia dos cromossomos, os quais foram dispostos em ordem decrescente e aos pares, obedecendo o critério da razão de braços proposta por Levan, Fredga e Sandberg (1964)

7.2 Citogenética Molecular

7.2.1 Extração de DNA segundo Murray; Thompson (1980), com modificações.

Tampão de extração sem CTAB. Para 15 mL de solução tampão:

5mL de NaCl 5M ([] final 1M)

5mL EDTA 0,5M ([] final 0,1M)

5mL TRIS-HCl 1M pH 8.0 ([] final 0,1M)

Guardar o tampão de extração em temperatura ambiente.

1. Em um tubo de 1,5mL colocar o tecido (cabeça, pronoto e fêmures), 180µL de tampão sem CTAB, 120µL de CTAB 5%, 15µL de proteinase K (10mg/mL) e 5µL de DTT (1M) ou 5µL de B mercaptoetanol.
2. Colocar a 50°C por 10 horas (overnight) ou até que o tecido esteja totalmente digerido;
3. Adicionar 10µL de RNase (10mg/mL);
4. Colocar a 37°C, em banho-Maria, por 2 horas;

5. Adicionar 600µL de clorofórmio;
6. Inverter os tubos suavemente durante 5 minutos;
7. Centrifugar a 8.000 rpm por 5 min a 4°C;
8. Retirar sobrenadante e transferir para um novo tubo;
9. Adicionar 600 µL de etanol 100% gelado e deixar a –20°C por 2 horas;
10. Centrifugar a 14.000 rpm por 15 min a 4°C.
11. Descartar o sobrenadante;
12. Lavar o pellet com 200µL de etanol 70% gelado;
13. Centrifugar por 3 min a 10.000 rpm a 4 °C ;
14. Descartar o sobrenadante;
15. Lavar o pellet com 200 µL de etanol 100% gelado;
16. Centrifugar por 3 min a 10.000 rpm a 4 °C;
17. Descartar o sobrenadante;
18. Deixar secar na estufa a 37°C;
19. Ressuspender em 40µL de água mili-Q ou TE.

7.2.2 Clonagem

Transformação

1. Tirar a bactéria competente do -80°C e deixar em gelo;
2. adicionar 1-10 l de plasmídeo (fechado ou produto de ligação) à bactéria competente;
3. deixar 10 minutos no gelo;
4. deixar em banho-maria 42°C por 90 segundos;
5. deixar 1 minuto no gelo;
6. adicionar 800 l de LB líquido;
7. deixar por 1 hora a 37°C;

PLAQUEAR:

8. derreter LB ágar e 2 fazer placas com 20 ml de ágar + antibiótico de interesse

9. (Opcional!) Uso de plasmídeos com diferenciação de colônias azul/branco: utilizando a alça de Drigalsky, espalhar sobre a placa 50 l de IPTG (200 mM) e 40 l de X-GAL (0,2%).
10. Centrifugar a cultura de bactérias por 2 minutos a 5000 rpm, descartar 600 l de meio e mexer para dissolver o pellet formado e espalhar com a alça de Drigalsky sobre a placa;
11. Deixar placa na estufa 37°C overnight;
12. Crescidas as colônias bacterianas, vedar as placas com parafilm e deixá-las na geladeira 4°C.

Mini preparação Plasmidial

Solução I:

- 60 l de RNase (20mg/ml)
- 300 l de Tris-HCl 1M
- 60 l EDTA 0,5M
- 2580 l água

Solução II:

- 600 l de NaOH 1M
- 300 l de SDS 10%
- 2100 l água

Solução III:

- 1800 l de acetato de potássio 5M
- 345 l de ácido acético
- 855 l água

PRÉ-INÓCULO: Picar uma colônia bacteriana com um palito autoclavado e fazer o pré-inóculo em 5 ml de LB líquido (adicionar antibiótico de interesse). Deixar a cultura a 200 rpm overnight a 37°C.

1. Deixar a centrifuga a 4°C;

2. Depois da cultura bacteriana ter crescido overnight, centrifugá-la em um eppendorf por 30 segundos em velocidade máxima;
3. Adicionar 400 l da **solução** e vortexar bem;
4. Adicionar 400 l da **solução** e inverter o tubo até ficar viscoso;
5. Adicionar 400 l da **solução** e inverter o tubo;
6. Centrifugar por 5 minutos em velocidade máxima;
7. Transferir o sobrenadante para um tubo limpo e realizar uma nova centrifugação por 5 minutos em velocidade máxima;
8. Transferir o sobrenadante para um tubo que contenha 400 l de isopropanol 100% e incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente;
9. Centrifugar por 10 minutos em velocidade máxima e descartar sobrenadante;
10. Adicionar 200 l de etanol 70% gelado e centrifugar por 5 minutos; descartar o sobrenadante;
11. Adicionar 200 l de etanol 100% gelado e centrifugar por 5 minutos; descartar o sobrenadante;
12. Secar na estufa a 37°C;
13. Adicionar 20 l de água ou TE para ressuspender.

7.2.3 Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) (PINKEL; STRAUME; GRAY, 1986)

Preparação das Lâminas e Hibridação

1. Lavar as lâminas em tampão PBS 1x durante 5 min. em temperatura ambiente;
2. Desidratar as lâminas em série alcoólica 70, 85 e 100%, 5 min cada;
3. Incubar as lâminas em 100 l de RNase (0,4% RNase/2xSSC) a 37 C por 1h em câmara úmida com água milli-Q;
4. Lavar 3 x por 5 min em 2xSSC;
5. Lavar durante 5 min em PBS 1x.
6. Incubar as lâminas por 10 min em solução de pepsina 0,005% (em 10mM HCl) a 37 C;

7. Lavar em PBS 1x durante 5 min (shaker) a temperatura ambiente;
8. Fixar em paraformaldeído 4% durante 10 min a temperatura ambiente;
9. Lavar em PBS 1x por 5 min;
10. Desidratar as lâminas em série alcoólicas (70,85, 100 %) por 5 min cada; voltar cada álcool em seu frasco.
11. Simultaneamente a desidratação em série alcoólica desnaturar a solução de hibridação a 100°C por um período de 10 min e passá-la imediatamente ao gelo;
12. Desnaturar o DNA cromossômico com formamida 70% em 2xSSC a 70°C por 4 min;
13. Desidratar o material em série alcoólica 70, 85 e 100% durante 5 min cada.
14. Preparar a câmara úmida a 37°C ;
15. Montar cada lâmina com 40 l de solução de hibridação, cobrir com lamínula e deixar overnight a 37°C;

Lavagens

16. Lavar 4 vezes em formamida 15%/0,2xSSC pH 7.0 a 42 °C durante 5 min cada;
17. Lavar durante 5 min em solução de Tween 0,5%/4xSSC, ambiente;

Deteccção e amplificação do Sinal

18. Incubar as lâminas em tampão 5% NFDM/4xSSC por 15 minutos;
19. Lavar 2 x 5min com Tween 0,5%/4xSSC, ambiente;
20. Incubar as lâminas com 90 l de FITC (0,1 l FITC/100 l NFDM) durante 30 min em câmara úmida e escura, a temperatura ambiente;
21. Lavar 3 x 5min com Tween 0,5%/4xSSC, ambiente;
22. Incubar com 90 l de anti-avidina (1 l anti-avidina/100 l de NFDM) durante 30 min em câmara úmida e escura, a temperatura ambiente;

Montagem da Lâmina

31. Misturar 200 µl de antifading mais 1 µl de DAPI -4'-6 diamidino -2 -phenilindole (50 µg/ml).

32. Colocar 30 µl da solução e cobrir com lamínula. Guardar no escuro