

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

MATHEUS AZAMBUJA DOS SANTOS

FILOGEOGRAFIA DE *Omophoita octoguttata* Fabricius (1775) (COLEOPTERA:
ALTICINAE) NA REGIÃO SUL DO BRASIL E DIFERENCIAÇÃO DE ESPÉCIES
CRÍPTICAS PERTENCENTES AO GÊNERO *Alagoasa* Bechyné (1955)
(COLEOPTERA: ALTICINAE)

PONTA GROSSA

2018

MATHEUS AZAMBUJA DOS SANTOS

FILOGEOGRAFIA DE *Omophoita octoguttata* Fabricius (1775) (COLEOPTERA:
ALTICINAE) NA REGIÃO SUL DO BRASIL E DIFERENCIAÇÃO DE ESPÉCIES
CRÍPTICAS PERTENCENTES AO GÊNERO *Alagoasa* Bechyné (1955)
(COLEOPTERA: ALTICINAE)

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 obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Biologia Evolutiva).

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Mara Cristina de Almeida Matiello
Coorientador: Prof. Dr. Mateus Henrique Santos

PONTA GROSSA

2018

S237	Santos, Matheus Azambuja dos Filogeografia de <i>Omophoita octoguttata</i> Fabricius (1775) (Coleoptera: Alticinae) na Região Sul do Brasil e diferenciação de espécies crípticas pertencentes ao gênero <i>Alagoasa</i> Bechyné (1955) (Coleoptera: Alticinae)/ Matheus Azambuja dos Santos. Ponta Grossa, 2018. 104 f., il. Dissertação (Mestrado em Biologia Evolutiva – Área de concentração – Biologia Evolutiva), Universidade Estadual de Ponta Grossa; Universidade Estadual do Centro-Oeste. Orientadora: Profa. Dra. Mara Cristina de Almeida Matiello Coorientador: Prof. Dr. Mateus Henrique Santos 1. Estruturação populacional. 2. FISH. 3. rDNA. 4. Telômero. 5. Besouros-pulga. I. Matiello, Mara Cristina de Almeida. II. Santos, Mateus Henrique. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa; Universidade Estadual do Centro Oeste - Mestrado em Biologia Evolutiva. IV. T. CDD : 575
------	---



Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva



PAPA

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. 03/2018

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, pelo candidato **Matheus Azambuja dos Santos**.

Aos vinte e seis dias do mês de fevereiro de dois mil e dezoito, no auditório do Programa, 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) **Matheus Azambuja dos Santos**, 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, Dr. Daniel Pacheco Bruschi (UFPR) e Dr^a Michelle Orane Schemberger (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 o candidato passou a defesa de sua dissertação intitulada: **"Filogeografia de *Omophoita octoguttata* Fabricius (1775) (Coleoptera: Alticinae) na Região Sul do Brasil e Diferenciação de Espécies Crípticas Pertencentes ao Gênero *Alagoasa* Bechyné (1955) (Coleoptera: Alticinae)".** Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento e a Comissão Examinadora considerou o (a) candidato (a) **APROVADO**. 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 sessenta 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 90 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, 26 de fevereiro de dois mil e dezoito.

Prof^a Dr^a Mara Cristina de Almeida Matiello (UEPG) _____

Prof. Dr. Daniel Pacheco Bruschi (UFPR) _____

Prof^a Dr^a Michelle Orane Schemberger (UEPG) _____

Dedico este trabalho
aos meus pais Airton
e Adriana.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, sendo grato pelas pessoas que colocou em minha vida, por ser meu refúgio, por me dar força nos momentos difíceis, me ajudar a superar as adversidades da vida e a entender que nem sempre as coisas são como queremos.

Sou imensamente grato aos meus pais, os quais sempre me apoiaram nas minhas escolhas, ajudando tanto de maneira financeira quanto emocional para que eu pudesse alcançar os meus objetivos. Agradeço pela educação que me foi dada, a qual é grande responsável pela pessoa e pelo profissional que sou. Agradeço ao meu irmão Bruno e a toda a minha família pelo apoio e momentos de alegria.

Agradeço a minha orientadora prof.^a Dr.^a Mara Cristina de Almeida, por todas as oportunidades dadas, desde a graduação, aceitando me orientar na IC, no TCC e agora no mestrado, sendo sempre prestativa e acessível. Da mesma forma agradeço ao Prof. Dr. Mateus Henrique Santos.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva e ao Laboratório de Genética Evolutiva por toda a estrutura e apoio para o desenvolvimento desta pesquisa, bem como à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela bolsa concedida.

Agradeço também a todos os professores do PPGBioEvol, pelos ensinamentos compartilhados e momentos de descontrações, saibam que vocês contribuíram com a minha formação. À Zoli, secretária do PPGBioEvol, por ajudar com as dúvidas e a resolvê-las, da mesma forma a Cleonice, secretária acadêmica *Stricto Sensu*, sempre prestativa.

Ao doutorando Lucas Rosolen, o qual nunca negou ajuda no laboratório e sempre esteve disposto a me auxiliar, e foi quem me ensinou grande parte das técnicas que sei hoje, podendo ser considerado um coorientador.

Agradeço aos meus amigos e colegas de laboratório e de mestrado pelo bom relacionamento que temos, pelos momentos de descontrações e brincadeira, pelos almoços no RU, e por toda a ajuda que me deram. Não podendo deixar de mencionar o Bruno, Fernanda, Augusto e Ana Paolla.

Ao Prof. Dr. Marcelo Vicari, o qual considero um amigo e tenho imenso respeito, por todos os conselhos dados, principalmente nos momentos difíceis, por todas as dúvidas tiradas, pelos churrascos, momentos de descontração e brincadeiras, assim como à Prof. Dr.^a Viviane Vicari. Que a nossa amizade prevaleça e seja cada vez mais forte.

Por fim agradeço aos meus amigos pessoais, que sempre me apoiaram, e a todos que de alguma forma contribuíram com este trabalho.

“Daqui a alguns anos você estará mais arrependido... Explore. Sonhe. Descubra.”

(Mark Twain)

“As pessoas que vencem neste mundo são as que procuram as circunstâncias de que precisam e, quando não as encontram, as criam.”

(George Bernard Shaw)

“Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Se estamos possuídos por uma inabalável determinação, conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho.”

(Dalai Lama)

RESUMO

Coleoptera é a ordem mais diversa entre os seres vivos, correspondendo a cerca de 40% dos insetos e 30% dos animais conhecidos. A subfamília Alticinae compreende 10.000 espécies, e seus indivíduos são conhecidos popularmente como besouros-pulgas. Além disso, este grupo ocorre em maior quantidade em áreas degradadas, de sucessão primária e de borda. A espécie *Omophoita octoguttata*, apresenta distribuição Neotropical, e é encontrada na mata Atlântica nas regiões Sul e Sudeste do Brasil; entretanto, sabe-se que esta vegetação sofre processos de desmatamento, e poucas áreas preservadas restaram, podendo assim interferir na dispersão das espécies. Do ponto de vista citogenético, a subtribo Oedionychina apresenta características interessantes para serem estudadas, como, cromossomos sexuais gigantes assinápticos, número diploide $2n=22$ e sistema de determinação sexual do tipo X+y, na maioria das suas espécies, bem como muitas espécies com problemas de identificação e miméticas. Assim, o objetivo deste estudo foi determinar a existência de estruturação populacional de *O. octoguttata* na região Sul do Brasil, a fim de inferir sobre barreiras naturais à dispersão e a presença de uma descontinuidade filogeográfica latitudinal para Alticinae nesta região. Conjuntamente foram analisadas três espécies crípticas pertencentes ao gênero *Alagoasa*, possivelmente miméticas, para diferenciá-las por meio da citogenética e da genética molecular. Para análise populacional de *O. octoguttata* utilizou-se sequências amplificadas a partir dos genes mitocondrial citocromo oxidase I (COI) e do fator de alongação (EF1-alfa) em 90 indivíduos coletados em 6 diferentes localidades nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. A diversidade haplotípica e nucleotídica foi alta em todas as localidades analisadas. Para o gene EF1-alfa, foram observados muitos haplótipos diferentes, indicando que o gene não é um bom marcador populacional para a análise realizada neste trabalho para esta espécie. A presença de uma descontinuidade filogeográfica para Alticinae não foi observada na Mata Atlântica da região Sul do Brasil, uma vez que indivíduos pertencentes a localidade de Nonoai, situada mais ao Sul, ainda mantém fluxo gênico com as localidades mais ao norte, possivelmente utilizando das áreas de borda dos fragmentos de Mata Atlântica para manter uma rota de dispersão. Com relação a análise citogenética, as três espécies (*Alagoasa pantina*, *Alagoasa sp.1* e *Alagoasa sp.2*) apresentaram número diploide $2n=22$, fórmula meiótica $2n=10II+X+y$, sistema

de determinação sexual do tipo X+y, com cromossomos sexuais gigantes assinápticos, concordante com o observado na subtribo Oedionychina. A FISH utilizando sondas rDNA 18S e 5S, mostrou a ocorrência de sintenia e colocação destes marcadores associados a um par de autossomos nas três espécies analisadas, condição considerada ancestral em Coleoptera. A FISH telomérica demonstrou a presença da repetição TTAGG_n nas três espécies analisadas, além disso mostrou a ocorrência de marcações intersticiais em alguns cromossomos sexuais.

Palavras-chave: Estruturação populacional, FISH, rDNA, Telômero, Besouros-pulga.

ABSTRACT

Coleoptera is the most diverse order among living beings, corresponding to about 40% of insects and 30% of known animals. The subfamily Alticinae comprises 10,000 species, and its individuals are popularly known as flea-beetles. In addition, they occur in greater amounts in degraded areas, primary succession and edges. The species *Omophoita octoguttata*, show a Neotropical distribution, and is found in the Atlantic forest in the South and Southeast regions of Brazil; however, it is known that this vegetation undergoes deforestation processes, and few preserved areas have remained, thus interfering with the dispersion of species. From the cytogenetic view, the subtribe Oedionychina presents interesting characteristics to be studied, such as, giant sex chromosomes assynaptics, diploid number $2n = 22$ and sexual determination system type $X + y$, in most of its species, as well as many species with identification problems and mimetics. Thus, the objective of this study was to determine the existence of population structure of *O. octoguttata* in the southern region of Brazil, in order to infer on natural barriers to the dispersion and the presence of a phylogeographic discontinuity for Alticinae in this region. Furthermore, were analyzed three species belonging to the genus *Alagoasa*, possibly mimetic, to differentiate them cytogenetically and by molecular techniques. For the population analysis of *O. octoguttata*, amplified sequences from the mitochondrial cytochrome oxidase I (COI) and elongation factor (EF1- α) were used in 90 individuals collected in 6 different locations in the states Paraná, Santa Catarina and Rio Grande do Sul. The haplotypic and nucleotide diversity was high in all the analyzed locations. For the EF1- α gene, many different haplotypes were observed, indicating that the gene is not a good population marker for the analysis performed in this work for this species. The presence of a phylogeographic discontinuity for Alticinae was not observed in the Atlantic Forest of the South region of Brazil, since individuals belonging to the locality of Nonoai, located to the South, still maintains gene flow with the northern localities, possibly using the edge of the Atlantic Forest fragments to maintain a dispersal path. With respect to cytogenetic analysis, the three species (*Alagoasa pantina*, *Alagoasa sp.1* and *Alagoasa sp.2*) presented diploid number $2n = 22$, meiotic formula $2n = 10II + X + y$, sex determination system type $X + y$, with giant sex chromosomes assynaptics, consistent with that observed in the subtribe Oedionychina. FISH using 18S and 5S rDNA probes showed the occurrence of

syntenia and colocalization of these markers associated with a pair of autosomes in the three species analyzed, a condition considered ancestral in Coleoptera. The telomeric FISH demonstrated the presence of the TTAGGn repeat in the three species analyzed, in addition to showing the occurrence of interstitial markings on some sex chromosomes.

Keywords: Populational structure, FISH, rDNA. Telomere, Flea-beetles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Localização geográfica aproximada das principais descontinuidades filogeográficas na Mata Atlântica. Em cinza a área original da Mata Atlântica. As linhas pontilhadas representam as descontinuidades. Descontinuidade (i) observada por Grazziotin et al. (2006), Cabanne, Santos e Miyaki (2007), Cabanne et al. (2008), Carnaval et al. (2009), Martins et al. (2009), Batalha-Filho et al. (2010) e Thomé et al. (2010). Descontinuidade (ii) observada por Cabanne, Santos e Miyaki (2007), Cabanne et al. (2008), Carnaval et al. (2009) e Thomé et al. (2010). Descontinuidade (iii) observada por Cabanne et al. (2008) e Carnaval et al. (2009).....	31
Figura 2 – Mapa do DNA mitocondrial humano. OH e OL, origens de replicação das fitas pesada e leve, respectivamente; ND1-ND6, subunidades 1-6 desidrogenase NADH; Cox1-Cox3, subunidades 1-3 do citocromo oxidase; ATP6 e ATP8, subunidades 6 e 8 da ATPase mitocondrial; Cyt b, citocromo b.....	33
Figura 3 – Distribuição original da Mata Atlântica, em 1500, e remanescentes em 1990, no Brasil.	36
Figura 4 – Distribuição dos remanescentes de Mata Atlântica no Brasil em 2016.	37
Figura 5 – Indivíduo adulto de <i>Omophoita octoguttata</i> . Em (A) visão dorsal, (B) visão ventral e (C) destaque para a porção antero-posterior e presença de mácula na cabeça (Barra 1mm).	41
Figura 6 – Machos adultos pertencentes ao gênero <i>Alagoasa</i> . A – <i>Alagoasa pantina</i> ; B – <i>Alagoasa sp.1</i> ; C – <i>Alagoasa sp.2</i> . (Barra 1mm).	42
Figura 7 – Locais de coleta dos indivíduos de <i>Omophoita octoguttata</i>	42
Figura 8 – Árvore filogenética com inferência Bayesiana para a matriz dos genes COI e EF1-alfa de <i>Omophoita octoguttata</i> . GUA – Guarapuava; NON – Nonoai; SEA – Seara; PON – Ponta Grossa; UNI – União da Vitória; RIO – Rio Branco do Sul.....	58
Figura 9 – Rede haplotípica linear construída para as sequências do gene COI para as localidades estudadas.	59
Figura 10 – Rede haplotípica linear construída para as sequências do gene EF1-alfa para as localidades estudadas.	59

- Figura 11** – Células mitóticas e meióticas de *Alagoasa pantina*. **A** – Cariótipo espermatogonial com $2n=22$ cromossomos. **B** – Metáfase espermatogonial. **C** – Metáfase I, presença de $2n=10II+X+y$. **D** – Metáfase II, complemento haploide $n=10+y$. **Barra** = 10 μm 73
- Figura 12** – Células mitóticas e meióticas de *A. pantina* submetidas à técnica de Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sonda rDNA 18S (verde) e 5S (vermelho) e contracolorados com DAPI (azul). **A** e **B** – Metáfase espermatogonial indicando a marcação em um par autossômico (setas). **C** – Sobreposição das imagens A e B mostrando que os cístrons são sintênicos e colocalizados (setas). **D** e **E** – Metáfase I evidenciando a hibridação em um único par autossômico (setas). **F** – Sobreposição das imagens D e E confirmando a sintonia e colocalização (seta). **Barra** = 10 μm 74
- Figura 13** – Célula meiótica de *A. pantina* submetida à técnica de Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sonda telomérica (TTAGG_n) (vermelho) e contracolorados com DAPI (azul). **A** – Cromossomos autossômicos em metáfase I indicando a marcação de cinco pares (setas). **B** – Cromossomos sexuais em metáfase I, mostrando marcações terminais apenas no cromossomo Y. **Barra** = 10 μm 74
- Figura 14** – Células mitóticas e meióticas de *Alagoasa sp.1*. **A** – Cariótipo espermatogonial com $2n=22$ cromossomos. **B** – Metáfase espermatogonial. **C** – Metáfase I, presença de $2n=10II+X+y$. **D** – Metáfase II, complemento haploide $n=10+y$. **Barra** = 10 μm 75
- Figura 15** – Células mitóticas e meióticas de *Alagoasa sp.1* submetidas à técnica de Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sonda rDNA 18S (verde) e 5S (vermelho) e contracolorados com DAPI (azul). **A** e **B** – Metáfase espermatogonial indicando a marcação em um par autossômico (setas). **C** – Sobreposição das imagens A e B mostrando que os cístrons são sintênicos e colocalizados (setas). **D** e **E** – Metáfase I evidenciando a hibridação em um único par autossômico, e o heteromorfismo de tamanho dos cístrons (seta). **F** – Sobreposição das imagens D e E confirmando a sintonia e colocalização (seta). **Barra** = 10 μm 76
- Figura 16** – Células meióticas de *Alagoasa sp.1* submetidas à técnica de Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sonda telomérica (TTAGG_n) (vermelho) e contracolorados com DAPI (azul). **A** – Metáfase II demonstrando a

presença da repetição telomérica em todos os cromossomos, e marcação intersticial proximal no cromossomo X. B – Metáfase II, mostrando a presença da repetição telomérica em todos os cromossomos, e marcações dispersas ao longo do braço curto do cromossomo Y. Barra = 10 µm.	76
Figura 17 – Células mitóticas e meióticas de <i>Alagoasa sp.2</i> . A – Cariótipo espermatozoidal com 2n=22 cromossomos. B – Metáfase espermatozoidal. C – Metáfase I, presença de 2n=10II+X+y. D – Anáfase I, complemento haploide n=10+X cromossomos. Barra = 10 µm.	77
Figura 18 – Células meióticas de <i>Alagoasa sp.2</i> submetidas à técnica de Hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH) com sonda rDNA 18S (verde) e 5S (vermelho) e contracolorados com DAPI (azul). A e B – Metáfase I indicando a marcação em um par autossômico (setas). C – Sobreposição das imagens A e B mostrando que os cístrons são sintênicos e colocalizados (setas). Barra = 10 µm.	78
Figura 19 – Célula meiótica de <i>Alagoasa sp.2</i> submetida à técnica de Hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH) com sonda telomérica (TTAGG _n) (vermelho) e contracolorados com DAPI (azul). Metáfase I demonstrando a presença da repetição telomérica em todos os cromossomos, bem como a ocorrência de marcação intersticial proximal no X. Barra = 10 µm.	78
Figura 20 – Árvores de relação filogenética obtidas a partir das sequências de COI para as espécies do gênero <i>Alagoasa</i> . A – Método Máxima Parcimônia (MP); B – Método Máxima Verossimilhança (MV); C – Método Neighbor Joining (NJ); D – Método Bayesiano.	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Espécies pertencentes ao gênero <i>Alagoasa</i> estudadas citogeneticamente, com seus respectivos números diploides (2n), fórmula meiótica e procedência. fr=fragmento cromossômico, B=cromossomo supranumerário.	23
Tabela 2 – Diversidade haplotípica (h) e nucleotídica (π) dos indivíduos de <i>Omophoita octoguttata</i> analisados nas diferentes localidades, e teste de neutralidade D de Tajima para a matriz gerada a partir dos genes COI e EF1-alfa. *(p<0,05).....	60
Tabela 3 – Resultados da Análise de Variância Molecular (AMOVA) para a matriz dos genes COI e EF1-alfa, considerando dois grupos. Em negrito valores significativos (p<0,05).	61
Tabela 4 – Estatística F de Wright para as localidades analisadas para a matriz de dados dos genes COI e EF1-alfa, considerando o agrupamento utilizado na AMOVA. Diagonal inferior representam os valores de Fst (*p<0,05). Diagonal superior representam os valores de p (em negrito valores significativos).	62
Tabela 5 – Distância intra (vertical inferior) e interespecífica (vertical superior) para os indivíduos pertencentes as 3 espécies do gênero <i>Alagoasa</i> calculadas a partir do fragmento do gene COI.....	79

SUMÁRIO

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
1.1 CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DE COLEOPTERA E ESPÉCIES DE ESTUDO	17
1.1.2 Citogenética De Alticinae	21
1.1.2.1 DNA repetitivo em Coleoptera.....	24
1.2 FILOGEOGRAFIA E MARCADORES MOLECULARES	27
1.2.1 Filogeografia.....	27
1.2.2 Marcadores Moleculares	31
1.2.2.1 Citocromo C Oxidase I	32
1.2.2.2 Fator de elongação EF1-alfa	34
1.3 MATA ATLÂNTICA.....	35
2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	39
2.1 OBJETIVO GERAL	39
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
3 MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1 MATERIAL BIOLÓGICO E LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA	41
3.2 MÉTODOS	43
3.2.1 Extração De DNA	43
3.2.2 Amplificação Do Gene COI	43
3.2.3 Amplificação Do Gene EF1-alfa	44
3.2.4 Análises Das Sequências.....	45
3.2.5 Análises De Diversidade	46
3.2.6 Análise Filogenética	47
3.2.7 Citogenética Convencional.....	47
3.2.8 Citogenética Molecular.....	48
3.2.8.1 Obtenção das sondas de rDNA e telomérica	48

3.2.8.2 Hibridação <i>in situ</i> Fluorescente (FISH).....	49
4 RESULTADOS.....	51
4.1 ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE <i>Omophoita Octoguttata</i> FABRICIUS (1775) (COLEOPTERA: ALTICINAE) E INFERÊNCIAS FILOGEOGRÁFICAS PARA A MATA ATLÂNTICA DA REGIÃO SUL DO BRASIL	52
4.2 DIFERENCIAÇÃO DE TRÊS ESPÉCIES PERTENCENTES AO GÊNERO <i>Alagoasa</i> (COLEOPTERA: ALTICINAE): ANÁLISE CITOGENÉTICA E SEQUENCIAMENTO DO GENE COI	68
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	84
REFERÊNCIAS.....	86
ANEXO A – Protocolos moleculares e citogenéticos	101

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DE COLEOPTERA E ESPÉCIES DE ESTUDO

A classe Insecta é o grupo taxonômico com o maior número de espécies descritas. Parte do seu sucesso de diversificação está relacionada ao pequeno tamanho corpóreo de seus integrantes, uma limitação imposta pelo sistema de trocas gasosas traqueais, permitindo assim a ocupação de diversos nichos ecológicos. As ordens de Insecta com maior riqueza de espécies são: Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera e Hemiptera (GULLAN; CRANSTON, 2010). A ordem Diptera possui cerca de 125.000 espécies descritas, Hymenoptera 250.000 espécies, Lepidoptera 150.000 espécies, e Hemiptera 95.000 espécies (GULLAN; CRANSTON, 2010). Coleoptera representa a ordem mais rica e variada dentro da Classe Insecta, com mais de 350.000 espécies descritas, distribuídas em 26.000 gêneros, o que corresponde a cerca de 40% das espécies conhecidas de insetos e 30% dos animais (COSTA, 2003; LAWRENCE; BRITTON, 1994; GULLAN; CRANSTON, 2010). No Brasil ocorrem 4.351 gêneros com 26.755 espécies (COSTA, 2003; TRIPLEHORN; JOHNSON, 2011).

O fóssil mais antigo de Coleoptera data do Permiano inferior, há cerca de 318 milhões de anos atrás, indicando o início da colonização dos ambientes por estes (BÉTHOUX, 2009). Neste processo estabeleceu-se uma elevada interação com a vegetação, ocorrendo em quase toda a parte vegetativa das plantas, e em algumas árvores podendo ser encontrados desde a casca até as flores, folhas, raízes, partes subterrâneas e no interior de galhas (GULLAN; CRANSTON, 2010).

Apesar da grande maioria dos besouros ser terrestre, algumas espécies ocupam ambientes aquáticos dulcícolas e marinhos, ocupando assim a maior parte dos ambientes possíveis (GILLOT, 2005). A capacidade de ocupar os mais variados nichos se deve principalmente ao desenvolvimento dos élitros, que são asas anteriores modificadas e muito resistentes, compactas e esclerotizadas. Esta estrutura os protege tanto contra dessecação quanto a choques mecânicos, além de proteger e recobrir as asas membranosas (GRIMALDI; ENGEL, 2006; GULLAN; CRANSTON, 2010).

Algumas outras adaptações observadas nos besouros que também permitiram a ocupação dos variados nichos e uma alimentação diversificada são o tamanho reduzido (em alguns grupos), o protórax, incluindo o pronoto, que articulam livremente com o restante do tórax, as pernas modificadas, com garras e estruturas adesivas, as fases larvais com cabeça capsulada esclerotizada com mandíbulas opositoras e olhos compostos (GRIMALDI; ENGEL, 2006; GILLOT, 2005; GULLAN; CRANSTON, 2010).

A presença de um aparelho bucal mastigador variado possibilitou aos coleópteros a exploração de uma ampla gama de recursos alimentares, visto que a ordem possui animais herbívoros, detritívoros, fungívoros e polípagos (LAWRENCE; BRITTON, 1994). Podendo atuar ainda como predadores de invertebrados, ou como pragas de madeiras, pastagens, cereais, leguminosas e até mesmo materiais secos de origem animal (GULLAN; CRANSTON, 2010).

A ordem Coleoptera agrupa quatro subordens: Archostemata, Adephaga, Myxophaga e Polyphaga (GILLOT, 2005). As subordens Archostemata e Myxophaga incluem juntas, aproximadamente 100 espécies, a subordem Adephaga possui cerca de 36.000 espécies, e a subordem Polyphaga compreende cerca de 90% da diversidade da ordem, contemplando aproximadamente 315.000 espécies distribuídas pelo mundo (COSTA, 2003; GRIMALDI; ENGEL, 2006; GULLAN; CRANSTON, 2010; LAWRENCE; NEWTON, 1995).

Dentro da subordem Polyphaga encontra-se a família Chrysomelidae, que possui 15 subfamílias, com aproximadamente 36.500 espécies descritas no mundo e 4.362 encontradas no Brasil (COSTA, 2003; TRIPLEHORN; JOHNSON, 2011). Dentre as subfamílias de Chrysomelidae encontra-se Alticinae, compreendendo 570 gêneros com mais de 10.000 espécies, as quais apresentam uma origem filogenética única (BORROR; DELONG, 1988; SEENO; WILCOX, 1982; SCHERER, 1988).

A distribuição dos gêneros de Alticinae reflete eventos geológicos e ecológicos na história da Terra, corroborando com a teoria da deriva continental proposta por Alfred Wegener em 1912 (SCHERER, 1988). O maior número de espécies desta subfamília encontra-se na região Neotropical, com mais de 200 gêneros apenas na América do Sul, e destes, 196 são endêmicas do continente (SCHERER, 1988). O grande número de gêneros endêmicos da América do Sul pode ser explicado, de acordo com Scherer (1988), pelo fato deste continente ter se

isolado do resto do mundo, durante a deriva continental, há pelo menos 100 milhões de anos atrás, tempo suficiente para a diversificação dos gêneros e tribos.

Os indivíduos pertencentes a subfamília Alticinae são conhecidos, popularmente, como *flea Beetles* ou besouros-pulgas, caracterizando-se por apresentarem os fêmures das pernas posteriores dilatados, o que lhes possibilita darem grandes saltos. Outra característica é a presença de somente um testículo na região direita anterior do abdômen (BORROR; DELONG, 1988; GILLOTT, 2005). A coloração geralmente é azul-metálica, esverdeada, marrom, preta ou preta com manchas claras (TRIPLEHORN; JOHNSON, 2011). De acordo com Linzmeier, Ribeiro-Costa e Marinoni (2006) os alticines são potenciais indicadores biológicos, pois se observa uma maior quantidade amostral destes em áreas degradadas, áreas de sucessão primária e de borda do que em áreas mais preservadas.

Para Begosi e Benson (1988) a coloração similar de muitos Oedionychina, subtribo de Alticinae, da região sudeste do Brasil sugere que estes podem ser miméticos. *Omophoita octoguttata*, *Alagoasa* cf. *pantina*, *Alagoasa scissa* e *Alagoasa areata* apresentam 3 ou 4 pares de manchas largas na cor creme no élitro contornadas por preto e pronoto com coloração laranja pálido (BEGOSI; BENSON, 1988). *Omophoita octoguttata* tende a ser mais abundante que seus miméticos e deve ser a espécie dominante neste complexo mimético (BEGOSI; BENSON, 1988). Mimetismo é uma interação ecológica em que uma espécie se assemelha com outra espécie, podendo ser dividida em dois tipos: mimetismo batesiano, onde uma espécie não-venenosa mimetiza uma espécie venenosa, e mimetismo mülleriano, em que duas espécies distintas venenosas se beneficiam por se assemelharem (RIDLEY, 2006).

Os testes de palatabilidade realizados por Begosi (1984) e Begosi e Benson (1988), utilizando espécies pertencentes aos gêneros *Omophoita* e *Alagoasa* demonstraram que o tipo de mimetismo entre as espécies destes gêneros seria mülleriano. Del-Claro (2004) propõe que *O. octoguttata* possui interação de mimetismo batesiano com *Adesmus colligatus* (Cerambycidae), espécie palatável, em relação a *O. octoguttata*, impalatável. O padrão de cores das duas espécies é bem semelhante, com isso *A. colligatus* se beneficia contra a predação, confundindo os possíveis predadores. *Omophoita octoguttata*, provavelmente, é impalatável por armazenamento de compostos fenólicos de plantas, o que acaba beneficiando a espécie contra os predadores (DEL-CLARO, 2004). As plantas hospedeiras dessa

espécie são *Hyptis umbrosa* e *Peltodon radicans*, pertencentes a família Labiatae (Lamiaceae), e *Aegiphila sellowiana*, pertencente à família Verbenaceae (BEGOSI, 1984; BEGOSI; BENSON, 1988). Sendo este então considerado uma espécie oligófaga (BEGOSI, 1984). Espécies pertencentes ao gênero *Alagoasa* também mostraram maior preferência por plantas das famílias Verbenaceae e Labiatae (Lamiaceae), porém também utilizam plantas das famílias Compositae e Acanthaceae (BEGOSI; BENSON, 1988).

A escolha de plantas hospedeiras pelos insetos depende da disponibilidade das plantas nas áreas ocupadas pelos insetos e, principalmente, das substâncias secundárias (atraentes e repelentes) presentes nas folhas das plantas (DETHER, 1954; FRAENKEL, 1959). Os insetos são capazes de discriminar diferentes plantas por meio de substâncias químicas secundárias, e estas têm um papel evolutivo neste sentido (SOUTHWOOD, 1972). As famílias Labiatae (Lamiaceae) e Verbenaceae contêm em suas folhas muitas moléculas aromáticas de terpenóides (GIBBS, 1974), as quais *O. octoguttata* provavelmente deve estar adaptado (BEGOSI, 1984).

A impalatabilidade da tribo Oedionychina sugere que a coloração destes besouros teria uma função de advertência. No entanto, não está claro porque todas as espécies não convergiram para o mesmo padrão de coloração, uma vez que coloração aposemática e mimetismo provem proteção contra predadores (BEGOSI; BENSON, 1988).

Apesar dos testes de oferecimento de alimentos realizados por Begosi (1984) e Begosi e Benson (1988) demonstrarem maior preferência por plantas pertencentes as famílias Labiatae (Lamiaceae) e Verbanaceae, *O. octoguttata* consumiu folhas de feijão (Fabaceae) em laboratório. Costa Lima (1955) e Silva et al. (1968), em seus trabalhos observaram este roendo folhas de algodão (Malvaceae), cacau (Malvaceae) e espigas de trigo (Poaceae), revelando que este pode se tornar potencial praga agrícola na ausência de plantas hospedeiras. Por outro lado, larvas e indivíduos adultos, de *Alagoasa parana* e *Alagoasa extrema*, foram estudados com relação ao potencial de agente de controle biológico de plantas da família Verbenaceae na África e na Austrália (WILLIAMS; DUCKETT, 2005; WINDER; SANDS; KASSULKE, 1988; DAY; JONES, 2011).

1.1.2 Citogenética De Alticinae

Apesar de Coleoptera possuir mais de 350.000 espécies (COSTA, 2003), apenas pouco mais de 3.000 foram estudadas citogeneticamente (PETITPIERRE, 1996). Os cromossomos dos besouros apresentam, geralmente, tamanho médio ou pequeno e são metacêntricos (PETITPIERRE, 1996). Adicionalmente, algumas espécies apresentam cromossomos B e, ocasionalmente este número é elevado (VIRKKI; SANTIAGO-BLAY, 1993). Uma grande variação do número de cromossomos é encontrada em Coleoptera, de $2n=4$ no Elateridae sul americano *Chalcolepidius zonatus* (FERREIRA et al., 1984) a $2n=69$ no Carabidae europeu *Ditomus capito* (SERRANO, 1981). Além disso, os sistemas de determinação sexual (SMITH; VIRKKI, 1978; PETITPIERRE; SEGARRA, 1985) são variáveis, havendo cromossomos sexuais sinápticos e assinápticos (PETITPIERRE, 1996). O tipo de sistema de determinação sexual mais frequente é a configuração em paraquedas (*parachute*), Xy_p , o qual é considerado como ancestral (STEVENS, 1906; SMITH, 1950).

Os processos cromossômicos, mais frequentes, envolvidos na evolução cariotípica de Coleoptera são fissões cêntricas, seguidas por inversões pericêntricas ou adições de heterocromatina. Isto poderia explicar o frequente aumento do número de cromossomos e a prevalência de cromossomos metacêntricos (VIRKKI, 1984). No entanto, apesar de espécies com baixo número cromossômico tenham surgido a partir de fusões cêntricas, esse mecanismo é menos frequente (VIRKKI, 1984).

A subfamília Alticinae é representada por cerca de 10.000 espécies (SEENO; WILCOX, 1982); no entanto, aproximadamente 230 espécies eram conhecidas citogeneticamente até 1996 (PETITPIERRE, 1996). Os representantes desta subfamília apresentam um variado número diploide, desde $2n=8$ em *Homoschema nigriventre* (VIRKKI; PURCELL, 1965) a $2n=64$ em *Disonycha bicarinata* (VIDAL, 1984), bem como uma grande diversidade de sistemas de determinação sexual (SMITH; VIRKKI, 1978; PETITPIERRE et al., 1988; VIRKKI, 1988; PETITPIERRE, 1989; SEGARRA; PETITPIERRE, 1989; VIRKKI; SANTIAGO-BLAY; CLARK, 1991; VIRKKI; SANTIAGO-BLAY, 1998).

Petitpierre (1988; 2006) e Virkki (1970) propuseram que o número cromossômico mais frequente em Alticinae é de 11 ou 12 pares. O sistema de

determinação sexual mais comum é do tipo X+y. No entanto, 19 tipos diferentes de sistemas de determinação já foram descritos nesta subfamília (VIRKKI, 1967; 1968).

A tribo Oedionychini agrupa duas subtribos, Oedionychina e Disonychina (VIRKKI, 1970; VIRKKI; SANTIAGO-BLAY; CLARK, 1991). Estas se diferenciam cariotipicamente: Oedionychina apresenta, geralmente, número cromossômico $2n=22$ ($10II+X+Y$), com cromossomos sexuais gigantes, e em Disonychina, o número cromossômico é mais variado, com cromossomos sexuais pequenos com diferentes associações, além de uma tendência de aumento do número cromossômico (PETITPIERRE, 1988; VIRKKI, 1988). A subtribo Oedionychina possui características cromossômicas interessantes para serem estudadas, como o comportamento assináptico dos cromossomos sexuais e seu tamanho aumentado em relação aos autossomos (VIRKKI, 1970; 1988). Cromossomos sexuais gigantes são encontrados principalmente nos gêneros *Alagoasa*, *Oedionychus*, *Walterianella*, *Omophoita*, *Paranaita* e *Pedema* (VIRKKI, 1970; VIRKKI; SANTIAGO-BLAY; CLARK, 1991; ALMEIDA; CAMPANER; CELLA, 2006). Acredita-se que durante a evolução os cromossomos sexuais tenham aumentado de tamanho, até tornarem-se os típicos cromossomos sexuais gigantes e assinápticos de Oedionychina (VIRKKI, 1968; 1970). Virkki (1970) propõe que o aumento de tamanho desses cromossomos se deu por translocações de heterocromatina dos cromossomos autossômicos para os sexuais, seguido de eventos de duplicações. No entanto, alguns autores acreditam que este aumento esteja associado ao acréscimo de eucromatina (PETITPIERRE, 1988; VIRKKI, 1988). Mello et al. (2014) mostraram que grande parte dos cromossomos sexuais de *Omophoita* é composta por regiões heterocromáticas de DNA repetitivo.

O gênero *Alagoasa* pertence à subtribo Oedionychina e possui 40 espécies analisadas citogeneticamente (Tabela 1). A maioria das espécies estudadas apresenta o número diploide igual a 22 e fórmula meiótica $2n=10II+X+y$, características conservadas na subtribo (SMITH; VIRKKI, 1978; VIRKKI, 1968; 1970; 1988; VIRKKI; SANTIAGO-BLAY, CLARK, 1991). A variação no número diploide nas espécies deste gênero ocorre devido à presença de cromossomos supranumerários (*Alagoasa oblecta* e *Alagoasa transparente*) ou devido a fusões cêntricas, reduzindo o número diploide (*Alagoasa arcifera*, *Alagoasa equestris* e *A. parana*).

Tabela 1 – Espécies pertencentes ao gênero *Alagoasa* estudadas citogeneticamente, com seus respectivos números diploides (2n), fórmula meiótica e procedência. fr=fragmento cromossômico, B=cromossomo supranumerário.

Espécie	2n	Fórmula meiótica	Procedência	Referência
<i>Alagoasa acutangula</i> Jac.	22	2n=10II+X+Y	El Salvador	VIRKKI, 1961; 1970
<i>A. apicata</i> Csiki	22	2n=10II+X+y	-	PETITPIERRE et al., 1988
<i>A. arcifera</i> Har.	16-0-3fr	2n=7II+0-3fr+X+y	-	PETITPIERRE et al., 1988
<i>A. bicolor</i> L.	22	2n=10II+X+y	Porto Rico	VIRKKI, 1970; 1985; VIRKKI; SANTIAGO-BLAY; CLARK, 1991
<i>A. bipunctata</i> Chevr.	22	2n=10II+X+y	El Salvador	VIRKKI, 1961
<i>A. burmesiteri</i> Har.	22	2n=10II+X+y	-	PETITPIERRE et al., 1988
<i>A. b. gounellei</i> Bech.	22	2n=10II+X+y	-	PETITPIERRE et al., 1988
<i>A. b. maculatissima</i> Jac.	22	2n=10II+X+y	-	PETITPIERRE et al., 1988
<i>A. ceracollis</i> Say	22	2n=10II+X+Y	El Salvador	VIRKKI, 1961; 1970
<i>A. clarissa</i>	22	2n=10II+X+y	Brasil	ALMEIDA, 2001
<i>A. coccinelloide</i> Har.	22	2n=10II+X+y	Brasil	MELO, 2013
<i>A. crux-nigra</i> Jac.	22	2n=10II+X+y	-	PETITPIERRE et al., 1988
<i>A. decemguttata</i> Fabr.	22	2n=10II+X+y	-	PETITPIERRE et al., 1988
<i>A. dipus</i> Ill.	22	2n=10II+X+y	Brasil, Peru	SMITH; VIRKKI, 1978
<i>A. dissepata</i>	22	2n=10II+X+y	Brasil	SMITH; VIRKKI, 1978
<i>A. cyaneofasciata</i> Jac.				
<i>A. equestris</i> Fabr.	22	2n=10II+X+y	Brasil	SMITH; VIRKKI, 1978
<i>A. equestris</i> Fabr.	13	2n=5II+1B+X+y	Brasil	SMITH; VIRKKI, 1978
<i>A. extrema</i> Har.	22	2n=10II+X+Y	El Salvador	VIRKKI, 1961; 1970
<i>A. fasciaticollis</i> Jac.	22	2n=10II+X+y	-	PETITPIERRE et al., 1988
<i>A. fasciaticollis</i> Jac.	22+fr	2n=10II+fr+X+y	-	PETITPIERRE et al., 1988
<i>A. florigera</i> Har.	22	2n=10II+X+y	Brasil	MELO, 2013
<i>A. illustris</i> Jac.	22	2n=10II+X+y	Brasil	SMITH; VIRKKI, 1978
<i>A. januaria</i> Bech.	22	2n=10II+X+y	Brasil	VIRKKI, 1985; VIRKKI; SANTIAGO-BLAY, 1993
<i>A. januaria meridionalis</i> Bech.	22	2n=10II+X+y	Brasil	ALMEIDA, 2001
<i>A. libentina</i> Germ.	22	2n=10II+X+y	Brasil	PETITPIERRE et al., 1988; ALMEIDA, 2001
<i>A. l. tetraspilota</i> Baly	22	2n=10II+X+y	-	PETITPIERRE et al., 1988
<i>A. mella commutata</i> Bech.; Bech.	22	2n=10II+X+y	Brasil	SMITH; VIRKKI, 1978
<i>A. oblecta</i> Baly	37	2n=10II+15B+X+y	Bolívia	VIRKKI; SANTIAGO-BLAY, 1993
<i>A. parana</i> Samuelson	16	2n=7II+X+y	Brasil	VIRKKI, 1988
<i>A. posticalis</i> Krisch	22	2n=10II+X+y	Peru	SMITH; VIRKKI, 1978
<i>A. rotundicollis</i> Jac.	22	2n=10II+X+y	-	PETITPIERRE et al., 1988
<i>A. rufina</i> Ill.	22	2n=10II+X+y	Peru	SMITH; VIRKKI, 1978
<i>A. scissa</i> Germ.	22	2n=10II+X+y	Brasil	ALMEIDA, 2001
<i>A. sp. 1</i>	22	2n=10II+X+y	El Salvador	VIRKKI, 1961
<i>A. sp. 2</i>	22	2n=10II+X+y	El Salvador	VIRKKI, 1961
<i>A. sp. 3</i>	22	2n=10II+X+y	Brasil	ALMEIDA, 2001
<i>A. transparente</i>	24	2n=10II+2B+X+y	Peru	VIRKKI; SANTIAGO-BLAY, 1993
<i>A. trifasciata</i> Fabr.	22	2n=10II+X+y	Peru, Brasil	SMITH; VIRKKI, 1978; VIRKKI, 1988
<i>A. trifasciata trifasciata</i> Bech.	22	2n=10II+X+y	Brasil	VIRKKI, 1971
<i>A. trifasciata vulgatissima</i> Bech.	22	2n=10II+X+y	Peru	VIRKKI, 1971
<i>A. umbratica</i> Ol.	22	2n=10II+X+y	-	PETITPIERRE et al., 1988

1.1.2.1 DNA repetitivo em Coleoptera

Os DNAs repetitivos constituem grande porcentagem do genoma eucariótico, e consistem de sequências que podem ser idênticas ou semelhantes, que se repetem diversas vezes no genoma, podendo estar em tandem ou dispersas (TIMBERLAKE, 1978; SUMNER, 2003). Essas sequências são de grande importância para a citogenética molecular e vem sendo uma ferramenta útil para entender os processos evolutivos das espécies (ALMEIDA et al., 2010; BARCISZEWSKA et al., 1995; CABRAL-DE-MELLO; MOURA; MARTINS, 2010; 2011b; MARTINS et al., 2006).

Repetições *in tandem* consistem em sequências arranjadas de forma consecutiva no cromossomo, formando blocos de DNA com centenas ou milhares de repetições. Por outro lado, os elementos repetitivos dispersos, são sequências que podem estar repetidas milhares de vezes no genoma, porém distribuídas de maneira dispersa (SUMNER, 2003). Os DNAs repetitivos podem ser definidos como sequências codificantes ou não-codificantes. DNAs repetitivos codificantes são representados pelas famílias multigênicas, como as famílias de DNA ribossomais, das histonas e das globinas, e os DNAs não codificantes são representados pelas classes de DNA satélite, minissatélites, como as sequências teloméricas, e elementos transponíveis (SUMNER, 2003).

A família multigênica dos DNAs ribossomais divide-se nas unidades transcricionais maior (45S) e menor (5S). A unidade maior transcreve para os rRNAs 18S, 5,8S e 28S, cada gene destes é separado entre si por um espaçador interno transcrito (ITS), formando os cístrons, e cada um é separado por espaçadores intergênicos (IGS). A unidade menor transcreve para o rRNA 5S, e cada unidade é separada das demais pelo espaçador não transcrito (NTS) (LONG; DAWID, 1980). Desta forma, a organização e o mapeamento das famílias multigênicas, tornam-se marcadores citogenéticos úteis, e podem elucidar a variação do cariótipo e organização genômica em diversos grupos de eucariotos (ALMEIDA et al., 2010).

A maioria dos trabalhos em relação a localização das Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs) em Coleoptera é baseada na técnica de impregnação pelo íon prata (ALMEIDA et al., 2010; CABRAL-DE-MELLO; MOURA; MARTINS, 2010; 2011b; SCHNEIDER et al., 2007; VIRKKI, MAZZELLA; DENTON, 1991). Schneider et al. (2007), por meio de uma extensa revisão, observaram que na

maioria das espécies de Coleoptera a localização das RONS ocorre nos cromossomos autossômicos, assim inferiram que um par autossômico portador de RON representaria a condição ancestral e/ou mais estável, por ser a condição mais comum. No entanto, Dutrillaux e Dutrillaux (2009) propuseram que para Scarabaeiidea a localização da RON no cromossomo X seria a condição ancestral.

Em relação à Alticinae, em estudos utilizando a FISH, o cluster ribossomal 45S está associado a um par autossômico em *Omophoita octoguttata*, *Omophoita personata* e *Alagoasa coccineoloide*, a dois pares autossômicos em *Omophoita magniguttis*, e a 3 pares autossômicos em *Alagoasa florigera* (ALMEIDA et al., 2010; MELO, 2013). Desta forma, Almeida et al. (2010), sugeriram que o rDNA 18S, por meio da FISH, poderia ser um importante marcador para demonstrar diferenças cariotípicas neste grupo, no qual, geralmente, não são observadas diferenças com citogenética convencional.

Com relação a família multigênica de rDNA 5S, poucos estudos em Coleoptera foram realizados, e estes demonstram que a localização deste gene é muito variável, podendo estar localizado em um par de autossomos, vários pares, e até mesmo em todos os pares de cromossomos (CABRAL-DE-MELO; MOURA; MARTINS, 2010, 2011a; MELO, 2013; GOLL et al, 2015). Segundo Cabral-de-Melo, Moura e Martins (2010, 2011a) a condição ancestral para Coleoptera seria a ocorrência de apenas um par cromossômico portador do gene 5S. Em Alticinae, Melo (2013) demonstrou que *Omophoita octoguttata*, *Omophoita personata* e *Alagoasa coccineoloide* apresentam o gene 5S associado a um par de autossomos, *Omophoita magniguttis* associado a 2 pares autossômicos, e *Alagoasa florigera* associado a 3 pares autossômicos, e Wolski (2014) demonstrou que em *Omophoita sexnotata* o gene 5S está localizado em todos os autossomos. Apesar da grande variação de localização dos rDNAs 45S e 5S, é provável que a maioria desses clusters não seja funcional (CABRAL-DE-MELLO; MOURA; MARTINS, 2011b), e a dispersão destes genes, provavelmente, está associada a presença de elementos transponíveis (CABRAL-DE-MELLO; MOURA; MARTINS, 2011b; GILLESPIE et al., 2006; YE et al., 2005).

Os telômeros, terminações físicas dos cromossomos eucarióticos, são componentes estruturais dos cromossomos, estruturas especializadas formadas por DNA e proteínas, que previnem a fusão dos cromossomos e a diminuição gradual das terminações dos cromossomos durante os sucessivos ciclos de duplicação

semiconservativa do DNA (BLACKBURN, 1991). No entanto, há uma diversidade na composição das sequências repetitivas teloméricas entre diferentes organismos (ZAKIAN, 1995) e algumas sequências são características para alguns grupos taxonômicos. Por exemplo, a sequência (TTAGGG)_n é conservada em todos os vertebrados (MEYNE; RATLIFF; MOYZIS, 1989; KRUPP; KLAPPER; PARWARESCH, 2000). Essa sequência também é encontrada no gênero *Trypanosoma* e alguns fungos (ZAKIAN, 1995), o que implica que a sequência telomérica não reflete um grau de relação filogenética entre os organismos (FRYDRYCHOVÁ; MAREC, 2002). Em plantas, a sequência (TTTAGGG)_n parece ser conservada neste grupo (COX et al., 1993; FUCHS; BRANDES; SCHUBERT, 1995), com algumas exceções (PICH; FUCHS; SCHUBERT, 1996). Em insetos, 4 diferentes tipos de organização do DNA telomérico foram identificadas: uma sequência pentanucleotídica (TTAGG)_n, elementos transponíveis HeT-A e TART, um complexo de repetições em tandem, e um segundo tipo de sequência pentanucleotídica (TCAGG)_n (OKAZAKI et al., 1993; BIESSMANN et al., 1990; LEVIS et al., 1993; NIELSEN; EDSTRÖM, 1993; ZHANG et al., 1994; OSANAI et al., 2006; RICHARDS et al., 2008). A sequência TTAGG é a mais comum em Insecta (VITKOVA et al., 2005). Sahara, Marec e Traut (1999) sugeriram que esta sequência é a condição ancestral para Insecta, sendo perdida de maneira independente nos diferentes grupos e substituída por outra sequência.

Em Coleoptera, 14 famílias foram testadas para a sequência TTAGG, sendo que 8 apresentaram resultado positivo para esta sequência (Silphidae, Buprestidae, Elateridae, Anobiidae, Cucujidae, Chrysomelidae, Cerambycidae e Dytiscidae), 5 negativo (Geotrupidae, Cleridae, Tenebrionidae, Gyrinidae e Carabidae), e a família Curculionidae, apresentou resultados positivos e negativos a esta sequência, sendo interpretado como múltiplas perdas desta sequência durante a evolução dos besouros (FRYDRYCHOVÁ; MAREC, 2002; MRAVINAC et al., 2011). Para a sequência TCAGG, 6 famílias foram testadas, sendo que destas Tenebrionidae, Mycetophagidae e Meloidae apresentaram resultados positivos para esta sequência, enquanto, Curculionidae, Cucujidae e Chrysomelidae não apresentaram sinais (MRAVINAC et al., 2011).

1.2 FILOGEOGRAFIA E MARCADORES MOLECULARES

1.2.1 Filogeografia

A filogeografia é uma subdisciplina da biogeografia, e é definida como o estudo dos princípios e processos que governam a distribuição geográfica de linhagens genealógicas, especialmente intra-especificamente e entre espécies próximas, em outras palavras, o tempo e o espaço são os eixos considerados na filogeografia para mapear as genealogias dos genes de interesse (AVISE, 2000).

A análise e a interpretação da distribuição dessas linhagens requerem o processamento em conjunto de informações de várias disciplinas, como genética molecular, genética de populações, etologia, demografia, filogenia, paleontologia, geologia e geografia histórica, criando uma ponte entre processos micro e macro evolutivos (AVISE, 2000).

Embora qualquer estudo envolvendo as relações filogenéticas de uma determinada característica genética e o seu padrão de distribuição geográfico possa ser considerado como tendo enfoque filogeográfico, a grande maioria dos estudos nesta área tem sido realizada pela análise do polimorfismo do DNA mitocondrial (mtDNA) (AVISE et al., 1987). Os primeiros trabalhos baseados na análise do mtDNA com enfoque filogeográfico foram realizados por Avise et al. (1979) e Avise, Lansman e Shade (1979) envolvendo estudos populacionais com roedores dos gêneros *Geomys* e *Peromyscus*. Estes estudos foram importantes por pelo menos duas razões, primeiro introduziram a noção de que um único indivíduo pode ser tratado como uma unidade taxonômica operacional (OTU, *Operational Taxonomic Unit*) nas análises de genética de populações, uma vez que cada indivíduo apresenta um genoma mitocondrial específico que é herdado intacto, sem recombinação, do ancestral materno. O segundo foi a introdução de conceitos filogenéticos no estudo dos mecanismos e processos envolvidos na evolução intraespecífica (AVISE, 2000).

Primeiramente, os estudos filogenéticos intraespecíficos foram realizados baseando-se na análise de padrões de bandas obtidos pela digestão do mtDNA com enzimas de restrição, e as relações filogenéticas entre os padrões de bandas (haplótipos) encontrados em uma espécie podiam ser inferidos com base na construção de redes haplotípicas (AVISE et al., 1979; LANSMAN et al., 1983;

BERMINGHAM; AVISE, 1986). Mais tarde, com o aperfeiçoamento da técnica de reação em cadeia da Polimerase (PCR, *Polimerase Chain Reaction*), e consequentemente do sequenciamento de DNA, os pesquisadores passaram a dispor de um conjunto maior de informações para trabalhar (AVISE, 2000). A comparação direta de sequências homólogas aumentou consideravelmente o potencial de aplicação deste marcador no estudo dos processos históricos envolvidos na distribuição da variabilidade genética das populações, principalmente em humanos (VIGILANT et al., 1989; VIGILANT et al., 1991; DI RENZO; WILSON, 1991). Desta forma, permitiu estimar a relação genealógica em adição as frequências alélicas, proporcionando oportunidades para considerar fluxo gênico histórico e a fragmentação em um quadro filogenético mais explícito (AVISE, 2000).

O marcador molecular escolhido para os primeiros trabalhos filogeográficos em animais foi o mtDNA, devido as suas características (AVISE, 2000). No entanto, existem alguns problemas ao uso de apenas um tipo de marcador molecular, pois a hipótese da história pode refletir somente a história de determinado marcador, e não a história dos organismos (EDWARDS; BEERLI, 2000). Sendo assim, diferentes marcadores podem resultar em genealogias diferentes e no caso dos estudos filogeográficos, como são diversificações recentes essa discordância entre marcadores é ainda mais expressa. Portanto, apesar da filogeografia multilocus apresentar problemas, principalmente relacionados as características do DNA nuclear, esta é considerada a mais adequada na reconstrução da história evolutiva das espécies, devido ao acesso de informações históricas e demográficas provenientes de vários marcadores (BATATA-FILHO; MIYAKI, 2011).

Ao estudar múltiplas regiões do genoma é possível obter uma história evolutiva mais completa por reduzir o risco de perder um evento ou processo devido à ausência de uma mutação apropriada no tempo e espaço em uma sequência de DNA em particular (TEMPLETON, 2004). Como o DNA citoplasmático é comumente herdado de forma uniparental, o padrão encontrado para estes marcadores pode não ser representativo da espécie caso haja dispersão e/ou seleção ligada ao sexo (HOELZER, 1997). Além disso, espera-se que loci sob seleção possuam padrões genéticos que se desviem das expectativas de loci afetados pela história da população e pela demografia. No entanto, os padrões selecionados, muitas vezes, imitam padrões demográficos alternativos (HARE, 2001). A seleção age localmente

no genoma, enquanto espera-se que a demografia afete de forma uniforme todos os loci neutros (FU; LI, 1999).

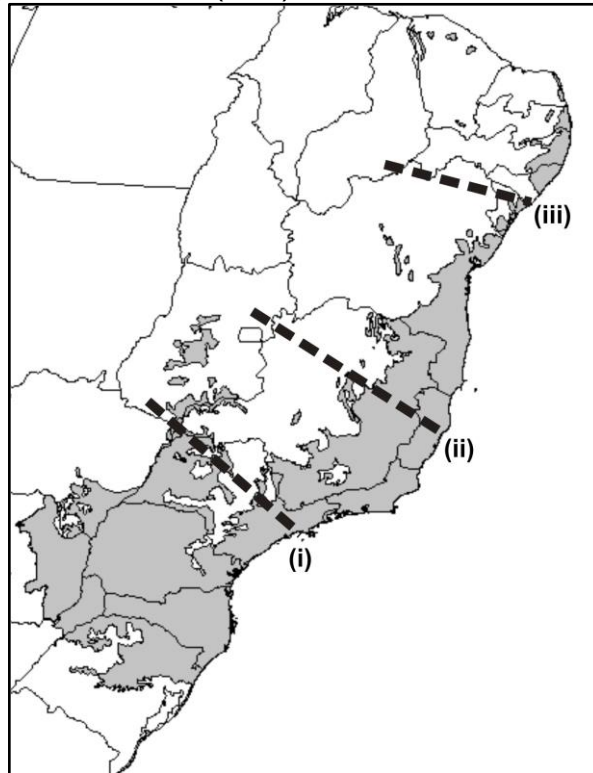
Muitos insetos voadores apresentam relativa mobilidade e, conseqüentemente, deve-se esperar que estes apresentem uma estrutura filogeográfica mínima ao longo de grandes áreas, exceto quando houver barreiras físicas a dispersão (AVISE, 2000). Insetos que comprovam esta ideia, apresentando baixa diferenciação filogeográfica ao longo de grandes áreas estudadas, incluem: a mamangaba de cauda amarela clara (*Bombus terrestris*) (ESTOUP et al., 1996), as moscas da fruta *Drosophila buzzatii* (ROSSI et al., 1996) e *Drosophila subobscura* (ROZAS et al., 1990), borboletas Swallowtail (*Papilio polyxenes* e *P. zelicaon*) (SPERLING; HARRISON, 1994), a mosca-varejeira (*Cochliomyia hominivorax*) (ROEHRDANZ; JOHNSON, 1988), a borboleta monarca (*Danaus plexippus*) (BROWER; BOYCE, 1991), e os bichos-pau *Argosarchus horridus* (BUCKLEY; MARSKE; ATTANAYAKE, 2009) e *Clitarchus hookeri* (BUCKLEY; MARSKE; ATTANAYAKE, 2010). Entretanto, outros insetos voadores podem não apresentar esse padrão, mostrando significativa estruturação filogeográfica numa variedade de padrões espaciais e temporais (BROWN et al., 1997), como mostrado por: Hale e Singh (1987) para a mosca *Drosophila melanogaster*, Ross et al. (1997) para a formiga *Solenopsis invicta*, Popkin et al. (2016) para o afídio *Brachycaudus helichrysi*, Maia et al. (2016) para a borboleta *Neoleucinodes elegantis*, e Batata-Filho et al. (2010) para a abelha sem ferrão *Melipona quadrifasciata*.

Em Coleoptera, os dois padrões filogeográficos propostos anteriormente, estrutura filogeográfica mínima e estruturação filogeográfica mais definida foram observados, como descrito para *Leptinotarsa decemlineata* (ZENHNDER et al., 1992), *Lasiornychus barbicornis* (PAINTING et al., 2017), *Ips typographus* (STAUFFER; LAKATOS; HEWITT, 1999; MAYER et al., 2015), *Dendroctonus micans* (MAYER et al., 2015), *Canthon cyanellus* (NOLASCO-SOTO et al., 2017), e *Tomicus destruens* (SÁNCHEZ-GARCÍA; GALIÁN; GALLEGÓ, 2015).

Poucos estudos filogeográficos de organismos pertencentes a Mata Atlântica foram realizados, não sendo possível determinar um padrão filogeográfico geral para as espécies (BATATA-FILHO; MIYAKI, 2011). No entanto, estes estudos demonstram a existência de descontinuidades filogeográficas para diferentes grupos de organismos, tais como: abelhas (BATATA-FILHO et al., 2010), anfíbios (CARNAVAL et al., 2009; THOMÉ et al., 2010), répteis (PELLEGRINO et al., 2005;

GRAZZIOTIN et al., 2006), aves (CABANNE, SANTOS e MIYAKI, 2007; CABANNE et al., 2008), morcegos (MARTINS et al., 2009), borboletas (MAIA et al., 2016) e plantas (RIBEIRO et al., 2010). As três descontinuidades principais ocorrentes na Mata Atlântica, consideradas por Batata-Filho e Miyaki (2011), representadas na Figura 1, seriam explicadas pela teoria dos refúgios. A teoria dos refúgios, proposta por Haffer (1969), determina que os refúgios são ilhas de florestas densas úmidas isoladas por vegetação aberta, e essas florestas se retraíam durante os períodos de máxima glacial, formando os refúgios, e se expandiriam durante os períodos mais quentes, períodos interglaciais, enquanto as áreas de vegetação aberta se comportavam de maneira contrária. Como os períodos seriam cíclicos, a expansão e a retração da vegetação também seriam cíclicas. Assim, espécies dependentes de ambientes florestais teriam acompanhado esses ciclos de retração e expansão das florestas durante todo o Quaternário, fazendo com que populações associadas a diferentes refúgios se diversificassem de maneira alopátrica caso o tempo de isolamento tenha sido suficiente para acumular diferenças entre elas (HAFFER, 1969).

Figura 1 – Localização geográfica aproximada das principais discontinuidades filogeográficas na Mata Atlântica. Em cinza a área original da Mata Atlântica. As linhas pontilhadas representam as discontinuidades. Descontinuidade (i) observada por Grazziotin et al. (2006), Cabanne, Santos e Miyaki (2007), Cabanne et al. (2008), Carnaval et al. (2009), Martins et al. (2009), Batalha-Filho et al. (2010) e Thomé et al. (2010). Descontinuidade (ii) observada por Cabanne, Santos e Miyaki (2007), Cabanne et al. (2008), Carnaval et al. (2009) e Thomé et al. (2010). Descontinuidade (iii) observada por Cabanne et al. (2008) e Carnaval et al. (2009).



Fonte: Batata-Filho; Miyaki (2011).

1.2.2 Marcadores Moleculares

Marcadores moleculares são frutos de um recente progresso da genética molecular, que gerou ferramentas e conhecimentos para estudos filogenéticos e populacionais, aumentando a capacidade de identificar espécies e caracterizar a biodiversidade de ecossistemas, bem como avaliar a variabilidade genética inter e intrapopulacional de diversas espécies (PAIVA; ROSA, 2009). Os marcadores moleculares são definidos como qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA. Estes surgiram devido à necessidade da detecção de polimorfismo genético diretamente no DNA. Esses marcadores são características do DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdados geneticamente (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; MILACH, 1998).

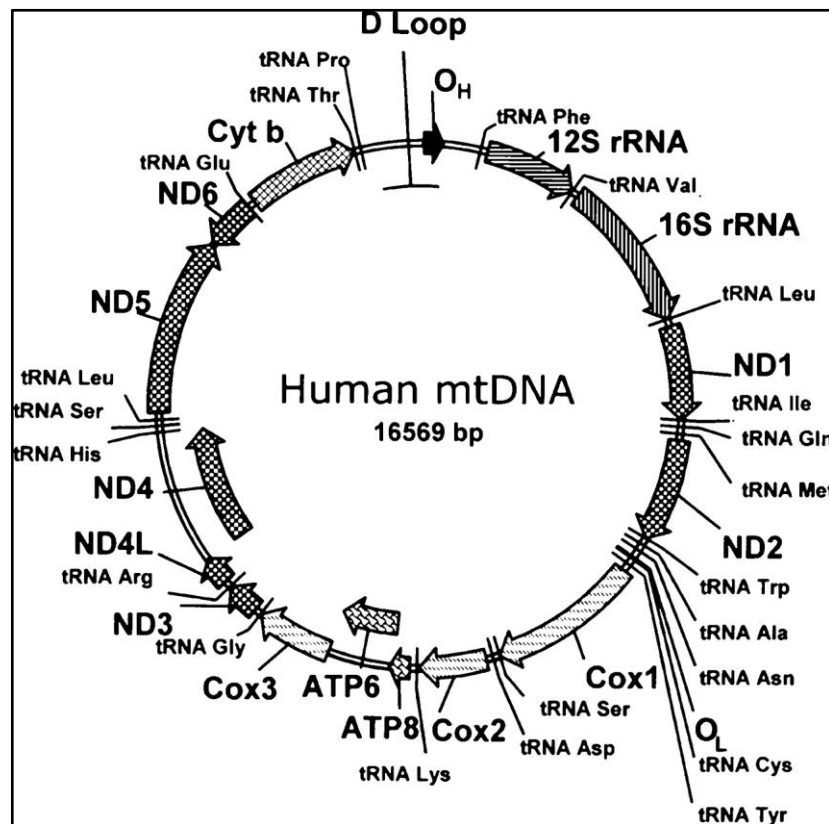
Existe um grande número de tecnologias na genética molecular que podem ser utilizadas para fornecer informações úteis aos programas de conservação e uso de recursos genéticos, bem como para a realização das pesquisas (FALEIRO, 2007). Cada tecnologia apresenta vantagens e desvantagens, sendo que o uso de uma ou outra vai depender, dentre outros fatores, do objetivo do estudo, da infraestrutura disponível, dos recursos financeiros para o investimento, da disponibilidade de recursos humanos com treinamento apropriado e do nível de conhecimento da genética molecular da espécie a ser estudada (FALEIRO, 2007).

1.2.2.1 Citocromo C Oxidase I

O DNA dos organismos eucarióticos está localizado no núcleo e em outras estruturas celulares como as mitocôndrias e os cloroplastos (AVISE, 2000). Nas células animais, a única organela que contém seu próprio genoma é a mitocôndria, e seu número varia de quinhentos, mil ou até 10 mil dessas estruturas nas diferentes células (AMABIS; MARTHO, 1990). Em cada mitocôndria animal geralmente existem várias moléculas de DNA, estas são dupla fitas, circular e apresentam tamanho variável de acordo com o grupo taxonômico (HARTL; CLARK, 1997).

Esta organela possui 13 genes codificantes de proteínas, dois RNA ribossômicos, 22 RNA transportadores e uma região conhecida como região controle responsável pelo processo de transcrição e replicação da molécula (PEREIRA; OLIVEIRA, 2015) (Figura 2). Os polipeptídios sintetizados a partir do mtDNA integram o complexo enzimático responsável pelo transporte de elétrons que ocorre no interior da mitocôndria (SBISA et al., 1997).

Figura 2 – Mapa do DNA mitocondrial humano. OH e OL, origens de replicação das fitas pesada e leve, respectivamente; ND1-ND6, subunidades 1-6 desidrogenase NADH; Cox1-Cox3, subunidades 1-3 do citocromo oxidase; ATP6 e ATP8, subunidades 6 e 8 da ATPase mitocondrial; Cyt b, citocromo b.



Fonte: ALEXEYEV; LeDOUX; WILSON (2004).

Além de ser uma molécula circular, de dupla fita, de tamanho reduzido (15 a 20 Kb) e relativa simplicidade, o mtDNA animal apresenta as seguintes características: herança predominante matrilinear, frequências extremamente baixas de rearranjos por recombinação, inversões ou transposições, altas taxas de substituição e de inserções e deleções, que fazem com que estas sequências mitocondriais se modifiquem cerca de 5 a 10 vezes mais rápidas do que sequências nucleares de cópia única (TABERLET, 1996). Muitas hipóteses foram desenvolvidas para testar a rápida evolução do mtDNA animal, entre as quais destacam-se: a) relaxamento da restrição funcional (uma vez que transcreve apenas 13 tipos de polipeptídeos); b) alta taxa de mutação (devido ao ineficiente sistema de reparo de DNA, alta exposição a radicais livres mutagênicos no meio oxidativo da mitocôndria, ou a rápida replicação dentro das linhagens celulares); c) o fato do mtDNA não ser compactado com histonas (AVISE, 2000). Desta forma, as características intrínsecas do mtDNA promovem o surgimento de múltiplos alelos ou haplótipos (AVISE, 2000). Este marcador, portanto, pode fornecer informações necessárias para estudos de

relações filogenéticas, estimativa de distância genética, discriminação de subpopulações, assim como investigar a história da biogeografia (ERIKSSON et al., 2006; GARRIGAN; HAMMER, 2006).

O gene citocromo oxidase I (COI) vem sendo alvo de estudos populacionais de variabilidade genética pela sua universalidade e importância evolutiva, além disso, é bastante conservado entre os mais diversos genomas e possui suficiente diferenciação entre espécies por apresentar um padrão de sequência espécie-específico denominada sequência barcode (TAUTZ et al., 2003; WILSON, 2003; BLAXTER, 2003; SCHINDEL; MILLER, 2005; RUBINOFF, 2006). Em Coleoptera, esse marcador vem sendo utilizado tanto para identificação de espécie e construção de árvores filogenéticas (TUDA et al., 2006; KOBAYASHI et al., 2011; BECERRA, 2004; KIM; KJER; DUCKETT, 2003), bem como em estudos intrapopulacionais (VASCONCELOS et al., 2006; LOPEZ et al., 2014; BRAY et al., 2011; RUIZ et al., 2009).

1.2.2.2 Fator de alongação EF1-alfa

O fator de alongação da síntese proteica (EF1-alfa) em eucariotos é membro da família das proteínas G e é composto de quatro subunidades: A, B α , B β e B γ , sendo a subunidade EF1A também conhecida como EF1-alfa (CARNEIRO; PETER; BRIAN, 1999). Esta subunidade desempenha um importante papel na síntese proteica, promovendo a ligação do aminoacil-tRNA ao sítio A do ribossomo em um mecanismo dependente de GTP (XU et al., 2007).

A principal função do EF1-alfa é sem dúvida relacionada a síntese de proteínas, porém outras funções são atribuídas a este elemento, como desempenhar um papel na transdução de sinais no interior das células (YANG et al., 1990). Acredita-se também que o EF1-alfa possa se ligar a proteínas do citoesqueleto, como actina e tubulina (GROSS; KINZY, 2005). O EF1-alfa é um monitor sensível do pH intracelular e níveis de Ca²⁺ (RANSOM-HODGKINS, 2009). Este ativa a fosfoinositol 4 quinase, uma enzima pertencente à cascata de transdução de sinais e é ativada por fatores de crescimento (YANG et al., 1993; INFANTE et al., 2008).

De acordo com os dados disponíveis na plataforma Gene do National Center for Biotechnology Information (NCBI), em *Tribolium castaneum* (Coleoptera:

Tenebrionidae) o gene EF1-alfa possui cerca de 1500 pb e apresenta 2 exóns e 1 intron. Kim, Kjer e Duckett (2003), estudando espécies pertencentes a Alticinae e Galerucinae, ao sequenciarem o primeiro terço do gene EF1- α observaram que a terceira base nitrogenada do códon é significativamente heterogênea entre os táxons, enquanto a primeira e a segunda base nitrogenada do códon eram mais homogêneas.

1.3 MATA ATLÂNTICA

A Mata Atlântica no Brasil abrangia uma área equivalente a 1.315.460 Km² em 1.500 (Figura 3), estendendo-se ao longo de 17 estados: Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso do Sul, Bahia, Alagoas, Sergipe, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Ceará e Piauí (SOS MATA ATLÂNTICA, 2015). Atualmente, restam 8,5% de remanescentes florestais acima de 100 hectares, em comparação a cobertura original, e somando-se todos os fragmentos de floresta nativa acima de 3 hectares, temos 12,5% de área remanescente (Figura 4) (SOS MATA ATLÂNTICA, 2015). A largura da floresta é muito variável, estendendo-se em algumas áreas do Brasil até o leste do Paraguai e na província de Misiones na Argentina (GALINDO-LEAL; CÂMARA, 2003; OLIVEIRA-FILHO; JARENKOW; RODAL, 2006). Contribuíram para o desmatamento, e conseqüentemente, perda da área original da mata, processos como extração madeireira, agricultura e agropecuária, industrialização e expansão urbana desordenada, impacto ambiental causado pelos habitantes da área, ciclos econômicos, como o da cana-de-açúcar, do café e do ouro e poluição (SOS MATA ATLÂNTICA, 2015).

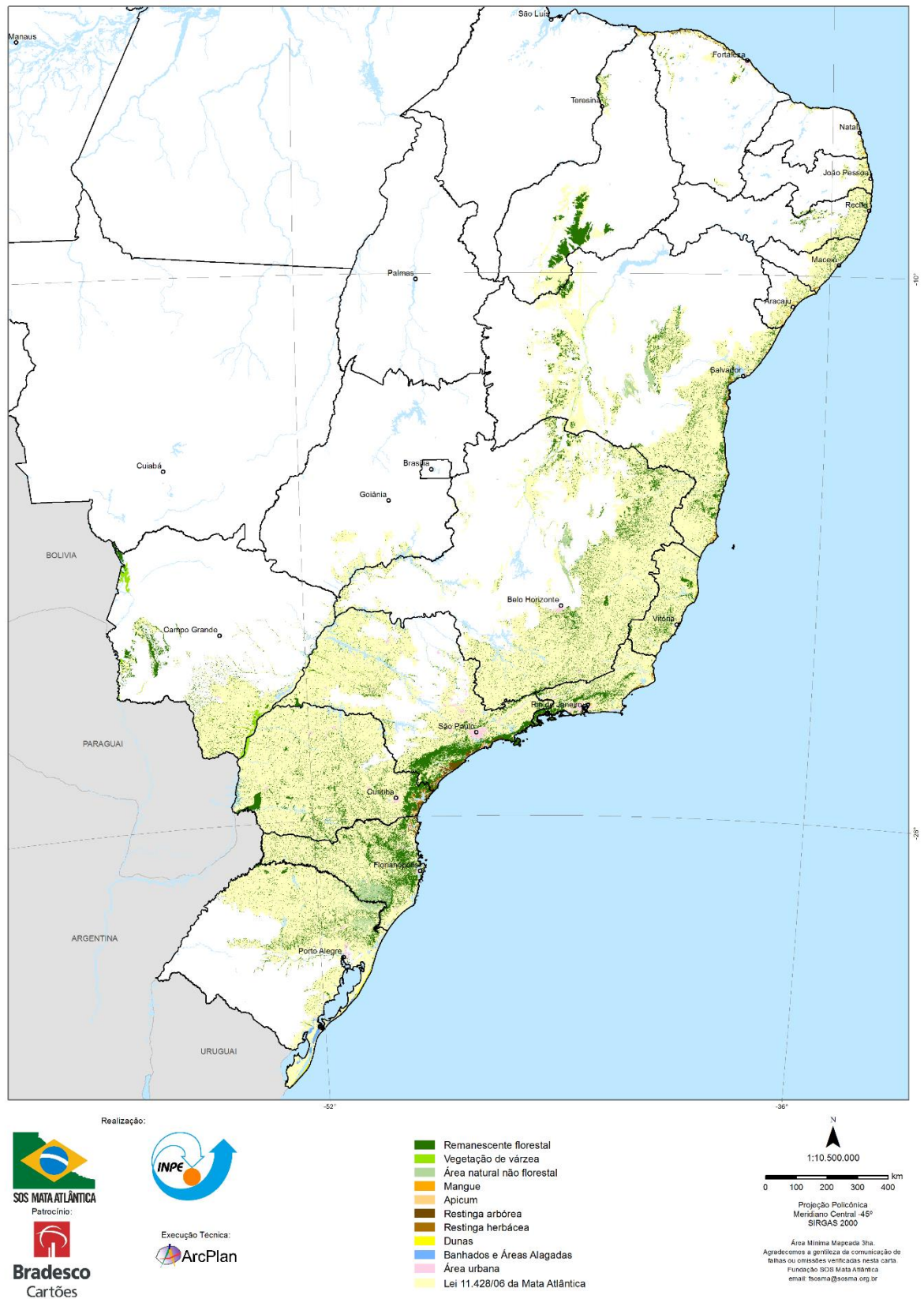
A Mata Atlântica é um dos domínios fitogeográficos melhor definido da América do Sul, exibindo uma biota única, resultante, em parte, de uma história evolutiva independente. Desta forma, a Mata Atlântica é considerada um *Hotspot* mundial devido sua alta riqueza em espécies e, além disso, uma das áreas mais ameaçadas do planeta (SOS MATA ATLÂNTICA, 2015). Das 633 espécies ameaçadas de extinção no Brasil, 383 ocorrem na Mata Atlântica (SOS MATA ATLÂNTICA, 2015), e somando-se a isso, esta ainda abriga mais de 15.700 espécies de plantas, das quais 8 mil são endêmicas, e mais de 2 mil espécies de vertebrados (PINTO et al., 2012).

Figura 3 – Distribuição original da Mata Atlântica, em 1500, e remanescentes em 1990, no Brasil.



Fonte: MORELLATO; HADDAD (2000).

Figura 4 – Distribuição dos remanescentes de Mata Atlântica no Brasil em 2016.



Fonte: SOS MATA ATLÂNTICA (2016).

A Mata Atlântica pode ser considerada uma ilha, utilizando uma perspectiva continental, pois encontra-se isolada das demais regiões florestais da América do Sul por formações vegetais predominantemente abertas, como o Chaco, o Cerrado e a Caatinga, formando um corredor denominado de “diagonal de formações abertas” (AB’SABER, 1977; SILVA; SANTOS; CASTELLETTI, 2004). Tal diagonal pode constituir uma barreira intransponível para grande parte das espécies animais típicas de ambientes florestais (COSTA, 2003). A composição original da Mata Atlântica é um mosaico de vegetações definidas como Florestas Ombrófilas Densa, Aberta e Mista, Florestas Estacionais Decidual e Semidecidual, Campos de Altitudes, Mangues e Restingas (SOS MATA ATLÂNTICA, 2015).

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A ordem Coleoptera é a mais rica e diversa dentro de Insecta, possuindo mais de 358.000 espécies descritas; no entanto estudos filogeográficos e citogenéticos dentro deste grupo ainda são escassos, principalmente para a região Neotropical e para o Brasil. Sabe-se, que os alticíneos, de maneira geral, ocorrem com maior frequência em áreas de borda e impactadas e apresentam certa preferência às plantas consumidas, uma vez que muitas espécies são impalatáveis pelo acúmulo de compostos fenólicos das plantas hospedeiras, o que pode delimitar a sua distribuição. Além disso, apresentam características citogenéticas interessantes como variados sistemas de determinação sexual, dispersão dos genes ribossomais nos cromossomos autossômicos e a ausência de informação quanto a composição da sequência telomérica em seus cromossomos.

Partindo da ausência de informação filogeográfica e populacional de *Omophoita octoguttata*, bem como do conhecimento da existência de descontinuidades filogeográficas na Mata Atlântica e do desmatamento que esta vem sofrendo, a análise populacional deste besouro pode trazer inferências a filogeografia de Alticinae na Região Sul do Brasil, além de demonstrar a variabilidade genética da espécie e a presença ou ausência de fluxo gênico nas localidades estudadas. A análise citogenética de espécies pertencentes ao gênero *Alagoasa* poderá contribuir com o conhecimento dos processos evolutivos que ocorreram no grupo.

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem a proposta de determinar se existe estruturação populacional na distribuição latitudinal da espécie *Omophoita octoguttata* na região sul do Brasil, identificando possíveis barreiras naturais para o fluxo gênico entre as populações e, assim, determinar a diversidade populacional desta. Adicionalmente, diferenciar três espécies do gênero *Alagoasa*, possivelmente miméticas, por meio de análises citogenéticas e moleculares.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

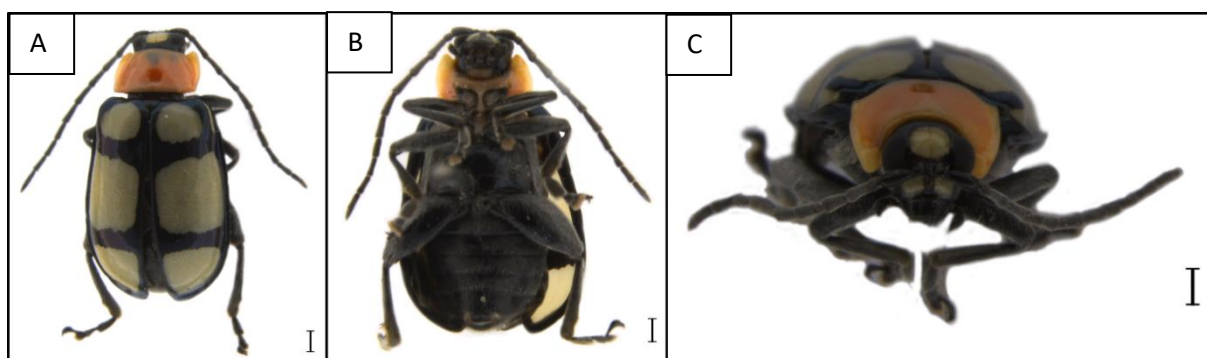
1. Estimar o grau de variabilidade intrapopulacional e interpopulacional de *O. octoguttata* nas localidades analisadas na região sul do Brasil;
2. Verificar se há fluxo gênico entre os indivíduos coletados nas diferentes localidades analisadas ou estruturação genética;
3. Verificar se existem descontinuidades filogeográficas para *O. octoguttata* na Mata Atlântica da região sul do Brasil;
4. Determinar o número haploide e diploide de cromossomos e o tipo de sistema de determinação sexual em espécies do gênero *Alagoasa*;
5. Mapear os genes ribossomais rDNA 18S e 5S e a sequência telomérica TTAGG em espécies do gênero *Alagoasa*;
6. Diferenciar as três espécies do gênero *Alagoasa* a partir do sequenciamento do gene COI.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO E LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA

Foram analisados indivíduos adultos de *Omophoita octoguttata* (Figura 5) e de 3 espécies pertencentes ao gênero *Alagoasa* (Figura 6), pertencentes à ordem Coleoptera, subfamília Alticinae. Um total de 90 exemplares de *O. octoguttata* foram coletados, sendo 15 indivíduos por localidade, em populações naturais, de maneira manual utilizando-se de puçás entomológicos, nas cidades de Ponta Grossa, Paraná, Brasil (S 25°07'10"; O 49°56'24"), Rio Branco do Sul, Paraná, Brasil (S 25°08'40"; O 49°20'12"), Guarapuava, Paraná, Brasil (S 25°21'16"; O 51°28'06"), Nonoai, Rio Grande do Sul, Brasil (S 27°23'25"; O 52°44'10"), União da Vitória, Paraná, Brasil (S 26°14'27"; O 51°08'42"), e Seara, Santa Catarina, Brasil (S 27°08'55"; O 52°22'49") (Figura 7).

Figura 5 – Indivíduo adulto de *Omophoita octoguttata*. Em (A) visão dorsal, (B) visão ventral e (C) destaque para a porção antero-posterior e presença de mácula na cabeça (Barra 1mm).



Os indivíduos pertencentes ao gênero *Alagoasa* foram coletados em populações naturais, de maneira manual utilizando-se de puçás entomológicos, na cidade de Ponta Grossa, Paraná, Brasil (S 25°07'10"; O 49°56'24"), sendo que foram coletados 12 indivíduos adultos de *Alagoasa pantina*, 10 de *Alagoasa* sp.1 e 10 de *Alagoasa* sp.2.

Figura 6 – Machos adultos pertencentes ao gênero *Alagoasa*. **A** – *Alagoasa pantina*; **B** – *Alagoasa* sp.1; **C** – *Alagoasa* sp.2. (Barra 1mm).

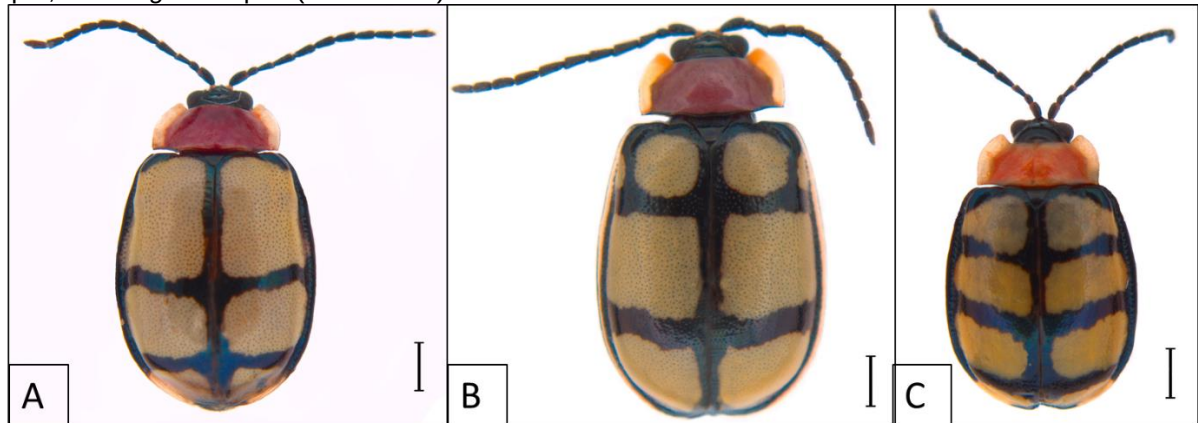
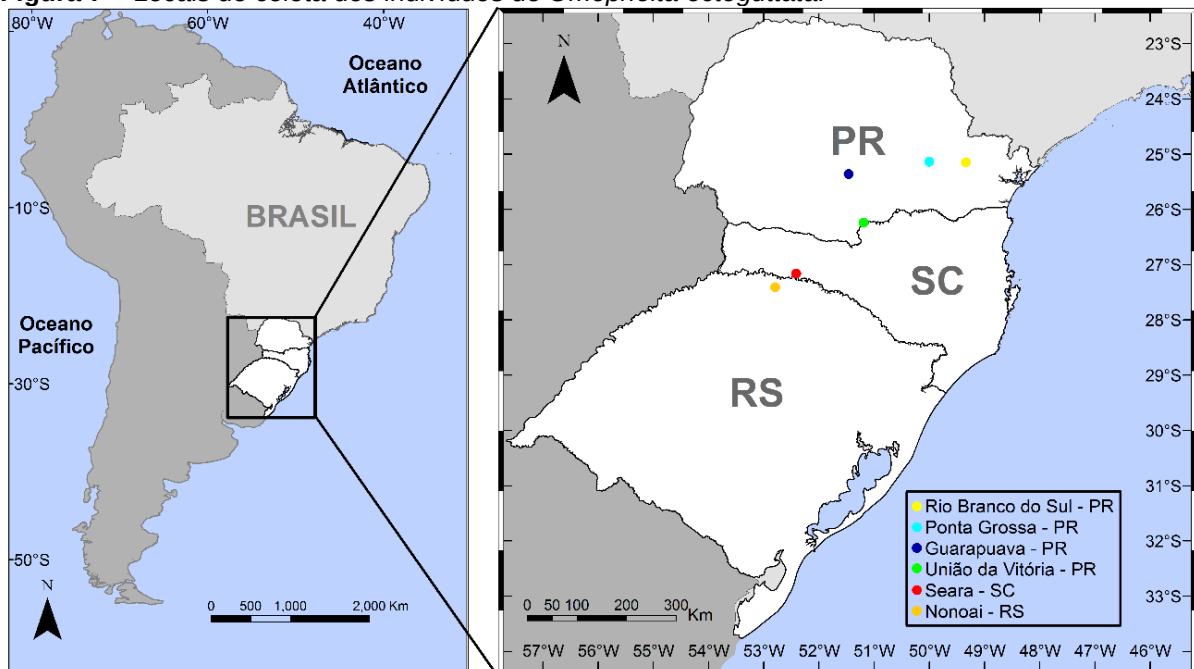


Figura 7 – Locais de coleta dos indivíduos de *Omophoita octoguttata*.



A cabeça, o pronoto e o terceiro par de pernas de todos os indivíduos coletados foram estocados em álcool etílico absoluto para extração de DNA. As gônadas dos indivíduos do sexo masculino de *O. octoguttata* coletados em Ponta Grossa, União da Vitória, Rio Branco do Sul, Guarapuava e Nonoai foram armazenadas em fixador Carnoy I (metanol-ácido acético 3:1), na geladeira para estudos posteriores. O abdômen e demais estruturas de todos os indivíduos coletados foram estocadas em álcool etílico, no freezer, no Laboratório de Genética Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Os indivíduos pertencentes ao gênero *Alagoasa* coletados foram mantidos em laboratório em potes plásticos, com algodão umedecido em água com açúcar, até a realização das técnicas.

Para identificação taxonômica das espécies, alguns exemplares foram enviados ao especialista Carlos Campaner do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo – USP.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Extração De DNA

O DNA genômico de *O. octoguttata*, *Alagoasa pantina*, *Alagoasa sp1.* e *Alagoasa sp.2* foi extraído a partir da fragmentação em nitrogênio líquido da cabeça, pronoto e do 3º par de pernas em tubos do tipo *ependorf* de 2 ml, de acordo com o protocolo de Murray e Thompson (1980), com modificações (Anexo A).

A concentração do DNA genômico foi quantificada por meio do espectrofotômetro Nanovue da GE Healthcare®, e a sua integridade, após corrida eletroforética à 70 V por 1 hora, foi verificada em gel de agarose 1%, corado com 4 µL de Gel Red (Biotium®) mais tampão de carregamento azul de bromofenol (1:1), e fotodocumentado sob luz ultravioleta no Imagequant Las 4000 da GE Healthcare®.

Em seguida as amostras de DNA foram diluídas para concentração de 20 ng.µL⁻¹.

3.2.2 Amplificação Do Gene COI

Os indivíduos de *O. octoguttata* coletados nos municípios de Seara e de União da Vitória, bem como 3 indivíduos pertencentes a *A. pantina*, 3 pertencentes a *Alagoasa sp.1*, e 3 pertencentes a *Alagoasa sp.2* tiveram a porção da subunidade I do gene mitocondrial Citocromo C Oxidase (COI) amplificados a partir de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando os *primers* descritos por Kim, Kjer e Duckett (2003), sendo que as reações, realizadas em microtubos de 0,2 mL, continham: 1X tampão Taq DNA polimerase (Invitrogen®), 1,5 mM de MgCl₂; 0,2 mM de solução dNTP; 1,0 µM de cada *primer* (*forward* 5' TAATTGGAGGATTTGGWAAYTG 3' e

reverse 5' CCYGGTAAAATTTAAATATAAACTTC 3'); 2,5 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen®) e 40 ng de DNA molde para um volume final de reação de 35 µL.

A PCR seguiu o programa: 1 ciclo de desnaturação inicial por 4 minutos a 95°C, seguido de 35 ciclos de 94°C por 60 segundos, temperatura de anelamento de 53°C por 30 segundos, e seguido da etapa de extensão dos fragmentos a 72°C por 30 segundos, com mais um passo final de 72°C por 10 minutos.

Os produtos de PCR foram conferidos, após corrida eletroforética à 70 V por 40 minutos, em gel de agarose 1%, corado com 4 µL de Gel Red (Biotium®) mais tampão de carregamento azul de bromofenol (1:1), fotodocumentados sob luz ultravioleta no Imagequant Las 4000 da GE Healthcare®, e purificadas utilizando o kit de purificação Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification, da GE Healthcare®, seguindo as instruções do fabricante. Após a purificação os produtos de PCR foram quantificados no espectrofotômetro Nanovue da GE Healthcare®, e a sua integridade foi verificada, após corrida eletroforética à 70 V por 40 minutos, em gel de agarose 1%, corado com 4 µL de Gel Red (Biotium®) mais tampão de carregamento azul de bromofenol (1:1), e fotodocumentado sob luz ultravioleta no Imagequant Las 4000 da GE Healthcare®.

As amostras foram encaminhadas para sequenciamento na empresa ACTGene Análises Moleculares, a qual utiliza um sequenciador automático (ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer) armado com capilares de 50 cm e polímero POP6 (Applied Biosystems).

Os indivíduos de *O. octoguttata* pertencentes às localidades de Ponta Grossa, Rio Branco do Sul, Guarapuava e Nonoai já haviam sido submetidos à amplificação do gene COI no Laboratório de Genética Evolutiva e suas sequências fazem parte do acervo do laboratório.

3.2.3 Amplificação Do Gene EF1-alfa

Os indivíduos de *O. octoguttata* coletados nos municípios de Seara e de União da Vitória tiveram o primeiro terço do gene nuclear Fator de Elongação alfa (EF1-alfa) amplificados a partir de PCR, utilizando os *primers* descritos por Duckett e Kjer (2003), sendo que as reações, realizadas em microtubos de 0,2 mL, continham: 1X tampão *Taq* DNA polimerase (Invitrogen®), 1,5 mM de MgCl₂; 0,2 mM de solução dNTP; 0,5 µM de cada *primer* (*forward* 5' ATCGAGAAGTTTCGAGAARGARGC 3' e

reverse 5' CCAYCCCTTRAACCANGGCAT 3'); 2,5 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen®) e 40 ng de DNA molde para um volume final de reação de 35 µL.

A PCR seguiu o seguinte programa: 1 ciclo de desnaturação inicial por 4 minutos a 95°C, seguido de 35 ciclos de 94°C por 60 segundos, temperatura de anelamento de 59,4°C por 30 segundos, e seguido da etapa de extensão dos fragmentos a 72°C por 30 segundos, com mais um passo final de 72°C por 10 minutos.

Os produtos de PCR foram conferidos, após corrida eletroforética à 70 V por 40 minutos, em gel de agarose 1%, corado com 4 µL de Gel Red (Biotium®) mais tampão de carregamento azul de bromofenol (1:1), fotodocumentados sob luz ultravioleta no Imagequant Las 4000 da GE Healthcare®, e purificadas utilizando o kit de purificação Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification, da GE Healthcare®, seguindo as instruções do fabricante. Após a purificação os produtos de PCR foram quantificados no espectrofotômetro Nanovue da GE Healthcare®, e a sua integridade foi verificada, após corrida eletroforética à 70 V por 40 minutos, em gel de agarose 1%, corado com 4 µL de Gel Red (Biotium®) mais tampão de carregamento azul de bromofenol (1:1), e fotodocumentado sob luz ultravioleta no Imagequant Las 4000 da GE Healthcare®.

As amostras foram encaminhadas para sequenciamento na empresa ACTGene Análises Moleculares, a qual utiliza um sequenciador automático (ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer) armado com capilares de 50 cm e polímero POP6 (Applied Biosystems).

Os indivíduos pertencentes às localidades de Ponta Grossa, Rio Branco do Sul, Guarapuava e Nonoai já haviam sido submetidos à amplificação do gene EF1-α no Laboratório de Genética Evolutiva e suas sequências fazem parte do acervo do laboratório.

3.2.4 Análises Das Sequências

As sequências *Foward* e *Reverse* dos genes COI e EF1-alfa foram verificadas e corrigidas utilizando os programas *Chromas Lite* v. 2.0 e *Geneious* v. 7.1.3 (KEARSE et al., 2012). Para o alinhamento e construção das sequências consenso foi utilizado o programa *Geneious* v 7.1.3 (KEARSE et al., 2012), o qual inclui o pacote *CLUSTAL W* (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994). O programa

Chromas Lite v. 2.0 também foi utilizado para conferência dos pontos de mutação e possível correção. A identidade das sequências obtidas foi realizada a partir da comparação das mesmas com informações disponíveis no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* – USA (NCBI), por meio da plataforma BLAST (ALTSCHUL et al., 1997). Após a correção das sequências, uma matriz foi construída utilizando as sequências dos dois genes analisados para *Omophoita octoguttata*.

3.2.5 Análises De Diversidade

Utilizando o programa *MEGA* v. 7.0 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016) foi determinado o modelo de substituição nucleotídica que melhor explica as transversões e transições para a matriz construída para as sequências de *O. octoguttata*.

A diversidade nucleotídica (π), a diversidade haplotípica (h), os índices de transversões, transições, substituições e sítios polimórficos para *O. octoguttata* foram calculados no programa *Arlequin* v. 3.5.2.1 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010), para a matriz construída. Utilizando este mesmo programa ainda foram realizadas a Análise de Variância Molecular (AMOVA) (EXCOFFIER; SMOUSE; QUATTRO, 1992), para avaliar a estrutura genética intrapopulacional e interpopulacional, utilizando o modelo de substituição nucleotídica Tamura (TAMURA, 1992), a estatística F de Wright (WRIGHT, 1931), para determinar a estruturação populacional dos indivíduos analisados, e o teste de neutralidade D de Tajima (TAJIMA, 1989).

Para a construção das redes haplotípica para *O. octoguttata*, a partir das sequências dos genes COI e EF1-alfa, foi utilizado o programa Haplotype Viewer, o qual necessita de uma árvore filogenética previamente construída para as sequências analisadas. Para a construção destas árvores foi utilizado o modelo de máxima verossimilhança no programa *MEGA* v. 7.0 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016).

3.2.6 Análise Filogenética

As sequências do gene COI obtidas para as três espécies pertencentes ao gênero *Alagoasa* foram alinhadas no programa *Geneious* v 7.1.3 (KEARSE et al., 2012), utilizando o pacote Clustal W. Árvores de relações filogenéticas foram construídas, utilizando o modelo de substituição nucleotídica GTR, nos programas *MEGA* v. 7.0 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016), através dos métodos Máxima Verossimilhança (MV), Neighbor Joining (NJ) e Máxima Parcimônia (MP) com 10.000 interações para bootstrap, considerando como grupos externos as espécies *O. octoguttata* (AF479430.1), *Chrysomela tremula* (KM452126.1) e *Timarcha tenebricosa* (KC185782.1), e *Geneious* v. 7.1.3, utilizando o plugin MrBayes 3.2.6 (HUELSENBECK; RONQUIST, 2001), empregando o método Bayesiano (MB), com 500.000 *Markov Chain Monte Carlo* (MCMC) e *burnin* de 50.000, considerando como grupo externo *C. tremula*. No programa *MEGA* 7.0, foram ainda calculadas as distâncias intra e interespecíficas para as sequências obtidas.

Para a matriz de dados dos genes COI e EF1-alfa de *O. octoguttata* foi construída uma árvore de inferência Bayesiana no plugin MrBayes 3.2.6 (HUELSENBECK; RONQUIST, 2001) do *Geneious* v. 7.1.3, com 500.000 *Markov Chain Monte Carlo* (MCMC) e *burnin* de 50.000, considerando como grupo externo *T. tenebricosa*.

3.2.7 Citogenética Convencional

Machos adultos de *A. pantina*, *A. sp1* e *A. sp.2* foram dissecados em solução fisiológica para insetos e processados, para obtenção das preparações cromossômicas, de acordo com a técnica descrita por Almeida, Zacaro e Cella (2000) (Anexo A). Em seguida as lâminas foram coradas com Giemsa 3%, durante 12 minutos (Anexo A)

As melhores células mitóticas e meióticas foram fotografadas em um microscópio de epifluorescência Olympus BX41, o qual está equipado com uma câmera Olympus DP-71 12 Mega pixels, utilizando o programa DP controller. A montagem dos cariótipos foi realizada de acordo com o tamanho e a morfologia dos cromossomos, os quais foram dispostos em ordem decrescente e aos pares, de

acordo com Levan, Fredga e Sandberg (1964), utilizando o software Adobe Photoshop CS6.

3.2.8 Citogenética Molecular

3.2.8.1 Obtenção das sondas de rDNA e telomérica

As sondas de rDNA 18S foram obtidas por PCR marcado, empregando-se a uracila biotinizada (16 dUTP-biotin – Roche®), a partir do gene parcial 18S de *Omophoita octoguttata* clonado em vetor PTZ (Almeida et al., 2010). A reação de PCR realizada no termociclador continha: 1X Tampão Taq DNA polimerase (Invitrogen®), 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 µM de cada primer M13, 0,04 mM de dATP, 0,04 mM de dCTP, 0,04 mM de dGTP, 0,028 mM de dTTP, 0,012 mM de Biotina-16-dUTP, 2 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®) e 200 ng de DNA clone, em um volume final de 80 µL. A PCR seguiu o seguinte programa: 1 ciclo de desnaturação inicial por 4 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos de 94°C por 60 segundos, temperatura de anelamento de 51°C por 45 segundos, e seguido da etapa de extensão dos fragmentos a 72°C por 90 segundos, com mais um passo final de 72°C por 5 minutos.

As sondas de rDNA 5S foram obtidas por PCR marcado, empregando-se a digoxigenina-11-dUTP (Roche®), utilizando-se do gene 5S de *Omophoita octoguttata* clonado em vetor PTZ (MELO, 2013). A reação de PCR realizada no termociclador continha: 1X Tampão Taq DNA polimerase (Invitrogen®), 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 µM de cada primer M13, 0,04 mM de dATP, 0,04 mM de dCTP, 0,04 mM de dGTP, 0,028 mM de dTTP, 0,012 mM de digoxigenina-11-dUTP, 2 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®) e 200 ng de DNA clone, em um volume final de 80 µL. A PCR seguiu o seguinte programa: 1 ciclo de desnaturação inicial por 4 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos de 94°C por 60 segundos, temperatura de anelamento de 51°C por 45 segundos, e seguido da etapa de extensão dos fragmentos a 72°C por 90 segundos, com mais um passo final de 72°C por 5 minutos.

A sonda telomérica foi obtida por PCR realizada no termociclador contendo: 1X Tampão Taq DNA polimerase (Invitrogen®), 1,5 mM de MgCl₂, 0,16 mM de dNTP, 0,5 µM de cada primer (*Foward* 5'TTAGG3' e *Reverse* 5'CCTAA3'), e 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®), em um volume final de 50 µL. A PCR seguiu o

programa proposto por Ijdo et. al. (1991), o qual consiste em: 1 ciclo de desnaturação inicial por 5 minutos a 94°C, seguido de 10 ciclos de 94°C por 60 segundos, temperatura de anelamento de 55°C por 30 segundos, e uma etapa de extensão a 72°C por 60 segundo, 30 ciclos de 94°C por 60 segundos, temperatura de anelamento de 60°C por 30 segundos, e etapa de extensão de 72°C por 90 segundos, e mais um passo final de 72°C por 5 minutos. A sonda telomérica foi marcada por meio da reação de *Nick Translation*, utilizando o kit Dig Nick Translation (Roche®), o qual contém digoxigenina-11-dUTP, e seguindo as instruções do fabricante.

Todas as sondas foram conferidas, após corrida eletroforética à 70 V por 40 minutos, em gel de agarose 1%, corado com 4 µL de Gel Red (Biotium®) mais tampão de carregamento azul de bromofenol (1:1), fotodocumentados sob luz ultravioleta no Imagequant Las 4000 da GE Healthcare®, e foram quantificadas no espectrofotômetro Nanovue da GE Healfcare®.

3.2.8.2 Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH)

O procedimento de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) foi realizado de acordo com Pinkel, Straume e Gray (1986), com pequenas modificações descritas por Almeida et al. (2010) (Anexo A) utilizando as sondas rDNA 18S, rDNA 5S e telomérica. As lâminas foram tratadas previamente com RNase 0,4% (RNase/2XSSC) a 37°C durante uma hora, pepsina 0,005% (em 10 mM 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 4 minutos, para adição da solução de hibridação. As condições de hibridação foram de alta extringência (2,5 ng/µL de sondas, formamida deionizada 50%, sulfato dextrano 10%, 2XSSC a 37°C por 16 horas). Após o tempo de hibridação as lâminas foram lavadas com formamida 15%/0,2XSSC a 42°C em quatro banhos de 5 minutos cada e Tween 0,5%/4XSSC por 5 minutos.

Para a detecção do sinal das sondas foram utilizados os anticorpos Streptavidina conjugada com Alexa Fluor 488 (Sigma®), para biotina, e anti-digoxigenina conjugada com rodamina (Roche®), para digoxigenina. Os cromossomos foram contra corados com DAPI (0,2 mg/mL) montado em uma solução anti-fade.

As melhores células mitóticas e meióticas foram fotografadas em microscópio de epifluorescência Olympus Bx41, com filtros específicos e captura de imagem em tempo real com câmera CCD DP-71 e o software DP controller. As imagens foram analisadas e montadas no software Adobe Photoshop CS6.

4 RESULTADOS

Os resultados estão organizados em 2 artigos a serem submetidos para revistas especializadas:

Análise da diversidade genética de *Omophoita octoguttata* Fabricius (1775) (Coleoptera: Alticinae) e inferências filogeográficas para a Mata Atlântica da Região Sul do Brasil

Diferenciação de três espécies crípticas pertencentes ao gênero *Alagoasa* (Coleoptera: Alticinae): análise citogenética e sequenciamento do gene COI

4.1 ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Omophoita Octoguttata* FABRICIUS (1775) (COLEOPTERA: ALTICINAE) E INFERÊNCIAS FILOGEOGRÁFICAS PARA A MATA ATLÂNTICA DA REGIÃO SUL DO BRASIL

RESUMO

Omophoita octoguttata, endêmico da região Neotropical, pertencente a subfamília Alticinae, apresenta maior ocorrência na Mata Atlântica, em áreas de borda, de sucessão primária e degradadas. No entanto, não existem informações sobre padrões filogeográficos ou de estruturação populacionais para essa espécie. Nos últimos anos, a Mata Atlântica vem sofrendo com inúmeros processos de desmatamento e fragmentação, restando cerca de 12,5% da área original, o que podem interferir nos processos de dispersão das espécies e aumentar áreas de bordas. O objetivo deste trabalho foi determinar a existência de estruturação populacional na distribuição latitudinal da espécie *Omophoita octoguttata*, identificando possíveis barreiras naturais para o fluxo gênico, e assim determinar a diversidade genética desta espécie na Mata Atlântica da região Sul do Brasil e realizar inferências filogeográficas. Para isso se utilizou de sequências amplificadas a partir dos genes mitocondrial COI e EF1-alfa em 90 indivíduos coletados em 6 diferentes localidades. A diversidade haplotípica e nucleotídica foi alta em todas as localidades analisadas. Com relação ao gene EF1-alfa, a ocorrência de muitos haplótipos diferentes, indicando que o gene não é um bom marcador populacional para *O. octoguttata*. A presença de uma descontinuidade filogeográfica para Alticinae não foi observada na Mata Atlântica da região Sul do Brasil, uma vez que indivíduos pertencentes a localidade de Nonoai, situada mais ao Sul, ainda mantém fluxo gênico com as localidades mais ao norte, possivelmente utilizando das áreas de borda dos fragmentos de Mata Atlântica para manter uma rota de dispersão, porém, a estruturação das localidades de Seara e União da Vitória com as outras localidades pode estar relacionada a barreiras naturais.

Palavras-chave: COI; EF1-alfa; Estruturação populacional; Fst.

INTRODUÇÃO

Coleoptera representa a ordem mais rica e variada dentro da Classe Insecta, com aproximadamente 358.000 espécies descritas, distribuídas em 26.000 gêneros, o que corresponde a cerca de 40% das espécies conhecidas de insetos e 30% dos animais (COSTA, 2003; LAWRENCE; BRITTON, 1994; GULLAN; CRANSTON, 2010). No Brasil ocorrem 4.351 gêneros com 26.755 espécies (COSTA, 2003; TRIPLEHORN; JOHNSON, 2011). Alticinae (Chrysomelidae), compreende 570 gêneros com mais de 10.000 espécies, as quais apresentam uma origem filogenética única (BORROR; DELONG, 1988; SEENO; WILCOX, 1982; SCHERER, 1988). A distribuição dos gêneros de Alticinae reflete eventos geológicos e ecológicos na história da Terra, corroborando com a teoria da deriva continental proposta por Alfred Wegener em 1912 (SCHERER, 1988). O maior número de espécies desta subfamília encontra-se na região Neotropical, com mais de 200 gêneros apenas na América do Sul, e destes, 196 são endêmicas do continente (SCHERER, 1988). De acordo com Linzmeier, Ribeiro-Costa e Marinoni (2006) os alticines são potenciais indicadores biológicos, pois se observa uma maior quantidade amostral destes em áreas degradadas, áreas de sucessão primária e de borda do que em áreas mais preservadas. A espécie *Omophoita octoguttata* Fabricius 1775, pertence à tribo Oedionychini, é endêmica da região Neotropical; porém, assim como em toda a ordem Coleoptera, os estudos citogenéticos e moleculares são escassos (RILEY et al., 2002; PETITPIERRI, 1996). A ocorrência da espécie *O. octoguttata* foi relatada no Brasil, nos Estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, Espírito Santo, São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul, e também no Paraguai (BECHYNÉ, 1955; 1959; SILVA et al., 1968; ALMEIDA; CAMPANER; CELLA, 2009).

A filogeografia é uma subdisciplina da biogeografia, definida como o estudo dos princípios e processos que governam a distribuição geográfica de linhagens genealógicas, especialmente intra-especificamente e entre espécies próximas. Em outras palavras, o tempo e o espaço são os eixos considerados na filogeografia para mapear as genealogias dos genes de interesse (AVISE, 2000). Embora qualquer estudo envolvendo as relações filogenéticas de uma determinada característica genética e o seu padrão de distribuição geográfico possa ser considerado como tendo enfoque filogeográfico, a grande maioria dos estudos nesta área tem sido

realizada pela análise do polimorfismo do DNA mitocondrial (mtDNA) (AVISE et al., 1987; AVISE, 2009).

O marcador molecular escolhido para os primeiros trabalhos filogeográficos em animais foi o mtDNA, devido as suas características (AVISE, 2000). No entanto, existem alguns problemas ao uso de apenas um tipo de marcador molecular, pois a hipótese da história pode refletir somente a história de determinado marcador, e não a história dos organismos (EDWARDS; BEERLI, 2000). Sendo assim, diferentes marcadores podem resultar em genealogias diferentes e no caso dos estudos filogeográficos, como são diversificações relativamente recentes, essa discordância entre marcadores é ainda mais expressiva. Portanto, apesar da filogeografia multilocus apresentar problemas, principalmente relacionados as características do DNA nuclear, esta é considerada a mais adequada na reconstrução da história evolutiva das espécies, devido ao acesso de informações históricas e demográficas provenientes de vários marcadores (BATATA-FILHO; MIYAKI, 2011).

Duas preocupações práticas são levantadas sobre a utilização de haplótipos nucleares para filogeografia: primeiro, a ocorrência de recombinação nos marcadores nucleares pode impedir a construção de árvores filogenéticas; e segundo baixas taxas de mutação podem resultar em uma má resolução, levando a poucos polimorfismos informativos (HARE, 2001). Estudos que utilizam mtDNA com objetivos filogeográficos tradicionais geralmente usam dados nucleares para corroborar os resultados iniciais com base em loco citoplasmático (HARE, 2001).

Apesar da Mata Atlântica ser o bioma com mais estudos filogeográficos realizados, não foi possível determinar um padrão filogeográfico geral para as espécies (BATATA-FILHO; MIYAKI, 2011). A Mata Atlântica abrangia uma área equivalente a 1.315.460 Km², estendendo-se ao longo de 17 estados: Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Goiás, Mato Grosso do Sul, Bahia, Alagoas, Sergipe, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Ceara, Piauí e Paraíba (SOS MATA ATLÂNTICA, 2015). Atualmente, restam 8,5% de remanescentes florestais acima de 100 hectares, em comparação a cobertura original, e somando-se todos os fragmentos de floresta nativa acima de 3 hectares, temos 12,5% de área remanescente (SOS MATA ATLÂNTICA, 2015).

Partindo da ausência de informação populacional e filogeográfica de *Omophoita octoguttata*, bem como do conhecimento da existência de

descontinuidades filogeográficas na Mata Atlântica, para algumas espécies, e do desmatamento que esta vem sofrendo, este trabalho tem a proposta determinar a existência de estruturação populacional na distribuição latitudinal de *O. octoguttata*, identificando possíveis barreiras naturais para a dispersão deste, e assim determinar a diversidade genética desta espécie na Mata Atlântica da região Sul do Brasil e realizar inferências filogeográficas.

MATERIAL E MÉTODOS

Um total de 90 indivíduos adultos de *Omophoita octoguttata* (Figura 5, material e métodos) foram coletados, de maneira manual com auxílio de puçás, em 6 localidades (15 indivíduos por localidade): Ponta Grossa, Paraná, Brasil (S 25°07'10"; O 49°56'24"), Rio Branco do Sul, Paraná, Brasil (S 25°08'40"; O 49°20'12"), Guarapuava, Paraná, Brasil (S 25°21'16"; O 51°28'06"), Nonoai, Rio Grande do Sul, Brasil (S 27°23'25"; O 52°44'10"), União da Vitória, Paraná, Brasil (S 26°14'27"; O 51°08'42"), e Seara, Santa Catarina, Brasil (S 27°08'55"; O 52°22'49") (Figura 7, material e métodos). A identificação da espécie foi realizada pelo pesquisador Carlos Campaner do MZUSP.

A extração de DNA foi realizada a partir da fragmentação da cabeça, pronoto e 3º par de pernas em nitrogênio líquido em tubos eppendorf de 2 ml seguindo o protocolo de Murray e Thompson (1980). A amplificação do gene COI foi realizada com a utilização dos *primers Forward* e *Reverse* descritos por Kim, Kjer e Duckett (2003), sendo que as reações, realizadas em microtubos de 200 µL, continham: 1X tampão Taq DNA polimerase (Invitrogen®), 1,5 mM de MgCl₂; 0,2 mM de solução dNTP; 1,0 µM de cada *primer*; 2,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®) e 40 ng de DNA molde para um volume final de reação de 35µL. A PCR foi realizada em termociclador com 1 ciclo de desnaturação inicial por 4 minutos a 95°C, seguido de 35 ciclos de 94°C por 60 segundos, 53°C por 30 segundos, e 72°C por 30 segundos, com mais um passo final de 72°C por 10 minutos.

A amplificação do gene EF1-alfa foi realizada utilizando os *primers Forward* e *Reverse* descritos por Duckett e Kjer (2003), em microtubos de 200 µL, que continham: 1X tampão Taq DNA polimerase (Invitrogen®), 1,5 mM de MgCl₂; 0,2 mM de solução dNTP 0,5 µM de cada *primer*; 2,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®)

e 40 ng de DNA molde para um volume final de reação de 35 μ L. A PCR foi realizada em termociclador com 1 ciclo de desnaturação inicial por 4 minutos a 95°C, seguido de 35 ciclos de 94°C por 60 segundos, 59,4°C por 30 segundos, e 72°C por 30 segundos, com mais um passo final de 72°C por 10 minutos.

Os produtos de PCR foram purificados utilizando o Kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification, da GE Healthcare®, e encaminhadas para sequenciamento pela empresa ACTGene Análises Moleculares. As sequências *Foward* e *Reverse* foram verificadas e corrigidas manualmente utilizando o programa *Geneious* v. 7.1.3 (KEARSE et al., 2012). Neste mesmo programa foi realizado o alinhamento e construção das sequências consenso, utilizando o pacote *CLUSTAL W*, com as configurações padrões de programa (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994). Uma matriz composta pelas sequências dos genes COI e EF1-alfa foi construída em arquivo fasta para os 90 indivíduos, sendo então utilizada para determinação do melhor modelo de substituição nucleotídica no programa *MEGA* v. 7.0 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016), e construção de uma árvore filogenética de inferência Bayesiana no software Mr.Bayes (HUELSENBECK; RONQUIST, 2001), utilizando a espécie *Timarcha tenebricosa* como grupo externo (COI - KC185782.1; EF1-alfa - AY171464.1). A diversidade nucleotídica (π), a diversidade haplotípica (h), os índices de transversões, transcrições, substituições e sítios polimórficos foram calculados no programa *Arlequin* v. 3.5.2.1 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010), utilizando este mesmo programa ainda foram realizadas a Análise de Variância Molecular (AMOVA) (EXCOFFIER; SMOUSE; QUATTRO, 1992), adotando o modelo de substituição nucleotídica Tamura (TAMURA, 1992, a estatística F de Wright (WRIGHT, 1931), e o teste de neutralidade D de Tajima (TAJIMA, 1989). Para a construção das redes haplotípica, a partir das sequências dos genes COI e EF1-alfa, foi utilizado o programa Haplotype Viewer.

RESULTADOS

A amplificação do gene Citocromo Oxidase I, nos indivíduos de *Omophoita octoguttata* pertencentes às diferentes localidades de coleta, mostrou um tamanho aproximado de 600 pb (pares de bases), quando visualizados em gel de agarose. As sequências obtidas destes fragmentos apresentam tamanho médio de 550 pb, sendo possível, após a verificação e correção destas, gerar uma sequência

consenso de 537pb. Quando essa sequência foi comparada com o banco de dados disponível no NCBI pelo software Blast, esta possui similaridade de 99% com o gene mitocondrial Citocromo C Oxidase subunidade I de *Omophoita octoguttata*.

A amplificação do gene EF1-alfa nos diferentes indivíduos de *Omophoita octoguttata* resultou em fragmentos com cerca de 500 pb, quando visualizados em gel de agarose. As sequências obtidas através do sequenciamento apresentam tamanho médio de 450 pb, sendo possível, após a verificação e correção destas, gerar uma sequência consenso de 390 pb. Quando essa sequência foi comparada com o banco de dados disponível no NCBI pelo software Blast, esta possui similaridade de 91% com o gene EF1-alfa de *Omophoita octoguttata*.

A partir das sequências dos dois genes foi construída uma matriz de 636 pb (COI – 382 pb; EF1-alfa – 254 pb), a qual apresentou como melhor modelo de substituição nucleotídica o modelo Tamura92 (BIC – 5713.093). A partir desta matriz gerou-se uma árvore de relações filogenéticas com inferência Bayesiana (Figura 8). A árvore demonstra uma distribuição homogênea dos indivíduos ao longo dos ramos, sem a formação evidente de agrupamentos de uma população ou de localidades próximas, o que indica o compartilhamento de haplótipos ou a proximidades das sequências como um todo. Um ramo interno mais evidente, com suporte de 64%, agrupa 60% dos indivíduos, com representantes de todas as localidades analisadas neste trabalho.

As redes haplotípicas também demonstram um padrão semelhante ao observado na árvore filogenética, demonstrando compartilhamento de haplótipos entre todas as localidades, ou com sequências derivadas dos haplótipos mais comuns. Para o gene COI, foram observados 30 diferentes haplótipos dentre as 90 sequências (Figura 9), sendo que um haplótipo mais comum compreende 30 indivíduos pertencentes as localidades de Nonoai, Ponta Grossa, Guarapuava, União da Vitória e Rio Branco do Sul. O segundo haplótipo mais comum compreende 15 indivíduos pertencentes as localidades de Seara, União da Vitória e Rio Branco do Sul, e deriva do haplótipo mais comum encontrado nos indivíduos analisados para o gene COI. Além disso, muitos haplótipos derivam dos dois maiores haplótipos observados por poucos passos mutacionais.

Para o gene EF1-alfa, foram observados 58 diferentes haplótipos entre os 90 indivíduos analisados (Figura 10). Dois haplótipos mais comuns foram observados para o gene EF1-alfa, sendo que cada um deles compreende 6 indivíduos. No

primeiro haplótipo estão presentes indivíduos das localidades Rio Branco do Sul, Seara e Guarapuava, já no segundo são observados indivíduos pertencentes as localidades de Guarapuava, Seara, Rio Branco do Sul e União da Vitória. Além disso, observa-se haplótipos compartilhados entre indivíduos das localidades de Ponta Grossa, Guarapuava, Rio Branco do Sul e União da Vitória, bem como entre Seara, Guarapuava, União da Vitória e Rio Branco do Sul. Para o gene EF1-alfa, Nonoai compartilha haplótipos apenas com Guarapuava, apresentando muitos haplótipos únicos.

Figura 8 – Árvore filogenética com inferência Bayesiana para a matriz dos genes COI e EF1-alfa de *Omophoita octoguttata*. GUA – Guarapuava; NON – Nonoai; SEA – Seara; PON – Ponta Grossa; UNI – União da Vitória; RIO – Rio Branco do Sul.

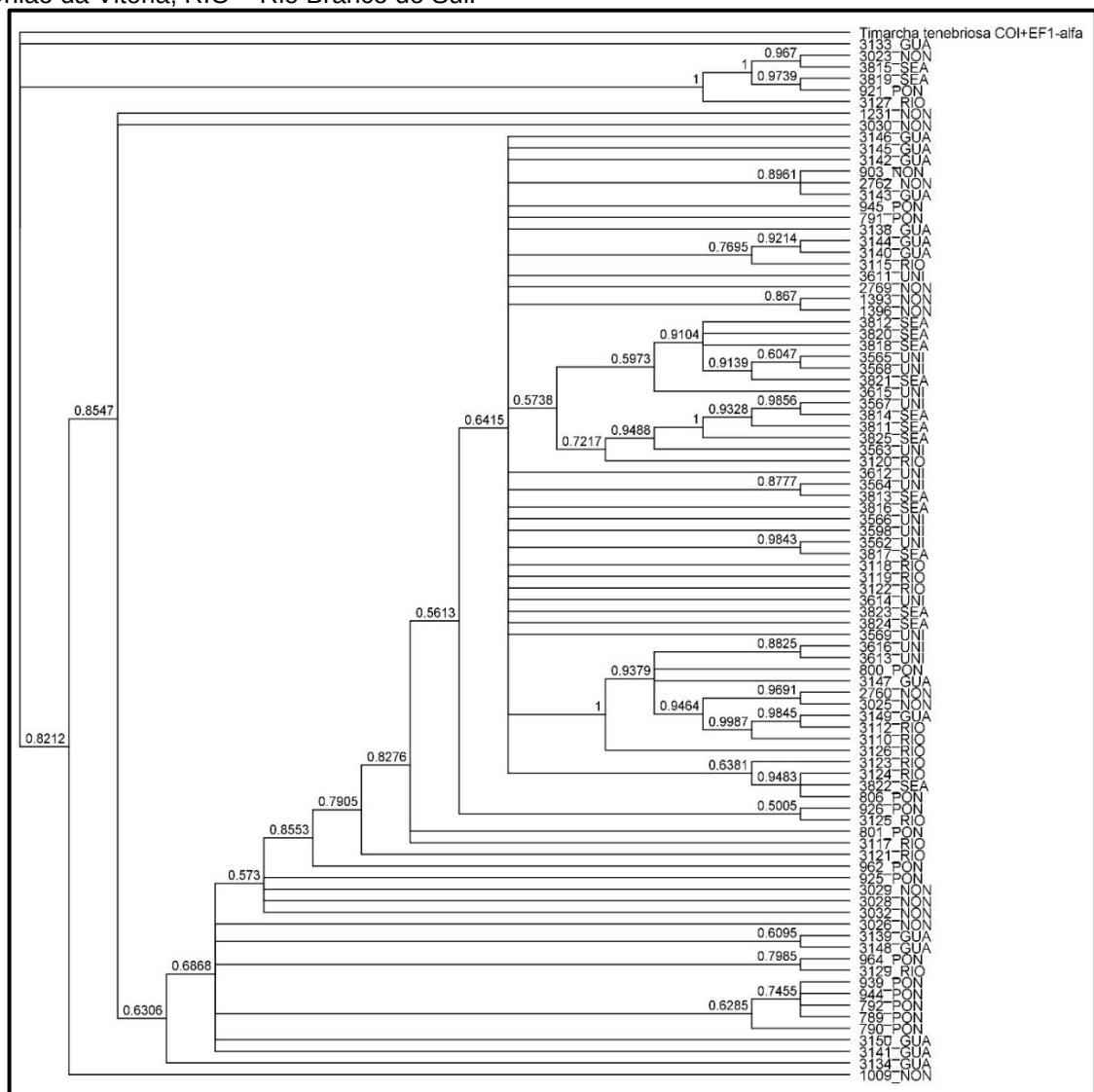


Figura 9 – Rede haplotípica linear construída para as sequências do gene COI para as localidades estudadas.

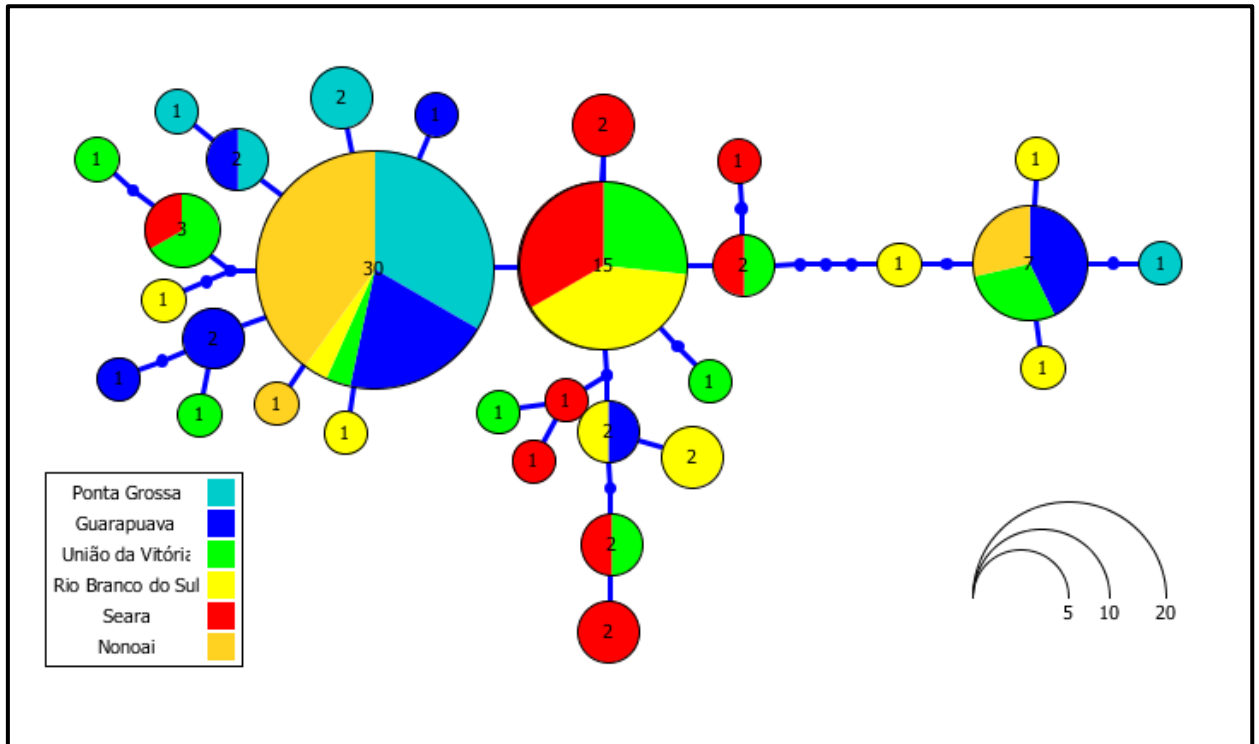
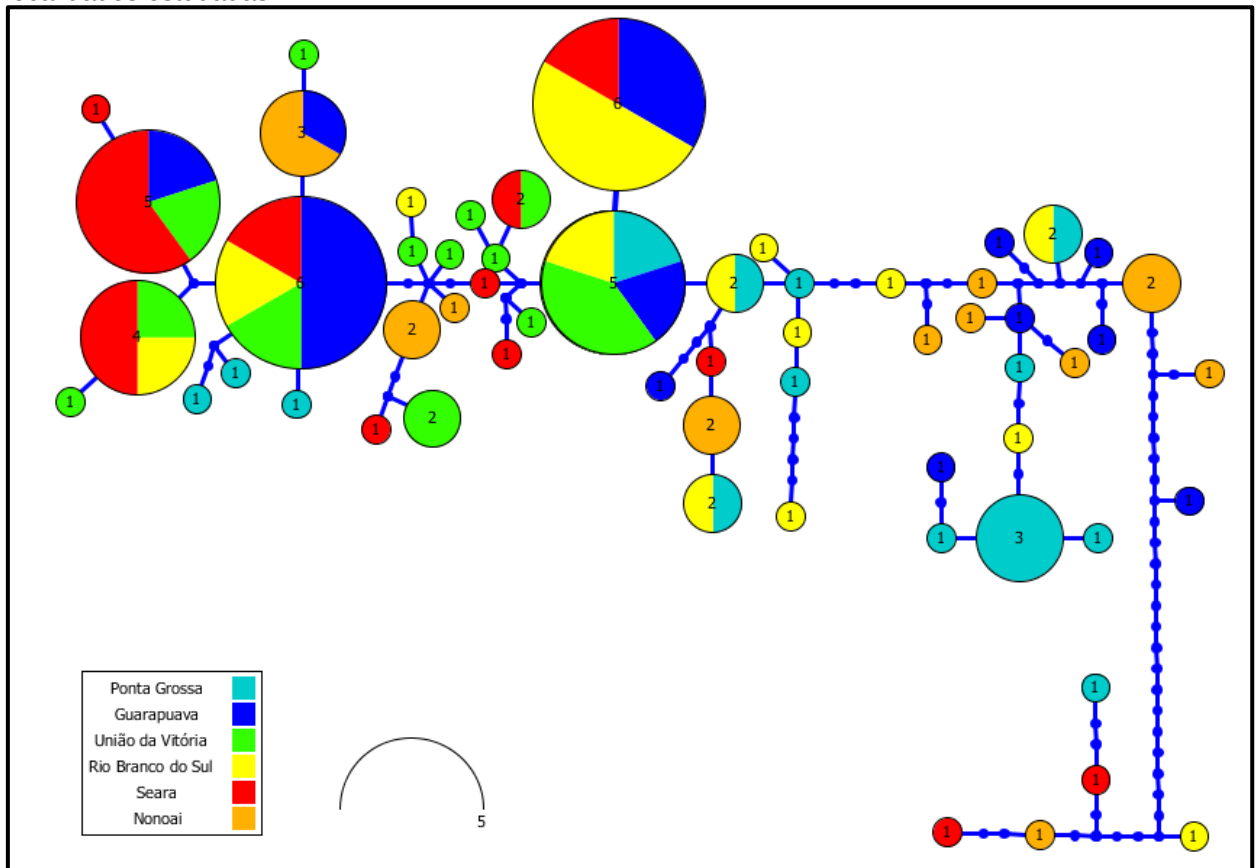


Figura 10 – Rede haplotípica linear construída para as sequências do gene EF1-alfa para as localidades estudadas.



A diversidade nucleotídica (π) variou de 0,010379 à 0,021582 nas localidades analisadas, sendo que os maiores valores foram encontrados em Seara (0,021582), Nonoai (0,019048) e Rio Branco do Sul (0,018868), e os menores valores foram observados em União da Vitória (0,010379), Ponta Grossa (0,016438) e Guarapuava (0,017595). Com relação a diversidade haplotípica (h), União da Vitória apresentou o maior valor, possuindo 15 haplótipos diferentes, e a menor diversidade foi verificada em Guarapuava e Nonoai (12 haplótipos). Os valores de diversidade nucleotídica e haplotípica para cada localidade analisada para a matriz de dados estão discriminados na Tabela 2.

Tabela 2 – Diversidade haplotípica (h) e nucleotídica (π) dos indivíduos de *Omophoita octoguttata* analisados nas diferentes localidades, e teste de neutralidade D de Tajima para a matriz gerada a partir dos genes COI e EF1-alfa. *($p < 0,05$).

Localidade	Nº Indivíduos	Diversidade haplotípica (h)	Diversidade nucleotídica (π)	D de Tajima
Ponta Grossa	15	0,866	0,016438 0,008907	+/- -1,17214
Guarapuava	15	0,800	0,017595 0,009495	+/- -0,31964
Rio Branco do Sul	15	0,933	0,018868 0,010141	+/- -1,04158
União da Vitória	15	1,000	0,010379 0,005825	+/- 0,20394
Seara	15	0,933	0,021582 0,011521	+/- -0,30210
Nonoai	15	0,800	0,019048 0,010233	+/- -0,4082

O teste D de Tajima, que indica a neutralidade das amostras, não apresentou resultado significativo para nenhuma das localidades analisadas ($p \leq 0,05$) sugerindo a ausência de ocorrência de seleção purificadora, efeito carona ou expansão populacional recente, apesar dos valores negativos encontrados (Tabela 2), o que indica a ocorrência de muitos alelos raros nas localidades estudadas.

Para a realização da Análise de Variância Molecular (AMOVA) para a matriz de dados, a fim de testar a estruturação populacional latitudinal, as amostras foram divididas em dois agrupamentos hierárquicos, baseando-se na distância entre as localidades e na localização latitudinal dos pontos amostrados, sendo estes formados por: Grupo 1: Rio Branco do Sul, Ponta Grossa, Guarapuava e União da Vitória; e Grupo 2: Seara e Nonoai. Com relação aos valores de Φ , que correlacionam a diversidade haplotípica nos diferentes níveis hierárquicos, Φ_{st} que

corresponde a covariância entre indivíduos dentro das localidades (0,07083), e Φ_{sc} que é a covariância entre as localidades dentro de um grupo (0,10045), apresentaram valores significativos ($p < 0,05$). Φ_{ct} que corresponde a variância entre os grupos (-0,3292) não apresentou valor significativo. Como pode ser observado na Tabela 3, a maior parte da variação encontrada nos haplótipos da matriz utilizada é explicada pela variação dentro das localidades (92,92%).

Tabela 3 – Resultados da Análise de Variância Molecular (AMOVA) para a matriz dos genes COI e EF1-alfa, considerando dois grupos. Em negrito valores significativos ($p < 0,05$).

Fonte da variação	Soma dos quadrados	Componentes da Variância	Porcentagem da variação
Entre grupos	6,972	-0,19642	-3,29
Entre localidades dentro dos grupos	59,317	0,61903	10,38
Dentro das localidades	465,667	5,54365	92,92
Total	531,956	5,96626	100

Índices de Fixação:
FSC: **0,10045**
FST: **0,07083**
FCT: -0,0392

A estatística F de Wright, considerando o mesmo agrupamento utilizado para a realização da AMOVA, demonstrou que a localidade de União da Vitória se apresenta estruturada quando comparada as demais localidades analisadas, com exceção de Seara, com a qual não apresentou valores significativos (Tabela 4). Além disso, a localidade de Seara apresentou estruturação em relação as localidades de Ponta Grossa, Guarapuava e Nonoai. Os valores de Fst encontrados entre as localidades de União da Vitória e Ponta Grossa (0,27593) indicam uma diferenciação genética muito grande. Já os valores observados entre União da Vitória e Nonoai (0,20448) e Seara e Ponta Grossa (0,17595) indicam uma grande diferenciação genética. A estruturação observada entre União da Vitória e Guarapuava (0,14829) e entre Seara e Nonoai pode ser considerada como uma moderada diferenciação genética, e a estruturação observada entre União da Vitória e Rio Branco do Sul (0,05420) é considerada como pequena. As demais localidades não apresentaram valores que indiquem uma estruturação significativa.

Tabela 4 – Estatística F de Wright para as localidades analisadas para a matriz de dados dos genes COI e EF1-alfa, considerando o agrupamento utilizado na AMOVA. Diagonal inferior representam os valores de F_{st} (* $p < 0,05$). Diagonal superior representam os valores de p (em negrito valores significativos).

Localidade	Ponta Grossa	Guarapuava	Rio Branco do Sul	União da Vitória	Seara	Nonoai
Ponta Grossa	—	0,30631	0,05405	0,00000	0,00000	0,54955
Guarapuava	0,01330	—	0,45946	0,00000	0,02703	0,72973
Rio Branco do Sul	0,05775	-0,00421	—	0,03604	0,27027	0,22523
União da Vitória	0,27593*	0,14829*	0,05420*	—	0,35135	0,00000
Seara	0,17595*	0,11855*	0,02568	0,01928	—	0,01802
Nonoai	-0,00916	-0,01813	0,02911	0,20448*	0,12937*	—

DISCUSSÃO

As análises dos dados referentes aos genes COI e EF1-alfa de *Omophoita octoguttata*, ocorrente na Mata Atlântica da região Sul do Brasil, demonstraram a ausência de um padrão semelhante ao verificado para a maioria dos organismos, ou seja, a ocorrência de subpopulações, padrão o qual foi proposto por Hartl e Clark (2010). A não ocorrência do padrão de subpopulações pode estar relacionado a maior ocorrência de Alticinae em áreas de borda e áreas degradadas, como relatado por Linzmeier, Ribeiro-Costa e Marinoni (2006). Além disso, a alta vagilidade da espécie *O. octoguttata*, apesar deste grupo mais saltar e realizar pequenos voos (BEGOSI, 1994), assim como observado para a espécie *Omophoita cyanipennis* por Virkki (1980), poderia contribuir para a não subdivisão das populações.

Vários processos naturais são capazes de restringir o fluxo gênico entre as populações, ou subpopulações, dentre eles destacam-se os efeitos geológicos, que interferem diretamente no relevo e na distribuição dos indivíduos, bem como a ocorrência de rios (BISHOP, 1995). Processos antrópicos, como a fragmentação dos habitats, quebrando a continuidade destes, também podem influenciar padrões de estruturação uma vez que restringe o fluxo gênico (EWERS; DIDHAM, 2006).

Além da perda de habitat, o processo de fragmentação de habitats resulta em outros efeitos, como o aumento do número de manchas de florestas, diminuição do tamanho dessas manchas, aumento do número de manchas isoladas e aumento das áreas de borda (FAHRIG, 2003). Existem três tipos de efeitos de borda nos fragmentos: (1) efeito abiótico, que envolve mudanças nas condições do ambiente;

(2) efeito biológico direto, que envolve mudanças na abundância e distribuição das espécies; (3) efeito biológico indireto, que envolve mudanças nas interações entre as espécies (MURCIA, 1995).

No Brasil, a Mata Atlântica, sofre processos de desmatamentos desde 1500, restando atualmente cerca de 12,5% da área original desta (SOS MATA ATLÂNTICA, 2015). O Estado do Paraná possuía 98% do seu território coberto pelo Bioma Mata Atlântica; no entanto, atualmente, restaram apenas 10,52% deste bioma no Estado. Em Santa Catarina, 100% do território estava inserido no Bioma Mata Atlântica, e, atualmente restam apenas 23,37%. O Estado do Rio Grande do Sul, possuía inicialmente, 48% do seu território no bioma, e, hoje restam apenas 7,31% (SOS MATA ATLÂNTICA, 2016).

Algumas espécies apresentam respostas positivas aos efeitos de borda (CARLSON; HARTMAN, 2001; KREMSATER; BUNNEL, 1999; LAURENCE et al., 2001). Para muitos habitats, quanto mais fragmentos apresentam, maior a área de borda, tornando-se um efeito positivo para a abundância e distribuição de algumas espécies (FAHRIG, 2003). A fragmentação da Floresta Atlântica permitiu o aumento das áreas de borda, e parece favorecer a espécie *O. octoguttata*; no entanto, a distância entre os fragmentos, ou a ocorrência de barreiras a dispersão poderiam interromper rotas de migração.

Para Avise (2000), insetos voadores tendem a apresentar relativa mobilidade e, conseqüentemente, deve-se esperar que estes apresentassem uma estrutura filogeográfica mínima ao longo de grandes áreas, exceto quando houver barreiras físicas a dispersão. Em Coleoptera, a ocorrência de estrutura filogenética mínima já foi observada para *Agrilus auroguttatus*, *Leptinotarsa decemlineata* e *Dendroctonus micans* (LOPEZ et al., 2014; ZENHNDER et al., 1992; MAYER et al., 2015), bem como a ocorrência de estruturação filogenética mais definida para as espécies *Lasioryhynchus barbicornis*, *Ips typographus*, *Canthon cyanellus* e *Tomicus destruens* (PAINTING et al., 2017; STAUFFER; LAKATOS; HEWITT, 1999; MAYER et al., 2015; NOLASCO-SOTO et al., 2017; SÁNCHEZ-GARCÍA; GALIÁN; GALLEGÓ, 2015).

Painting et al. (2017), utilizando os marcadores mitocondriais COI e COII, revelaram que populações de *L. barbicornis* do Norte da Nova Zelândia apresentam uma maior diversidade genética do que as populações localizadas mais ao sul da Ilha. Além disso, evidenciaram estruturação genética em relação as 4 linhas

biogeográficas, observadas na Ilha, geradas pela perda de florestas durante os ciclos glaciais, e que teriam restringido a espécie em refúgios nos períodos de retração das florestas. Por outro lado, Lopez et al. (2014), utilizaram o sequenciamento parcial do gene mitocondrial COI e do gene nuclear 28S, para demonstrar que *A. auroguttatus* não apresenta estruturação genética entre os Estados do Arizona e da Califórnia, nos Estados Unidos da América.

A ocorrência da espécie *O. octoguttata* foi relatada no Brasil, nos Estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, Espírito Santo, São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul, e também no Paraguai (BECHYNÉ, 1955; 1959; SILVA et al., 1968; ALMEIDA; CAMPANER; CELLA, 2009). No entanto, nenhum estudo filogeográfico ou populacional foi realizado para determinar padrões de distribuição da espécie ou estruturas populacionais. A análise molecular dos genes COI e EF1-alfa, em *O. octoguttata*, em diferentes localidades na região Sul do Brasil, demonstraram a ausência de uma descontinuidade filogeográfica na Mata Atlântica da região Sul do Brasil, uma vez que nas análises realizadas, a localidade de Nonoai, localizada mais ao Sul mantém fluxo gênico com as localidades mais ao Norte (Rio Branco do Sul, Ponta Grossa e Guarapuava), não apresentando estruturação populacional na estatística F_{st} e compartilhando haplótipos, tanto para o gene COI, como para o gene EF1-alfa (Guarapuava). Além do compartilhamento de haplótipos, a árvore de inferência Bayesiana não demonstrou a formação de ramos onde se agrupam indivíduos de uma mesma localidade, mas sim a ocorrência de ramos com indivíduos pertencentes a todas as localidades analisadas.

O fluxo gênico observado entre as localidades de Nonoai e Rio Branco do Sul, Ponta Grossa e Guarapuava, e entre Seara e Rio Branco do Sul, possivelmente ocorre por uma rota de dispersão através da região leste de Santa Catarina e do Rio Grande do Sul, onde são encontrados a maior parte dos resquícios de Mata Atlântica nesses Estados (SOS MATA ATLÂNTICA, 2016), podendo esta região formar um corredor de dispersão. Alternativamente, poderia ocorrer por uma rota mais a oeste do Brasil, envolvendo países como Argentina e Paraguai e a porção oeste do Estado do Paraná, a qual mantém consideráveis fragmentos de Mata Atlântica. O teste de neutralidade D de Tajima, não apresentou valores significativos, que poderiam indicar processos de expansão populacional recente, e demonstrar possíveis centros de origem da migração.

A hipótese de uma rota de migração sentido Norte-Sul e/ou Sul-Norte através da região mais ao leste da região Sul do Brasil pode ser suportada pela presença de estruturação dos indivíduos pertencentes a localidade de Seara com relação a localidade de Nonoai, e dos indivíduos pertencentes a localidade de União da Vitória com relação a Ponta Grossa, Guarapuava e Nonoai. A estruturação entre Seara e Nonoai poderia ser explicada pela presença do Rio Uruguai, na divisa entre os Estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, o qual apresenta grande largura, cerca 450 metros, na região próxima as localidades. Adicionalmente, a estruturação entre as localidades de União da Vitória e Ponta Grossa, Guarapuava e Rio Branco do Sul, também poderia ser explicada pelo mesmo motivo, a presença do Rio Iguaçu, o qual possui cerca de 350 metros de largura próximo ao local de coleta. Desta forma, o fluxo gênico entre Nonoai e as demais localidades situadas ao norte, poderia ocorrer por uma rota ao leste do Rio Grande do Sul, onde ocorrem diminuições da largura do rio Uruguai, bem como do Rio Iguaçu, no Estado do Paraná, e a presença de áreas mais conservadas de Mata Atlântica numa distribuição latitudinal. No entanto, estudos com indivíduos ocorrentes na região leste da região Sul do Brasil, são necessários para maiores esclarecimentos da rota de migração.

A ausência de descontinuidades filogeográficas na Mata Atlântica na região Sul do Brasil já havia sido observada para abelhas (BATATA-FILHO et al., 2010), anfíbios (CARNAVAL et al., 2009; THOMÉ et al., 2010), répteis (PELLEGRINO et al., 2005; GRAZZIOTIN et al., 2006), aves (CABANNE, SANTOS e MIYAKI, 2007; CABANNE et al., 2008), morcegos (MARTINS et al., 2009), borboletas (MAIA et al., 2016) e plantas (RIBEIRO et al., 2010). Apesar da ocorrência de fluxo gênico entre os indivíduos de Nonoai e as localidades da região central do Estado do Paraná, a presença do indicativo de fluxo gênico entre as localidades de Seara e União da Vitória, e seu isolamento em relação as demais localidades poderia indicar que o Estado de Santa Catarina pode ter passado por um processo de retração e expansão das florestas durante o Quaternário, formando uma ilha de refúgio para *O. octoguttata* e permitindo que esta acumulasse diferenças nucleotídicas em relação as demais localidades.

Apesar da ausência de descontinuidades filogeográficas na Mata Atlântica na região Sul do Brasil para a espécie estudada, mesmo com o grande desmatamento que esta mata vem sofrendo nos últimos séculos, os marcadores

utilizados não conseguiriam captar assinaturas genéticas tão recentes para demonstrar um efeito da fragmentação desta para limitação da dispersão da espécie. No entanto, o indicativo da dispersão destes organismos, que são oportunistas, por rotas pelos fragmentos remanescentes, indicam a importância da manutenção e ampliação dos fragmentos de Mata Atlântica.

O gene EF1-alfa não se demonstrou um bom marcador para estudos populacionais em *O. octoguttata*, uma vez que o elevado número de haplótipos não foi resolutivo para a identificação de um padrão filogeográfico. Esse elevado número de haplótipos podem ser justificados pelo fato de que em Alticinae, a terceira base nitrogenada dos códons do gene EF1-alfa é significativamente heterogênea entre os táxons (Kim; Kjer; Duckett, 2003).

Com relação a diversidade haplotípica e nucleotídica, todas as localidades apresentaram valores altos, corroborando para a ocorrência de fluxo gênico, e tamanho populacional grande, sem a presença de alta taxa de endocruzamento, e, consequente redução da diversidade. Os valores de diversidade haplotípica corroboram com o fato de cerca de 92%, da variação ser explicada pela variação dentro das localidades.

Apesar da manutenção de fluxo gênico entre a localidade do Sul com as localidades do Norte, é importante ressaltar que a fragmentação de habitats traz consequências negativas para grande parte das espécies, pela perda do habitat, pela exposição dos organismos a condições diferentes do ecossistema e pelos efeitos de borda (MURCIA, 1995). Neste estudo utilizou-se de um organismo que responde positivamente aos efeitos de borda e áreas degradadas, assim pode-se demonstrar que esse efeito afeta positivamente espécies oportunistas, entretanto, sabe-se que este altera drasticamente o ecossistema e consequentemente afeta inúmeras espécies, levando muitas a extinção. Desta maneira, ressalta-se a importância em se ampliar os estudos com *O. octoguttata* uma vez que ele se apresenta como um ótimo bioindicador de áreas degradadas e esses processos de aumento do desmatamento pode ser observado em sua estrutura populacional ou a falta dela.

REFERÊNCIAS

As referências do artigo científico se encontram com as demais referências da dissertação.

4.2 DIFERENCIAÇÃO DE TRÊS ESPÉCIES PERTENCENTES AO GÊNERO *Alagoasa* (COLEOPTERA: ALTICINAE): ANÁLISE CITOGENÉTICA E SEQUENCIAMENTO DO GENE COI

RESUMO

Coleoptera possui cerca de 1% de suas espécies analisadas do ponto de vista citogenético, e a subtribo Oedionychina apresenta características cromossômicas interessantes, como o comportamento assináptico dos cromossomos sexuais, seu tamanho gigante em relação aos autossomos, além de, geralmente, apresentarem número diploide igual a 22. O objetivo deste trabalho foi diferenciar três espécies do gênero *Alagoasa* (*Alagoasa pantina*, *Alagoasa sp.1* e *Alagoasa sp.2*), possivelmente miméticas, por meio de análises citogenéticas e moleculares. Para isso utilizou-se de metodologias convencionais de citogenética e da Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH). As três espécies apresentaram número diploide $2n=22=20+X+y$, fórmula meiótica $2n=10II+X+y$ e sistema de determinação sexual do tipo $X+y$, com cromossomos sexuais gigantes e assinápticos, características concordantes as observadas na subtribo Oedionychina. A FISH demonstrou a presença de um cluster de 5S e 18S associado a um par de autossomos, em sintenia e colocalizados, nas três espécies analisadas. No entanto, em *Alagoasa sp.1*, foi observado a ocorrência de heteromorfismo entre os cístrons. Com relação a sonda telomérica, as três espécies apresentaram marcações com a sonda TTAGG_n, sendo observado a presença de marcações proximais do cromossomo X e dispersas no cromossomo Y de *Alagoasa sp.1* e proximal no X de *Alagoasa sp.2*. A análise filogenética do fragmento COI demonstrou que se tratam de 3 espécies distintas, corroborando com as características citogenéticas.

Palavras-chave: FISH; meiose; rDNA; cromossomos

INTRODUÇÃO

Coleoptera possui mais de 350.000 espécies descritas (COSTA, 2003); no entanto, apenas cerca de 1% destas foram analisadas citogeneticamente (PETITPIERRE, 1996). Na subfamília Alticinae, com 10.000 espécies, apenas 230 são conhecidas citogeneticamente (PETITPIERRE, 1996). Dentre essas observa-se uma variação cariotípica de $2n=8$ em *Homoschema nigriventre* a $2n=64$ em

Disonycha bicarinata, bem como um variado sistema de determinação sexual (VIRKKI; PURCELL, 1965; VIDAL, 1984; SMITH; VIRKKI, 1978; PETITPIERRE et al., 1988; VIRKKI, 1988; PETITPIERRE, 1989; SEGARRA; PETITPIERRE, 1988; VIRKKI; SANTIAGO-BLAY; CLARK, 1991; VIRKKI; SANTIAGO-BLAY, 1998). Entretanto, o número cromossômico mais frequente é de 11 ou 12 pares, e sistema de determinação sexual do tipo X+y, apesar da ocorrência de 19 tipos diferentes (PETITPIERRE, 1988; 2006; VIRKKI, 1967; 1968; 1970).

A tribo Oedionychini agrupa duas subtribos, Oedionychina e Disonychina. A subtribo Oedionychina apresenta características cromossômicas interessantes do ponto de vista citogenético, como o comportamento assináptico dos cromossomos sexuais e seu tamanho aumentado em relação aos autossomos, além de, geralmente apresentar $2n=22$ ($10II+X+y$) (VIRKKI, 1970; 1988; VIRKKI; SANTIAGO-BLAY; CLARK, 1991; PETITPIERRE, 1988). O gênero *Alagoasa* pertence a subtribo Oedionychina e possui 40 espécies analisadas citogeneticamente, sendo que destas a grande maioria apresenta $2n=22$, e todas apresentaram sistema de determinação sexual do tipo X+y, com cromossomos sexuais gigantes (VIRKKI, 1961; 1970; 1985; 1988; VIRKKI; SANTIAGO-BLAY; CLARK, 1991; PETITPIERRE et al., 1988; ALMEIDA, 2001; MELO, 2013; SMITH; VIRKKI, 1978; VIRKKI; SANTIAGO-BLAY, 1993). A variação no número diploide neste gênero foi observada devido a presença de cromossomos supranumerários em *Alagoasa oblecta* ($2n=37$; 15B) e *Alagoasa transparente* ($2n=24$; 2B) ou devido a fusões cêtricas *Alagoasa arcifera* ($2n=16$), *Alagoasa equestris* ($2n=13$; 1B) e *Alagoasa parana* ($2n=16$) (VIRKKI; SANTIAGO-BLAY, 1993; PETITPIERRE et al., 1988; SMITH; VIRKKI, 1978; VIRKKI, 1988).

Com relação a família multigênica 45S, Schneider et al. (2007) propuseram que a condição de um par de cromossomos autossômicos portador dessa marcação representaria a condição ancestral e/ou mais estável. Em Alticinae, em estudos utilizando a metodologia da FISH, Almeida et al. (2010) e Melo (2013) encontraram um cluster associado a 1 par de autossomos em *Omophoita octoguttata*, *Omophoita personata* e *Alagoasa coccineolide*, a 2 pares em *Omophoita magniguttis*, e a 3 pares em *Alagoasa florifera*. Sendo assim, Almeida et al. (2010) propuseram que o rDNA 18S, através da FISH, pode ser um importante marcador neste grupo, a fim de demonstrar diferenças cariotípicas.

Para o rDNA 5S, a localização nos cromossomos é variada em Coleoptera, podendo estar presente em um par de autossomos, vários pares e até mesmo em

todos os pares de cromossomos (CABRAL-DE-MELO; MOURA; MARTINS, 2010, 2011a; MELO, 2013; GOLL et al, 2015). Em Alticinae, Melo (2013) demonstrou que *O. octoguttata*, *O. personata* e *A. coccineoloide* apresentam o gene 5S associado a um par de autossomos, *O. magniguttis* associado a 2 pares autossômicos, e *A. florigera* associado a 3 pares autossômicos, sendo que estes estão colocalizados ao gene 18S. Wolski (2014) demonstrou que em *Omophoita sexnotata* o gene 5S está localizado em todos os autossomos.

Em Coleoptera, foram encontradas até o momento 2 tipos de sequências teloméricas, a sequência TTAGG_n, considerada como ancestral para Insecta por Sahara, Marec e Traut (1999), e a sequência TCAGG_n observada inicialmente em Tenebrionidae (OKAZAKI et al., 1993; OSANAI et al., 2006; RICHARDS et al., 2008). Sendo que na maioria dos casos em que foram estudados, uma família tende a apresentar apenas uma das sequências em seus indivíduos, como demonstrado por FRYDRYCHOVA e MAREC (2002) e MRAVINAC et al. (2011). Contudo, na família Curculionidae as duas sequências já foram observadas em espécies diferentes. Em Chrysomelidae apenas a sequência TTAGG_n foi observada. No entanto, muitas subfamílias ainda não foram analisadas, como o caso de Alticinae.

Alticinae apresenta um problema de identificação das espécies, além de poucos taxonomistas na área, as espécies são muito parecidas, gerando confusões na identificação. Para Begosi e Benson (1988) a coloração similar de muitos Oedionychina sugere que estes podem ser miméticos: *Omophoita octoguttata*, *Alagoasa* cf. *pantina*, *Alagoasa scissa* e *Alagoasa areata* apresentam 3 ou 4 pares de manchas largas na cor creme no élitro contornadas por preto e pronoto com coloração laranja pálido, sendo que *O. octoguttata* tende a ser mais abundante que seus miméticos (espécies pertencentes ao gênero *Alagoasa*) e deve ser a espécie dominante neste complexo mimético.

O objetivo deste trabalho foi diferenciar três espécies do gênero *Alagoasa*, possivelmente miméticas, por meio da análise citogenética convencional e molecular, além do sequenciamento de um fragmento do gene Citocromo Oxidase I.

MATERIAL E MÉTODOS

Indivíduos adultos machos pertencentes ao gênero *Alagoasa* foram coletados em populações naturais, de maneira manual utilizando-se de puçás

entomológicos, na cidade de Ponta Grossa, Paraná, Brasil (S 25°07'10"; O 49°56'24"), sendo que foram coletados 12 indivíduos adultos de *Alagoasa pantina*, 10 de *Alagoasa sp.1* e 10 de *Alagoasa sp.2* (Figura 6, material e métodos). Alguns exemplares foram encaminhados ao especialista Carlos Campaner, do Museu de zoologia da USP, para identificação. Todos os indivíduos coletados encontram-se depositados no Laboratório de Genética e Evolução da UEPG.

Os cromossomos mitóticos e meióticos foram obtidos a partir da dissecação dos besouros em solução fisiológica para insetos de acordo com Almeida, Zacaro e Cella (2000). As lâminas foram coradas com Giemsa (3% de solução comercial Giemsa Merck em tampão fosfato pH 6,8) por 12 minutos, lavadas com água destilada, e secas ao ar.

As sondas de rDNA 18S foram obtidas por PCR, utilizando-se a uracila bionitilada (16 dUTP-biotin - Roche®), a partir do gene parcial 18S de *Omophoita octoguttata* (HM036738.1) de acordo com Almeida et al. (2010). As sondas rDNA 5S foram obtidas por PCR, empregando-se a digoxigenina-11-dUTP (Roche®), utilizando-se do gene 5S de *O. octoguttata* (KX858924.1), conforme Melo (2013). A sonda telomérica foi obtida a partir de reação de PCR realizada no termociclador contendo: 1X Tampão Taq DNA polimerase (Invitrogen®), 1,5 mM de MgCl₂, 0,16 mM de dNTP, 0,5 µM de cada primer (*Foward* 5'TTAGG_n3' e *Reverse* 5'CCTAA_n3') (SAHARA; MAREC; TRAUT, 1999) e 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®), em um volume final de 50 µL, e seguiu o programa proposto por Ijdo et. al. (1991). A marcação do produto de PCR foi realizada através da reação de *Nick Translation*, utilizando o kit Dig Nick Translation (Roche®).

A Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH) foi realizada de acordo com Pinkel, Straume e Gray (1986), com pequenas modificações descritas por Almeida et al. (2010). Para a detecção do sinal das sondas foram utilizados os anticorpos Streptavidina conjugada com Alexa Fluor 488 (Sigma®), para biotina, e anti-digoxigenina conjugada com rodamina (Roche®), para digoxigenina. Os cromossomos foram contra corados com DAPI (0,2 mg/mL) montado em uma solução anti-fade.

As melhores células mitóticas e meióticas foram fotografadas em microscópio de epifluorescência Olympus Bx41, com filtros específicos e captura de imagem em tempo real com câmera CCD DP-71 e o software DP controller. As imagens foram analisadas e montadas no software Adobe Photoshop CS6.

O DNA genômico de 3 indivíduos pertencentes às espécies *A. pantina* e *Alagoasa sp.1*, e 2 indivíduos pertencentes a *Alagoasa sp.2*, foi extraído a partir da fragmentação da cabeça, pronoto e 3º par de pernas em nitrogênio líquido em tubos eppendorf de 2 ml seguindo o protocolo de Murray e Thompson (1980), e tiveram uma porção do gene COI amplificada utilizando os *primers Forward* e *Reverse* descritos por Kim, Kjer e Duckett (2003), sendo que as reações continham: 1X tampão Taq DNA polimerase (Invitrogen®), 1,5 mM de MgCl₂; 0,2 mM de solução dNTP; 1,0 µM de cada *primer*; 2,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®) e 40 ng de DNA molde para um volume final de reação de 35µL. A PCR foi realizada em termociclador com 1 ciclo de desnaturação inicial por 4 minutos a 95°C, seguido de 35 ciclos de 94°C por 60 segundos, 53°C por 30 segundos, e 72°C por 30 segundos, com mais um passo final de 72°C por 10 minutos. Os produtos de PCR foram purificados utilizando o Kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification, da GE Healthcare®, e encaminhadas para sequenciamento pela empresa ACTGene Análises Moleculares. As sequências *Forward* e *Reverse* foram verificadas e corrigidas manualmente utilizando o programa *Geneious* v. 7.1.3 (KEARSE et al., 2012). Árvores de relações filogenéticas foram construídas, utilizando o modelo de substituição nucleotídica GTR, nos programas *MEGA* v. 7.0 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016), através dos métodos Máxima Verossimilhança (MV), Neighbor Joining (NJ) e Máxima Parcimônia (MP) com 10.000 interações para bootstrap, considerando como grupos externos as espécies *O. octoguttata* (AF479430.1), *Chrysomela tremula* (KM452126.1) e *Timarcha tenebricosa* (KC185782.1), e *Geneious* v. 7.1.3, utilizando o plugin MrBayes 3.2.6 (HUELSENBECK; RONQUIST, 2001), empregando o método Bayesiano (MB), com 500.000 *Markov Chain Monte Carlo* (MCMC) e *burnin* de 50.000, considerando como grupo externo *C. tremula*. No programa *MEGA* 7.0, foram ainda calculadas as distâncias intra e interespecíficas para as sequências obtidas.

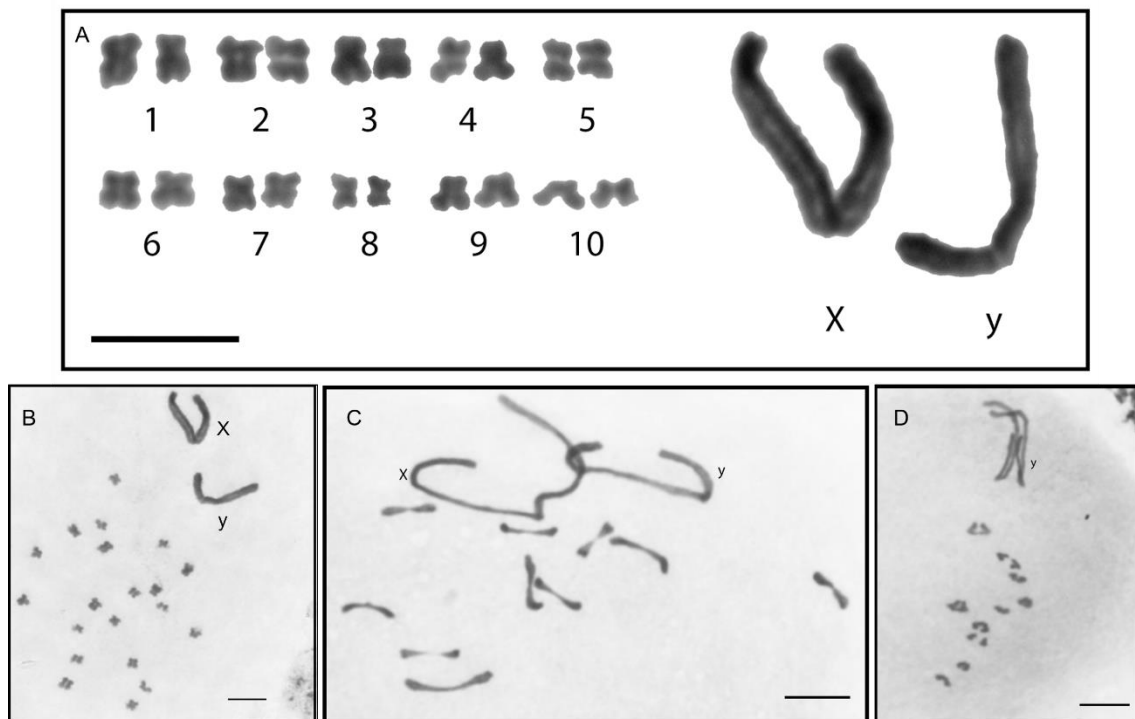
RESULTADOS

Alagoasa pantina

A análise das metáfases espermatozoniais de *A. pantina* (Figuras 11A e 11B) mostrou que esta espécie possui um cariótipo com 2n=22, com cromossomos sexuais gigantes e sistema de determinação sexual do tipo X+y. A morfologia

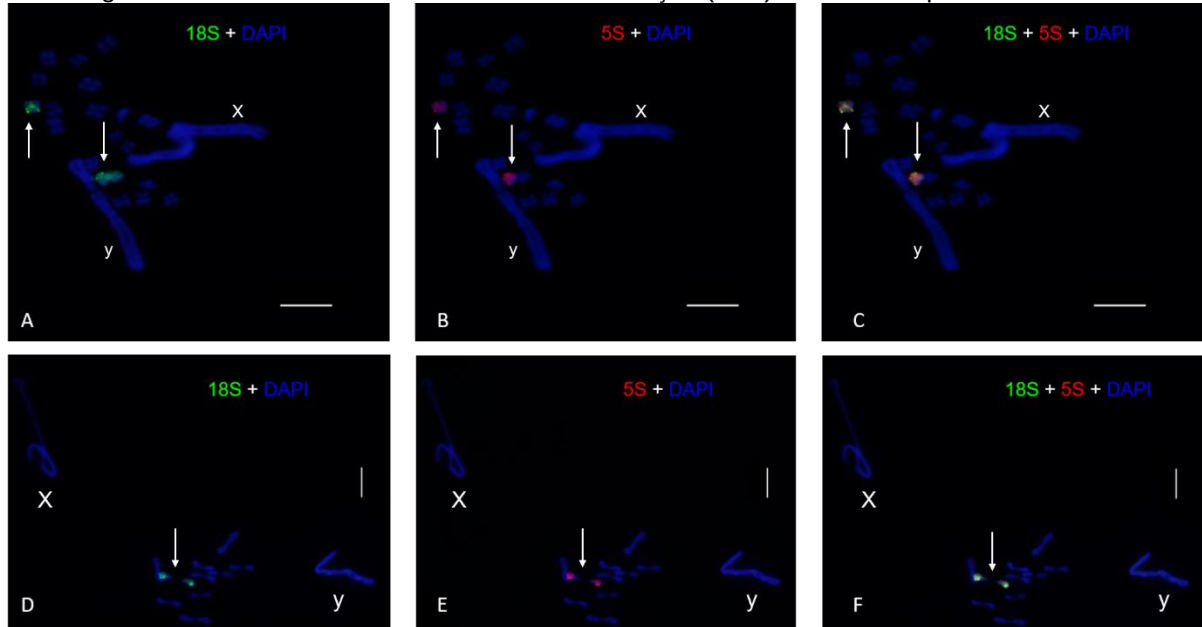
cromossômica dos autossomos é metacêntrica e submetacêntrica, com um par acrocêntrico. O cromossomo X é metacêntrico e o Y submetacêntrico. As células em metáfase I demonstraram a fórmula meiótica $2n=10II+X+y$, com cromossomos sexuais assinápticos (Figura 11C). As células em metáfase II evidenciaram a correta segregação dos cromossomos sexuais, com a formação de células haploides $n=10+X$ e $n=10+y$ (Figura 11D).

Figura 11 – Células mitóticas e meióticas de *Alagoasa pantina*. **A** – Cariótipo espermatogonial com $2n=22$ cromossomos. **B** – Metáfase espermatogonial. **C** – Metáfase I, presença de $2n=10II+X+y$. **D** – Metáfase II, complemento haploide $n=10+y$. Barra = 10 μ m



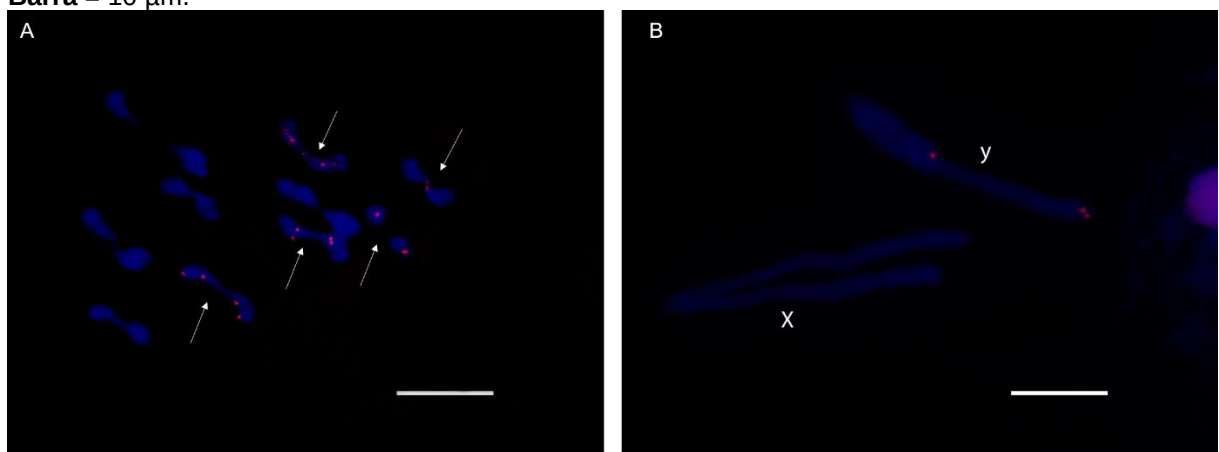
As células de *A. pantina* submetidas à FISH com sonda rDNA 18S (Figura 12A e 12D) e rDNA 5S (Figura 12B e 2E), mostraram a presença de um cluster associado a um par cromossômico em metáfase espermatogonial (Figura 12A e 12B) e em metáfase I (Figura 12D e 12E) tanto para o gene 18S, quanto para o gene 5S. A sobreposição de imagens indica que estes são sintênicos e colocalizados (Figura 12C e 12F).

Figura 12 – Células mitóticas e meióticas de *A. pantina* submetidas à técnica de Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sonda rDNA 18S (verde) e 5S (vermelho) e contracolorados com DAPI (azul). **A e B** – Metáfase espermatogonial indicando a marcação em um par autossômico (setas). **C** – Sobreposição das imagens A e B mostrando que os cístrons são sintênicos e colocalizados (setas). **D e E** – Metáfase I evidenciando a hibridação em um único par autossômico (setas). **F** – Sobreposição das imagens D e E confirmando a sintenia e colocalização (seta). **Barra** = 10 μ m.



A análise das células meióticas submetidas à FISH com sonda telomérica mostraram a presença de repetições teloméricas terminais em 5 pares autossômicos e no cromossomo Y, em metáfases I em *A. pantina* (Figura 13).

Figura 13 – Célula meiótica de *A. pantina* submetida à técnica de Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sonda telomérica (TTAGG_n) (vermelho) e contracolorados com DAPI (azul). **A** – Cromossomos autossômicos em metáfase I indicando a marcação de cinco pares (setas). **B** – Cromossomos sexuais em metáfase I, mostrando marcações terminais apenas no cromossomo Y. **Barra** = 10 μ m.



Alagoasa sp.1

A análise das metáfases espermatogoniais de *Alagoasa sp.1* (Figuras 14A e 14B) demonstram que esta espécie apresenta um cariótipo com $2n=22$, com

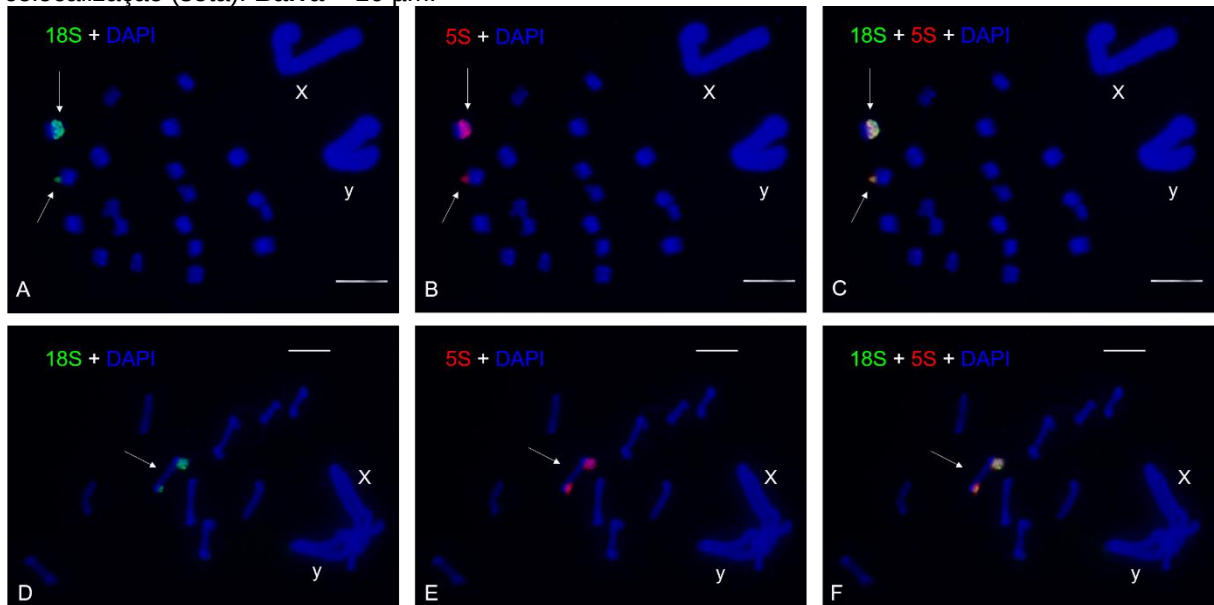
cromossomos sexuais gigantes e sistema de determinação sexual do tipo X+y. O estudo da morfologia mostrou que a maioria dos autossomos é meta e submetacêntrico e que os cromossomos sexuais são submetacêntricos. A fórmula meiótica encontrada foi de $2n=10II+X+y$, com cromossomos sexuais assinápticos (Figura 14C), e as metáfases II comprovaram a formação de células haploides com $n=10+X$ e $n=10+y$ (Figura 14D).

Figura 14 – Células mitóticas e meióticas de *Alagoasa sp.1*. **A** – Cariótipo espermatogonial com $2n=22$ cromossomos. **B** – Metáfase espermatogonial. **C** – Metáfase I, presença de $2n=10II+X+y$. **D** – Metáfase II, complemento haploide $n=10+y$. Barra = 10 μm .



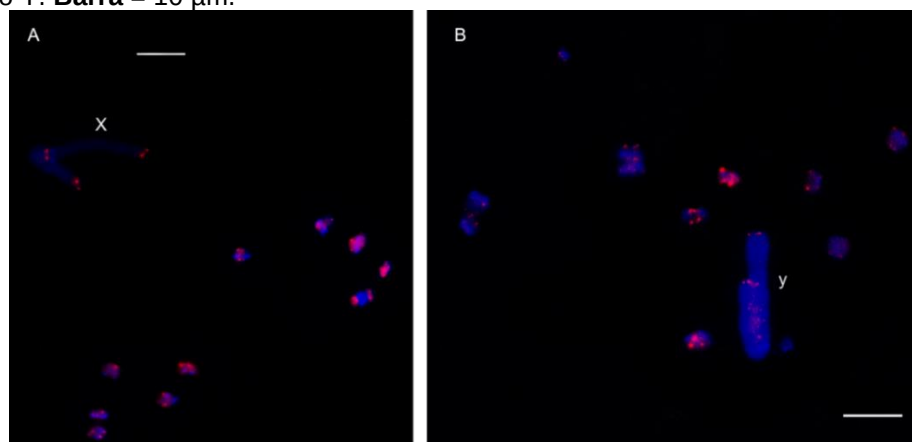
A FISH utilizando as sondas rDNA 18S e 5S demonstraram a presença de um par de cromossomos autossômicos portador do cluster de rDNA 18S e do rDNA 5S em metáfase espermatogonial (Figura 15A e 15B) e em metáfase I (Figura 15D e 15E). Além disso, pode-se observar a ocorrência de heteromorfismo de tamanho dos cístrons de 5S e 18S entre os cromossomos do par. A sobreposição das imagens indica sintenia e colocalização destes clusters (Figura 15C e 15F).

Figura 15 – Células mitóticas e meióticas de *Alagoasa sp.1* submetidas à técnica de Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sonda rDNA 18S (verde) e 5S (vermelho) e contracolorados com DAPI (azul). **A e B** – Metáfase espermatogonial indicando a marcação em um par autossômico (setas). **C** – Sobreposição das imagens A e B mostrando que os cístrons são sintênicos e colocalizados (setas). **D e E** – Metáfase I evidenciando a hibridação em um único par autossômico, e o heteromorfismo de tamanho dos cístrons (seta). **F** – Sobreposição das imagens D e E confirmando a sintenia e colocalização (seta). **Barra** = 10 μ m.



A análise das metáfases II de *Alagoasa sp.1* submetidas à FISH com sonda telomérica demonstrou a marcação em todos os cromossomos. No cromossomo X observa-se marcações nas regiões terminais e também uma marcação intersticial proximal (Figura 16A). No cromossomo Y, também se observam marcações terminais; além disso, algumas marcações dispersas são observadas ao longo do braço curto do cromossomo (Figura 16B).

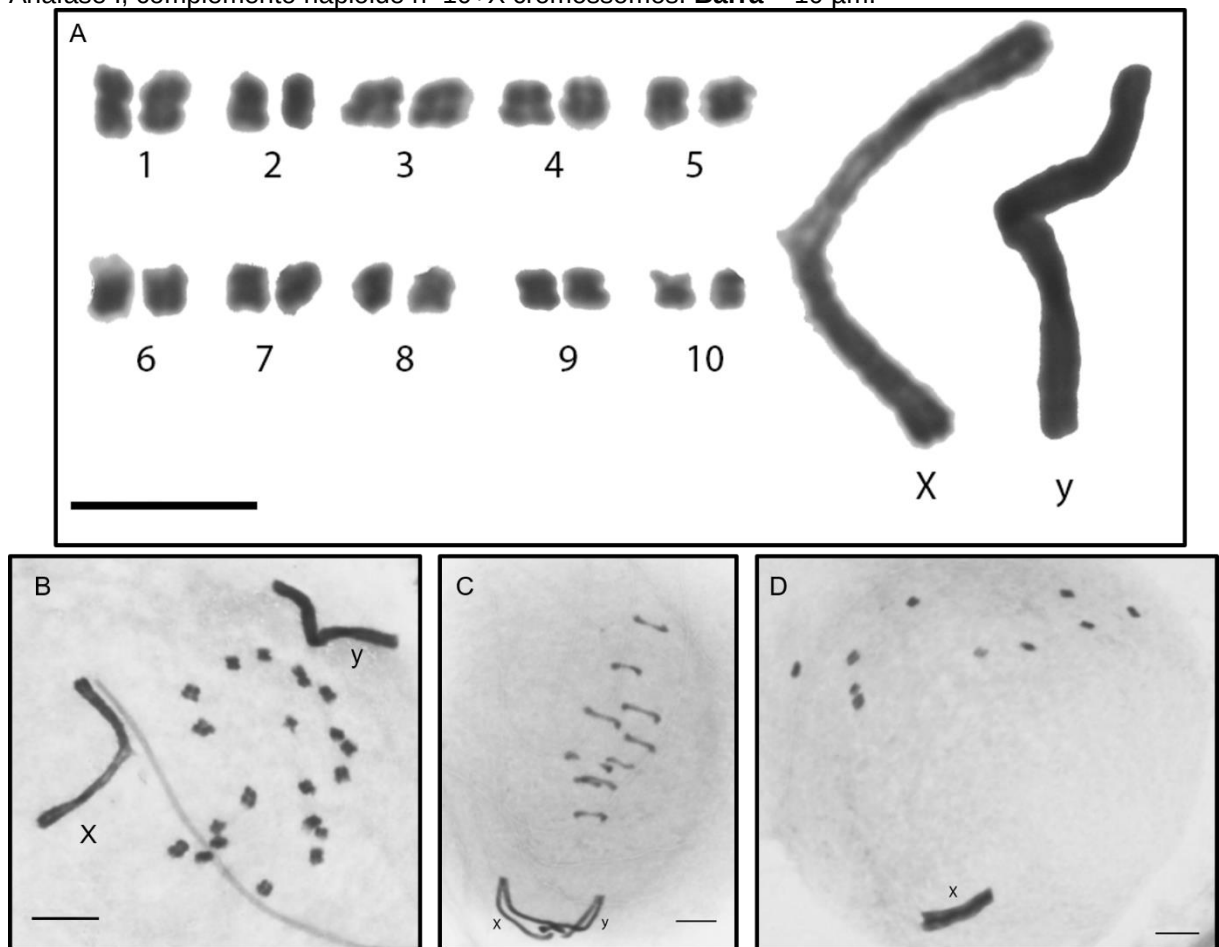
Figura 16 – Células meióticas de *Alagoasa sp.1* submetidas à técnica de Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sonda telomérica (TTAGG_n) (vermelho) e contracolorados com DAPI (azul). **A** – Metáfase II demonstrando a presença da repetição telomérica em todos os cromossomos, e marcação intersticial proximal no cromossomo X. **B** – Metáfase II, mostrando a presença da repetição telomérica em todos os cromossomos, e marcações dispersas ao longo do braço curto do cromossomo Y. **Barra** = 10 μ m.



Alagoasa sp.2

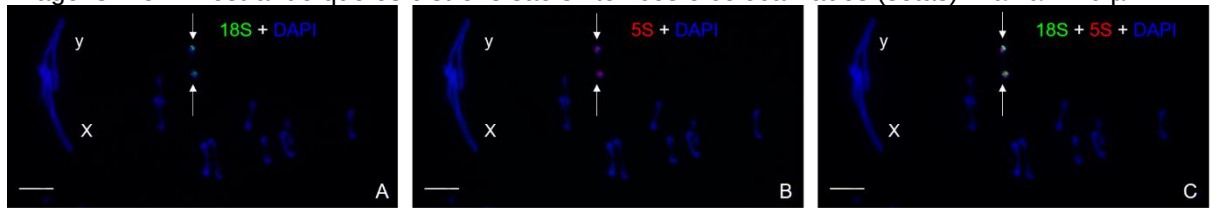
As metáfases espermatogoniais de *Alagoasa sp.2* (Figura 17A e 17B) mostraram que esta espécie apresenta número diploide igual a 22 e sistema de determinação sexual do tipo X+y, com cromossomos sexuais gigantes. A morfologia predominante dos autossomos é meta e submetacêntrica e dos cromossomos sexuais metacêntricos. A fórmula meiótica observada foi de $2n=10II+X+y$, com cromossomos sexuais assinápticos (Figura 17C). Metáfases II e anáfases I demonstram a correta segregação dos cromossomos sexuais e a formação de células haploides $n=10+X$ e $n=10+y$ (Figura 17D).

Figura 17 – Células mitóticas e meióticas de *Alagoasa sp.2*. **A** – Cariótipo espermatogonial com $2n=22$ cromossomos. **B** – Metáfase espermatogonial. **C** – Metáfase I, presença de $2n=10II+X+y$. **D** – Anáfase I, complemento haploide $n=10+X$ cromossomos. Barra = 10 μ m.



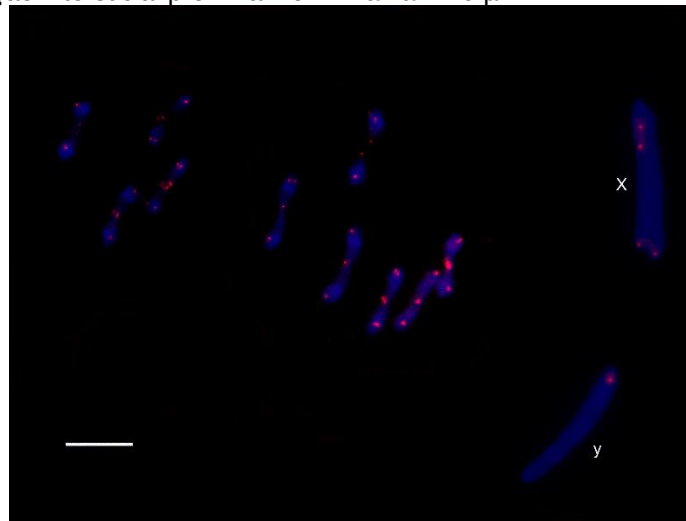
Com relação as sondas de rDNA 18S e 5S, em metáfase I, esta espécie demonstrou a ocorrência de um par de autossômicos portador de um cluster de cada família multigênica (Figura 18A e 18B), e a sobreposição das imagens demonstra que estes estão sintênicos e colocalizados neste par (Figura 18C).

Figura 18 – Células meióticas de *Alagoasa sp.2* submetidas à técnica de Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sonda rDNA 18S (verde) e 5S (vermelho) e contracolorados com DAPI (azul). **A e B** – Metáfase I indicando a marcação em um par autossômico (setas). **C** – Sobreposição das imagens A e B mostrando que os cístrons são sintênicos e colocalizados (setas). **Barra** = 10 µm.



A análise da FISH telomérica em metáfases I de *Alagoasa sp.2* demonstrou a marcação de todos os cromossomos nas regiões terminais (Figura 19). Com relação aos cromossomos sexuais, o X mostra uma marcação intersticial proximal (Figura 19).

Figura 19 – Célula meiótica de *Alagoasa sp.2* submetida à técnica de Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sonda telomérica (TTAGG_n) (vermelho) e contracolorados com DAPI (azul). Metáfase I demonstrando a presença da repetição telomérica em todos os cromossomos, bem como a ocorrência de marcação intersticial proximal no X. **Barra** = 10 µm.

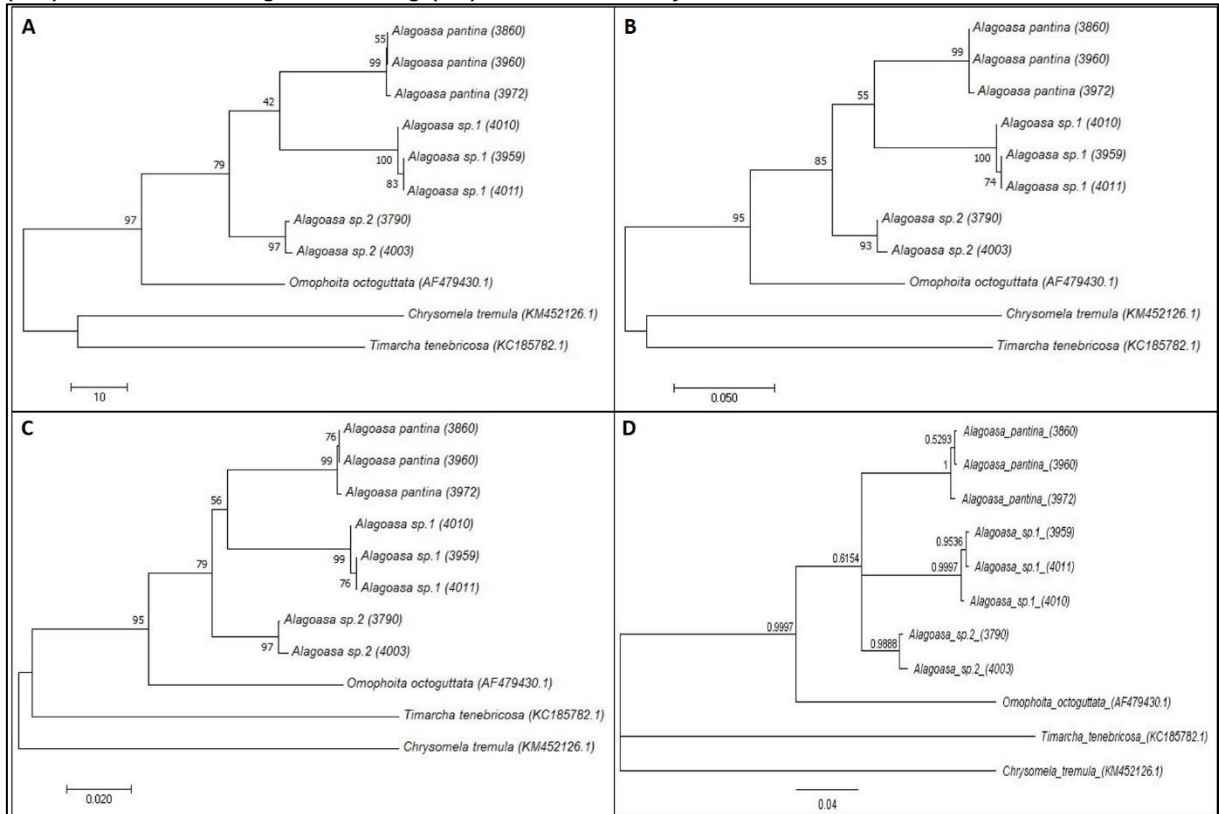


Análise filogenética do gene COI

As 4 árvores filogenéticas construídas a partir das sequências do gene COI das três espécies analisadas neste trabalho apresentaram a mesma tipologia para todos os métodos utilizados (Figura 20). Nas 4 análises *Alagoasa pantina*, *Alagoasa sp.1* e *Alagoasa sp.2* formam um clado irmão com *Omophoita octoguttata*, grupo externo mais próximo (MP= 97; MV= 95; NJ= 95; MB= 0,99). As 3 espécies são suportadas como clados nas 4 análises realizadas (MP= 79; MV= 85; NJ= 79; MB= 0,61), sendo que o primeiro clado reúne os indivíduos pertencentes a *A. pantina*, e esse clado é grupo irmão dos exemplares pertencentes a *Alagoasa sp.1* (MP= 42;

MV= 55; NJ= 56). As amostras de *Alagoasa sp.2* foram reunidas em um terceiro clado e são grupo-irmão de *A. pantina* e *Alagoasa sp.2*.

Figura 20 – Árvores de relação filogenética obtidas a partir das sequências de COI para as espécies do gênero *Alagoasa*. **A** – Método Máxima Parcimônia (MP); **B** – Método Máxima Verossimilhança (MV); **C** – Método Neighbor Joining (NJ); **D** – Método Bayesiano.



A distância intraespecífica média em *Alagoasa pantina* e *Alagoasa sp.1* foi de 0,0013, e para *Alagoasa sp.2* a distância intraespecífica foi igual a 0,0041. Já a distância interespecífica entre *A. pantina* e *Alagoasa sp.1* foi igual a 0,1452 e entre *A. pantina* e *Alagoasa sp.2* foi de 0,1143. A distância interespecífica entre *Alagoasa sp.1* e *Alagoasa sp.2* foi de 0,1211 (Tabela 5).

Tabela 5 – Distância intra (vertical inferior) e interespecífica (vertical superior) para os indivíduos pertencentes as 3 espécies do gênero *Alagoasa* calculadas a partir do fragmento do gene COI.

	1	2	3	4	5	6	7	8
1 <i>Alagoasa pantina</i> (3860)	-							
2 <i>Alagoasa pantina</i> (3960)	0,0000	-			0,1452		0,1143	
3 <i>Alagoasa pantina</i> (3972)	0,0020	0,0020	-					
4 <i>Alagoasa sp.1</i> (3959)	0,1454	0,1454	0,1497	-				
5 <i>Alagoasa sp.1</i> (4010)	0,1417	0,1417	0,1459	0,0020	-		0,1211	
6 <i>Alagoasa sp.1</i> (4011)	0,1454	0,1454	0,1497	0,0000	0,0020	-		
7 <i>Alagoasa sp.2</i> (3790)	0,1120	0,1120	0,1084	0,1205	0,1171	0,1205	-	
8 <i>Alagoasa sp.2</i> (4003)	0,1190	0,1190	0,1153	0,1239	0,1205	0,1239	0,0041	-

DISCUSSÃO

A subfamília Alticinae é um grupo interessante para estudos de citogenética e evolução, uma vez que espécies deste grupo conservam características citogenéticas enquanto outros apresentam derivações em relação ao número cromossômico, comportamento e tamanho dos cromossomos sexuais, em relação a maioria das espécies de Coleoptera (ALMEIDA et al., 2010). Essas características tornam a subtribo Oedionychina interessante para serem estudadas (VIRKKI, 1970; 1988). As três espécies analisadas citogeneticamente neste trabalho apresentaram número diploide de 22 cromossomos, cromossomos sexuais gigantes, com comportamento assináptico durante a meiose, e sistema de determinação sexual do tipo X+y, características conservadas na subtribo Oedionychina e no gênero *Alagoasa* (SMITH; VIRKKI, 1978; VIRKKI, 1968; 1970; 1988; VIRKKI; SANTIAGO-BLAY, CLARK, 1991). Alterações no número cromossômico neste gênero foi observado em apenas 5 espécies, e correspondem a presença de cromossomo supranumerários ou fusões cêntricas (VIRKKI; SANTIAGO-BLAY, 1993; PETITPIERRE et al., 1988; SMITH; VIRKKI, 1978; VIRKKI, 1988).

Em muitos gêneros de Alticinae, as características cariotípicas são muito similares (SMITH; VIRKKI, 1978; SEGARRA; PETITPIERRE, 1985; 1988; PETITPIERRE et al., 1988), o que torna difícil a diferenciação destas por técnicas de citogenética convencional. Nas três espécies analisadas a morfologia dos cromossomos autossômicos predominante é metacêntrica e submetacêntrica, com exceção de *A. pantina* que apresenta um par de cromossomos acrocêntricos. Já a morfologia dos cromossomos sexuais difere entre as espécies analisadas: em *A. pantina* o X é metacêntrico e o Y submetacêntrico; em *Alagoasa sp.1* X e Y são submetacêntricos; e em *Alagoasa sp.2* X e Y são metacêntricos. Almeida et al. em 2010, propuseram a utilização da sonda rDNA 18S, junto à técnica de FISH, para evidenciar diferenças cariotípicas. No entanto, nas espécies analisadas neste trabalho com este marcador não mostrou diferenças, todas as espécies apresentaram um cluster associado a um par autossômico, da mesma maneira que o marcador rDNA 5S. Entretanto, *A. sp.1* apresentou heteromorfismo de tamanho dos cístrons entre cromossomos dos pares. Mecanismos como *crossing-over* desigual, transposições ou outros rearranjos, incluindo deleções e/ou duplicações, envolvem segmentos de cromossomos homólogos e, são, portanto, frequentemente

atribuídos a mecanismos relacionados a modificações estruturais de RONS (GALLETI Jr et al., 1995). A presença de um par de cromossomos autossômicos portador de rDNA 18S e 5S é considerada como condição ancestral para Coleoptera (SCHNEIDER et al., 2007; CABRAL-DE-MELO; MOURA; MARTINS, 2010;2011a). Entretanto, a dispersão destes genes, principalmente por meio de transposons não é rara em Coleoptera ou até mesmo em Alticinae (CABRAL-DE-MELLO; MOURA; MARTINS, 2011b; GILLESPIE et al., 2006; YE et al., 2005). A ocorrência de mais de um par portador dos genes 18S e 5S já foi observada em Alticinae nos gêneros *Omophoita* e *Alagoasa* (ALMEIDA et al., 2010; MELO, 2013; WOLSKI, 2014) e indicam derivações no cariótipo.

As 3 espécies analisadas apresentaram os genes 18S e 5S em sintenia e colocalizados. A sintenia e colocalização dos clusters 45S e 5S já foi descrita em Scarabaeidae (CABRAL-DE-MELO et al., 2011), Tenebrionidae (GOLL et al., 2015) e Chrysomelidae (MELO, 2013). Essa associação pode ter funções importantes na organização no núcleo, na manutenção de sequências conservadas e na regulação da expressão das famílias multigênicas (KAPLAN et al., 1993; LIU; FREDGA, 1999).

As três espécies analisadas neste trabalho apresentaram marcações teloméricas quando submetidas a FISH, indicando a presença da repetição TTAGG_n no gênero *Alagoasa*. A presença de sequência TTAGG_n foi observada em Chrysomelidae em *Leptinotarsa decemlineata*, *Timarcha balearica*, *Chrysolina americana*, *Chrysolina herbácea* e *Chrysolina polita* por meio de Southern blot e FISH. Nestas espécies foram observadas a ocorrência de repetições terminais e intersticiais (MRAVINAC et al., 2011). A presença de marcações intersticiais no gênero *Alagoasa* precisa ser melhor analisada; entretanto, estas podem estar associadas a inversões pericêntricas, comuns na evolução cromossômica de Coleoptera (VIRKKI, 1984). Além disso, pode ocorrer devido a atividade de elementos transponíveis ou também a eventos de fusão cromossômica, o que explicaria o aumento dos cromossomos sexuais, uma vez que apenas estes mostraram esse tipo de marcação.

Alagoasa pantina mostrou a marcação de regiões teloméricas terminais de apenas 5 pares autossômicos e do cromossomo sexual Y; no entanto, a ausência de marcações nos demais cromossomos deve estar relacionado a problemas da FISH no grupo, sendo comum a presença da membrana celular nas células mesmo após a realização das lavagens de preparação da FISH, do que a ausência da sequência

telomérica ou substituição desta por outra. *Alagoasa sp. 1* e *Alagoasa sp.2*, demonstraram a ocorrência de marcações teloméricas nas regiões terminais de todos os cromossomos, diferindo pela ocorrência de marcações intersticiais nos cromossomos sexuais, na primeira há presença de marcações dispersas ao longo do braço curto do cromossomo Y e marcação proximal no X, e na segunda há uma marcação intersticial proximal no cromossomo X.

As análises de relações filogenéticas construídas utilizando as sequências do fragmento do gene COI para as três espécies analisadas demonstram a separação destas em 3 espécies, uma vez que os indivíduos pertencentes a cada espécie foram agrupados em clados diferentes, com valores de bootstrap sempre maiores que 60%, juntamente a presença de distância interespecífica maior que 10% entre estas. A identificação dos táxons analisados neste trabalho pelo especialista, chegou a nível de espécie apenas para *Alagoasa pantina*, e para os 2 outros táxons a nível de gênero. Morfologicamente, *Alagoasa sp.1* assemelha-se muito com a espécie *A. areata*, devido ao padrão de coloração e algumas estruturas morfológicas, espécie disponibilizada pelo Museo del Instituto de Zoologia Agrícola (<http://chrysomelidae.miza-ucv.org.ve/>) e Museu de Zoologia da USP, no entanto, uma análise morfológica comparativa entre essas é necessária.

Alagoasa sp.2 assemelha-se morfolologicamente a espécie *A. scissa* disponibilizada pelo Museo del Instituto de Zoologia Agrícola; no entanto o táxon identificado como *A. scissa* em Almeida (2001), difere fisicamente do táxon analisado neste trabalho, entretanto ambos apresentam número diploide $2n=22$, cromossomos sexuais gigantes metacêntricos assinápticos e sistema de determinação sexual do tipo X+y.

A subfamília Alticinae apresenta inúmeros problemas de taxonomia, e apesar de poucas diferenças serem observadas nos cariótipos das espécies analisadas neste trabalho, a morfologia dos cromossomos autossômicos e sexuais, o heteromorfismo de tamanho dos cístrons 18S e 5S, a presença de marcações intersticiais nos cromossomos sexuais e a caracterização do fragmento do gene COI puderam auxiliar a resolução de alguns destes problemas. No entanto, é importante ressaltar que a taxonomia descritiva, principalmente analisando as genitálias masculina e feminina, poderiam corroborar com a diferenciação destas em três espécies.

REFERÊNCIAS

As referências do artigo científico se encontram com as demais referências da dissertação.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho foi analisada a diversidade genética de *Omophoita octoguttata*, espécie endêmica da região Neotropical, ocorrente na Mata Atlântica na região Sul do Brasil, por meio do sequenciamento do gene Citocromo Oxidase subunidade I (COI) e do gene nuclear EF1-alfa, e também se analisou citogeneticamente e por meio da genética molecular três espécies pertencentes ao gênero *Alagoasa*.

Os resultados obtidos para *O. octoguttata* indicam a ausência de uma descontinuidade filogeográfica na Mata Atlântica na região Sul do Brasil para a espécie em estudo, uma vez que indivíduos pertencentes a localidade mais ao sul (Nonoai) ainda mantem fluxo gênico com indivíduos pertencentes as localidades mais ao norte. Além disso, o gene EF1-alfa não demonstrou ser um bom marcador nuclear para *O. octoguttata*, para este estudo, uma vez que apresentou muitos haplótipos. Apesar da manutenção do fluxo gênico para esta espécie, ressalta-se que se trata de uma espécie que responde positivamente aos efeitos de borda, e são evidentes que os efeitos que a fragmentação de habitats causa na maioria das espécies, levando muitas a extinção e interrompendo processos de dispersão.

A análise citogenética de *Alagoasa pantina*, *Alagoasa sp.1* e *Alagoasa sp.2*, mostrou número diploide $2n=22$ para as três espécies, além de sistema de determinação sexual do tipo X+y, com cromossomos sexuais gigantes assinápticos, porém com correta segregação na anáfase I, padrão esperado para indivíduos pertencentes a subtribo Oedionychina. A morfologia dos cromossomos sexuais variou entre as três espécies: *A. pantina* possui cromossomo X metacêntrico e Y submetacêntrico; *Alagoasa sp.1* possui X e Y submetacêntricos; e *Alagoasa sp.2* possui X e Y metacêntricos. Os genes ribossomais 5S e 18S estão localizados em um cluster em um par de autossomos, condição considerada como ancestral para Coleoptera, e como já foi observado para outros alticines estes genes encontram-se em sintenia e colocalizados, além disso, *Alagoasa sp.1* apresentou heteromorfismo de tamanho dos clusters 18S e 5S. A FISH utilizando a sonda TTAGG_n apresentou resultados positivos para as três espécies analisadas, demonstrando a ocorrência desta repetição no gênero *Alagoasa*. Também foram observadas marcações intersticiais no cromossomo X e dispersa no braço curto do cromossomo Y de *Alagoasa sp.1* e intersticial no cromossomo X de *Alagoasa sp.2*.

O sequenciamento do gene COI e os dados citogenéticos indicam a separação das três espécies pertencentes ao gênero *Alagoasa* analisadas neste trabalho.

REFERÊNCIAS

- AB'SABER, A. N. Os domínios morfoclimáticos da América do Sul. Primeira aproximação. **Geomorfologia**, v. 53, p. 1-23, 1977.
- ALEXEYEV, M. F.; LeDOUX, S. P.; WILSON, G. L. Mitochondrial DNA and aging. **Clinical Science**, v. 107, p. 355-364, 2004.
- ALMEIDA, M. C. **Estudos cariotípicos em 14 espécies de Alticinae (Coleoptera, Polyphaga, Chrysomelidae): regiões de heterocromatina constitutiva e regiões organizadoras de nucléolo (RONs)**. 2001. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular)) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2001.
- 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, 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 and C-banding technique. **Micron**, v. 40, p. 586-596, 2009.
- ALMEIDA, M. C.; GOLL, L. G.; ARTONI, R. F.; NOGAROTO, V.; MATIELLO, R. R.; VICARI, M. R. Physical mapping of 18S rDNA cistron in species of the *Omophoita* genus (Coleoptera, Alticinae) using fluorescent in situ hybridization. **Micron**, v. 41, p. 729-734, 2010.
- 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**. (133): 147–157, 2000.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- AMABIS, J. M.; MARTHO, G. R. **Fundamentos da Biologia Moderna**. São Paulo: Editora Moderna, 1990.
- AVISE, J. C.; GIBLIN-DAVIDSON, C.; LAERM, J.; PATTON, J. C.; LANSMAN, R. A. Mitochondrial DNA clones and matriarchal phylogeny within and among geographic populations of the pocket gopher, *Geomys pinetis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, p. 6694-6698, 1979.
- AVISE, J. C., LANSMAN, R. A., SHADE, R. O. The use of restriction endonucleases to measure mitochondrial DNA sequence relatedness in natural populations. I. Population structure and evolution in the genus *Peromyscus*. **Genetics**, v. 92, p. 279-295, 1979.
- AVISE, J. C.; ARNOLD, J.; BALL, R. M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J. E.; REEB, C. A.; SAUNDERS, N. C. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial

DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology and systematics**, v. 18, p. 489-522, 1987.

AVISE, J. C. **Phylogeography**: the history and formation of species. Cambridge: Harvard University Press, 2000.

AVISE, J. C. Phylogeography: retrospect and prospect. **Journal of Biogeography**, v. 36, p. 3-15, 2009.

BARCISZEWSKA, M. Z.; GAWRONSKI, A.; SZYMANSKI, M.; ERDMANN, V. A. The primary structure os *Harpalus rufipes* 5S ribossomal RNA – a contribution for understanding insect evolution. **Molecular Biology Reports**, v. 21, p. 375-403, 1995.

BATATA-FILHO, H.; WALDSCHMIDT, A. M.; CAMPOS, L. A. O.; TAVARES, M. G.; FERNANDES-SALOMÃO, T. M. Phylogeography and historical demography of the Neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae): incongruence between morphology and mitochondrial DNA. **Apidologie**, v. 41, p. 534-547, 2010.

BATATA-FILHO, H.; MIYAKI, C. Y. Filogeografia da Mata Atlântica. **Revista da Biologia**, v. Esp. Biogeografia, p. 31-34, 2011.

BECERRA, J. X. Molecular systematics of *Blepharida* beetles (Chrysomelidae: Alticinae) and relatives. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 30, p. 107–117, 2004.

BECHYNÉ, J. Troisieme note sur les chrysomeloidea néotropicaux des collections de l'Institut Royal des Sciences naturelles de Belgique (Col. Phytophaga). **Institut royal des Sciences naturelles de Belgique, Bulletin**, v. 31, p. 1-28, 1955.

BECHYNÉ, J. Beitrage zur Kenntnis der Alticidenfauna Boliviens. **Beitrage zur neotropischen Fauna**, v. 1, p. 269-388, 1959.

BEGOSI, A. **Hábitos alimentares e coloração de advertência em alguns altícineos (Coleoptera: Chrysomelidae)**. 1984, 231f. Dissertação (Mestrado em Biologia (Ecologia)) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1984.

BEGOSI, A.; BENSON, W. W. Host plant and defense mechanism in Oedionychina (Alticinae). In: **Biology of Chrysomelidae**. Dordrecht/ Boston/ Londres: Kluwer Academic Publishers, p. 57-71, 1988.

BERMINGHAM, E.; AVISE, J. C. Molecular zoogeography of freshwater fishes in the southeastern United States. **Genetics**, v. 113, p. 939-965, 1986.

BÉTHOUX, O. "The earliest beetle identified". **Journal of Paleontology**, v. 83, p. 931-937, 2009.

BIESSMANN, H.; MASON, J. M.; FERRY, K.; d'HULST, M.; VALGEIRSDOTTIR, K.; TRAVERSE, K. L.; PARDUE, M. Addition of telomere-associated HeT DNA sequences "heals" broken chromosome ends in *Drosophila*. **Cell**, v. 61, p. 663-673, 1990.

BISHOP, P. Drainage rearrangement by river capture, beheading and diversion. **Physical Geography**, v. 19, p. 449-473, 1995.

- BLACKBURN, E. H. Structure and function of telomeres. **Nature**, v. 350, p. 569-573, 1991.
- BLAXTER, M. Counting angels with DNA. **Nature**, v. 421, p. 122-124, 2003.
- BORROR, D. J.; DELONG, D. M. **Introdução ao estudo dos insetos**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 1988.
- BRAY, A. M.; BAUER, L. S.; POLAND, T. M.; HAACK, R. A. COGNATO, A. I.; SMITH, J. Genetic analysis of emerald ash borer (*Agrilus planipennis* Fairmaire) populations in Asia and North America. **Biological Invasions**, v. 13, p. 2869-2887, 2011.
- BROWER, A. V. Z.; BOYCE, T. M. Mitochondrial DNA variation in monarch butterflies. **Evolution**, v. 45, p. 1281-1286, 1991.
- BROWN, J. M.; LEEBENS-MACK, J. H.; THOMPSON, J. N.; PELLMYR, O.; HARRISON, R. G. Phylogeography and host association in a pollinating seed parasite *Greya politella* (Lepidoptera: Prodoxidae). **Molecular Ecology**, v. 6, p. 215-224, 1997.
- BUCKLEY, T. R.; MARSKE, K. A.; ATTANAYAKE, D. Identifying glacial refugia in a geographic parthenogen using paleoclimate modelling and phylogeography: the New Zealand stick insect *Argosarchus horridus* (White). **Molecular Ecology**, v. 18, p. 4650-4663, 2009.
- BUCKLEY, T. R.; MARSKE, K.; ATTANAYAKE, D. Phylogeography and ecological niche modelling of the New Zealand stick insect *Clitarchus hookeri* (White) support survival in multiple coastal refugia. **Journal of Biogeography**, v. 37, p. 682-695, 2010.
- CABANNE, G. S.; SANTOS, F. R.; MIYAKY, C. Y. Phylogeography of *Xiphorhynchus fuscus* (Passeriformes, Dendrocolaptidae): vicariance and recent demographic expansion in southern Atlantic forest. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 91, p. 73-84, 2007.
- CABANNE, G. S.; d'HORTA, F. M.; SARI, E. H. R.; SANTOS, F. R.; MIYAKI, C. Y. Nuclear and mitochondrial phylogeography of the Atlantic Forest endemic *Xiphorhynchus fuscus* (Aves: Dendrocolaptidae): biogeography and systematic implications. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 49, p. 760-773, 2008.
- 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 genes in insects, and repetitive DNA similarity between the B chromosome and A complement. **Heredity**, v. 104, p. 393-400, 2010.
- CABRAL-DE-MELO, D. C.; MOURA, R. C.; MARTINS, C. Cytogenetic mapping of rRNAs and histone H3 genes in 14 species of *Dichotomius* (Coleoptera, Scarabaeidae, Scarabaeinae) beetles. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 134, p. 127-135, 2011a.
- CABRAL-DE-MELLO, D. C.; MOURA, R. C.; MARTINS, C. Evolutionary dynamics of 5S rDNA location in acridid grasshoppers and its relationship with H3 histone gene and 45S rDNA location. **Genetica**, v. 139, p. 921-931, 2011b.

- CABRAL-DE-MELLO, D. C.; OLIVEIRA, S. G.; MOURA, R. C.; MARTINS, C. Chromosomal organization of the 18S and 5S rRNAs and histone H3 genes in Scarabaeinae coleopterans: insights into the evolutionary dynamics of multigenes families and heterochromatin. **BMC Genetics**, v. 12, p. 1-12, 2011.
- CARNAVAL, A. C.; HICKERSON, M. J.; HADDAD, C. F. B.; RODRIGUES, M. T.; MORITZ, C. Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic forest hotspot. **Science**, v. 323, p. 785-789, 2009.
- CARLSON, A.; HARTMAN, G. Tropic forest fragmentation and nest predation – an experimental study in an Eastern Arc montane forest, Tanzania. **Biodiversity & Conservation**, v. 10, p. 1077-1085, 2001.
- CARNEIRO, N. P.; PETER, A. H.; BRIAN, A. L. The eEF1A gene family is differentially expressed in maize endosperm. **Plant Molecular Biology**, v. 41, p. 801-804, 1999.
- COSTA, C. Estado de conocimiento de los Coleoptera neotropicales. **Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa (Versión Electrónica)**, v. 32, 2003. Disponível em: <<http://www.sea-entomologia.org/aracnet/11/01/index.htm>> acesso em: ago. 2017.
- COSTA, L. P. The historical bridge between the Amazon and the Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. **Journal of Biogeography**, v. 30, p. 71-86, 2003.
- COSTA LIMA, A. M. **Insetos do Brasil**. Tomo 9. Rio de Janeiro: Tipografia da Imprensa Nacional, 1955.
- COX, A. V.; BENNETT, S. T.; PAROKONNY, A. S.; KENTON, A.; CALLIMASSIA, M. A.; BENNETT, M. D. Comparison of plant telomere locations using a PCR-generated synthetic probe. **Ann Botany**, v. 72, p. 239-247, 1993.
- DAY, M. D.; JONES, P. K. Life History and host range of *Alagoasa extrema* (Coleoptera: Chrysomelidae: Alticinae), a potential biological control agente of *Lantana* spp. (Verbenaceae) in Australia. **Biocontrol Science and Technology**, v. 21, p. 1177-1191, 2011.
- DEL-CLARO, K. **Comportamento Animal** - Uma introdução à ecologia comportamental. Jundiaí: Distribuidora / Editora - Livraria Conceito, 2004.
- DETHIER, V. G. Evolution of feeding preferences in phytophagous insects. **Evolution**, v. 8, p. 67-82, 1954.
- DI RENZO, A.; WILSON, A. C. Branching pattern in the evolutionary tree for human mitochondrial DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, p. 1597-1601, 1991.
- DUCKETT, C. N.; KJER, K. M. Cladistic analysis of the Oedionychines of Southern Brazil (Chrysomelidae: Galerucine: Alticini) based on two molecular markers. In: **Fifth International Symposium of Chrysomelidae Biology**, 2003, Iguassu Falls, Brazil. Sofia: Pensoft Publishers, p. 117-132, 2003.
- DUTRILLAUX, A. M.; DUTRILLAUX, B. Sex chromosome rearrangements in Polyphaga beetles. **Sexual Development**, v. 3, p. 43-54, 2009.

EDWARDS, S. V.; BEERLI, P. Perspective: gene divergence, population divergence, and the variance in coalescence time in phylogeographic studies. **Evolution**, v. 54, p. 1839-1854, 2000.

ERIKSSON, J.; SIEDEL, H.; LUKAS, D.; KAYSER, M.; ERLER, A.; HASHIMOTO, C.; HOHMANN, G.; BOESCH, C.; VIGILANT, L. Y-chromosome analysis confirms highly sex-biased dispersal and suggests a low male effective population size in bonobos (*Pan paniscus*). **Molecular Ecology**, v. 15, p. 939-949, 2006.

ESTOUP, A.; SOLIGNAC, M.; CORNUET, J. M.; GOUDET, J.; SCHOLL, A. Genetic differentiation of continental and island populations of *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae) in Europe. **Molecular Ecology**, v. 5, p. 19-31, 1996.

EWERS, R. M.; DIDHAM, R. K. Confounding factors in the detection of species responses to hábitat fragmentation. **Biological Reviews**, v. 81, p. 117-142, 2006.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analysis under Linux and Windows. **Molecular Ecology Research**, v. 10, p. 564-567, 2010.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of Molecular Variance inferred from metric distances among DNA Haplotypes: Application to Human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v. 131, p. 479-491, 1992.

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2007.

FAHRIG, L. Effects of hábitat fragmentation on biodiversity. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v.34, p.487-515, 2003.

FERREIRA, A.; CELLA, D.; TARDIVO, J. R.; VIRKKI, N. Two pairs of chromosomes: A new low record for Coleoptera. **Revista Brasileira de Genética**, v. 7, p. 231-239, 1984.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: Embrapa Cernagen, 1998.

FRAENKEL, G. S. The raison d'Être of secondary plant substances. **Science**, v. 129, p. 1466-1470, 1959.

FRYDRYCHOVA, R.; MAREC, F. Repeated losses of TTAGG telomere repeats in evolution of beetles (Coleoptera). **Genetica**, v. 115, p. 179-187, 2002.

FU, Y. X.; LI, W. H. Coalescing into the 21st century: an overview and prospects of coalescent theory. **Theoretical Population Biology**, v. 56, p. 1-10, 1999.

FUCHS, J.; BRANDES, A.; SCHUBERT, I. Telomere sequence localization and karyotype evolution in higher plants. **Plant Syst Evol**, v. 196, p. 227-241, 1995.

GALETI Jr, P. M.; MESTRINER, C. A.; MONACO, P. J.; RASCH, E. M. Post-zygotic modifications and interindividual nucleolar organizing region in fish: report of a case involving *Leporinus friderici*. **Chromosome Research**, v. 3, p. 285-290, 1995.

GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I. G. Atlantic forest hotspots status: an overview. In: **The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, threats, and outlook**. Washington: Center for Applied Biodiversity Science and Island Press, p. 3-11, 2003.

GARRIGAN, D.; HAMMER, M. F. Reconstructing Human Origins in the genomic era. **Nature Reviews Genetics**, v. 7, p. 669-690, 2006.

GIBBS, R. D. **Chemotaxonomy of flowering plants**. v. 1-4. Montreal: Mc Gill-Queen's University Pr., 1974.

GILLESPIE, J. J.; JOHNSTON, J. S.; CANNONE, J. J.; GUTELL, R. R. Characteristics of the nuclear (18S, 5.8S, 28S and 5S) and mitochondrial (12S and 16S) rRNA gene of *Apis mellifera* (Insecta: Hymenoptera): structure, organization, and retrotransposable elements. **Insect Molecular Biology**, v. 15, p. 657-686, 2006.

GILLOTT, C. **Entomology**, Dordrecht: Springer, 2005.

GOLL, L. G.; MATIELLO, R. R.; ARTONI, R. F.; VICARI, M. R.; NOGAROTO, V.; BARROS, A. V.; ALMEIDA, M. C. High-resolution physical chromosome mapping of multigene families in *Lagria vilosa* (Tenebrionidae): Occurrence of interspersed ribosomal genes in Coleoptera. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 146, p. 64-70, 2015.

GRAZZIOTIN, F. G.; MONZEL, M.; ECHEVERRIGARAY, S.; BONATTO, S. L. Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest. **Molecular Ecology**, v. 15, p. 3969-3982, 2006.

GRIMALDI, D.; ENGEL, M. S. **Evolution of the Insects**. New York: Cambridge University Press, 2006.

GROSS, S. R.; KINZY, T. G. Translation elongation factor 1A is essential for regulation of the actin cytoskeleton and cell morphology. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 12, p. 772-778, 2005.

GULLAN, P. J.; CRANSTON, P. **The Insects: An Outline of Entomology**. 3. ed. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2010.

HAFFER, J. Speciation in Amazonian forest birds. **Science**, v. 165, p. 131-137, 1969.

HALE, L. R.; SINGH, R. S. Mitochondrial DNA variation and genetic structure in populations of *Drosophila melanogaster*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 622-637, 1987.

HARE, M. P. Prospects for nuclear gene phylogeography. **TRENDS in Ecology & Evolution**, v. 16, n. 12, p. 700-706, 2001.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Principles of population genetics**. Sunderland: Sinauer Associates, 1997.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Princípios de genética de populações**. 4 ed. Porto Alegre: ArtMed, 2010.

HOELZER, G. A. Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-genes tree versus nuclear-genes trees revisited. **Evolution**, v. 51, p. 622-626, 1997.

HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics**, v. 17, p. 754-755, 2001.

IJDO, J. W.; WELLS, R. A.; BALDINI, A.; REEDERS, S. T. Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 19, p. 4780, 1991.

INFANTE, C.; ASENSIO, E.; CAÑAVATE, J. P.; MANCHADO, M. Molecular characterization and expression analysis of five different elongation factor 1 alpha genes in the flatfish Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup): Differential gene expression and thyroid hormones dependence during metamorphosis. **BMC Molecular Biology**, v. 30, p. 9-19, 2008.

KAPLAN, F. S.; MURRAY, J.; SYLVESTER, J. E.; GONZALEZ, I. L.; O'CONNOR, J. P.; DOERING, J. L.; MUENKE, M.; EMANUEL, B. S.; ZASLOFF, M. A. The topographic Organization of repetitive DNA in the Human Nucleolus. **Genomics**, v. 15, p. 123-132, 1993.

KEARSE, M.; WILSON, M. R.; STONES-HAVAS, S.; CHEUNG, M.; STURROCK, S.; BUXTON, S. COOPER, A.; MARKOWITZ, S.; DURAN, C.; THIERER, T.; ASHTON, B.; MEINTJES, P.; DRUMMOND, A. Geneious Basic: an integrad and extendable desktop software platform for the organization and analysis sequence data. **Bioinformatics**, v. 15, p. 1647-1649, 2012.

KIM, S. J.; KJER, K. M.; DUCKETT, C. N. Comparison between molecular and morphological-based phylogenies of galerucine/alticine leaf beetles (Coleoptera: Chrysomelidae). **Insects Systematics and Evolution**, v. 34, p. 53-64, 2003.

KOBAYASHI, N.; KUMAGAI, M.; MINEGISHI, D.; TAMURA, K.; AOTSUKA, K.; KATAKURA, H. Molecular population genetics of a host-associated sibling species complex of phytophagous ladybird beetles (Coleoptera: Coccinellidae: Epilachninae). **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 49, p. 16-24, 2011.

KREMASTER, L.; BUNNELL, F. L. Edge effects: theory, evidence and implications to management of western North American forests. In: **Forest Fragmentation: Wildlife and management Implications**. Boston: Brill, 1999.

KRUPP, G.; KLAPPER, W.; PARWARESCH, R. Cell proliferation, carcinogenesis and diverse mechanism of telomerase regulation. **Cell. Mol. Life Sci**, v. 57, p. 464-486, 2000.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, p. 1870-1874, 2016.

LANSMAN, R. A.; AVISE, J. C.; AQUADRO, C. F.; SHAPIRA, J. F.; DANIEL, S. W. Extensive genetic variation in mitochondrial DNA's among geographic populations of the deer mouse, *Peromyscus maniculatus*. **Evolution**, v. 37, p. 1-16, 1983.

LAURANCE, W. F.; PÉREZ-SALICRUP, D.; DELAMÔNICA, P.; FEARNSIDE, P. M.; D'ANGELO, S.; JEROZOLINSKI, A.; POHL, L.; LOVEJOY, T. Rain forest fragmentation and the structure of amazonian liana communities. **Ecology**, v. 82, p. 105-116, 2001.

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

LAWRENCE, J. F.; NEWTON JR, A. F. Families and subfamilies of Coleoptera (with selected genera, notes, references and data on family-group names). In: Pakaluk and Slipinski (eds.). **Biology. Phylogeny, and classification of Coleoptera: Papers Celebrating the 80th Birthday of Roy A. Crowson**. p. 779-1092, 1995.

LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, v. 52, p. 201-220, 1964.

LEVIS, R. W.; GANESAN, R.; HOUTCHENS, K.; TOLAR, L. A.; SHEEN, F. M. Transposons in place of telomeric repeats at a *Drosophila* telomere. **Cell**, v. 75, p. 1083-1093, 1993.

LINZMEIER, A. M.; RIBEIRO-COSTA, C. S.; MARINONI, R. C. Fauna de Altícini (Newman) (Coleoptera, Chrysomelidae, Galerucinae) em diferentes estágios sucessionais na Floresta com Araucária do Paraná, Brasil: diversidade e estimativa de riqueza de espécies. **Revista Brasileira de entomologia**, vol. 50, n. 1, p. 101-109, 2006.

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

LONG, E. O.; DAWID, I. D. Repeated genes in eukaryotes. **Annual Review of Biochemistry**, v. 49, p. 727-764, 1980.

LOPEZ, V. M.; RUGMAN-JONES, P. F.; COLEMAN, T. W.; HODDLE, M. S.; STOUTHAMER, R. Population genetics of goldspotted oak borer, *Agrilus auroguttatus* Schaeffer (Coleoptera: Buprestidae): investigating the origin of an invasive pest of native oaks in California. **Biological Invasions**, Online: 10 p., 2014.

MAIA, A. V. P.; ALMEIDA, C.; SANTORO, K. R.; MELO, J. L. A.; OLIVEIRA, J. V.; GUEDES, R. N. C.; BADJI, C. A. High-level phylogeographic structuring of *Neoleucinodes elegantis* Guenée (Lepidoptera, Crambidae) in Brazil: an important tomato pest. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 60, p. 206-210, 2016.

MARTINS, C.; FERREIRA, I. A.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; GALETTI, P. M. Jr. A tandemly repetitive centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) is derived from 5S rDNA. **Genetica**, v. 127, p. 133-141, 2006.

MARTINS, F. M.; TEMPLETON, A. R.; PAVAN, A. C. O.; KOHLBACH, B. C.; MORGANTE, J. S. Phylogeography of the common vampire bat (*Desmodus rotundus*): marked population structure, Neotropical Pleistocene vicariance and incongruence between nuclear and mtDNA markers. **BMC Evolutionary Biology**, v. 9:294, p. 1-13, 2009.

MAYER, F.; PIEL, F. B.; CASSEL-LUNDHAGEN, A.; KIRICHENKO, N.; GRUMIAU, L.; ØKLAND, B.; BERTHEAU, C.; GRÉGOIRE, J. C.; MARDULYN, P. Comparative multilocus phylogeography of two Palearctic spruce bark beetles: influence of contrasting ecological strategies on genetic variation. **Molecular Ecology**, v.24, p. 1292-1310, 2015.

MELO, B. G. **Análise citogenética e molecular em espécies da subfamília Alticinae (Alticinae: Chrysomelidae)**. 2013, 80f. Dissertação (Mestrado em Biologia Evolutiva) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2013.

MELLO, L. R. A.; TASIOR, D.; GOLL, L. G.; ARTONI, R. F.; VICARI, M. R.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M. C. Physical map of repetitive DNA and Karyotype evolution in three species of the genus *Omophoita* (Coleoptera: Alticinae). **Italian Journal of Zoology**, p. 1-9, 2014.

MEYNE, J.; RATLIFF, R. L.; MOYZIS, R. K. Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)_n among vertebrates. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 86, p. 7049-7053, 1989.

MILACH, S. C. K. Marcadores de DNA. **BIOTECNOLOGIA Ciência e Desenvolvimento**, v. 5, p. 14-17, 1998.

MORELLATO, P. C.; HADDAD, C. F. B. Introduction: The Brazilian Atlantic Forest. **Biotropica**, v. 32, p. 786-792, 2000.

MRAVINAC, B.; MESTROVIC, N.; CAVRAK, V. V.; PLOHL, M. TCAGG, an alternative telomeric sequence in insects. **Chromosoma**, v. 120, p. 367-376, 2011.

MURCIA, C. Edges effects in fragmented forests: implications for conservation. **Tree**, v. 10, p. 58-62, 1995.

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

NIELSEN, L.; EDSTRÖM, J. E. Complex telomere associated repeat units in members of the genus *Chironomus* evolve from sequences similar to simple telomeric repeats. **Mol Cell Biol**, v. 13, p. 1583-1589, 1993.

NOLASCO-SOTO, J.; GONZÁLEZ-ASTORGA, J.; ESPINOSA DE LOS MONTEROS, A.; GALANTE-PANTIÑO, E.; FAVILA, M. E. Phylogeographic structure of *Canthon cyanellus* (Coleoptera: Scarabaeidae), a Neotropical dung beetle in the Mexican Transition Zone: insights on its origin and the impacts of Pleistocene climatic fluctuations on population dynamics. **Molecular Ecology and Evolution**, p. 42, 2017.

OKAZAKI, S.; TSUCHIDA, K.; MAEKAWA, H.; ISHIKAWA, H.; FUJIWARA, H. Identification of a pentanucleotide telomeric sequence, (TTAGG)_n, in the silkworm *Bombyx mori* and in other insects. **Mol Cell Biol**, v. 13, p. 1424-1432, 1993.

OLIVEIRA-FILHO, A. T.; JARENKOW, J. A.; RODAL, M. J. N. Floristic relationships of seasonally dry forest of eastern South America based on tree species distribution patterns. In: **Neotropical Savannas and Dry Forests: Diversity, Biogeography, and Conservation**. Flórida: CRC Press, p. 159-192, 2006.

OSANAI, M.; KOJIMA, K. K.; FUTAHASHI, R.; YAGUCHI, S.; FUJIWARA, H. Identification and characterization of the telomerase reverse transcriptase of *Bombyx mori* (silkworm) and *Tribolium castaneum* (flour beetle). **Gene**, v. 376, p. 281-289, 2006.

PAINTING, C. J.; MYERS, S.; HOLWELL, G. I.; BUCKLEY, T. R. Phylogeography of the New Zealand giraffe weevil *Lasiorhynchus barbicornis* (Coleoptera: Brentidae): A comparison of biogeographic boundaries. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. XX, p. 1-16, 2017.

PAIVA, S. R.; ROSA, A. J. M. **Marcadores Moleculares e suas aplicações em estudos populacionais de espécies de interesse zootécnico**, Planatina: Embrapa Cerrados, 2009.

PELLEGRINO, K. C. M.; RODRIGUES, M. T.; WAITE, A. N.; MORANDO, M.; YASSUDA, Y. Y.; SITES, J. W. Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwinii* complex (Gekkonidae, Squamata): genetic structure coincides with river system in the Brazilian Atlantic Forest. **Bioogical Journal of the Linnean Society**, v. 85, p. 13-26, 2005.

PEREIRA, L. H. G.; OLIVEIRA, C. Genômica e o código de barras da vida. In: **Ciências Genômicas: Fundamentos e aplicações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2015.

PETITPIERRE, E. Cytogenetics, cytotaxonomy and genetics of Chrysomelidae. In: **Biology of Chrysomelidae**. Dordrecht/ Boston/ Londres: Kluwer Academic Publishers, p. 131-159, 1988.

PETITPIERRE, E. Recent advances in the evolutionary cytogenetics of the leaf beetles (Coleoptera, Chrysomelidae). **Entomography**, v. 6, p. 433-442, 1989.

PETITPIERRE, E. Molecular cytogenetics and taxonomy of insects, with particular reference to the Coleoptera. **International Journal of Insect Morphology and Embryology**. v. 25, n. ½, p. 115-133, 1996.

PETITPIERRE, E. A new contribution to the cytogenetic knowledge of Alticinae (Coleoptera, Chrysomelidae). **Hereditasn**, v.143, p. 58-61, 2006.

PETITPIERRE, E.; SEGARRA, C. Chromosomal variability and evolution of Chrysomelidae (Coleoptera), particularly that of Chrysomelinae and Palearctic Alticinae. **Entomography**, v. 3, p. 403-426, 1985.

PETITPIERRE, E.; SEGARRA, C.; YADAV, J. S.; VIRKKI, N. Chromosome numbers and meioformulae of Chrysomelidae. In: **Biology of Chrysomelidae**. Dordrecht/ Boston/ Londres: Kluwer Academic Publishers, p. 161-186, 1988.

PICH, U.; FUCHS, J.; SCHUBERT, I. How do Alliaceae stabilize their chromosome ends in the absence of TTTAGGG sequence?. **Chromosome Res**, v. 4, p. 207-213, 1996.

PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, p. 2934-2938, 1986.

PINTO, L. P.; BEDÊ, L. C.; FONSECA, M. T.; LAMAS, I. R.; MESQUITA, C. A. B. PAGLIA, A. P.; PINHEIRO, T. C.; SÁ, M. B. Mata Atlântica. In: **Biomass Brasileiros: retratos de um país plural**. Rio de Janeiro: Casa da Palavra, 2012.

POPKIN, M.; PIFFARETTI, J.; CLEMENS, A. L.; QIAO, G. X.; CHEN, J. VITALIS, R.; VANLERBERGHE-MASUTTI, F.; GUPTA, R. K.; LAMAARI, M.; LANGELLA, O.; D'ACIER, A. C.; JOUSSELIN, E. Large-scale phylogeography study of the cosmopolitan aphid pest *Brachycaudus helichrysi* reveals host plant associated lineages that evolved in allopatry. **Biological Journal of the Linnean Society**, p. 13, 2016.

RANSOM-HODGKINS, W. D. The application of expression analysis in elucidating the eukaryotic elongation factor one alpha gene family in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Genetic Genomics**, v. 281, p. 391–405, 2009.

RIBEIRO, R. A.; LEMOS-FILHO, J. P.; RAMOS, A. C. S.; LOVATO, M. B. Phylogeography of the endangered rosewood *Dalbergia nigra* (Fabaceae): insights into the evolutionary history and conservation of the Brazilian Atlantic Forest. **Heredity**, v. 106, p. 46-57, 2010.

RICHARDS, S.; GIBBS, R. A.; WEINSTOCK, G. M. et al. The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. **Nature**, v. 452, p. 949-955, 2008.

RIDLEY, M. **Evolução**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

RILEY, E. G.; CLARCK, S. M.; FLOWERS, R. W.; GILBERT, A. J. Family 124. Chrysomelidae. In: ARNETT, R. H., THOMAS, M. C., SKELLEY, P. E., FRANK, J. H. (Eds.), v. 2, **American Beetles. Polyphaga: Scarabaeoidea through Curculionoidea**. London: CRC Press, p. 617–691, 2002.

ROEHRDANZ, R. L.; JOHNSON, D. A. Mitochondrial DNA variation among geographical populations of the screwworm fly, *Cochliomyia hominivorax*. **Journal of Medical Entomology**, v. 25, p. 136-141, 1988.

ROSS, K. G.; KRIEGER, M. J. B.; SHOEMAKER, D. D.; VARGO, E. L.; KELLER, L. Hierarchical analysis of genetic structure in native fire ant populations: Results from three classes of molecular markers. **Genetics**, v. 147, p.643-655, 1997.

ROSSI, M.; BARRIO, E.; LATORRE, A.; QUEZADA-DÍAZ, J. E.; HASSON, E.; MOYA, A.; FONTDEVILLA, A. The evolutionary History of *Drosophila buzzatii*. XXX. Mitochondrial DNA polymorphism in original and colonizing populations. **Molecular Biology and Evolution**, v. 13, p. 314-323, 1996.

ROZAS, A.; HERNANDEZ, J. M.; CABRERA, V. M.; PREROSTI, A. Colonization in America by *Drosophila subobscura*: Effect of the founder event on mitochondrial DNA polymorphism. **Molecular Biology and Evolution**, v. 7, p. 103-109, 1990.

RUBINOFF, D. DNA barcoding evolves into the familiar. **Conservation Biology**, v. 20, n. 5, p. 1548-1549, 2006.

RUIZ, E. A.; RINEHART, J. E.; HAYES, J. L.; ZÚÑIGA, G. Effect of geographic isolation on genetic differentiation in *Dendroctonus pseudotsugae* (Coleoptera: Curculionidae). **Hereditas**, v. 146, p. 79-92, 2009.

SAHARA, K.; MAREC, F.; TRAUT, W. TTAGG telomeric repeats in chromosomes of some insects and other arthropods. **Chromosome Res**, v. 7, p. 449-460, 1999.

SÁNCHEZ-GARCÍA, F. J.; GALIÁN, J.; GALLEGÓ, D. Distribution of *Tomicus destruens* (Coleoptera: Scolytinae) mitochondrial lineages: phylogeographic insights and niche modelling, **Organisms Diversity & Evolution**, v. 15, p. 101-113, 2015.

SBISA, E.; TANZARIELLO, F.; REYES, A.; PESOLE, G.; SACCONI, C. Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications. **Gene**, v. 205, p. 125-140, 1997.

- SCHERER, G. The origins of the Alticinae. In: **Biology of Chrysomelidae**. Dordrecht/ Boston/ Londres: Kluwer Academic Publishers, p. 115-130, 1988.
- SCHINDEL, D. E.; MILLER, S. E. DNA barcoding a useful tool for taxonomists. **Nature**, v. 435, p. 17, 2005.
- SCHNEIDER, M. C.; ROSA, S. P.; ALMEIDA, M. C.; COSTA, C.; CELLA, D. M. 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, p. 308-316, 2007.
- SEENO, T. N.; WILCOX, J. A. Leaf Beetle Genera (Coleoptera: chrysomelidae). **Entomography**, v. 1, p. 1-221, 1982.
- SEGARRA, C.; PETITPIERRE, E. A new contribution of the knowledge of chromosomes of the European Alticinae (Coleoptera, Chrysomelidae). **Cytobios**, v. 43, p. 23-30, 1985.
- SEGARRA, C.; PETITPIERRE, E. Chromosomes of sixteen European species of *Longitarsus* flea-beetles (Coleoptera, Chrysomelidae). **Genetica**, v.76, p.203-208, 1988.
- SEGARRA, C.; PETITPIERRE, E. Cytogenetic diversity of the European *Psylliodes* flea beetles (Coleoptera, Chrysomelidae). **Hereditas**, v. 110, p. 169-174, 1989.
- SERRANO, J. Chromosome numbers and karyotype evolution of caraboidea. **Genetica**, v. 55, p. 51-60, 1981.
- SILVA, A. G. d'A.; GONÇALVES, C. R.; GALVÃO, D. M.; GONÇALVES, A. J. L.; GOMES, J.; SILVA, M. N.; SIMONI, L. **Quarto catalogo dos insetos que vivem nas plantas do Brasil – seus parasitas e predadores: Coleoptera, Chrysomelidae, Alticinae**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1968.
- SILVA, J. M. C.; SANTOS, M. C.; CASTELLETI, C. H. M. Areas of endemismo for passerine birds in the Atlantic forest, South America. **Global Ecology and Biogeography**, v. 13, p. 85-92, 2004.
- SMITH, S. G. The cyto-taxonomy of Coleoptera. **Can Entomol.**, v.82, p. 58-68, 1950.
- SMITH, S.; VIRKKI, N. Coleoptera. In: **Animal citogenetics 3**. Berlin: Gebruder Borntraeger, 1978.
- SOS MATA ATLÂNTICA. **Relatório Anual de Atividades SOS Mata Atlântica - Edição 2015**, v. 1, p. 88, 2015.
- SOS MATA ATLANTICA. 2016. **Atlas da Mata Atlântica**, disponível em: <<https://www.sosma.org.br/projeto/atlas-da-mata-atlantica/>>, acesso em: set. 2017.
- SOUTHWOOD, T. R. E. The insect/plant relationship – an evolutionary perspective. In: **Insects – Plant Relationships**. Oxford: Blackwell, p. 3-30, 1972.
- SPERLING, F. A. H.; HARRISON, R. G. Mitochondrial DNA variation within and between of the *Papilo machaon* group of swallowtail butterflies. **Evolution**, v. 48, p. 408-422, 1994.

STAUFFER, C.; LAKATOS, F.; HEWITT, G. M. Phylogeography and postglacial colonization routes of *Ips typographus* L. (Coleoptera, Scolytidae). **Molecular Ecology**, v. 8, p.763-773, 1999.

STEVENS, N. M. Studies in spermatogenesis with special reference to the "accessory chromosome". **Caregie Institution of Washington**, v. 36, p. 1-33, 1906.

SUMNER, A. T. **Chromosomes: organization and function**. Malden: Blackwell Publishing, 2003.

TABERLET, P. The use of mitochondrial DNA control region sequencing in conservation genetics. In: **Molecular Genetic Approaches in Conservation**. New York: Oxford University Press, p. 125-142, 1996.

TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, v. 123, p. 585-595, 1989.

TAMURA, K. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C content biases. **Molecular Biology and Evolution**, v. 9, p. 678-687, 1992.

TAUTZ, D.; ARCTANDER, P.; MINELLI, A.; THOMAS, R. H.; VOGLER, A. P. A plea for DNA taxonomy. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 18, n. 2, p. 70-74, 2003.

TEMPLETON, A. R. Using haplotypes trees for phylogeographic and species inference in fish populations. **Environmental biology of fishes**, v. 69, p. 7-20, 2004.

THOMÉ, M. T. C.; ZAMUDIO, K. R.; GIOVANELLI, J. G. R.; HADDAD, C. F. B.; BALDISSERA JR., F. A.; ALEXANDRINO, J. M. B. Phylogeography of endemic toads and post-Pliocene persistence of the Brazilian Atlantic Forest. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 55, p. 1018-1031, 2010.

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**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

TIMBERLAKE, E. Low repetitive DNA content in *Aspergillus nidulans*. **Science**, v.202, p. 973-975, 1978.

TRIPLEHORN, C. A.; JOHNSON, N. F. **Estudo dos insetos**. 7. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2011.

TUDA, M.; RÖNN, J.; BURANAPANICHPAN, S.; WASANO, N.; ARNQVIST, G. Evolutionary diversification of the bean beetle genus *Callosobruchus* (Coleoptera: Bruchidae): traits associated with stored-product pest status. **Molecular Biology**, v. 15, p. 3541-3551, 2006.

VASCONCELOS, T.; HORN, A.; LIEUTIER, F.; BRANCO, M.; KERDELHUÉ, C. Distribution and population genetic structure of the Mediterranean pine shoot beetle *Tomicus destruens* in the Iberian Peninsula and Southern France. **Agricultural and Forest Entomology**, v. 8, p. 103–111, 2006.

VIDAL, O. R. Chromosome numbers of Coleoptera from Argentina. **Genetica**, v. 65, p. 235-239, 1984.

VIGILANT, L.; PENNINGTON, R.; HARPENDING, H.; KOCHER, T. D.; WILSON, A. C. Mitochondrial DNA sequences in single hairs from a southern African population. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, p. 9350-9354, 1989.

VIGILANT, L.; STONEKING, M.; HARPENDING, H.; HAWKES, K.; WILSON, A. C. African populations and the evolution of human mitochondrial DNA. **Science**, v. 253, p. 1503-1507, 1991.

VIRKKI, N. Non-conjugation and conjugation of the sex chromosomes in the beetles of the genus *Alagoasa* (Chrysomelidae: Alticinae). **Annales Academiae Scientiarum Fennicae**, v. 54, p. 1-22, 1961.

VIRKKI, N. Rapid allocyclic changes in the centric and arm segments of the X chromosome in the meiosis of male *Omophoita superba* Weise (Coleoptera, Alticidae). **Hereditas**, v. 58, p. 262-264, 1967.

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

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

VIRKKI, N. Fleabeetles, especially Oedionychina of a Puerto Rican Marshland in 1969-72. **Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico**, v. 64, p. 63-92, 1980.

VIRKKI, N. Chromosomes in evolution of Coleoptera. In: **Chromosome in evolution of eukaryotic groups**. Boca Raton: CRC Press, p. 41-76, 1984.

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

VIRKKI, N. Cytotaxonomy of Alticinae. In: **Biology of Chrysomelidae**. Dordrecht/ Boston/ Londres: Kluwer Academic Publishers, p. 187-203, 1988.

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

VIRKKI, N.; PURCELL, C. M. Four pairs of chromosomes: the lowest number in Coleoptera. **Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico**, v. 49, p. 386-387, 1965.

VIRKKI, N.; SANTIAGO-BLAY, J. Chromosome numbers in 71 Puerto Rican species of leaf beetles (Coleoptera: Chrysomelidae). **Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico**, v. 82, p. 69-83, 1998.

VIRKKI, N.; SANTIAGO-BLAY, J. A. Trends of karyotype evolution in neotropical Oedionychina (Coleoptera: Chrysomelidae: Alticinae). **Hereditas**, v. 119, p. 263-283, 1993.

VIRKKI, N.; SANTIAGO-BLAY, J.; CLARK, S. M. Chromosome of some Puerto Rican Disonycha and Oedionychina (Coleoptera: Chrysomelidae: Alticinae: Oedionychini). **Psyche**, v. 98, p. 373-390, 1991.

- VITKOVA, M.; KRAL, J.; TRAUT, W.; ZRZAVY, J. MAREC, F. The evolutionary origin of insect telomeric repeats, (TTAGG)_n. **Chromossome Res**, v. 13, p. 145-156, 2005.
- XU, W. L.; WANG, X. L.; WANG, H.; LI, X. B. Molecular characterization and expression analysis of nine cotton GhEF1A genes encoding translation elongation factor 1A. **Gene**, v. 389, p. 27-35, 2007.
- YANG, F.; DEMMA, M.; WARREN, V.; DHARMAWARDHANE, S.; CONDEELIS, J. Identification of an actin-binding protein from *Dictyostelium* as elongation factor 1A. **Nature**, v. 347, p. 494-496, 1990.
- YANG, W.; BURKHART, W.; CAVALLIUS, J.; MERRICK, W. C.; BOSS, W. F. Purification and characterization of a phosphatidylinositol 4-kinase activator in carrot cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 268, p. 392-398, 1993.
- YE, J.; PÉREZ-GONZÁLEZ, C. E.; EICKBUSH, D. G.; EICKBUSH, T. H. Competition between R1 and R2 transposable elements in the 28S rRNA genes of insects. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 110, p. 299-306, 2005.
- WINDER, J. A.; SANDS, D. P. A.; KASSULKE, R. C. The life history, host specificity and potential of *Alagoasa parana* Samuelson (Coleoptera: Chrysomelidae) for biological control of *Lantana camara* in Australia. **Bulletin of Entomological Research**, v. 78, p. 511-518, 1988.
- WILLIAMS, H. E.; DUCKETT, C. N. The trimorphic flea-beetle, *Alagoasa extrema*, not suitable for biocontrol of *Lantana camara* in Africa. **Biocontrol**, v. 50, p. 657-683, 2005.
- WILSON, E. O. The encyclopedia of life. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 18, p. 77-80, 2003.
- WOLSKI, M. A. V. Inferências evolutivas para duas espécies do gênero *Omophoita* (Coleoptera, Chrysomelidae): diferenciação cariotípica e molecular. 2014, 92f. Dissertação de Mestrado (Biologia Evolutiva) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2014.
- WRIGHT, S. Evolution in Mendelian Populations. **Genetics**, v. 16, p. 97-159, 1931.
- WRIGHT, S. **Evolution and the genetic populations**. Chicago: The University of Chicago Press, 1987.
- ZAKIAN, V. A. Telomeres: beginning to understand the end. **Science**, v. 270, p. 1601-1607, 1995.
- ZEHNDER, G. W.; SANDALL, L.; TISLER, A. M.; POWERS, T. O. Mitochondrial DNA diversity among 17 geographic populations of *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v.85, p. 234-240, 1992.
- ZHANG, Y. J.; KAMNERT, I.; LÓPEZ, C. C.; COHN, M.; EDSTRÖM, J. E. A Family of complex tandem repeats in the telomeres of *Chironomus pallidivittatus*. **Mol Cell Biol**, v. 14, p. 8028-8036, 1994.

ANEXO A – Protocolos moleculares e citogenéticos

EXTRAÇÃO DE DNA SEGUNDO MURRAY E THOMPSON (1980), COM MODIFICAÇÕES.

Tampão de extração sem CTAB:

- 5 mL de NaCl 5M;
- 5 mL de EDTA 0,5M;
- 5 mL de TRIS-HCl 1M pH 8.0.
- Armazenar o tampão em temperatura ambiente.

1. Em um tubo de 2,0 mL colocar o material (cabeça, pronoto e fêmur), macerar com nitrogênio líquido, e adicionar 180 µL de tampão de extração sem CTAB, 120 µL de CTAB 5%, 15 µL de proteinase K (10 mg/mL) e 5 µL de DTT (1M) ou 5 µL de β-mercaptoetanol;
2. Colocar a 55°C no banho maria, por 14 horas (overnight) ou até que o tecido esteja totalmente digerido;
3. Adicionar 10 µL de RNase (10 mg/mL);
4. Colocar a 37°C, em banho maria, por 2 horas;
5. Adicionar 600 µL de clorofórmio;
6. Inverter os tubos suavemente por 5 minutos;
7. Centrifugar a 8.000 rpm por 5 minutos a 4°C;
8. Retirar a fase sobrenadante e transferir para um novo tubo;
9. Adicionar 600 µL de etanol 100% gelado ao material transferido e deixar a -20°C por 2 horas ou overnight;
10. Centrifugar a 14.000 rpm por 15 minutos a 4°C;
11. Descartar o sobrenadante;
12. Adicionar 500 µL de etanol 70% gelado;
13. Centrifugar por 3 minutos a 10.000 rpm a 4°C;
14. Descartar o sobrenadante;
15. Adicionar 200 µL de etanol 100% gelado;
16. Centrifugar por 3 minutos a 10.000 rpm a 4°C;
17. Descartar o sobrenadante;
18. Deixar secar na estufa a 37°C;
19. Ressuspender em 40 µL de água milli-Q ou TE.

METODOLOGIA PARA ESTUDO DE CROMOSSOMOS OBTIDOS A PARTIR DE GÔNADAS, DESCRITO POR ALMEIDA, ZACARO E 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 lâmina de vidro e secar em placa de metal à temperatura média de 35 a 40°C.

COLORAÇÃO CONVENCIONAL SEGUNDO GIEMSA

Para análise das preparações citogenéticas as lâminas foram coradas, à temperatura ambiente, durante 12 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, acrescentados nessa ordem. As lâminas foram colocadas numa cubeta juntamente a solução de maneira que toda a parte da lâmina com material emersa na solução. As lâminas foram então lavadas em água destilada, para remoção do excesso de Giemsa e secas ao ar.

HIBRIDAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH) (PINKEL; STRAUME; GRAY, 1986)

Preparação das lâminas e hibridação

1. Lavar as lâminas em tampão PBS 1X durante 5 minutos em temperatura ambiente;
2. Desidratar as lâminas em série alcoólica 70, 85 e 100%, 5 minutos cada;
3. Incubar as lâminas em 100 µL de RNase (0,4% RNase/2XSSC) a 37°C por 1 hora em câmara úmida com água milli-Q;
4. Lavar 3 vezes por 5 minutos em 2XSSC;
5. Lavar durante 5 minutos em PBS 1X;
6. Incubar as lâminas por 10 minutos em solução de pepsina 0,005% (em 10 mM HCl) a 37°C;
7. Lavar em PBS 1X durante 5 minutos a temperatura ambiente;

8. Fixar em paraformaldeído 4% durante 10 minutos à temperatura ambiente;
9. Lavar em PBS 1X por 5 minutos;
10. Desidratar as lâminas em série alcoólicas (70, 85, 100%) por 5 minutos cada;
11. Simultaneamente à desidratação em série alcoólica, desnaturar a solução de hibridação a 100°C, por um período de 10 minutos, e passa-la imediatamente ao gelo;
12. Desnaturar o DNA cromossômico com formamida 70% em 2XSSC a 70°C por 4 minutos;
13. Desidratar o material em série alcoólica 70, 85, 100% durante 5 minutos cada;
14. Preparar a câmara úmida a 37°C;
15. Montar cada lâmina com 40 µL 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 minutos cada;
17. Lavar durante 5 minutos em solução de Tween 0,5%/4XSSC.

Deteccção e amplificação do sinal

18. Incubar as lâminas em tampão 5% NFDm/4XSSC por 15 minutos;
19. Lavar 2 vezes com Tween 0,5%/4XSSC, durante 5 minutos cada;
20. Incubar as lâminas com 100 µL do mix de anticorpos durante 1 hora em câmara úmida e escura, a 37°C;
21. Lavar 3 vezes em solução de Tween 0,5%/4XSSC, durante 5 minutos;
22. Desidratar em série alcoólica 70, 85 e 100%, durante 5 minutos cada.

Montagem da lâmina

23. Misturar 200 µL de antifading mais 1 µL de DAPI-4'-6 diamidino-2-phenilindole (50 µg/mL);
24. Colocar 50 µL da solução e cobrir com lamínula. Guardar no escuro.