

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

LEONARDO GUSSO GOLL

ANÁLISE CITOGENÉTICA EM *Lagria villosa* (COLEOPTERA, TENEBRIONIDAE):
ÊNFASE NA EVOLUÇÃO CROMOSSÔMICA

Ponta Grossa
2012

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

LEONARDO GUSSO GOLL

ANÁLISE CITOGENÉTICA EM *Lagria villosa* (COLEOPTERA, TENEBRIONIDAE):
ENFASE NA EVOLUÇÃO CROMOSSÔMICA

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

Orientadora: Profa. Dra. MARA CRISTINA DE ALMEIDA
Co-orientadora: Profa. Dra. VIVIANE NOGAROTO

Ponta Grossa
2012

Ficha catalográfica Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG.

G626a Goll, Leonardo Gusso
Análise citogenética em *Lagria villosa* (Coleoptera: Tenebrionidae) : ênfase na evolução cromossômica / Leonardo Gusso Goll. Ponta Grossa, 2012.
99 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – área de concentração Biologia Evolutiva). Universidade Estadual de Ponta Grossa e Universidade Estadual do Centro - Oeste.

Orientadora: Profª. Drª Mara Cristina de Almeida

Co-orientadora : Profª Drª Viviane Nogaroto

1. Heterocromatina. 2. DNAr. 3. Região organizadora de nucléolo.
4. Sistemas de determinação sexual. Famílias multigênicas. I. Almeida, Mara Cristina de. II. Nogaroto, Viviane. III. T.

CDD: 575



Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva

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



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº. 11/2012

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 **LEONARDO GUSSO GOLL**.

Aos vinte e nove do mês de fevereiro de dois mil e doze, no Auditório do Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa sob a presidência da Dr^a Mara Cristina de Almeida Matiello, em sessão pública, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação do (a) aluno (a) **LEONARDO GUSSO GOLL**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-área de concentração Biologia Evolutiva, visando o título de Mestre, constituída pelos: Dr^a Mara Cristina de Almeida Matiello (Orientadora), Dr^a Ana Paula Zampieri Silva de Pietri e Dr. Roberto Ferreira Antoni. 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: "**Análise Citogenética em Lagria villosa (Coleoptera: Tenebrionidae) Ênfase na Evolução Cromossômica**". 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 trinta dias; 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) neste prazo 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, 29 de fevereiro de dois mil e doze.

Prof^a Dr^a Mara Cristina de Almeida Matiello

Prof^a Dr^a Ana Paula Zampieri Silva de Pietri

Prof. Dr. Roberto Ferreira Antoni

Dedico este trabalho aos meus pais
Lourival e Angela, ao meu grande
amor Thatyla e a toda minha família.

“Ser feliz é encontrar força no perdão, esperança nas batalhas, segurança no palco do medo, amor nos desencontros.

Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e se tornar um autor da própria história. É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar um oásis no recôndito da sua alma. É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.

Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos. É saber falar de si mesmo. É ter coragem para ouvir um "não". É ter segurança para receber uma crítica, mesmo que injusta. Ser feliz é deixar viver a criança livre, alegre e simples, que mora dentro de cada um de nós.

Ser feliz não é ter uma vida perfeita, mas usar as lágrimas para irrigar a tolerância. Usar as perdas para refinar a paciência. Usar as falhas para lapidar o prazer. Usar os obstáculos para abrir as janelas da inteligência.

Pedras no caminho? Guardo todas... Um dia vou construir um castelo!”

(Fernando Pessoa)

"A mente que se abre a uma nova ideia, jamais voltará ao seu tamanho original "
(Albert Einstein)

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, sendo grato por tudo, por todas as pessoas que o Senhor colocou em minha vida, por ser o meu refúgio e sempre me mostrar o caminho da bondade e da paz.

Agradeço imensamente aos meus Pais, aos quais agradeço tudo o que sou como pessoa e como profissional. Essa dissertação é dedicada a vocês, como uma forma de mostrar meu amor. Sempre estiveram comigo na minha jornada me aconselhando e disponibilizando todo o apoio necessário, obrigado pai e mãe pela boa educação, pela força constante e por seu amor incondicional. Igualmente aos meus irmãos Leandro, Alessandra e Amanda que sempre torceram por mim, e aos meus sobrinhos Gabriel, Helena, Renata e Julia que me deram tanta alegria nesse período. Também a minha querida avó Mira, quem tanto amei e sinto falta. Agradeço por todas as lições recebidas, por me ensinar a sempre praticar a bondade e seguir com bom humor todos os dias.

Ao amor da minha vida, minha linda noiva Thatyla, tenho tudo a agradecer a você pela realização dessa dissertação. O seu amor me deu força, me manteve sempre alegre e firme, e sempre me fez sonhar em nosso futuro juntos como pesquisadores, me impulsionando cada vez mais. Obrigado pelo seu apoio em todos os momentos, por ouvir todos os meus medos e receios, e principalmente por sempre acreditar em mim. Obrigado por me amar tanto, “amo você além do infinito”.

Gostaria de agradecer, de forma especial, à minha orientadora Mara Cristina de Almeida, a quem considero com muito carinho como uma mãe. Minha mãe científica que admiro muito, que desde a primeira iniciação sempre confiou em mim, me apoiou, e me ensinou lições que vou guardar para sempre. Agradeço muito pela dedicação em minha pesquisa, pela atenção, pelos conhecimentos compartilhados, confiança, sugestões, críticas, puxões de orelha, mas principalmente pelo constante incentivo, amizade, e pela preocupação no meu crescimento profissional. Obrigado por tudo professora.

Agradeço também de forma especial, minha co-orientadora, professora Viviane que compartilhou muitos conhecimentos de Biologia molecular, essenciais nesse trabalho, e por sempre estar disposta a me ajudar em toda pesquisa.

Igualmente agradeço ao professor Rodrigo, que sempre esteve disposto a ajudar em nossas coletas de insetos, além de sempre contribuir em nossos trabalhos. Obrigado por sua amizade e por sempre me ajudar em todos os momentos.

Ao professor Roberto, agradeço por todo conhecimento compartilhado, sempre envolvido e interessado no meu trabalho e na minha formação. Agradeço pelo professor ter me ofertado estágio no primeiro ano do curso de Biologia, e desde então me aconselhando e incentivando, se tornando um grande amigo que admiro muito.

Ao professor Marcelo pelos momentos de descontração, brincadeiras e pela ajuda na realização da minha pesquisa, compartilhando novas ideias e conhecimentos que foram essenciais em todo meu trabalho. Obrigado pelas sugestões, críticas e pela amizade desde meu início no Laboratório.

Ao Miguel, meu amigão de tantos anos, agradeço pelo apoio técnico em minha pesquisa em todas as horas que precisei, por todas as brincadeiras, piadas e momentos de descontração, mas principalmente pelas palavras de fé e os vários momentos de reflexão.

Agradeço de coração a todos meus colegas de mestrado e de Laboratório, por todos os momentos de descontração, amizade, compressão e paciência no dia a dia de trabalho. Sempre serei grato a todos pelas trocas de conhecimento, sugestões, críticas, pelas conversas loucas, pelos churras, pelas coletas. Muito obrigado a todos.

À Priscila e minha mana Fernanda, agradeço a vocês pelo apoio em tantos momentos e pelos conselhos. Obrigado de coração pelo ombro amigo, sempre disposto, tão importante para mim.

Agradeço ao Cléber, um grande amigo que sempre me deu força, e me aconselhou em tantos momentos durante esses 2 anos. Obrigado por tudo, valeu Cléber.

À Zoli, por ajudar a resolver tantas coisas na secretaria do mestrado, e por ser sempre tão prestativa.

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

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

Por fim gostaria de agradecer a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a conclusão dessa pesquisa.

Resumo

Os Coleoptera apresentam grande variação quanto aos sistemas de determinação sexual, sendo o mecanismo cromossômico do tipo Xy_p considerado ancestral para esta ordem. A presença de uma substância argirofílica associada ao bivalente sexual é descrita como sendo a responsável pela manutenção e associação desses cromossomos, porém não existe um consenso na literatura sobre a natureza desse material. Além disso, poucas espécies têm sido analisadas utilizando a Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH) para a localização das famílias multigênicas, as quais são úteis marcadores e podem elucidar a variação do cariótipo e a organização genômica de diversas espécies. Até o presente momento, não existe análise citogenética em espécies do gênero *Lagria*. Desta forma, o objetivo desse trabalho foi caracterizar citogeneticamente *Lagria villosa*, através da citogenética convencional e molecular, investigando o mecanismo de associação dos cromossomos sexuais Xy_p , através da análise da natureza do material argirofílico presente no lúmen do bivalente sexual. Adicionalmente, realizou-se o mapeamento cromossômico das famílias multigênicas DNAr 5S, DNAr 18S e genes de histona H3 em *L. villosa*, mostrando pela primeira vez uma associação intercalar dos genes DNAs 5S e 18S em Coleoptera. Além disso, a análise de células testiculares evidenciou $2n=18=16+Xy_p$ e fórmula meiótica $2n=8II+Xy_p$. No presente trabalho são discutidos os possíveis mecanismos envolvidos na associação dos cromossomos sexuais Xy_p , onde é considerado que a associação de proteínas do complexo sinaptonêmico pode participar da correta segregação desses cromossomos. Além disso, a técnica de fiber-FISH com dupla sonda (18S e 5S) foi utilizada para uma melhor resolução do mapeamento dessas regiões genômicas em *L. villosa*, mostrando que os dois DNAs estão intimamente intercalados com quantidades variáveis de ambas as classes de DNA. Associação entre as duas famílias DNAr tem sido relatado para outras espécies e diferentes hipóteses são levantadas sobre a organização funcional dessas famílias.

Palavras-chave: Heterocromatina, DNAr, região organizadora de nucléolo, sistema de determinação sexual, famílias multigênicas, histonas.

Abstract

The Coleoptera have a large variation of the sex determination system, being the Xy_p mechanism considered ancestor for this order. The presence of a argyrophilous material associated with the sex bivalent is described as responsible for maintenance and association of these chromosomes. However, there is no consensus in the literature about the nature of this argyrophilous material. In addition, few species have been studied using fluorescence *in situ* hybridization (FISH) to the location of the multigene families, which are useful and can elucidate the variation in the karyotype and genomic organization of several species. To date, there is no cytogenetic analysis in the genus *Lagria*. Thus, the aim of this study was to characterize cytogenetically *Lagria villosa*, through conventional and molecular cytogenetics, for investigating the mechanism of association of sex chromosomes Xy_p , through analysis of nature of argyrophilous material in the lumen of sex bivalent. Additionally, the chromosomal mapping of 5S rDNA multigene families, 18S rDNA and histone H3 genes in *L. villosa*, was carried out, and showing for the first time in Coleoptera, that genes 18S and 5S DNAs are interspersed. In addition, the analysis of testicular cells showed $2n=18=16+Xy_p$ and formula meiotic $2n=8II+Xy_p$. In this work we discuss the possible mechanisms evolving in the association of Xy_p sex chromosomes, where it is considered that the combination of synaptonemal complex proteins may participate in the correct segregation of chromosomes. In addition, the fiber-FISH technique with dual probes (18S and 5S) was used for better resolution mapping of these regions in *L. villosa*, showing that the two DNAs are closely interspersed with varying amounts of both classes of DNA. Association between the two rDNA families have been reported for other species and different hypotheses are raised about the functional organization in these families.

Key words: Heterochromatin, rDNA, Nucleolar Organizer Region, Sex Determination System, histone.

Lista de figuras

Introdução

- Figura 1** – Relações filogenéticas entre as subordens de Coleoptera. **A.** Proposta por Klausnitzer (1975) e corroborada por Beutel & Haas (2000). **B.** Proposta por Baher, (1979). **C.** Proposta por Kukalová-Peck & Lawrence 199. Redesenhado por Goll (2011) **14**

Material e Métodos

- Figura 1** – Indivíduo adulto fêmea de *Lagria villosa*. Escala=1,2cm. **28**

Capítulo I

- Figura 1** – Cariótipos mitóticos oogoniais de *L. villosa* em coloração convencional. **A.** Cariótipo de fêmea com $2n=16+XX$. **B.** Cariótipo de macho com $2n=16+Xy_p$. Escala = 10 μm **47**

- Figura 2** – Células meióticas de macho de *L. villosa*, em coloração convencional. **A.** Paquíteno evidenciando o bivalente Xy_p e as regiões centroméricas (cabeça de setas). **B.** e **C.** Diacinese e metáfase I, respectivamente, mostrando a configuração em paraquedas dos cromossomos sexuais. **D.** e **E.** Metáfases II com $n=8+X_p$ e $n=8+y_p$, respectivamente. **F.** Anáfase II, mostrando a segregação regular das cromátides irmãs. Setas=quiasma. Escala = 10 μm **48**

- Figura 3** – Célula meiótica de *L. villosa* submetida à técnica sequencial Giemsa/Banda C (**A/D**, **B/E** e **C/F**). **A.** e **D.** Metáfase I com $2n=8^{II}+Xy_p$. **B.** e **E.** Metáfase II com $n=8+X_p$ e **C.** e **F.** com $n=8+y_p$. Setas = regiões heterocromáticas. Escala = 10 μm **49**

- Figura 4** – Células meióticas de *L. villosa* submetidas aos fluorocromos DAPI/CMA₃, mostrando que as regiões pericentroméricas são ricas em repetições GC (setas). Escala = 10. **50**

- Figura 5** – **A.** e **B.** Célula metafásica I em coloração convencional (**A**) e impregnada pelo íon prata (**B**) evidenciando material fortemente impregnado sobre o Xy_p . **C.** e **D.** Células submetidas à técnica de FISH com sondas de DNAr 18S mostrando os cístrons ribossomal associados a um bivalente autossômico (**C**) e ao par 4, em metáfase espermatogonial (**D**). Escala = 10 μm **51**

Figura 6 – Microestendidos celulares de *L. villosa* impregnados pelo íon prata, observado ao microscópio eletrônico, mostrando um aumento gradual na eletrondensidade associada aos cromossomos sexuais. Setas = regiões cinetocóricas. Detalhes = Cromossomos sexuais. Escala = 10 µm. 52

Figura 7 – Células metafásicas I, submetidas a diferentes incubações, com RNase e/ou Pepsina, no pré-tratamento da hibridação *in situ* fluorescente (**A**, **B**, **C** e **D**) e, posteriormente, as mesmas células foram impregnadas pelo íon prata (**E**, **F**, **G** e **H**). **A**. FISH sem pepsina e com RNase. **B**. FISH com pepsina e sem RNase. **C**. FISH sem pepsina e sem RNase. **D**. FISH com pepsina e com RNase. **E**. e **G**. Bivalente sexual impregnado pelo íon prata. **F**. e **H**. Bivalente sexual não impregnado pelo íon prata, sendo possível observar a configuração em paraquedas. Setas = Cístrons ribossômicos. Escala = 10 µm..... 53

Capítulo II

Figura 1 – **A**. Sequência consenso parcial do gene histona H3 de *Lagria villosa* com 315 pares de bases. **B**. Alinhamento parcial do gene de histona H3 de *L. villosa* com sequências de histona H3 de outras espécies depositadas no GenBank. Acessos: (AJ566027.1, EU048316.1, EU048314.1 e EU048315.1)..... 67

Figura 2 –**A**. Sequência consenso parcial do gene de DNAr 5S de *Lagria villosa* com 94 pares de bases. **B**. Alinhamento parcial do gene DNAr 5S de *L. villosa* com sequências de DNAr 5S de outras espécies depositadas no GenBank. Acessos: (GQ443312.1 e X83208.1) 68

Figura 3 – Células metafásicas de *Lagria villosa* submetidas a FISH com sondas de DNAr 18S (verde), DNAr 5S (Vermelho) e histona H3 (Verde). **A**. e **B**. Metafase I submetida a dupla-FISH com sondas histona H3 e DNAr 5S. **C**. Sobreposição das imagens vistas em **A**. e **B**. mostrando os cístrons, histona H3 e DNAr 5S, estão em bivalentes autossômicos diferentes **D**. e **E**. Metafase I submetida a dupla-FISH com sondas DNAr 18S e DNAr 5S. **F**. Sobreposição das imagens vistas em **D**. e **E**. mostrando que os cístrons ribossomais são sintênicos **G**. e **H**. Metafase mitótica submetida a dupla-FISH com sondas DNAr 18S e DNAr 5S e. **I**. Sobreposição das imagens vistas em **G**. e **H**. confirmando a colocalização dos cístrons ribossomais.. 69

Figura 4 – Dupla-FISH com sondas ribossomais de DNAr 5S (Vermelho) e DNAr 18S (Verde) em *L. villosa*. **A**. núcleo interfásico com sítios sobrepostos **D**. cromossomo metafásico mostrando sítios colocalizados no braço curto do par submetacêntrico 4. **B**, **C**, **E**, e **F** Dupla-fiber-FISH cromática em células de gônada pré-fixadas, mostrando em **E** e **F** que os sítios sintênicos e colocalizados são interespaçados. 70

Lista de Tabelas

Capítulo I

Tabela 1 – Ensaios de modificação no pré-tratamento da FISH realizados para testar a natureza do material argirofílico fortemente associado ao bivalente sexual	46
--	-----------

Capítulo II

Tabela 1 – Matriz de identidade da sequência DNAr 5S de <i>L. villosa</i> com outras espécies de Coleoptera	66
--	-----------

Tabela 2 – Matriz de identidade da sequência histona H3 de <i>L. villosa</i> com outras espécies de Tenebrionidae.	66
--	-----------

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Características citogenéticas da família Tenebrionidae	17
1.2	Heterocromatina e DNA repetitivo em Coleoptera	19
1.3	Famílias Multigênicas em Coleoptera	21
1.4	Complexo Sinaptonêmico e o Estudo dos Cromossomos Sexuais	24
2	JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS	27
3	MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1	Material biológico	28
3.2	Metodologias	28
3.2.1	Citogenética Convencional	28
3.2.2	Citogenética Molecular	29
3.2.3	Microscopia Eletrônica de Transmissão	31
4	RESULTADOS	33
Capítulo I - Análise citogenética de <i>Lagria villosa</i> (Coleoptera, Tenebrionidae): ênfase no mecanismo de associação dos cromossomos sexuais Xy _p 34		
Capítulo II - Mapeamento físico das famílias multigênicas em <i>Lagria villosa</i> (Tenebrionidae) fornece a primeira evidência de genes ribossomais intercalados em Coleoptera.....54		
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	71
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
7	ANEXOS	90

1 INTRODUÇÃO

Os besouros pertencem à ordem Coleoptera, a mais rica e variada da classe Insecta, com aproximadamente 357.899 espécies e 25.368 gêneros descritos (COSTA, 2003). Os coleópteros correspondem a cerca de 40% do total de insetos e 30% dos animais, constituindo a maior ordem do Reino Animal (LAWRENCE e BRITTON, 1994).

Os coleópteros ocupam a grande parte dos ambientes, embora a grande maioria seja terrestre, existem espécies que vivem na água doce e salgada (GILLOT, 2005). Os besouros são holometábolos, pois apresentam metamorfose completa (ovo → larva → pupa jovem → pupa adiantada → imago), são caracterizados por um rígido exoesqueleto e um protórax articulando livremente com o restante do tórax. A maioria dos besouros apresentam quatro asas, sendo o primeiro par modificado em uma estrutura espessa e dura denominada élitro. Esta estrutura de asas é considerada singular para os coleópteros (TRIPLEHORN e JOHNSON, 2005).

A diversidade e abundância dos Coleoptera estão relacionadas com características que permitiram a adaptação de indivíduos adultos a ambientes escondidos ou espaços apertados, inacessíveis para outros grupos. A presença dos élitros é uma dessas características, pois protegem o organismo contra dissecação, choques mecânicos e protege as asas membranosas, mantendo ainda a capacidade de voar (GRIMALDI e ENGEL, 2006). Segundo Lawrence e Briton (1994) o aparelho bucal mastigador dos coleópteros permite também que se alimentem de quase todos os recursos alimentares disponíveis, podendo ser carnívoros, detritívoros, herbívoros, fungívoros e algívoros. Esta característica aliada ao fato de muitos indivíduos serem especialistas e apresentarem um pequeno tamanho pode ter contribuído para a grande diversidade de coleópteros (GRIMALDI e ENGEL, 2006).

A ordem Coleoptera é dividida nas subordens Archostemata, Adephaga, Myxophaga e Polyphaga (GILLOT, 2005). É consenso entre a maioria dos autores que as quatro subordens compõe um grupo monofilético, porém as relações filogenéticas ainda são controversas surgindo diferentes hipóteses (VANIN e IDE, 2002), como

mostra a figura abaixo:

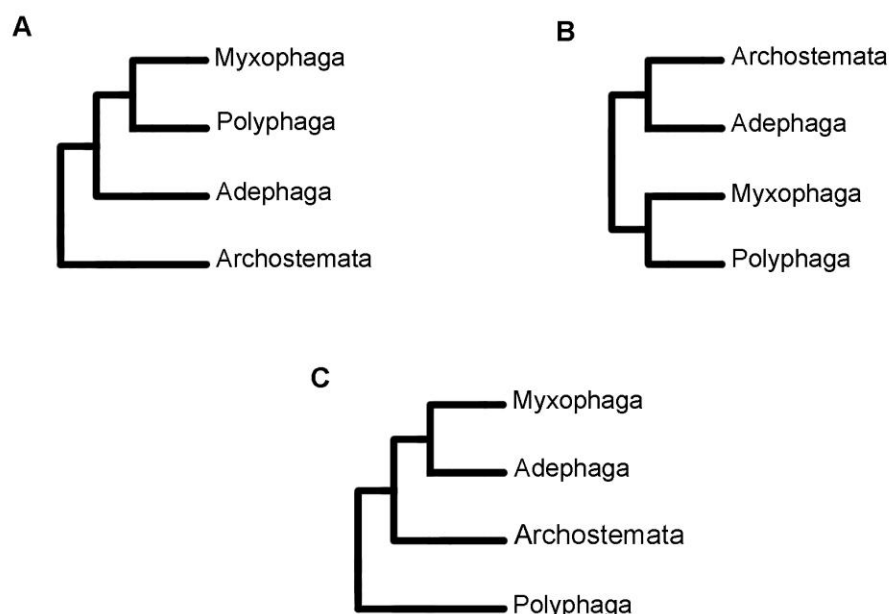


Figura 1 – Relações filogenéticas entre as subordens de Coleoptera. **A.** Proposta por Klausnitzer (1975) e corroborada por Beutel e Haas (2000). **B.** Proposta por Baher, (1979). **C.** Proposta por Kukalová-Peck e Lawrence 1993. Redesenhado por Goll (2011).

As subordens Archostemata e Myxophaga incluem juntas, aproximadamente 100 espécies. A subordem Adephaga representa cerca de 10% da ordem (aproximadamente, 35.780 espécies). A subordem Polyphaga inclui a grande diversidade da ordem com 90% das espécies (aproximadamente 322.019 espécies) (GRIMALDI e ENGEL, 2006).

Estudos taxonômicos realizados na subordem Polyphaga relatam a ocorrência de 18.000 espécies pertencentes a família Tenebrionidae, destas 4.624 espécies ocorrem na região Neotropical e estão agrupadas em 478 gêneros (COSTA, 2003). Tenebrionidae é uma das maiores famílias de besouros, com representantes com uma grande diversidade de formas, porém geralmente de cores escuras (GILLOT, 2005).

Em 1974, Watt revisou a classificação da família Tenebrionidae, incluindo nesta a família Lagriidae, juntamente com as famílias Alleculidae e Nilionidae, rebaixando-as ao status de subfamília. Posteriormente, Bouchard *et al.* (2005) descreveu a família Tenebrionidae como possuindo 10 subfamílias, 96 tribos e 61 subtribos. A subfamília Lagriinae Latreille, 1825 (1820) é composta por 9 tribos, destas Lagriini Latreille, 1825 (1820) é composta pelas subtribos Lagriina e Statirina. O gênero *Lagria* Fabricius,

1775 pertence a subtribo Lagriina, o qual possui mais de 150 espécies presentes na Europa, África, Ásia, Nova Guiné e Austrália (MERKL, 2006). *Lagria villosa* é uma espécie exótica, originária da África, foi introduzida via porto de Vitória – ES sendo encontrada principalmente em áreas agrícolas (MOURA, 2007). As larvas alimentam-se de madeira em decomposição e no folhiço, e os adultos alimentam-se de flores e folhas e são igualmente encontrados sob cascas de árvores e no folhiço (MARINONI *et al.*, 2001). É considerada uma praga agrícola, uma vez que os indivíduos adultos em altas populações provocam diminuição da produção de alimentos como feijão, fava e soja (GALLO *et al.*, 2002).

Apesar do grande número de espécies na ordem Coleoptera, os estudos citogenéticos são escassos, pouco mais de 3.000 espécies foram estudadas sob o ponto de vista citogenético, representando cerca de 1% de todas as espécies (PETITPIERRE, 1996). A grande maioria das espécies estudadas pertence às subordens Adephaga e Polyphaga (SMITH e VIRKKI, 1978).

O cariótipo em besouros é formado principalmente por cromossomos metacêntricos de tamanho médio ou pequeno, apresentando em metáfases mitóticas tamanhos variáveis entre 0,5 e 6,5 μm (PETITPIERRE, 1996). Os besouros apresentam um amplo intervalo de número cromossômico, de $2n = 4$ em *Chalcolepidius zonatus* (FERREIRA *et al.*, 1984) a $2n=64$ em *Ditomus capito* (SERRANO, 1981).

Smith (1950) originalmente postulou a fórmula cromossômica primitiva para os Coleoptera como sendo $2n=20=9^{\text{II}}+Xy_p$ nos machos, adotando Xy para designar o sistema cromossômico de determinação sexual heterogamético e o “p” para representar o tipo de associação meiótica do par sexual, o qual foi originalmente comparado a um paraquedas por Stevens em 1906 (apud SMITH e VIRKKI, 1978).

A evolução cariotípica dos Coleoptera ocorre principalmente por fissões centroméricas seguidas de inversões pericentroméricas, para explicar o aumento do número de cromossomos e a prevalência de cromossomos metacêntricos em relação a fórmula basal proposta como ancestral $2n=20=9^{\text{II}}+Xy_p$ (SMITH e VIRKKI, 1978; VIRKKI, 1984).

Os mecanismos cromossômicos de determinação do sexo em Coleoptera são variáveis, podendo ser classificados em aquiasmáticos, como é o caso dos sistemas Xy_p , Xny_p/nXy_p , Xy_c , $X0$ e X_1+X_2 , ou quiasmáticos, como o neoXY, Xy , Xy_r , X_1X_2Y e XY_1Y_2 (SMITH e VIRKKI, 1978).

O mecanismo cromossômico de determinação sexual mais frequente encontrado na subordem Polyphaga é do tipo Xy_p . O cromossomo X deste sistema é um metacêntrico grande, porém não maior que os autossomos e o cromossomo y é um metacêntrico pequeno. O espaço entre o cromossomo X e o y, formado pela associação meiótica em metáfase I, é muitas vezes preenchido por uma substância semelhante ao material nucleolar (SMITH e VIRKKI, 1978).

O sistema de determinação sexual Xy_p é considerado ancestral para os Coleoptera ou pelo menos para a subordem Polyphaga (SMITH, 1950; SMITH e VIRKKI, 1978). Na família Tenebrionidae esse sistema está presente em 65 % das espécies estudadas citogeneticamente (JUAN e PETITPIERRE, 1990).

O segundo sistema cromossômico de determinação sexual mais encontrado em Coleoptera é o XO ocorrendo em 14% das espécies, o qual também tem sido observado em Tenebrionidae (SMITH e VIRKKI, 1978; YADAV, KONDAL, e YADAV, 1985). A origem deste sistema ocorre por perda do cromossomo y_p . Esta derivação pode ocorrer devido à heterocromatinização ou degeneração desse cromossomo (JOHN & SHAW, 1967; WHITE, 1973; DUTRILLAUX e DUTRILLAUX, 2009), ou ainda por fusão do y_p com outros cromossomos (GÓMEZ-ZURITA *et al.* 2004; DUTRILLAUX e DUTRILLAUX, 2009).

Ainda é pouco claro o mecanismo envolvido no reconhecimento, associação e posterior segregação cromossômica do X_p e y_p durante a meiose dos Coleoptera. Na literatura vários mecanismos foram descritos:

- i) A presença de nucléolo no bivalente sexual, a qual seria responsável pela configuração em para-quédas (STEVENS 1905,1906 apud SMITH e VIRKKI, 1978);
- ii) Associação biquiasmática entre os segmentos terminais dos homólogos X e y_p (SMITH, 1951);
- iii) Associação não específica, envolvendo segmentos terminais heterocromáticos do X e do y_p e manutenção através de associação nucleolar (JOHN e LEWIS, 1960);
- iv) Associação de segmentos cromossômicos terminais do X e do y_p , contendo heterocromatina constitutiva (POSTIGLIONI e BRUM-ZORRILLA, 1988; POSTIGLIONI, STOLL e BRUM-ZORRILLA, 1991);
- v) Associação não-específica de regiões de heterocromatina constitutiva (DRETS, CORBELL e FOLLE, 1983);

- vi) Presença de uma substância proteinácea argirofílica entre os sexuais, semelhante a encontrada nos Complexos Sinaptonêmicos (VIRKKI *et al.*, 1991).

1.1 Características citogenéticas da família Tenebrionidae

As análises citogenéticas têm demonstrado que os tenebrionídeos são muito conservados quanto ao número diplóide, morfologia cromossômica e tipo de sistema de determinação sexual. Cerca de 200 espécies foram estudadas ao nível citogenético até o presente momento e a maioria apresenta o número diplóide em torno de $2n=20$ e sistema de determinação sexual Xy_p . Adicionalmente, no cariótipo de Tenebrionidae existe uma prevalência de cromossomos metacêntricos, podendo ser diferenciados por seus respectivos tamanhos em preparações convencionais (SMITH E VIRKKI, 1978, JUAN e PETITPIERRE 1988, 1990; JUAN, PETITPIERRE e OROMÍ, 1989; PETITPIERRE, 1996; PALMER e PETITPIERRE 1997).

Juan e Petitpierre (1988) realizaram um estudo citogenético em 20 espécies de tenebrionídeos do Mediterrâneo, encontrando em 10 espécies o número cromossômico $2n=20$ e fórmula meiótica $9+Xy_p$. Entretanto uma espécie, *Erodus orientalis*, apresentou fórmula meiótica $9+Xy$, indicando um estágio diferente dos cromossomos sexuais. As demais espécies analisadas apresentaram uma redução do número cromossômico, mostrando $2n=18$ cromossomos. Posteriormente, Juan, Petitpierre e Oromí (1989) estudando 25 espécies de Tenebrionidae encontraram uma variação do número cromossômico de $2n=18$ (4 espécies) a $2n=22$ (3 espécies); no entanto, a maioria (17 espécies) apresentou $2n=20$ e fórmula meiótica $9+Xy_p$. Com relação ao sistema sexual três espécies apresentaram o sistema $neoXy$ e 22 o sistema Xy_p . Na revisão realizada por Smith e Virkki (1978) o sistema $neoXy$ ocorre em 7% das espécies de Coleoptera. Sendo possivelmente um sistema derivado dos sistemas Xy_p e $X0$, os quais servem como estágios iniciais da diferenciação.

Juan e Petitpierre (1990), analisando 20 espécies de tenebrionídeos, também encontraram uma variação do número diplóide, de $2n=16$ a $2n=26$ cromossomos, porém essa variação foi observada somente em cinco espécies. Yadav, Pillai e Yadav (1994), através da análise citogenética de seis espécies Tenebrionidae, descreveram

o número diplóide $2n=20$ e sistema Xy_p para as espécies analisadas. Neste estudo, além da morfologia metacêntrica encontrada na maioria dos Tenebrionideos, foi observada a predominância de cromossomos submetacêntricos para as espécies analisadas. No estudo realizado por Almeida, Zacaro e Cella (2000), em células mitóticas e meióticas de *Palembus demestoides* (Tenebrionidae), foi descrito o número diplóide $2n=20$ e fórmula meiótica $9+Xy_p$. O cariótipo dessa espécie apresenta a morfologia cromossômica submetacêntrica e subtelocêntrica, diferindo também do padrão metacêntrico encontrado na maior parte das espécies.

Entre as variações encontradas em tenebrionides a espécie *Holobrachium dentipes* exibiu um número diplóide $2n=22$ e um raro sistema de determinação sexual Xy_r (BISOI e PATNAIK, 1988). Neste sistema, durante a meiose, os cromossomos sexuais X e y_r associam-se pelas regiões distais de um dos braços, originando um bivalente em forma de haste (WHITE, 1973). O sistema Xy_r também foi observado em algumas espécies das famílias Chrysomelidae, Coccinelidae, Meloidae e Scarabidae (SMITH e VIRKKI, 1978; MARTINS, 1994).

O número diplóide e fórmula meiótica ($2n=20$, $9+Xy_p$) são característicos para 63% dos tenebrionideos estudados (SMITH, 1952; SMITH e VIRKKI, 1978; YADAV e PILLAI, 1974a, b, 1976; YADAV, PILLAI e KARAMJEET 1980; JUAN e PETITPIERRE, 1991). Entretanto, algumas tribos derivam do cariótipo considerado ancestral para Coleoptera, como Akidini $2n=16$ ($7+neoXy$) e Pimeliini $2n=18$ ($8+Xy_p$) que apresentaram redução do número cromossômico. Por outro lado, a tribo Blaptini possui espécies com número de cromossomos elevados ($2n>30$) e cromossomos sexuais múltiplos, como a espécie *Blaps gibba* que apresenta número diplóide $2n=38$ e fórmula meiótica ($15+7XY$) (JUAN e PETITPIERRE, 1990; VITTURI *et al.*, 1996; PONS, 2004). A compilação do número diplóide e fórmula cariotípica de 30 espécies do gênero *Pimelia* revelou uma conservação do número diplóide $2n=18$ ($8+Xy_p$) exceto em quatro espécies analisadas, as quais mostraram número diplóide $2n=20$ ($9+Xy_p$) em *Pimelia cribra*, *Pimelia elevata* e *Pimelia interjecta*, e $2n=18$ ($8+neoXY$) em *Pimelia sparsa sparsa* (PONS, 2004).

Apesar de a família Tenebrionidae apresentar 10 subfamílias (BOUCHARD *et al.* 2005), aproximadamente 96% das espécies analisadas citogeneticamente pertencem a somente duas subfamílias: Pimeliinae e Tenebrioninae (HOLECOVÁ, ROZEK e LACHOWSKA, 2008). Análises citogenéticas em espécies da subfamília Lagriinae, a qual *Lagria villosa* pertence são escassos, sendo somente descrita a

espécie *Laenia reitteri* pertencente à tribo Laenini (HOLECOVÁ, ROZEK e LACHOWSKA, 2008). Nesta espécie foi encontrado o número diplóide $2n=18$ e sistema de determinação sexual do tipo Xy_p , sendo também evidenciada a presença de 1-3 cromossomos Bs. A morfologia cromossômica encontrada foi subtelocêntrica e acrocêntrica, os autores consideram que processos de fusão seguidos por inversão seriam responsáveis pela redução do número diplóide e pela morfologia acrocêntrica da maioria dos autossomos.

A tendência evolutiva para as famílias da subordem dos Polyphaga foi manter o número cromossômico próximo ao original, sendo eventos como fusões cêntricas menos frequentes, uma vez que existem poucas espécies com baixos números de cromossomos (SMITH e VIRKKI, 1978). Por outro lado, os processos evolutivos responsáveis pelas modificações cariotípicas em Tenebrionidae até agora propostos são: fusão cêntrica entre autossomos ou entre autossomos e sexuais; aumento ou diminuição do tamanho do cromossomo X e aumento ou eliminação do cromossomo y e também a ocorrência de poliploidias (SMITH, 1952; YADAV e PILLAI, 1976; SMITH e VIRKKI, 1978; JUAN e PETITPIERRE, 1990; PALMER e PETITPIERRE, 1997).

1.2 Heterocromatina e DNA repetitivo em Coleoptera

A heterocromatina constitutiva nos Coleoptera localiza-se preferencialmente na região centromérica, podendo ocorrer também nas regiões intersticiais e telomérica de todos os cromossomos autossômicos. Nos cromossomos sexuais tem ocorrência variável, podendo estar presente somente na região pericentromérica ou ao longo de todo o comprimento cromossômico (ALMEIDA, ZACARO e CELLA, 2000; ROZEK *et al.*, 2004).

Rozek *et al.* (2004) estudaram as regiões de heterocromatina, com a técnica de obtenção de bandas C, em cromossomos de 32 espécies de Coleoptera pertencentes a diferentes famílias: entre elas Elateridae, Cantharidae, Oedemeridae, Cerambycidae, Anthicidae, Chrysomelidae, Attelabidae e Curculionidae. Os resultados obtidos demonstram que a maioria dos besouros possui uma pequena quantidade heterocromatina, e que segmentos C-positivos são fracamente observados em estágios paquitênicos, e fracamente ou imperceptíveis em metáfases mitóticas ou

meióticas.

Os estudos com a técnica de obtenção de Bandas C realizados em Tenebrionidae têm revelado uma grande quantidade de heterocromatina em todos os cromossomos e a predominância nas regiões pericentroméricas, tendo algumas espécies apresentado os cromossomos X_p ou y_p totalmente heterocromáticos (JUAN e PETITPIERRE 1989; JUAN, GOSÁLVEZ e PETITPIERRE, 1990, 1993; PONS, PETITPIERRE E JUAN, 1993; PLOHL *et al.*, 1993; URGAKOVIC *et al.*, 1994; ALMEIDA, ZACARO e CELLA 2000; PONS, 2004)

Juan e Petitpierre (1989) analisaram o padrão de banda C em sete espécies de Tenebrionidae, onde todas apresentaram grandes blocos de heterocromatina na região pericentromérica de todos os cromossomos. Nas variações encontradas, a espécie *Misolampus goudoti* apresentou bandas teloméricas e *Gonocephalum patrulele* apresentou o cromossomo X quase todo heterocromático. No estudo realizado por Almeida, Zacaro e Cella (2000), com a técnica de obtenção de bandas C, a espécie *Palembus dermestoides* apresentou heterocromatina presente na região pericentromérica de todos os cromossomos, com exceção do cromossomo y_p o qual não mostrou a presença de heterocromatina. Bandas adicionais foram também observadas na região teloméricas do braço curto de alguns cromossomos. Essa situação também foi descrita para as espécies *Misolampus goudoti* e *Tribolium obscuro* (JUAN, PONS e PETITPIERRE, 1993; URGAKOVIC *et al.*, 1994), as quais também apresentaram bandas C teloméricas, além de bandas em todas as regiões pericentroméricas.

A heterocromatina constitutiva possui a maior parte dos segmentos constituídos por DNAs repetitivos, os quais aparecem em grande quantidade em genomas eucarióticos. Os DNAs repetitivos são classificados em DNAs repetitivos *in tandem* ou repetitivos dispersos. Repetições *in tandem* consistem de sequências arranjadas de forma consecutiva no cromossomo, formando blocos de DNA com centenas ou milhares de repetições. Os elementos repetitivos dispersos são sequências que podem estar repetidas milhares de vezes no genoma, porém arranjados de forma dispersa. Os DNAs repetitivos podem ser definidos como sequências codificantes ou não-codificantes. Os DNAs repetitivos codificantes são representados pelas famílias multigênicas como, por exemplo, as famílias de DNA ribossomais e dos genes das histonas. Por sua vez os DNAs não codificantes são representados pelas classes de DNA satélite, minissatélite, microsatélite e elementos transponíveis (SUMMER,

2003).

Análises moleculares do DNA heterocromático dos representantes da família Tenebrionidae têm revelado DNAs satélite como componente prevalente, constituindo aproximadamente 50% do DNA genômico (UGARKOVIĆ e PLOHL, 2002). Muitos estudos baseados em digestão *in situ* de cromossomos com enzimas de restrição, e posteriormente utilizando hibridação *in situ*, têm demonstrado que estes blocos heterocromáticos são compostos em grande parte por sequências de DNA satélites (JUAN *et al.* 1991; JUAN, PONS e PETITPIERRE, 1993; PONS *et al.* 2004). Essas sequências satélites são compostas de uma única sequência de DNA repetitivo que são agrupados *in tandem* (PONS, PETITPIERRE E JUAN, 2002). Estes DNAs satélite nos tenebrionídeos são quase sempre espécie-específicos (PETITPIERRE, 1996). Segundo Pons *et al.* (2004) o alto conteúdo de heterocromatina e, portanto, de DNA satélites, poderia ser um fator que poderia explicar a baixa variação do número diplóide em Tenebrionidae.

Cabral-de-Mello *et al.*, (2011c) analisando a heterocromatina e os sítios de DNAr 18S em diferentes espécies subfamília Scarabaeinae (Scarabaeidae) mostrou que a extensa variabilidade de sítios de DNAr 45S observado esta relacionado com a heterocromatina dispersa. Desta forma, os autores sugerem que a associação heterocromatina/sítio ribossomal está submetida a semelhantes forças evolutivas de regulação e propagação na subfamília Scarabaeinae.

1.3 Famílias Multigênicas em Coleoptera

As famílias multigênicas pertencem a classe de DNAs repetitivos codificantes como, por exemplo, as famílias de DNA ribossomais e dos genes das histonas (SUMMER, 2003). Esses genes descendem de um gene ancestral comum, portanto, apresentando similares sequências e funções (NEI e ROONEY, 2005). Os DNAs ribossomais (DNAr) são organizados *in tandem*, estando divididos nas unidades transcricionais maior (45S) e menor (5S). A unidade maior transcreve para os rRNAs 18S, 5,8S e 28S, sendo separados entre si pelos espaçadores internos transcritos (ITS). Cada cístron da unidade maior é separado por espaçadores intergênicos (IGS). A unidade menor transcreve para o rRNA 5S, cada unidade por sua vez, é separada das demais pelo espaçador não transcrito (NTS) (LONG, 1980). A família multigênica

que codifica as proteínas histônicas em geral pode ser organizada em um cluster formado por todas as sequências histônicas *in tandem* (H1, H2a, H2B, H3 e H4), espaçadas por sequências de DNA não-codificante, como encontrado no genoma de *Drosophila melanogaster*. Esses mesmos genes podem ser distribuídos como genes individuais (*Gallus domesticus*) ou grupo de genes (Humanos e Roedores). Entretanto, os dois tipos de organização podem ser encontrados no mesmo organismo como, por exemplo, em *Xenopus laevis* (LIFTON *et al.* 1977; ENGEL e DODGSONT, 1981; RUBERTI *et al.*, 1982; CABRAL-DE-MELLO e MARTINS, 2010).

O modo de organização dos clusters de DNA ribossomal e de genes de histona tornam-se úteis marcadores cromossômicos e podem ajudar a elucidar a variação do cariótipo e a organização genômica em diversos grupos de eucariotos.

A região organizadora do nucléolo (RON) representa a região cromossômica que possui as unidades transcricionais dos genes de rRNAs 18S, 5,8S e 28S. A detecção das RONS é de particular interesse em estudos de citogenética em Coleoptera considerando que pode fornecer dados sobre organização molecular dos cromossomos, possíveis inferências sobre diferenciação cariotípica de espécies relacionadas e esclarecer o modo de associação de cromossomos sexuais assinápticos, tais como o tipo Xy_p (PETITPIERRE, 1996; ALMEIDA *et al.*, 2010).

A Hibridação *in situ* Fluorescente tem sido um eficiente e rotineiro método para localização de genes ribossomais em cromossomos de várias espécies. Porém poucas espécies de Coleoptera tem sido analisadas utilizando esse procedimento.

A revisão realizada por Schneider *et al.* (2007) mostra que a localização da RON foi descrita em apenas 190 espécies das subordens Adephaga e Polyphaga, e estas se encontram em pares autossômicos e/ou nos cromossomos sexuais. Neste trabalho, Schneider *et al.* (2007) mostram que a RON em autossomos é mais frequente, sendo encontrada em 82% das espécies de Adephaga e 63% de Polyphaga. Segundo esses autores, a presença das RONS em pares autossômicos poderia ser representativa de uma condição ancestral e/ou uma situação mais estável e as localizações em autossomos e cromossomos sexuais ou somente sexuais poderia ser uma condição derivada.

A região 45S foi mapeada para algumas espécies da subordem Adephaga (Carabidae e Cicindelidae), mostrando uma prevalência dos cístrons ribossomais em um par autossômico. Porém algumas espécies mostraram variações, apresentando um maior número de pares portadores dos cístrons ribossomais, ou ainda, algumas

espécies mostram os cístrons associados aos cromossomos sexuais. A subordem Polyphaga apresenta mais famílias estudadas (Scarabaeidae, Chrysomelidae, Tenebrionidae, Coccinelidae e Geotrupidae), nas quais foi evidenciado que os genes ribossomais estão presentes em cromossomos autossômicos, em cromossomos sexuais ou ainda em ambos (GALIÁN et al., 1995; VITTURI et al., 1999; PROENÇA et al., 2004; SCHNEIDER et al. 2007; ALMEIDA et al. 2010; CABRAL-DE-MELLO, MOURA e MARTINS, 2011a).

Na família Tenebrionidae o padrão de distribuição da RON foi estudado em apenas 6 espécies. A análise com impregnações pelo íon prata mostrou que as RONS de *Blaps gigas* e *Blaps gibba* estão associadas aos sexuais múltiplos (VITTURI et al., 1996). A utilização da técnica de impregnação pelo íon prata e da hibridação *in situ* com sonda de DNAr, mostrou que *Misolampus goudoti* apresenta as RONS no bivalente sexual X_p e em um bivalente autossômico. No entanto, a FISH evidenciou um par autossômico portador da RON (JUAN, PONS e PETITPIERRE, 1993). Neste mesmo trabalho, *Tenebrio molitor* apresentou o bivalente sexual X_p marcado pela impregnação pelo íon prata, porém com a hibridação *in situ* fluorescente os genes ribossomais foram detectados em dois pares autossômicos e no bivalente sexual. No entanto, a impregnação por Ag-RON mostrou que somente as RONS presentes nos cromossomos sexuais de *T. molitor* estavam ativas, pelo menos durante a meiose. Para a subfamília Lagriinae a RON foi descrita somente para a espécie *Laena reitteri* (HOLECOVÁ, ROZEK e LACHOWSKA, 2008), a qual apresentou um bivalente autossômico impregnada pelo íon prata em células metafásicas I.

A RON foi descrita em menos de 1% das espécies de Coleoptera (SCHNEIDER et al., 2007), as quais pertencem a somente 12 das 166 famílias descritas. Desta forma, até o presente momento, não existe um padrão de distribuição das RONS bem estabelecido para as diferentes famílias de Coleoptera, estando estas regiões localizadas em pares autossômicos e/ou nos cromossomos sexuais (ALMEIDA, ZACARO e CELLA, 2000; SCHNEIDER et al., 2007).

O conhecimento sobre a localização cromossômica dos genes de DNAr 5S e genes da histonas são ainda mais escassos. A localização dos cístrons ribossomais 5S e dos genes da Histona-H3 foi descrita para 16 espécies do gênero *Dichotomius* (Scarabaeidae). Adicionalmente, esses genes estão colocalizados no par cromossômico 2 (CABRAL-DE-MELLO, MOURA e MARTINS, 2010; CABRAL-DE-MELLO, MOURA e MARTINS, 2011a).

Os diferentes tipos de associação entre famílias gênicas nos Coleoptera apontam um campo promissor de estudos na citogenética evolutiva. Porém os dados sobre a associação colocalizada entre diferentes famílias gênicas são escassos e o mapeamento físico dessas regiões pela FISH, com duas ou mais sondas, em cromossomos metafásicos precisa de técnicas que tenham uma maior resolução dos cístrons sobrepostos, de modo a obter um padrão mais claro sobre a organização estrutural dessas classes de DNAs. Para tal, a técnica de Hibridação *in situ* Fluorescente em fibras estendidas, denominada Fiber-FISH pode ser utilizada, pois é muito informativa para analisar a base física de efeitos de posição, regulação epigenética e rearranjos cromossômicos (BARROS, *et al.* 2011).

A Fiber-FISH vem contribuindo de maneira significativa para o mapeamento físico, com sondas de regiões cromossômicas de interesse, de diversos grupos (RAPP, 1998). A FISH em cromossomos metafásicos tem uma resolução de mapeamento de 1-3Mb, enquanto que a FISH em fibras estendidas pode apresentar uma resolução 1-400 Kb (RAAP *et al.*, 1996). Desta forma a fiber-FISH fornece uma melhor resolução para se investigar a associação entre diferentes classes de DNA, como, por exemplo, a colocalização entre diferentes DNAs repetitivos.

1.4 O Complexo Sinaptonêmico e o Estudo dos Cromossomos Sexuais

O complexo sinaptonêmico (CS) é uma rede de proteínas formando uma estrutura tripartida, que conecta os cromossomos homólogos na maioria dos sistemas meióticos. As proteínas que se associam às cromátides irmãs em cada cromossomo formam os elementos axiais (EA), os quais, posteriormente, formarão os elementos laterais (EL). Os EL são conectados às proteínas que se agrupam no interior da estrutura e formam o elemento central (EC) através dos filamentos transversais. Os ELs desempenham um papel importante na condensação cromossômica, no emparelhamento, na montagem do filamento transversal e impedindo que quebras de dupla fita (DSBs) em vias de recombinação envolvam cromátides irmãs. As proteínas dos filamentos transversais do CS também desempenham um papel inicial, comprometendo um subconjunto de DSBs em uma via de recombinação, o que resulta na produção de reciprocidade do crossing-over meiótico (JOHN, 1990; PAGE & HAWLEY, 2004).

Até o momento existem poucos trabalhos descrevendo o complexo sinaptonêmico em Coleoptera (WEITH, 1985; POSTIGLIONI, STOLL e BRUM-ZORRILLA, 1991; SCHMEKEL *et al.*, 1993; ALMEIDA, ZACARO e CELLA, 2000). A utilização de técnicas como microscopia eletrônica de transmissão em espermátócitos pode fornecer resultados que permitem inferir sobre sistemas cromossômicos até então não completamente elucidados.

Almeida, Zacaro e Cella (2000) realizaram a análise do CS, através da microscopia eletrônica, em duas espécies de Coleoptera, os quais apresentam fórmula meiótica ($9+Xy_p$). Os autores descreveram a presença de material nucleolar associado ao 7° bivalente autossômico em *Palembus dermestoides* (Tenebrionidae) e ao 3° e 7° bivalente autossômico em *Epicauta atomaria* (Meloidae). Adicionalmente, em ambas as espécies, através da citogenética utilizando a impregnação por prata, observou-se o material nucleolar associado ao bivalente sexual Xy_p . Posteriormente, Zacaro, Almeida e Cella (2003) analisando células paquitênicas das mesmas espécies, observaram 9 filamentos duplos e dois filamentos simples eletrondensos, interpretados como os elementos axiais dos cromossomos Xp e yp os quais estavam mais eletrondensos em relação aos bivalentes autossômicos.

Postiglioni, Stoll e Brum-Zorrilla (1991) analisando o complexo Sinaptonêmico de *Chelymorpha variabilis*, a qual apresenta a fórmula meiótica $9+Xy_p$, evidenciaram que os eixos dos cromossomos sexuais X e y não estavam emparelhados durante toda a fase de paquíteno. Além disso, não observaram nenhuma substância nucleolar associada aos cromossomos sexuais, diferindo do típico modelo Xy_p encontrado para Coleoptera. Para explicar o aparecimento e a manutenção da configuração em paraquedas nas fases mais tardias da prófase I, os autores sugeriram uma associação terminal não homóloga entre estes cromossomos, envolvendo blocos de heterocromatina constitutiva.

Recentemente a técnica de imunolocalização tem sido utilizada para estudos com proteínas do complexo e de recombinação, com o objetivo de entender tanto o complexo estruturalmente como o comportamento de cromossomos assinápticos. de la Fuente *et al.* (2007) estudaram a estrutura e o comportamento meiótico dos cromossomos sexuais de *Meriones unguiculatus* (Roedor), os quais são assinápticos. Estes autores, através da imunofluorescência com anticorpos específicos para proteínas do complexo sinaptonêmico (SYCP1 e SYCP3) bem como para proteínas envolvidas na recombinação meiótica (RAD51, MLH1 e c-H2AX) observaram que a

SYCP3 forma uma rede intrincada entre os cromossomos sexuais. Neste trabalho, os autores descreveram que tanto a associação dos cromossomos sexuais quanto estrutura formada por esta proteína entre esses cromossomos permaneceram até o final da Metáfase I. Desta forma, os autores sugerem que a modificação dos componentes de SC pode ser o principal mecanismo para explicar a associação e segregação correta dos cromossomos assinápticos.

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Os Coleoptera oferecem uma gama de perspectivas na citogenética evolutiva e na citotaxonomia, especialmente em famílias como Tenebrionidae que incluem variações no cariótipo e várias espécies que são pragas agrícolas ou de produtos armazenados. Além disso, os Coleoptera possuem uma grande variabilidade de sistema de determinação do sexo, sistemas de emparelhamento, sinapse, recombinação e segregação cromossômica. Adicionalmente, os estudos nestas espécies onde não ocorre sinapse e recombinação são relevantes para descobrir os mecanismos alternativos que possam promover corretamente o reconhecimento, associação e posterior segregação cromossômica durante a meiose.

Este trabalho teve como objetivo caracterizar citogeneticamente *Lagria villosa* e investigar o mecanismo de associação dos cromossomos sexuais Xy_p . Para realizar essa análise pretendeu-se:

1. Estudar os cromossomos mitóticos e meióticos visando caracterizar o número diplóide e haplóide dos cromossomos;
2. Determinar os cromossomos portadores das RONS e determinar o padrão de distribuição e composição das regiões heterocromáticas;
3. Realizar o mapeamento físico dos cístrons do gene da histona H3 e DNAr 5S.
4. Investigar a disposição molecular da associação entre os genes DNAr 45S e 5S.
5. Estudar o comportamento meiótico dos cromossomos sexuais com enfoque no emparelhamento e segregação destes.
6. Propor os possíveis mecanismos envolvidos na associação dos cromossomos sexuais de *L. villosa*, assim como, detectar a natureza do material argirofílico presente no lúmen do bivalente sexual do tipo Xy_p .

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material biológico

Para o estudo foram utilizados indivíduos adultos de *Lagria villosa* (Figura 1), pertencentes à ordem Coleoptera, família Tenebrionidae. Os exemplares foram capturados na Fazenda Escola da Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG, na localidade “Capão da Onça”, Ponta Grossa, Paraná (S25°05'44” e W050°030'62”).

As preparações citológicas para o estudo dos cromossomos foram obtidas a partir das gônadas de indivíduos adultos. As partes da cabeça e do pronoto foram estocadas em álcool etílico para a extração de DNA.

Para identificação da espécie, alguns indivíduos adultos foram enviados ao especialista Carlos Campaner do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo – USP.



Figura – 1 . Indivíduo adulto fêmea de *Lagria villosa*. Escala=1,2cm

3.2 Metodologias

3.2.1 Citogenética Convencional

Os animais foram dissecados em solução fisiológica para insetos, e

processados segundo a metodologia descrita por Almeida, Zacaro e Cella (2000) (Anexo 7.1.1) Para obtenção de cromossomos mitóticos os órgãos (testículo e ovário) foram processados de acordo com a metodologia de Webb *et al.* (1978) (Anexo - 7.1.2).

Para determinar o padrão de heterocromatina constitutiva foi utilizada a técnica de obtenção de bandas C descrita por Sumner (1972) (Anexo - 7.1.4.2). Adicionalmente para determinar a composição das regiões heterocromáticas foram utilizados os fluorocromos Cromomicina A3 (CMA₃), específico para as sequências de bases GC altamente repetidas, e o 4-6-Diamino-fenil-indol (DAPI), preferencial para sequências de bases AT altamente repetidas, segundo a metodologia descrita por Schweizer (1980) (Anexo - 7.1.5).

A técnica de impregnação pelo íon prata, segundo Howell e Black (1980) (Anexo - 7.1.4.1) foi utilizada para a determinação das regiões organizadoras de nucléolo.

A montagem dos cariótipos foi feita de acordo com o tamanho e a morfologia dos cromossomos, que foram dispostos em ordem decrescente e aos pares. Estes foram numerados e os cromossomos tentativamente emparelhados para facilitar a apresentação, obedecendo ao critério da razão de braços segundo a proposta de Levan, Fredga e Sandberg (1964).

3.2.2 Citogenética Molecular

- Obtenção, clonagem e sequenciamento das sondas histona-H3 e DNAr 5S

A extração de DNA genômico de *L. villosa* foi realizada segundo a técnica de (MURRAY e THOMPSON, 1980) (Anexo - 7.2.1), com adição de um passo inicial que consiste em macerar a cabeça e o pronoto em nitrogênio líquido.

A amplificação da sequência de Histona-H3 foi realizada empregando-se os primers H3_F: 5'-CGYAARTCNACYGGWGGWGGNAA-3' e H3_R: 5'-TDGCRCA YARRTTNGTRTCY-3', construídos a partir de sequências de DNA Histona-H3 de outras espécies de Tenebrionídeos depositas no GenBank (Acesso: EU048314.1, EU048315.1, AJ566027.1, AJ566024.1, EU048316.1, EU048312.1 e

AJ566030.1).

A amplificação da sequência de DNAr 5S de *Lagria villosa* foi realizada utilizando-se os *primers* 5S_F: 5'-AACGNCCATANCACGCTGNA-3' e 5S_R: 5'-AGCGGTCNCNCATCNANGTAC-3', construídos a partir de sequências de DNAr 5S de outras espécies de coleópteros depositadas no GenBank (X83208.1, U58709.1, U58720.1, GQ443312.1).

Para cada sequência a reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada em um volume total de 50 µL, nas seguintes concentrações: 20 ng de DNA genômico, Tampão de reação 1X (200 mM Tris-HCl, pH 8,4, 500 mM KCl), 1 U Taq DNA polymerase (Invitrogen), 2,0 mM de cada primer, 1,5 mM MgCl₂, 0,08 mM de cada dNTP (Invitrogen®).

A amplificação das sequências de histona H3 e DNAr 5S foi realizada em um termociclador nas seguintes programações:

Programa Histona-H3	Programa DNAr 5S
5 min – 94°C	5 min – 94°C
1 min – 95°C	1 min – 95°C
45seg – 56°C	1 min – 58°C
1 min – 72°C	1 min – 72°C
5 min – 72°C	5 min – 72°C
} 35 ciclos } 35 ciclos	

Os produtos de PCR foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 1% corados com gelred Biotium® (1:1000).

Os fragmentos obtidos foram purificados pelo kit de purificação (High Pure PCR Cleanup Micro Kit) - Roche®, clonados no vetor pTZ57R/T (Fermentas®) e transformados na bactéria *Escherichia coli* DH5α (Gibco GBRL®). O isolamento e a purificação do DNA plasmidial baseou-se no método de lise alcalina (Anexo - 7.2.2). Os plasmídeos recombinantes foram sequenciados usando um sequenciador automático (ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer) armado com capilares de 50 cm e polímero POP6 (Applied Biosystems). As sequências obtidas foram analisadas e editadas com o auxílio do programa BioEdit (HALL, 1999). Posteriormente, as sequências foram submetidas ao nucleotídeo-BLAST (ZHANG *et al.*, 2000). As sequências nucleotídicas foram então comparadas com aquelas depositadas no

banco de sequências GenBank e alinhadas utilizando o programa ClustalW v. 1.6 (THOMPSON *et al.*, 1994).

- Hibridação *in situ* fluorescente (FISH)

O Procedimento de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) baseou-se na técnica descrita por Pinkel, Straume e Gray (1986) (Anexo - 7.2.3).

As sondas de DNAr 18S foram obtidas por PCR marcado, empregando-se a uracila biotilada (16 dUTP–biotin - Roche®), a partir do gene parcial 18S de *Omophoita octoguttata* (Alticinae) clonado (ALMEIDA *et al.*, 2010). Para o reconhecimento e amplificação do sinal foram utilizados os anticorpos avidina-FITC, anti-avidina biotilada (Sigma®).

As sondas de DNA Histona-H3 foram obtidas por PCR marcado, empregando-se o composto biotina-14-dUTP (Roche®), utilizando-se gene Histona-H3 de *Lagria villosa* clonado no vetor pTZ57R/T (Fermentas®). Para o reconhecimento do sinal foi utilizado a streptoavidin conjugada (GE®)

As sondas DNAr 5S foram obtidas por PCR marcado, empregando-se a digoxigenina-11-dUTP (Roche®), utilizando-se gene de 5S de *Lagria villosa* clonado no vetor pTZ57R/T (Fermentas). Para o reconhecimento do sinal foi utilizado antidigoxigenina-rodamina (Roche®)

Os cromossomos foram contados e identificados quando possível. As melhores células mitóticas e meióticas foram fotografadas em microscópio de epifluorescência Olympus BX41 com objetiva 100X de imersão, com filtros específicos e captura de imagem digital em tempo real com câmera CCD DP-71 (Olympus) e software DP controller.

3.2.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para obtenção de microestendidos celulares foi utilizada a técnica descrita por LOIDL e JONES (1986) (Anexo - 7.3.1), com algumas modificações. Após o animal ser dissecado o testículo foi macerado e transferido para uma lâmina revestida com uma película plástica, tratado com lipsol (0,5%) por 20 segundos. Em seguida foi adicionada uma solução contendo paraformaldeído 4% e sacarose 0,1M por 24 horas.

Para análise do complexo sinaptonêmico as preparações foram impregnadas pelo íon prata, segundo a técnica de Howell e Black (1980) (Anexo - 7.1.4.1), e fotografadas em Microscópio Eletrônico de transmissão JEOL 5800 SEM à 60 kV.

4 RESULTADOS

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

Capítulo I

Análise citogenética de *Lagria villosa* (Coleoptera, Tenebrionidae): ênfase no mecanismo de associação dos cromossomos sexuais Xy_p

Capítulo II

Mapeamento físico das famílias multigênicas em *Lagria villosa* (Tenebrionidae): primeira evidência de genes ribossomais intercalados em Coleoptera

Capítulo I

Análise citogenética de *Lagria villosa* (Coleoptera, Tenebrionidae): ênfase no mecanismo de associação dos cromossomos sexuais Xy_p

Resumo

O mecanismo cromossômico de determinação sexual do tipo Xy_p é o sistema mais frequente encontrado em Coleoptera e considerado ancestral para a Ordem. Além disso, na maioria das espécies a presença de um material argirofílico associado ao bivalente sexual é descrito como sendo o responsável pela manutenção e associação desses cromossomos. Não existe, até o momento, um consenso na literatura sobre o material argirofílico presente no lúmen do bivalente sexual. Assim, o objetivo desse trabalho foi investigar o mecanismo de associação dos cromossomos sexuais Xy_p para *Lagria villosa* e detectar a natureza do material argirofílico presente no lúmen do Xy_p . Adicionalmente, caracterizar citogeneticamente, pela primeira vez, *L. villosa* em relação ao número diplóide, morfologia cromossômica, tipo de sistema de determinação sexual, localização e composição das regiões heterocromáticas e determinar os cromossomos portadores das regiões organizadoras de nucléolo (RONS). A análise de células testiculares e oogoniais evidenciou $2n=18=16+Xy_p$ para machos e $2n=18=16+XX$ em fêmeas. A fórmula meiótica observada foi $2n=8II+Xy_p$. O bandamento C mostrou blocos de heterocromatina pericentromérica em todos os cromossomos, exceto no cromossomo yp . Nestas regiões o uso dos fluorocromos DAPI/CMA₃ revelou a presença de heterocromatina contendo sequências de DNA ricas em G+C. O estudo de microestendidos profásicos em diferentes estágios, ao microscópio eletrônico de transmissão, mostrou aumento gradual na eletrondensidade dos elementos axiais dos cromossomos sexuais e a aproximação destes até sua associação com material fortemente eletrondenso. Os experimentos de pré-tratamento com Pepsina revelou que o material impregnado pela prata relacionado ao bivalente sexual é de natureza proteica.

Palavras chave: FISH – Hibridação *in situ* Fluorescente, CS – Complexo Sinaptonêmico, Meiose, Sistema de Determinação Sexual, Cariótipo, Sinapse.

Introdução

A ordem Coleoptera inclui aproximadamente 350.000 espécies descritas ao nível taxonômico (COSTA, 2003). Porém, aproximadamente 3.000 espécies foram estudadas sob o ponto de vista citogenético (PETITPIERRE, 1996), sendo a grande maioria pertencente às sub-ordens Adephaga e Polyphaga (SMITH e VIRKKI, 1978).

Estudos taxonômicos realizados na sub-ordem Polyphaga relatam a ocorrência de 18.000 espécies pertencentes a família Tenebrionidae (COSTA, 2003). Contudo, o número diplóide, morfologia cromossômica e tipo de sistema de determinação sexual são descritos para somente 200 espécies (SMITH e VIRKKI, 1978; JUAN e PETITPIERRE, 1991). Na região Neotropical 4.624 espécies de Tenebrionidae são agrupadas em 478 gêneros (COSTA, 2003). *Lagria* Fabricius, 1775 é o maior gênero da subtribo Lagriina, o qual inclui mais de 150 espécies distribuídas na Europa, Ásia, África, Nova Guiné e Austrália (MERKL, 2006). *Lagria villosa* é uma espécie exótica, originária da África, que foi introduzida via porto de Vitória – ES - Brasil (MOURA, 2007), sendo considerada hoje uma praga agrícola, uma vez que os indivíduos adultos em altas populações provocam diminuição da produção de alimentos como feijão, fava e soja (GALLO *et al.*, 2002).

O número diplóide dos tenebrionídeos varia de $2n=14$ nas espécies *Diaperis boleti* e *Scotobius miliaris* (JUAN e PETITPIERRE, 1991) a $2n=38$ em *Blaps gibba* (VITTURI *et al.*, 1996). O mecanismo cromossômico de determinação sexual mais frequente é do tipo Xy_p , ocorrendo em 63% das espécies de Tenebrionidae estudadas até o presente momento (JUAN e PETITPIERRE, 1991; PETITPIERRE, 1996), o qual tem sido considerado o possível sistema primitivo para Coleoptera (SMITH e VIRKKI, 1978). O segundo sistema mais frequente em Coleoptera é o XO, o qual também tem sido observado na família Tenebrionidae (SMITH e VIRKKI, 1978; YADAV, KONDAL, e YADAV, 1985). A origem deste sistema ocorre por perda do cromossomo y_p (JOHN e SHAW, 1967; WHITE, 1973; DUTRILLAUX e DUTRILLAUX, 2009), ou pela fusão do y_p com outros cromossomos (GÓMEZ-ZURITA, *et al.*, 2004; DUTRILLAUX e DUTRILLAUX, 2009).

Na literatura existem vários mecanismos descritos para explicar o modo de associação, manutenção e segregação dos cromossomos sexuais Xy_p durante a meiose: i) associação biquiasmática entre os segmentos terminais dos homólogos X e

y_p (SMITH, 1951); *ii*) associação não específica e manutenção através de associação nucleolar (JOHN e LEWIS, 1960); *iii*) associação não-específica de regiões de heterocromatina constitutiva (DRETS, CORBELL e FOLLE, 1983); e, *iv*) presença de uma substância proteinácea argirofílica entre os sexuais, semelhante a encontrada nos Complexos Sinaptonêmicos (VIRKKI *et al.*, 1991).

A ocorrência da heterocromatina em Coleoptera tem sido descrita nas regiões pericentroméricas e teloméricas para a maioria das espécies. Estudos em 11 espécies de Tenebrionidae, com a técnica de bandas C, mostraram a ocorrência de heterocromatina constitutiva na região pericentromérica de todos os autossomos, tendo algumas espécies apresentado os cromossomos X_p ou y_p totalmente heterocromáticos (JUAN e PETITPIERRE, 1989; JUAN, PONS e PETITPIERRE, 1993; PLOHL *et al.*, 1993; URGAKOVIC *et al.*, 1994; ALMEIDA, ZACARO e CELLA, 2000).

A localização da Região Organizadora de Nucléolo (RON) tem sido analisada em apenas 190 espécies de Coleoptera das subordens Adephaga e Polyphaga (SCHNEIDER *et al.*, 2007). Em Coleoptera a RON geralmente é encontrada em pares autossômicos e/ou nos cromossomos sexuais. Nas subordens mais estudadas, Adephaga e Polyphaga, a RON em autossomos foi descrita em 82% e 63%, respectivamente (para revisão ver Schneider *et al.*, 2007). Segundo esses autores, a presença das RONS exclusivamente em pares autossômicos poderia ser representativo de uma condição ancestral e/ou uma situação mais estável, e as localizações em autossomos e cromossomos sexuais ou somente sexuais poderia ser uma condição derivada.

A aplicação das técnicas de impregnação por íon prata e hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sonda utilizando genes ribossomais é de grande interesse tanto para determinar um padrão de distribuição das RONS entre grupos relacionados como também, para possivelmente elucidar as formas de associação entre cromossomos sexuais em alguns sistemas particulares de determinação sexual nos Coleoptera (GALÍAN *et al.*, 1995; PETITPIERRE, 1996; WOLF, 1996).

Neste trabalho, foi investigada a natureza de associação dos cromossomos sexuais em *Lagria villosa* através da análise do comportamento meiótico, incluindo o pareamento e segregação, como também a natureza do material argirofílico presente no lúmen do bivalente sexual Xy_p . Adicionalmente, foi descrito pela primeira vez o

cariótipo desta espécie incluindo a localização das regiões heterocromáticas pela técnica de bandamento C e fluorocromo (DAPI e CMA₃) como também a identificação dos cromossomos portadores da RON através da impregnação pelo íon prata e pela FISH com DNAr.

Material e Métodos

As preparações citológicas para o estudo dos cromossomos foram obtidas a partir de testículos e ovários de 110 indivíduos adultos (74 machos e 36 fêmeas) de *L. villosa* coletados na Fazenda Escola “Capão da Onça”, Ponta Grossa, Paraná (S25°05'44”W 050°030'62”). Os animais foram dissecados em solução fisiológica para insetos (7,5 g NaCl, 2,38 g Na₂HPO₄, 2,72 g KH₂PO₄ em 1L de água destilada), e as preparações foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Almeida, Zacaro e Cella (2000). Para preparação mitótica os órgãos foram processados de acordo com a metodologia de Webb *et al.* (1978), descrita para embriões.

Para determinar o padrão de heterocromatina constitutiva e sua composição foi utilizada a técnica de obtenção de bandas C descrita por Sumner (1972). Em adição, para determinar a composição das regiões heterocromáticas os fluorocromos Cromomicina A3 (CMA₃) e o 4-6-Diamino-fenil-indol (DAPI) foram utilizados segundo a metodologia descrita por Schweizer (1980).

A técnica de impregnação pelo íon prata, segundo Howell & Black (1980), foi utilizada para a determinação das RONS. Além disso, a Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH) foi realizada segundo o protocolo descrito por Pinkel, Straume e Gray (1986) e modificado por Almeida *et al.*, (2010). A FISH foi realizada usando uma sonda de DNAr 18S obtida por PCR marcado, empregando-se a adenina biotinilada (14 dATP–biotin - Invitrogen[®]), a partir do gene parcial 18S de *Omophoita octoguttata* (Alticinae) clonado (ALMEIDA *et al.*, 2010). Para o reconhecimento e amplificação do sinal foram utilizados os anticorpos avidina-FITC, anti-avidina biotinilada (Sigma[®]).

As células meióticas foram submetidas à diferentes incubações com RNase (0,4% RNase/2xSSC) e/ou Pepsina (0,005%pepsin/10mM HCl) durante o pré-tratamento da Hibridação *in situ* fluorescente e subsequente impregnação pelo ion prata para detectar a natureza do material argirofílico presente no lúmen do bivalente

sexual.

As melhores células mitóticas e meióticas foram fotografadas em microscópio de epifluorescência Olympus® BX 41 com objetiva 100X de imersão com câmera digital em tempo real CCD DP-71 (Olympus®), utilizando filtros específicos e o software DP controller.

A montagem dos cariótipos foi feita de acordo com o tamanho e a morfologia dos cromossomos, segundo a proposta de Levan, Fredga e Sandberg (1964).

A obtenção dos microestendidos celulares foi através da técnica descrita por Loidl e Jones (1986), com algumas modificações. Para análise do complexo sinaptonêmico as preparações foram impregnadas pelo íon prata, segundo a técnica de Howell e Black (1980), e fotografadas em Microscópio Eletrônico de transmissão JEOL 5800 SEM à 60 kV.

Resultados

A análise de células testiculares e oogoniais mostraram $2n=18=16+Xy_p$ para machos e $2n=18=16+XX$ em fêmeas. A morfologia cromossômica observada foi metacêntrica (par 5 e X), submetacêntrica (pares 1, 3, 4, 6, 7 e 8) e subtelocêntrica (par 2) (Figura 1). Devido ao tamanho pequeno do cromossomo y_p não foi possível a identificação de sua morfologia. O estudo de células paquítenicas mostrou 8 bivalentes autossômicos completamente emparelhados e o bivalente sexual na configuração em paraquedas, sendo observado o y_p heteropicnótico negativo. Além disso, em paquíteno observou-se pequenos blocos heteropicnóticos positivos em todos os bivalentes autossômicos (Figura 2A). As células diplotênicas e metafásicas I mostraram a fórmula meiótica $2n=8^{II}+Xy_p$ e a ocorrência de 1 ou 2 quiasmas por bivalente autossômico. Em adição, os cromossomos sexuais estão associados na configuração em paraquedas. Adicionalmente, o y_p mantém a heteropicnose negativa (Figuras 2B e 2C). As metafases II com $n=8+X_p$ e $n=8+y_p$ confirmam a morfologia cromossômica e a segregação meiótica regular dos cromossomos (Figuras 2E e 2F).

O estudo de células meióticas submetidas à técnica sequencial Giemsa/Banda C mostrou a presença de um bloco heterocromático nas regiões pericentroméricas de todos os bivalentes autossômicos, incluindo o cromossomo X_p . O cromossomo y_p não

apresentou marcações (Figuras 3A e 3D). Os resultados de bandas C, em células metafásicas II, mostraram um padrão de heterocromatina semelhante ao obtido em metáfase I (Figuras 3B, 3C, 3E e 3F).

As células metafásicas I e II, submetidas aos fluorocromos base-específicos (DAPI/CMA₃) mostraram o padrão DAPI negativo na região pericentromérica de todos os cromossomos, exceto o cromossomo sexual y_p (Figuras 4A, 4B e 4C). Adicionalmente foi possível observar uma forte marcação pelo fluorocromo CMA₃ nas regiões pericentroméricas de todos os cromossomos, exceto o cromossomo sexual y_p (Figuras 4D, 4E e 4F). Essas regiões CMA₃ positivas são coincidentes com as regiões DAPI negativa e com a heterocromatina obtida pelo bandamento C, desta forma, evidenciando, que essas regiões heterocromáticas são ricas em base GC.

A impregnação pelo íon prata em células metafásicas I mostrou a ocorrência de um material fortemente associado aos cromossomos sexuais (Figuras 5A e 5B). Entretanto, a análise de células metafásicas espermatozoniais submetidas à FISH com sonda de DNAr 18S mostrou que os genes ribossomais estão localizados no par autossômico 4 (Figura 5D).

A análise de microestendidos profásicos, através do microscópio eletrônico de transmissão, evidenciou 8 filamentos duplos, os quais foram interpretados como Complexos Sinaptonêmicos (CSs) dos bivalentes autossômicos e dois filamentos simples eletrondensos, interpretados como os elementos axiais dos cromossomos X_p e y_p (Figura 6). As células paquitênicas mostraram o material nucleolar associado à um bivalente autossômico. A maioria dos microestendidos celulares mostrou pontuações eletrondensas associadas ao CS na região distal, sendo interpretadas como regiões cinetocóricas. Nos estágios paquitênicos finais foi possível observar um aumento gradual na eletrondensidade dos elementos axiais dos cromossomos sexuais e a aproximação e associação com material fortemente eletrondenso (Figura 6).

As células metafásicas I submetidas a diferentes incubações no pré-tratamento com incubação de RNase e/ou pepsina (Tabela 1) antes da técnica de hibridação *in situ* fluorescente e subsequente impregnação pelo íon prata, apresentaram dois padrões. As metáfases que não foram tratadas com pepsina (Ensaio 1) antes da FISH mostrou um material fortemente associado com o bivalente sexual Xy_p (Figura 7A e 7E), independente da incubação com RNase (Ensaio 3), a qual não mostrou interferir

na associação desse material ao íon prata (Figuras 7C e 7G). No tratamento com pepsina 0,005% (Ensaio 2) o bivalente sexual apareceu mais saturados que os outros pares cromossômicos, mas o lúmen do bivalente sexual não foi impregnado pelo nitrato de prata, sendo possível identificar a configuração em paraquedas (Figura 7B e 7F). Adicionalmente, nas lâminas submetidas a FISH sem mudanças no pré-tratamento (Ensaio 4), as metáfases I mostraram um padrão de impregnação pela prata similar ao obtido no ensaio 2 (Figura 7D e 7H).

Discussão

Através da análise dos dados de número diplóide e morfologia cromossômica pode-se inferir a ocorrência de fusão autossômica seguida de inversão pericêntrica como possível derivação do cariótipo de *Lagria villosa*, considerando o número diploide $2n=20$ e a morfologia metacêntrica como ancestral para Coleoptera. Adicionalmente, inversões pericêntricas na maioria dos autossomos também estiveram presentes, uma vez que a maioria dos cromossomos de *L. villosa* é submetacêntrica. De acordo com Smith e Virkki (1978), a tendência evolutiva para coleópteros da subordem dos Polyphaga foi manter o número cromossômico próximo ao original, e que eventos como fusões cêntricas parecem ser menos frequentes, uma vez que existem poucas espécies com baixos números de cromossomos. Por outro lado, os processos evolutivos responsáveis pelas modificações cariotípicas em Tenebrionidae são: fusão cêntrica entre autossomos ou entre autossomos e sexuais; aumento ou diminuição do tamanho do X e aumento ou eliminação do Y e poliploidias (SMITH, 1952; SMITH e VIRKKI, 1978; JUAN e PETITPIERRE, 1990; PALMER e PETITPIERRE, 1997). Análises citogenéticas em espécies da subfamília Lagriinae são escassos, sendo somente descrita *Laenia reitteri* (HOLECOVÁ, ROZEK e LACHOWSKA, 2008). Nesta espécie, com $2n=16+Xy_p+1-3B$, os autores consideram que processos de fusão seguida de inversão seriam responsáveis pela redução do número diploide e pela morfologia acrocêntrica da maioria dos autossomos. Apesar do pequeno número de espécies estudadas, a redução de um par de cromossomos autossômicos e inversões pericentroméricas na maioria dos cromossomos do complemento poderiam representar uma tendência evolutiva para a subfamília Lagriinae.

A heteropicnose positiva nos cromossomos sexuais durante a meiose é observada na maioria dos Coleoptera; esta heteropicnose parece, no entanto, variar entre espécies afins (FERREIRA e MESA, 1977; YADAV, KONDAL, e YADAV, 1985; JUAN, PONS e PETITPIERRE *et al.*, 1993; ALMEIDA, ZACARO e CELLA 2000). A heteropicnose positiva também é observada nos cromossomos sexuais X e y de algumas espécies de Tenebrionidae (BISOL e PATNAIK, 1988; JUAN, PONS e PETITPIERRE, 1993). O padrão observado em *Lagria villosa* difere do modelo apresentado por espécies da família, sendo o cromossomo y_p heteropicnotico negativo. As diferenças que envolvem heteropicnose podem ocorrer devido a condensação cromossômica diferencial e/ou a presença de um tipo especial de cromatina (VIRKKI, 1967; YADAV, KONDAL, e YADAV, 1985; ALMEIDA, ZACARO e CELLA, 2000). Além disso, pode-se hipotetizar que o cromossomo y_p dos machos de *L. villosa* ainda esteja num estágio mais inicial de diferenciação em relação ao cromossomo X quando comparado ao sistema onde o y_p aparece heteropicnótico positivo.

A técnica de obtenção de bandas C tem sido a mais utilizada para estabelecer o padrão de heterocromatina em Coleoptera. Até o momento, os estudos têm mostrado que a heterocromatina desse grupo é predominantemente pericentromérica, podendo ocorrer em regiões intersticiais e teloméricas (JUAN e PETITPIERRE, 1989; JUAN, GOSÁLVEZ e PETITPIERRE, 1990; ALMEIDA, ZACARO e CELLA, 2000; MOURA *et al.*, 2003; PONS, 2004).

A espécie *L. villosa* apresentou o padrão típico dos Coleoptera, com exceção do cromossomo y_p o qual não foi marcado pela técnica de banda C, aparecendo com coloração semelhante a regiões não marcadas nos demais cromossomos do complemento; assim como observado em *Epicauta atomaria* (Meloidae), *Gymnopleurus sturmi* (Scarabaeidae) e *Palembus dermestoides* (Tenebrionidae) (ALMEIDA, ZACARO e CELLA, 2000; COLOMBA, VITTURI e ZUNINO, 2000). Este fato não exclui a possibilidade de que este cromossomo seja de constituição heterocromática, pois a técnica empregada não evidência todos os tipos de heterocromatina (SUMNER, 1990) e, além disso, devido ao tamanho desse cromossomo.

Técnicas mais refinadas, como a FISH, tem auxiliado no estudo sobre a heterocromatina do cromossomo y_p ; sendo evidenciado na maior parte dos trabalhos

como heterocromático. Juan, Pons e Petitpierre (1993), utilizando sondas de DNA satélite em *Tenebrio molitor* (Tenebrionidae), confirmou a presença de DNA repetitivo neste cromossomo. Entretanto, Pons (2004), também utilizando sondas de DNA repetitivo, não encontrou evidências de heterocromatina no cromossomo y_p de várias espécies do gênero *Pimelia* (Tenebrionidae) que possuem o sistema Xy_p : essas espécies são negativas para Banda-C no cromossomo y_p , assim como *Lagria villosa*.

O uso dos fluorocromos DAPI/CMA₃, em *L. villosa*, mostrou a presença de heterocromatina contendo sequências de DNA ricas em G+C na região pericentromérica de todos os cromossomos, exceto o cromossomo sexual y_p . Resultados semelhantes foram encontrados em *Gymnopleurus sturni* (Scarabaeidae), *Thorectes intermedius* (Geotrupidae), e *Geniates borelli* (Scarabaeidae) (VITTURI *et al.*, 1999; COLOMBA, VITTURI e ZUNINO, 2000; BIONE, CAMPAROTO e SIMÕES, 2005). Porém o estudo da composição das regiões heterocromáticas por meio dos fluorocromos CMA₃/DAPI, hibridação *in situ* com sondas de DNA altamente repetido, e sequenciamento das regiões heterocromáticas tem revelado sequências altamente repetidas ricas em A+T para os Tenebrionidae (JUAN *et al.*, 1993; PLOHL *et al.*, 1993; URGAKOVIC *et al.*, 1994; PONS, 2002).

Em relação a localização das regiões organizadoras de nucléolo (RON), os dados obtidos para *Lagria villosa* estão de acordo com aqueles descritos na literatura. Embora os dados de localização das RONS sejam escassos, estudos realizados em Coleoptera até o momento têm revelado um par de autossomos organizador de nucléolo (DRETS, CORBELL e FOLLE, 1983; COLOMBA, VITTURI e ZUNINO, 2000; SCHNEIDER *et al.*, 2007). Esta parece ser a condição evolutiva mais estável da subordem Polyphaga, ou representativo de um estado ancestral para Coleoptera, segundo Schneider *et al.* (2007). Porém essa condição ainda não está bem estabelecida para a família Tenebrionidae, pois segundo a revisão realizada por esses autores, a localização da RON foi evidenciada somente em cinco espécies dessa família, das quais apenas *Misolampus goudoti* apresentou um par de cromossomos autossômicos portador da RON pela técnica de FISH. As espécies *Blaps gibba* e *Blaps gigas* apresentaram a RON localizada nos cromossomos sexuais, utilizando a técnica de impregnação pelo íon prata; *Palembus dermestoides* apresentou a RON em dois pares autossômicos e no bivalente sexual Xy_p pela análise de microscopia eletrônica do CS; e, *Tenebrio molitor* apresentou a RON em dois pares autossômicos

e nos sexuais X_p e y_p , com a utilização da técnica de FISH (JUAN, PONS E PETITPIERRE, 1993; VITTURI *et al.*, 1996; ALMEIDA, ZACARO e CELLA, 2000).

Semelhante ao modelo descrito para *M. goudoti* (JUAN, PONS E PETITPIERRE, 1993) a espécie *L. villosa* apresentou o bivalente sexual Xy_p impregnado pelo íon prata, sendo a RON estabelecida em um par autossômico a partir da utilização da técnica de FISH. A diferença na localização das regiões organizadoras de nucléolo detectada pela FISH nos autossomos e pela impregnação pelo íon prata nos cromossomos sexuais já foi descrita para muitas espécies com sistema Xy_p (VITTURI *et al.*, 1999; COLOMBA, VITTURI e ZUNINO, 2000; BIONE, CAMPAROTO e SIMÕES, 2005). John e Lewis (1960) estudando esse sistema nas espécies *T. molitor* (Tenebrionidae), *Adalia bipunctata* e *Coccinella septempunctata* (Coccinellidae) sugeriram que esse material, de possível origem nucleolar, seria responsável pela manutenção da associação dos cromossomos sexuais durante a meiose.

Os dados obtidos por Juan, Pons e Petitpierre (1993), em *T. molitor*, apoiam a hipótese clássica da teoria nucleolar ao detectar a RON ativa somente no bivalente sexual Xy_p durante a meiose, uma vez que a FISH revelou em células mitóticas a presença da RON nos cromossomos sexuais X e y e em dois pares autossômicos que não estavam ativos durante a meiose.

Os experimentos neste presente estudo realizados para testar a natureza do material presente no lúmen do bivalente Xy_p mostraram que a composição da substância argirofílica é proteica. Essa inferência se deve ao fato de que a pepsina, e não a RNase, se mostrou o fator mais importante na impregnação do lúmen, pois somente quando a pepsina foi retirada do processo, ou seja a não degradação das proteínas, é que houve impregnação do bivalente sexual pelo íon prata. Desta forma, esses resultados estão de acordo com Virkki *et al.* (1991) os quais sugeriram que o material encontrado no lúmen do Xy_p seria uma substância argirofílica, semelhante as proteínas do Complexo Sinaptonêmico, a qual facilitaria a configuração em paraquedas servindo como uma substância de adesão e teria um papel importante na segregação destes cromossomos.

Essa hipótese é reforçada através dos resultados obtidos com microscopia eletrônica, os quais mostraram um aumento gradual do material eletrondenso associado aos elementos axiais dos cromossomos X e y_p , indicando uma possível

agregação de proteínas durante o decorrer do evento da prófase I. Este modelo seria semelhante aquele proposto por de la Fuente *et al.* (2007) para *Meriones unguiculatus* (roedor), no qual as proteínas do complexo, principalmente a SYCP3 e a RAD51 se acumulam sobre os elementos do X e y formando uma vesícula sexual para manutenção dos cromossomos sexuais.

Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado pela Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPE. Os autores são gratos ao Senhor Miguel Airton Carvalho pela colaboração nas atividades laboratoriais, a Dr^a. Célia Guadalupe San Martin do Departamento de Biologia, UEL, Londrina, Brasil, pelo auxílio na utilização do microscópio eletrônico e ao especialista Carlos Campaner pela identificação da espécie *Lagria villosa*.

Referências Bibliográficas

As referências citadas neste capítulo estão listadas ao final da dissertação em um único tópico com todas as demais referências.

Tabela 1 – Ensaios de modificação no pré-tratamento da FISH realizados para testar a natureza do material argirofílico fortemente associado ao bivalente sexual.

	Pepsina	RNAse	Prata/Sexuais	Sonda/Autoss.	Sonda/Sexuais
Ensaio 1	Ausente	Presente	+	+	-
Ensaio 2	Presente	Ausente	-	+	-
Ensaio 3	Ausente	Ausente	+	+	-
Ensaio 4	Presente	Presente	-	+	-

(+) Com impregnação/Com Sinal , (-) Sem impregnação /Sem Sinal

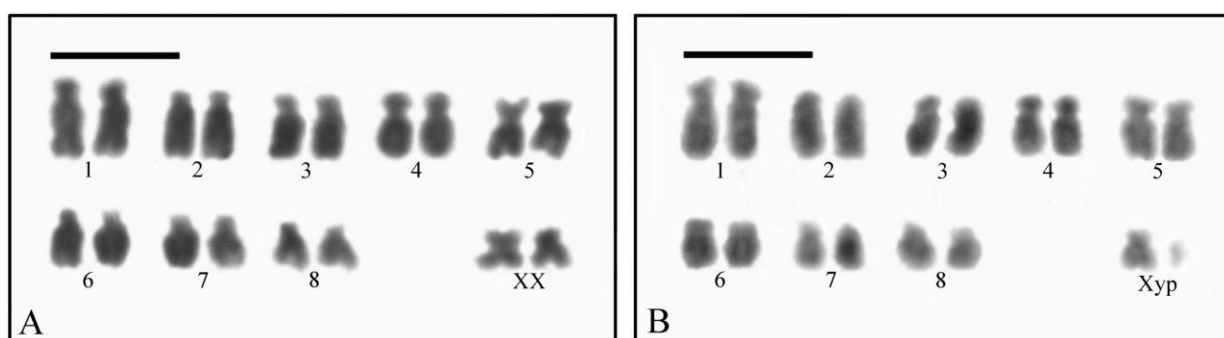


Figura 1. Cariótipos mitóticos goniais de *L. villosa* em coloração convencional. **A.** Cariótipo de fêmea com $2n=16+XX$. **B.** Cariótipo de macho com $2n=16+Xy_p$. Escala=10 μm .

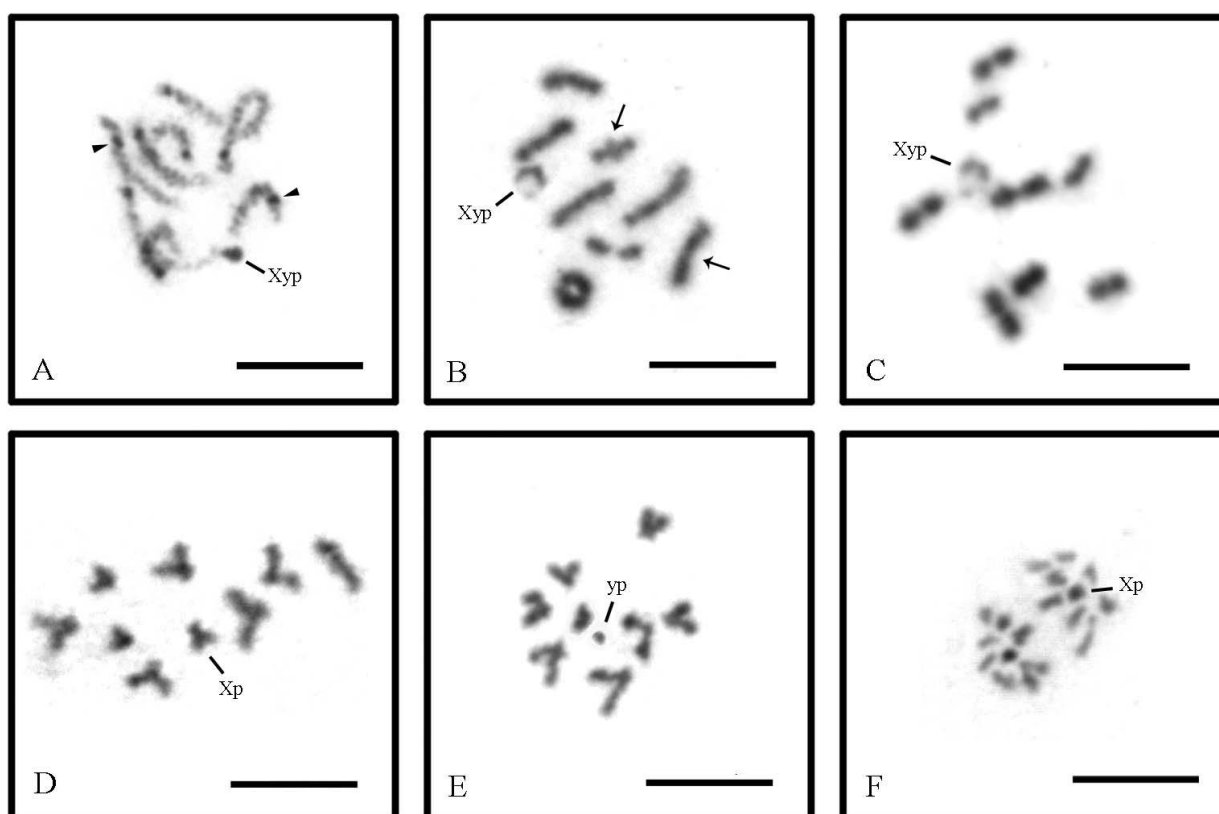


Figura 2 – Células meióticas de macho de *L. villosa*, em coloração convencional. **A.** Paquíteno evidenciando o bivalente Xy_p e as regiões centroméricas (cabeça de setas). **B.** e **C.** Diacinese e metáfase I, respectivamente, mostrando a configuração em paraquedas dos cromossomos sexuais. **D.** e **E.** Metáfases II com $n=8+X_p$ e $n=8+y_p$, respectivamente. **F.** Anáfase II, mostrando a segregação regular das cromátides irmãs. Setas=quiasma. Escala=10 μm .

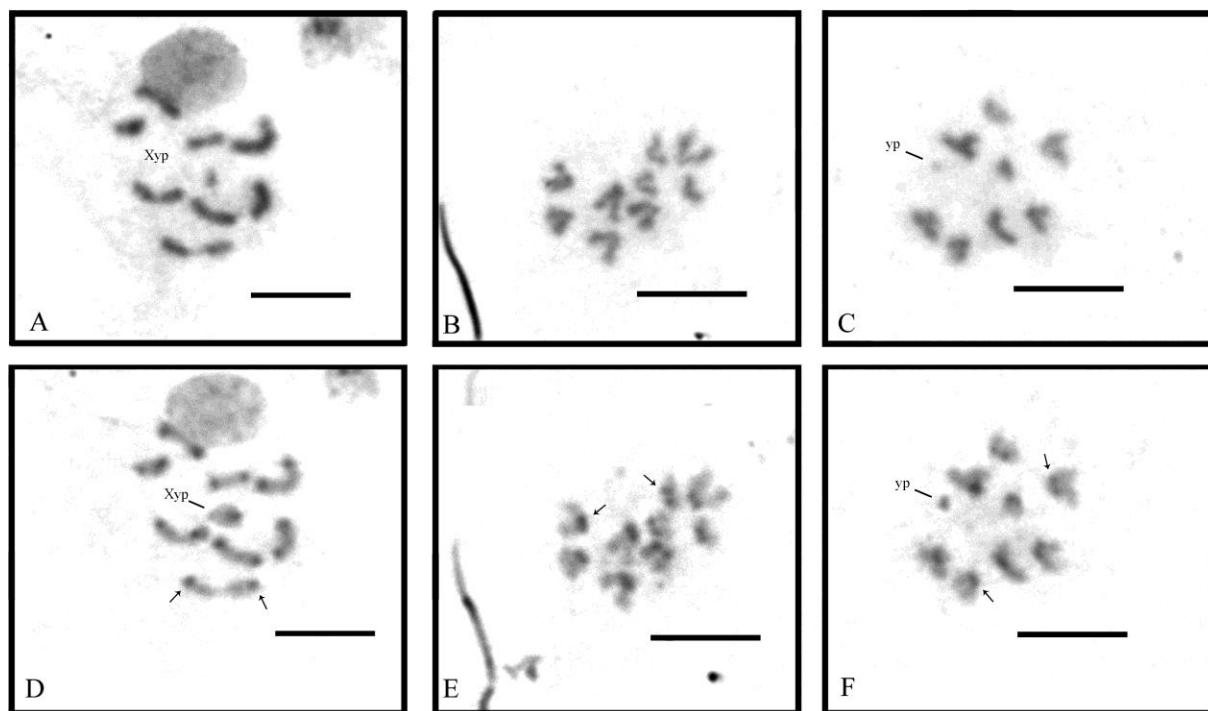


Figura 3 – Célula meiótica de *Lagria villosa* submetida à técnica sequencial Giemsa/Banda C (**A/D**, **B/E** e **C/F**). **A.** e **D.** Metáfase I com $2n=8II+X_{yp}$. **B.** e **E.** Metáfase II com $n=8+X_p$ e **C.** e **F.** com $n=8+y_p$. Setas = regiões heterocromáticas. Escala=10 μm .

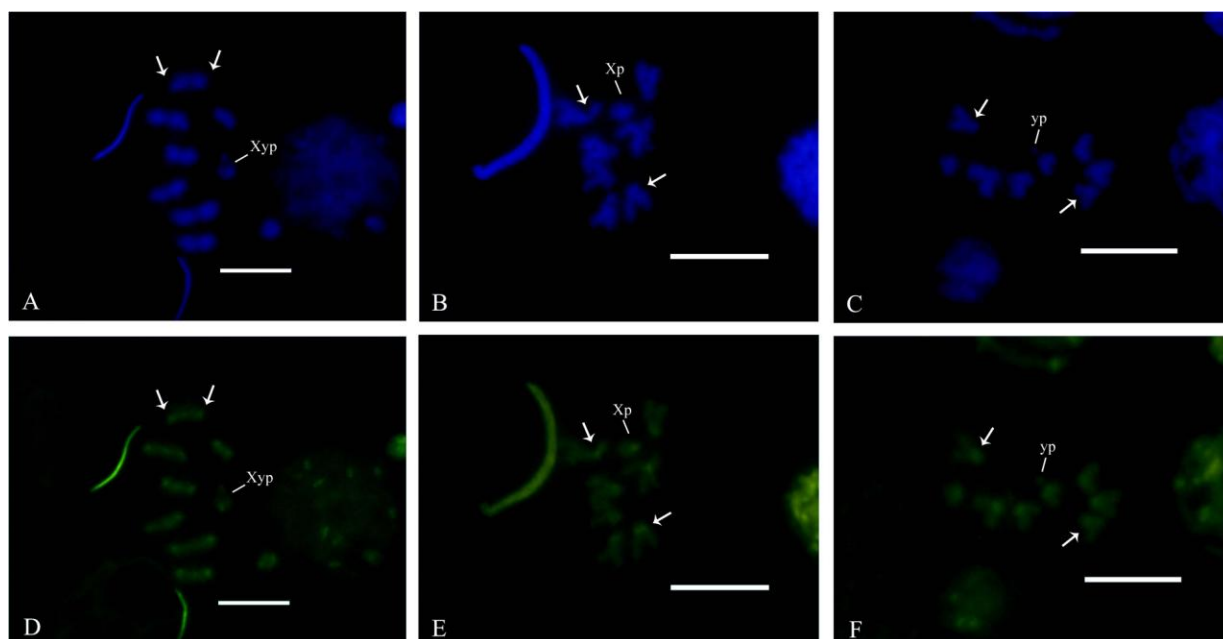


Figura 4 – Células meióticas de *Lagria villosa* submetidas aos fluorocromos DAPI/CMA₃, mostrando que as regiões pericentroméricas são ricas em repetições GC (setas). Escala=10 μ m.

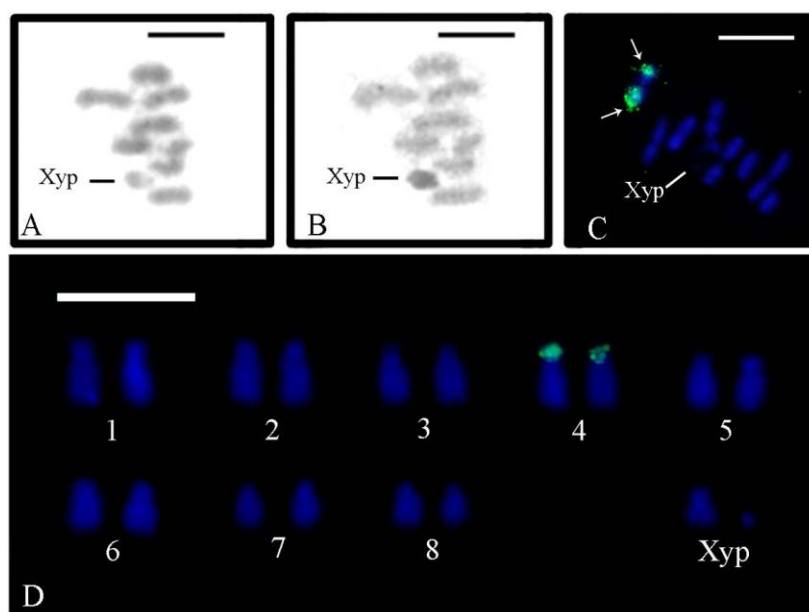


Figura 5 – A. e B. Células metafásica I em coloração convencional (A) e impregnada pelo íon prata (B) evidenciando material fortemente impregnado sobre o Xyp. C. e D. Células submetidas à técnica de FISH com sondas 18S mostrando os cístrons ribossomais associados a um bivalente autossômico (C) e ao par 4, em metáfase espermatogonial (D). Escala=10 μ m.

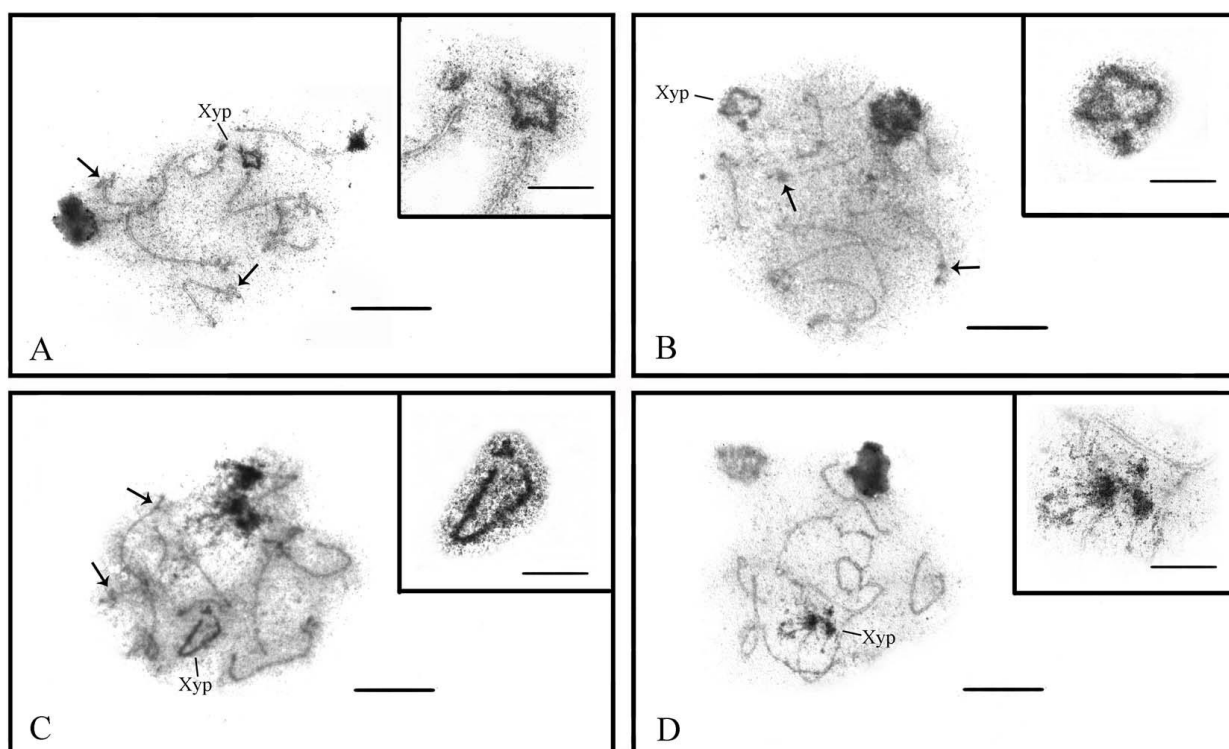


Figura 6 – Microestendidos celulares de *Lagria villosa* impregnados pelo íon prata, observado ao microscópio eletrônico, mostrando um aumento gradual na eletrondensidade associada aos cromossomos sexuais. Setas = regiões cinetocóricas. Detalhes=cromossomos sexuais. Escala=10 μm.

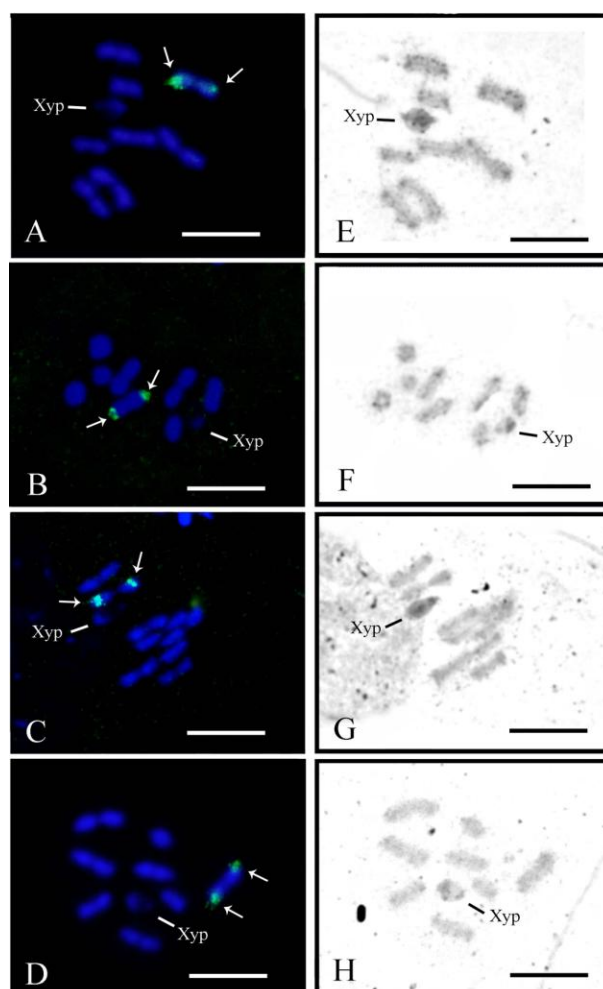


Figura 7 – Células metafásicas I, submetidas a diferentes incubações, com RNase e/ou Pepsina, no pré-tratamento da hibridação in situ fluorescente (**A**, **B**, **C** e **D**) e, posteriormente, as mesmas células foram impregnadas pelo íon prata (**E**, **F**, **G** e **H**). **A**. FISH sem pepsina e com RNase. **B**. FISH com pepsina e sem RNase. **C**. FISH sem pepsina e sem RNase. **D**. FISH com pepsina e com RNase. **E**. e **G**. Bivalente sexual impregnado pelo íon prata. **F**. e **H**. Bivalente sexual não impregnado pelo íon prata, sendo possível observar a configuração em paraquedas. Setas = Cístrons ribossômicos. Escala=10 μ m.

Capítulo II

Mapeamento físico das famílias multigênicas em *Lagria villosa* (Tenebrionidae): primeira evidência de genes ribossomais intercalados em Coleoptera

Resumo

A organização e o mapeamento das famílias multigênicas tornam-se úteis marcadores e podem elucidar a variação do cariótipo e a organização genômica em diversos grupos de eucariotos. Poucas espécies de Coleoptera têm sido analisadas utilizando a Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH) para a localização das famílias gênicas. Com o objetivo de contribuir para os conhecimentos da organização genômica em Coleoptera, realizou-se o mapeamento cromossômico das famílias gênicas DNAr 5S, DNAr 18S e genes de Histona H3 em *Lagria villosa*, mostrando, pela primeira vez, que os genes ribossomais 5S e 18S em Coleoptera estão interespaçados. A FISH foi realizada utilizando sondas de histona H3, DNAr 5S e DNAr 18S, e obtidas por PCR marcado. A dupla FISH para DNAr 5S e 18S revelou que ambas as regiões ribossomais estão colocadas no braço curto do par cromossômico submetacêntrico 4. Adicionalmente, a FISH com sonda de Histona-H3 mostrou que esta sequência está presente em apenas um par autossômico diferente do par 4. A técnica de fiber-FISH com dupla sonda (18S e 5S) foi utilizada para uma melhor resolução do mapeamento dessas regiões em *L. villosa*, mostrando que os dois DNAs estão intimamente intercalados com quantidades variáveis de ambas as classes de DNA. Associação entre as duas famílias DNAr tem sido relatado, em outros grupos de invertebrados e vertebrados. Para que uma família gênica não interfira na organização funcional da outra família, em casos de colocação, podemos supor que essas famílias estão intercaladas em quantidades variadas, de maneira interespaçada a ponto de uma família não interferir na funcionalidade da outra. Ou ainda, a possibilidade de que outros sítios dessas famílias estejam situados em outros cromossomos, porém não são evidenciados pela FISH devido ao tamanho pequeno dos cístrons.

Palavras chave: Fiber-FISH, sintenia, organização genômica, hibridação *in situ* fluorescente, RON, 5S

Introdução

Os DNAs repetitivos compõem uma grande quantidade dos genomas eucarióticos, podendo estar arrançados de maneira dispersa ou *in tandem* (SUMNER, 2003). As famílias multigênicas compreendem uma importante classe desses DNAs, definida como DNAs repetitivos codificantes, e correspondem à família dos DNAs ribossomais e histônicos. As famílias multigênicas são grupos de genes que descendem de um gene ancestral comum apresentando, portanto, sequências e funções similares (NEI e ROONEY, 2005). Desta forma, a organização e o mapeamento das famílias multigênicas, tornam-se úteis marcadores citogenéticos e podem elucidar a variação do cariótipo e organização genômica em diversos grupos de eucariotos.

Os DNAs ribossomais (DNAr) em eucarioto são organizados *in tandem*, estando divididos nas unidades transcricionais maior (45S) e menor (5S). A unidade maior transcreve para os rRNAs 18S, 5,8S e 28S, sendo separados entre si pelos espaçadores internos transcritos (ITS). Cada cístron da unidade maior é separado por espaçadores intergenicos (IGS). A unidade menor transcreve para o rRNA 5S, cada unidade por sua vez, é separada das demais pelo espaçador não transcrito (NTS) (LONG, 1980). A família multigênica que codifica as proteínas histônicas em geral pode estar organizada em um cluster formado por todas as sequências histônicas *in tandem* (H1, H2A, H2B, H3 e H4), espaçadas por sequências de DNA não-codificante ou esses genes podem ser distribuídos individualmente ou, ainda, arrançados por combinação aleatória dos genes (LIFTON *et al.* 1977; ENGEL e DODGSONT, 1981; RUBERTI *et al.*, 1982; CABRAL-DE-MELLO, MOURA e MARTINS, 2010). Em insetos esses genes de histonas podem estar agrupados em um quarteto ou mais frequentemente agrupados em um quinteto, como demonstrado para algumas espécies de Curculionidae (NAGODA *et al.*, 2005; ROEHRDANZ, *et al.* 2011).

A Hibridação *in situ* Fluorescente tem sido um eficiente e rotineiro método para localização de genes ribossomais em cromossomos de várias espécies. Porém poucas espécies de Coleoptera têm sido analisadas utilizando esse procedimento. A região 45S foi mapeada para algumas espécies da subordem Adephaga (Carabidae e Cicindelidae), mostrando uma prevalência dos cístrons ribossomais em um par autossômico. Porém algumas espécies mostraram variações, apresentando um maior número de pares portadores dos cístrons ribossomais, ou ainda, algumas espécies

mostram os cístrons associados aos cromossomos sexuais. A subordem Polyphaga apresenta mais famílias estudadas (Scarabaeidae, Chrysomelidae, Tenebrionidae, Coccinelidae e Geotrupidae), nas quais foi evidenciado que os genes ribossomais estão presentes em cromossomos autossômicos, em cromossomos sexuais ou, ainda, em ambos (GALIÁN *et al.*, 1995; VITTURI *et al.*, 1999; PROENÇA *et al.*, 2004; SCHNEIDER *et al.* 2007; ALMEIDA *et al.* 2010; CABRAL-DE-MELLO, MOURA e MARTINS, 2011a).

Por sua vez, o conhecimento sobre a distribuição cromossômica dos genes ribossomais 5S e dos genes das histonas ainda são escassos. Poucos trabalhos de mapeamento físico dos genes DNAr 5S e histonas têm sido realizados em Coleoptera. A localização dos cístrons DNAr 5S e dos genes da Histona-H3 foi descrita para algumas espécies do gênero *Dichotomius* (Scarabaeidae). Nas espécies desse gênero, esses genes estão colocalizados no par cromossômico 2, mostrando uma organização conservada e compartilhada entre todas as espécies estudadas neste trabalho (CABRAL-DE-MELLO, MOURA e MARTINS, 2010; CABRAL-DE-MELLO, MOURA e MARTINS, 2011a). Esse tipo de associação entre as famílias gênicas DNAr 5S e histonas, também foi descrita para outros invertebrados como crustáceos (BARZOTTI *et al.* 2000) mexilhões (EIRÍN-LÓPEZ *et al.* 2004) e gafanhotos (CABRAL-DE-MELLO *et al.*, 2011b). Em comparação com as famílias multigênicas de DNAr, os genes das histonas são mais conservados entre as espécies, em relação ao número de clusters e a posição no cromossomo (CABRERO *et al.* 2009; CABRAL-DE-MELLO *et al.* 2011b).

Por outro lado, associação entre as duas famílias de DNAr (45S e 5S) tem sido pouco estudada, sendo relatada para alguns grupos, por exemplo, em nematóides (VAHIDI *et al.* 1988), crustáceos, aranhas (DROUIN *et al.*, 1992), fungos (DROUIN e MONIZ de SÁ, 1995), anelídeos (VITTURI *et al.*, 2002), moluscos (COLOMBA *et al.*, 2002; VITTURI *et al.*, 2004), (PISANO & GHIGLIOTTI, 2009) e besouros (CABRAL-DE-MELLO *et al.* 2011c).

A Hibridação *in situ* Fluorescente em fibras estendidas, denominada Fiber-FISH, vem contribuindo de maneira significativa para o mapeamento físico, com sondas de regiões cromossômicas de interesse, em diversos grupos (RAPP, 1998) com exceção de Coleoptera. A FISH em cromossomos metafásicos tem uma resolução de mapeamento de 1-3Mb, enquanto que a FISH em fibras estendidas pode apresentar uma resolução 1-400 Kb (RAAP *et al.*, 1996). Desta forma, a fiber-FISH

fornece uma melhor resolução para se investigar a associação entre diferentes classes de DNA.

A família Tenebrionidae possui 18.000 espécies descritas (COSTA, 2003), agrupadas em 1700 gêneros. O gênero *Lagria* Fabricius 1775, o qual possui inúmeras espécies distribuídas na Europa, Ásia, África, Nova Guiné e Austrália (MERKL, 2006). No Brasil *Lagria villosa* é a única espécie introduzida a qual se tornou uma praga agrícola para as lavouras de soja, fava e feijão (GALLO *et al.*, 2002). As espécies da família Tenebrionidae são muito promissoras para estudos de citogenética evolutiva e citotaxonomia, assim como inúmeras espécies dessa família são pragas agrícolas ou de produtos armazenados (PETITPIERRE, 1996). Apesar do grande número de espécies nessa família, os estudos de citogenética molecular são escassos.

Com o objetivo de contribuir para os conhecimentos da organização genômica em Coleoptera, realizou-se o mapeamento cromossômico das famílias gênicas Histona H3, DNAr 5S e DNAr 18S em *Lagria villosa*, descrevendo pela primeira vez a o mapeamento físico em fibras estendidas dos genes DNAs 5S e 18S em Coleoptera.

Material e Métodos

- Coleta e preparações cromossômicas

Indivíduos adultos machos de *Lagria villosa* foram coletados em uma plantação de soja na fazenda escola da Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG na localidade “Capão da Onça”, Ponta Grossa, Paraná (S25°05’44” e W050°030’62”). As preparações citológicas para o estudo dos cromossomos foram obtidas a partir das gônadas de indivíduos adultos, dissecados em solução fisiológica para insetos e processados segundo metodologia descrita por Almeida, Zacaro e Cella (2000).

- Obtenção das sondas dos genes da histona H3 e do DNAr 5S

A extração de DNA genômico de *L. villosa* foi realizada segundo a técnica de MURRAY e THOMPSON (1980) com pequenas modificações. A amplificação da sequência de histona H3 e DNAr 5S de *Lagria villosa* foi realizada utilizando-se os *primers* (H3_F: 5’CGYAARTCNACYGGWGGWGGNAA-3’ / H3_R: / 5’-

TDGCRCA YARRTTNGTRTCY-3) e (5S_F: 5'-AACGNCCATANCACGCTGNA-3' / 5S_R:5'-AGCGGTCNCNCATCNANGTAC-3'), respectivamente, construídos a partir de sequências depositadas no GenBank: histona H3 (Acessos: EU048314.1, EU048315.1, AJ566027.1, AJ566024.1, EU048316.1, EU048312.1 e AJ566030.1) e DNAr 5S (Acessos: X83208.1, U58709.1, U58720.1, GQ443312.1). Para cada gene a reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada em um volume total de 50 µL, nas seguintes concentrações: 20 ng de DNA genômico, Tampão de reação 1X (200 mM Tris-HCl, pH 8,4, 500 mM KCl), 1 U Taq DNA polymerase (Invitrogen®), 2,0 mM de cada primer, 1,5 mM MgCl₂, 0,08 mM de cada dNTP (Invitrogen®). A amplificação das sequências foi realizada nas seguintes programações: histona H3 (5 min à 94 °C e 35 ciclos por 1 min à 95 °C, 45s à 56 °C, 1 min à 72 °C e uma extensão final de 5 min à 72 °C) e DNAr 5S (5 min à 94 °C e 35 ciclos por 1 min à 95 °C, 1 min à 58 °C, 1 min à 72 °C e uma extensão final de 5 min à 72 °C).

Os fragmentos obtidos foram purificados pelo kit de purificação (High Pure PCR Cleanup Micro Kit - Roche®), clonados no vetor pTZ57R/T (Fermentas®) e transformados na bactéria *Escherichia coli* DH5α (Gibco® GBRL). Os plasmídeos recombinantes foram sequenciados usando um sequenciador automático (ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer) armado com capilares de 50 cm e polímero POP6 (Applied Biosystems®). As sequências obtidas foram analisadas e editadas com o auxílio do programa BioEdit (HALL, 1999). Posteriormente, as sequências foram submetidas ao nucleotídeo-BLAST (ZHANG *et al.*, 2000). As sequências nucleotídicas foram então comparadas com aquelas depositadas no banco de sequências GenBank e alinhadas utilizando o programa ClustalW v. 1.6 (THOMPSON *et al.*, 1994).

- Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH)

O Procedimento de FISH baseou-se na técnica descrita por Pinkel, Straume e Gray, (1986), com algumas modificações realizadas por Almeida *et al.*, (2010). As sondas DNAr 18S foram obtidas por PCR marcado, empregando-se a biotina - (16 dUTP-Roche®), a partir do gene parcial 18S de *Omophoita octoguttata* (Alticinae) clonado (ALMEIDA *et al.*, 2010). As sondas de DNA Histona-H3 foram obtidas por PCR marcado, empregando-se o composto biotina-16-dUTP (Roche®), utilizando-se gene Histona-H3 de *Lagria villosa* clonado no vetor pTZ57R/T (Fermentas). As sondas DNAr 5S foram obtidas por PCR marcado, empregando-se a digoxigenina-11-dUTP

(Roche®), utilizando-se gene de 5S de *Lagria villosa* clonado no vetor pTZ57R/T (Fermentas®). Para o reconhecimento do sinal foi utilizado streptavidina-alexa fluor 488 (Molecular Probes®) ou anti-digoxigenin-rhodamine (Roche®).

- Hibridação *in situ* Fluorescente em Fibras estendidas (Fiber-FISH)

O protocolo de Fiber-FISH foi realizado segundo a técnica descrita por Barros *et al.* (2011), com algumas modificações, incluindo um pré-tratamento com pepsina 0,005%. As preparações citológicas obtidas da suspensão celular de gônadas contendo aproximadamente 10 ± 5 núcleos foram tratadas com pepsina 0,005% por 20 minutos e, na sequência, lavadas em solução salina (PBS) por cinco minutos à temperatura ambiente (25°C). Para estender as fibras foi adicionado na parte superior da lâmina 200 µl de hidróxido de sódio (NaOH) 0,25M diluído em 30% de álcool. Com o auxílio de outra lâmina o esfregaço foi realizado, espalhando todo o NaOH pela lâmina. Logo após esse procedimento, 500µl de etanol 100% gelado foi adicionado à lâmina, a qual foi totalmente seca, e então submetida ao procedimento de Hibridização *in situ*, descrito anteriormente.

As melhores células foram fotografadas em microscópio de epifluorescência Olympus BX41 com objetiva 100 de imersão, com filtros específicos e captura de imagem digital em tempo real com câmera CCD DP-71 (Olympus®).

Resultados

A amplificação com primers específicos da região de histona H3 e DNAr 5S de *Lagria villosa*, gerou fragmentos de 315 pb e 94 pb, respectivamente, os quais foram clonados, sequenciados e denominados *Lagria_HistonaH3* e *Lagria_5SrDNA*. A sequência consenso de histona H3 é composta por 31,11% A, 20,95% C, 20,00% G e 27,94% T (Figura 1A). A sequência consenso de DNAr 5S é composta por 19,15% A, 22,34% T, 28,72% C e 29,79% G (Figura 2A). O alinhamento da sequência consenso de histona H3 e 5S DNAr com sequências de outras espécies de Coleoptera depositadas no GenBank (Figura 1B e 2B) mostrou uma similaridade mínima de 72% para a sequência de histona H3 e 81% para sequência de DNAr 5S (Tabela 1 e 2).

O cariótipo, a meiose e a localização do gene DNAr 45S de *L. villosa* foram descritos anteriormente por Goll *et al.* (artigo 1, presente trabalho), com

$2n=18=16+Xy_p$ para machos e $2n=18=16+XX$ para fêmeas. A morfologia observada é predominantemente submetacêntrica para os cromossomos autossômicos, e metacêntrica para o cromossomo X, sendo o cromossomo y de difícil identificação. A fórmula meiótica obtida foi $2n=8II+Xy_p$, sendo meiose I o bivalente sexual encontrado na configuração em paraquedas. Além disso a RON está localizada no braço curto do par submetacêntrico 4.

O estudo de células meióticas de *L. villosa* submetidas à dupla FISH com sondas DNAr 5S e Histona H3 mostrou em metáfase I que os clusters de DNAr 5S (Figura 3A) e Histona (Figura 3B) estão associados a bivalentes autossômicos distintos (Figura 3C). A análise de células mitóticas com sonda de DNAr 5S mostrou a localização no braço curto do par 4, coincidente com a localização do cístron 45S descrito por Goll *et al.* (artigo 1, presente trabalho). Para investigar a sintenia entre os genes 5S e 18S utilizou-se a dupla FISH com sondas de DNAr 5S e 18S, o qual evidenciou em metáfase I que os clusters ribossomais estão presentes em apenas um par autossômico (Figuras 3D e 3E), mostrando uma organização sintênica e colocalizada como observado na sobreposição das imagens (Figura 3F). A análise de células mitóticas espermatogoniais submetidas à dupla FISH com sondas de DNAr 18S e 5S confirmou que os clusters ribossomais 45S e 5S estão localizado no par autossômico 4 (Figuras 3G e 3H). A sobreposição das imagens com a hibridação de sondas 18S e 5S DNAr evidência que os clusters ribossomais são colocalizados no braço curto do cromossomo 4 (Figura 3I).

Com o objetivo de estudar a organização estrutural dos cístrons 18S e 5S colocalizados em *L. villosa* utilizou-se a técnica de fiber-FISH com ambas as sondas.

A dupla fibra-FISH com sondas de 18S e 5S DNAr mostrou uma maior resolução do mapeamento da região de sobreposição das famílias gênicas ribossomais (Figura 4). Sendo demonstrado que os cístrons ribossomais colocalizados estão intimamente intercalados com variáveis quantidades de ambas as classes de DNA (Figura 4C e 4D).

Discussão

O número diploide, a fórmula meiótica ($2n=18=8II+Xy_p$) e o numero de organizadores de RON obtidos para espécie *L. villosa*, os quais já foram descritos

anteriormente por Goll *et al.* (artigo 1, presente trabalho) são concordantes com os descritos para as espécies de Tenebrionidae analisadas até o momento, as quais possuem um cariótipo conservado com número diploide igual a 18 cromossomos (SMITH e VIRKKI, 1978; PETITPIERRE, 1996).

Recentemente, técnicas mais refinadas têm sido empregadas para análise, caracterização e diferenciação dos cromossomos em Coleoptera (GALIÁN, PROENÇA e VOGLER, 2007; ALMEIDA *et al.*, 2010); porém de maneira incipiente. Apesar da Hibridação *in situ* Fluorescente ser um eficiente e rotineiro método para localização de famílias gênicas em diversos organismos, poucas espécies de Coleoptera têm sido analisadas sob este aspecto. Portanto, torna-se necessário o estabelecimento de sondas específicas para localização dessas famílias gênicas. A comparação das sequências consenso obtida de *L. villosa*, da histona H3 (315 pb) e o gene 5S (94 pb), com outras sequências depositadas no GenBank, indicou uma similaridade mínima de 72% e 81%, respectivamente. Essa alta similaridade com as espécies descritas validou as sondas para os genes H3 e 5S e possibilita o amplo emprego na hibridação *in situ*. As diferenças encontradas nas sequências são possivelmente o resultado de mutações de base do tipo transição ou transversão.

Em Coleoptera os estudos de localização e mapeamento das famílias multigênicas foram realizados principalmente para o gene ribossomal DNAr 45S, sendo raros os trabalhos descrevendo o mapeamento do DNAr 5S e genes das histonas. Cabral-de-Melo *et al.* (2010) através da FISH com sonda de DNAr 5S descreveram para *Dichotomius germinatus* (Scarabaeidae) a presença de um único par cromossômico (par 2) portador desse gene. Neste mesmo trabalho, os autores mapearam o gene da histona H3 e observaram que este gene está colocalizado com o cístron 5S. Posteriormente, Cabral-de-Melo *et al.* (2011a) mapearam os cístrons DNAr 5S e histona H3 em outras 14 espécies do gênero *Dichotomius* (Scarabaeidae). Nestas espécies o cístron localiza-se na região proximal do braço curto do par 2 também colocalizado com o gene da histona H3. Esses autores propõem que esse padrão conservado de colocalização no par 2 poderia representar um estado ancestral para o grupo. No entanto, essa situação de ancestralidade precisa ser melhor analisada uma vez que outros padrões de associação formam descritos para espécies da mesma família ou de outras famílias, como, por exemplo, 5S associado a 45S (presente trabalho e Cabral-de-Melo *et al.*, 2011c) e histona e 45S (Curculionidae).

Apesar de raros trabalhos utilizarem a FISH para investigar a relação entre as

famílias gênicas nos diversos grupos de Coleoptera, interessantes dados foram obtidos sobre a organização desses DNAs nesta ordem utilizando os genes 45S e histona. Um estudo de mapeamento gênico realizado em *Anthonomus grandis* e *Anthonomus texanus* (Curculionidae) mostrou que o cóstron 45S é interespaçado com os genes das histonas (ROEHRDANZ *et al.*, 2010).

Por outro lado, a associação entre os genes ribossomais 45S e 5S de forma interespaçada está sendo descrita pela primeira vez em Coleoptera. Os dados obtidos com dupla FISH em *L. villosa* mostrou que esses cóstrons estão colocalizados no braço curto do par 4. Adicionalmente, os dados de Fiber-FISH confirmam a colocalização em quantidades variáveis. Na literatura existe somente dados de descrição de associação entre as famílias de DNAr 45S e 5S como, por exemplo, em nematóides (VAHIDI *et al.*, 1988), crustáceos (DROUIN *et al.*, 1992), aranhas (Drouin *et al.*, 1992), fungos (DROUIN e MONIZ de SÁ, 1995), anelídeos (VITTURI *et al.*, 2002), moluscos (COLOMBA *et al.*, 2002; VITTURI *et al.*, 2004), peixes (PISANO e GHIGLIOTTI 2009) e besouros (CABRAL-DE-MELO, *et al.* 2011c).

Funcionalmente, a associação de famílias gênicas de maneira intercalar pode desencadear o silenciamento gênico devido à interferência na organização funcional dos cóstrons. Vicari *et al.* (2008) demonstraram em *Astyanax janae* que a RON estava inativa nos cóstrons ribossomais onde o elemento repetitivo As 51(DNAsat) estava associado. Assim, para explicar essa situação em espécies que possuem apenas um par com esses genes, é possível propor que essas famílias estariam intercaladas em quantidades variadas, ou ocorrer ainda de maneira interespaçada ao ponto de uma família não interferir na funcionalidade da outra. Nesse sentido, o trabalho realizado por Roehrdanz *et al.* (2010) em *A. grandis* e *A. texanus* (Curculionidae) mostra que o padrão intercalar da unidade DNAr 45S e os genes das histonas, pelas regiões espaçadoras intergênicas, não interfere na expressão das unidades histona-DNAr, possivelmente como ocorre em *L. villosa*.

Contudo, ainda é possível, que sítios dessas famílias estejam situados em outros pares cromossômicos, porém não sendo evidenciados pela FISH devido possivelmente à um tamanho menor dos cóstrons, como observado em gafanhotos por Cabrero e Camacho (2008) que descreveram alguns cóstrons de DNAr 45S de gafanhoto com a RON inativa, enquanto que algumas regiões mostraram atividade da RON mesmo sem a FISH evidenciar a presença de cóstrons nestas regiões.

Desta forma, essa organização intercalar entre famílias multigênicas pode ser

comum dentro da ordem Coleoptera. Contudo esta hipótese deve ser testada em mais espécies.

Em todos os grupos analisados até o momento, considerados primitivos ou derivados, o padrão de localização entre o DNAr 5S e 45S parece altamente variável, mostrando que o evento de associação ou separação ocorreu varias vezes durante a evolução desses grupos, principalmente no que se refere ao DNAr 5S que tornou-se repetidamente associado a diferentes famílias multigênicas, embora o mecanismo de transposição dessa família ainda não seja completamente elucidado (DROUIN e MONIZ DE SÁ, 1995). Martinez *et al.* (1996) propoem ainda que a associação entre as famílias ribossomais é uma condição derivada. Deste modo, em *L. villosa* a sintonia entre os genes ribossomais DNAr 18S e 5S, poderia corroborar o processo de fusão entre dois pares autossômicos, como descrito por Goll *et al.*, (presente trabalho) considerando o número basal proposto para Coleoptera (SMITH e VIRKKI, 1978).

A diversidade das ligações entre as famílias multigênicas, bem como a sua falta de conservação durante a evolução, torna improvável que as associações destas forneçam alguma vantagem seletiva (DROUIN & MONIZ DE SÁ, 1995), como as sugerida por (ANDREWS *et al.* 1987; AKSOY *et al.* 1992) onde poderia ocorrer a co-regulação da transcrição do genes DNAr 5S e dos genes de outras famílias ligadas. Segundo Vitturi *et al.* (2002) a colocalização ou interespaçamento de famílias multigênicas pode resultar em crossing-over desigual com consequente heteromorfismo. KAPLAN *et al.* (1993) sugerem ainda que a estreita associação entre essas familias multigênicas pode ter um papel funcional na organização do nucléolo.

O motivo que levaria a uma associação e/ou interespaçamento envolvendo repetidas unidades de diferentes famílias ainda é incerto e pouco estudado (Vitturi *et al.*, 2002, 2004). Há evidências de que esta condição envolvendo famílias multigênicas ocorre mais frequentemente em invertebrados (Vitturi *et al.*, 2004).

Um avanço neste trabalho refere-se a técnica de Fiber-FISH a partir de células de gônadas fixadas. A técnica de fiber descrita por Barros *et al.* (2011) descreve a extensão das fibras a partir de núcleos de um material celular somático fixado em suspensão. Além desse material não estar em suspensão celular, a fixação torna o órgão muitas vezes rígido o que limita a obtenção de uma fibra continua. Porém a técnica descrita foi satisfatória na obtenção de fibras para esse tipo celular, mostrando ser uma metodologia promissora para citogenética molecular de Coleoptera e de outros grupos. Desta forma, é possível que casos de colocalização entre famílias

gênicas como vem sendo observado em Coleoptera, quando analisados pela FISH em cromossomos metafásicos, sejam estudados pela Fiber-FISH proporcionando um padrão mais claro dessa forma de associação, como por exemplo, a associação encontrada das famílias gênicas DNAr 5S e histona H3 em *Dichotomius* (Scarabeidae) (Cabral-de-Mello, 2011b), ou ainda a associação do DNAr 45S e Histonas evidenciado para algumas espécies do gênero *Anthonomus* (Curculionidae) (Roehrdanz *et al.*, 2010).

Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado pela Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES. Os autores são gratos ao especialista Carlos Campaner pela identificação da espécie *Lagria villosa*.

Referências Bibliográficas

As referências citadas neste capítulo estão listadas ao final da dissertação em um único tópico com todas as demais referências.

Tabela 1 – Matriz de identidade da sequência histona H3 de *L. villosa* com outras espécies de Tenebrionidae.

espécies	1	2	3	4	5	6
1. <i>L. villosa</i>	ID	0,774	0,755	0,761	0,771	0,72
2. <i>P. atlantis</i>	0,774	ID	0,774	0,831	0,765	0,828
3. <i>T. molitor</i>	0,755	0,774	ID	0,787	0,726	0,796
4. <i>G. cornutus</i>	0,761	0,831	0,787	ID	0,749	0,838
5. <i>L. oryzae</i>	0,771	0,765	0,726	0,749	ID	0,73
6. <i>T. brevicornis</i>	0,72	0,828	0,796	0,838	0,73	ID

Tabela 2 – Matriz de identidade da sequência DNAr 5S de *L. villosa* com outras espécies de Coleoptera.

Espécies	1	2	3
1. <i>L. villosa</i>	ID	0,819	0,861
2. <i>D. semisquamosus</i>	0,819	ID	0,819
3. <i>H. rufipes</i>	0,861	0,819	ID

5'...TCGTAAGTCGACTGGTGGGAAAGCACCACGTAAACAATTGGCCACAAAAGCTGCACGTAAAAAGTGCAACGCAACTGGTGGAGTTAAAAAACCT
CATCGTTATCGTCTGGTACTGTTGCTCTACGAGAAATTCGTGCTTATCAAAAAAGTACTGAATTGCTTATTCGTAAATTACCTTTTCAACGCTTAG
TTCGTGAAATCGCTCAAGATTTCAAAAGTATTACGTTTCCAAAGTTCAGCTGTAATGGCTTTACAAGAAGCAAGTGAAAGCTTATTGGTTCGGTCT
ATTTGAAGACACCAACCTATGCGCCAA...3' 315pb

A

	10	20	30	40	50	60	70	80
<i>Lagria villosa</i>	TCGTAAGTCGACTGGTGGGAAAGCACCACGTAAACAATTGGCCACAAAAGCTGCACGTAAAAAGTGCAACGCAACTGGTGGAGTTAAAAAACCT							
<i>Pimelia atlantis</i>	 A . T A . A T . T GC G . G . C . GA . A C . T C . C .							
<i>Tenebrio molitor</i>	A . C C . C . A . A C . CA . G C . . T . C G . CA . G C . T . C . C C .							
<i>Gnathacerus cornutus</i>	 A . T . C C . G TA . A G G . G . G . CA . A C . T . C . C . C . A .							
<i>Latheticus oryzae</i>	----- . A T . A . A . . GC . T . T . T TA . A C . T T							
<i>Tribolium brevicornis</i>	 A . T . C . A . A T . GA . A GC . C G C . CA . G . G T . G . C . C . C .							
	90	100	110	120	130	140	150	160
<i>Lagria villosa</i>	GAGTTAAAAACCTCATCGTTATCGTCTGGTACTGTTGCTCTACGAGAAATTCGTCGTTATCAAAAAAGTACTGAATTG							
<i>Pimelia atlantis</i>	. T . G C CA . A . C . A . C . C . C . T . T C . A C							
<i>Tenebrio molitor</i>	. C . C . G . G . C . C CA . A C . G G . T . G . C C . G C . G . .							
<i>Gnathacerus cornutus</i>	. T . C . G C CA . G . C G . C . C . T . T . G G . C C . T .							
<i>Latheticus oryzae</i>	. T . A CA . G . A . A . C T . T C . GC . T							
<i>Tribolium brevicornis</i>	. . . C C . C CA . G . A . A . C . A . C . T . C . G . C G . G . C . G							
	170	180	190	200	210	220	230	240
<i>Lagria villosa</i>	CTTATTCGTAAATTACCTTTTCAACGCTTAGTTCGTGAAATCGCTCAAGATTTCAAAAGTACTGATTACGTTTCCAAAGTTTC							
<i>Pimelia atlantis</i>	T . A G . G . G C T . G . CA . A A . R . C G . A . CC . C T . G							
<i>Tenebrio molitor</i>	. . C . C . C . GC . T . C T . G . GA . G . G G C . G . C C							
<i>Gnathacerus cornutus</i>	T . G . C . C . GC . G C TC . C . C . A . G C G . C . C . C							
<i>Latheticus oryzae</i>	T . A C . C . G . A . C TC . T . AA . A T . G T T							
<i>Tribolium brevicornis</i>	T . G . CA . G . GC G . C TC . G . GA . A . G . T . C . G . C . T . G . C . CC . G G							
	250	260	270	280	290	300	310	
<i>Lagria villosa</i>	AGCTGTAATGGCTTTACAAGAAGCAAGTGAAGCTTATTGGTTCGGTCTATTTGAAGACACCAACCTATGCGCCAA							
<i>Pimelia atlantis</i>	T G CC . T . G C . C C . C C . T T TT T .							
<i>Tenebrio molitor</i>	C . C . G CC . C . G G . C C . C G . C . G G . TT . G T .							
<i>Gnathacerus cornutus</i>	G . C . G AC . T C . C . G C . C C . C T . G T .							
<i>Latheticus oryzae</i>	 T T A T . A . T T . A . T . G T .							
<i>Tribolium brevicornis</i>	G . G . G AC . C . G . G . G . C . G C . C T . C T . T G T .							

B

Figura 1 – A. Sequência consenso parcial do gene da histona H3 de *Lagria villosa* com 315 pares de bases. **B.** Alinhamento parcial do gene de histona H3 de *L. villosa* com sequências de histona H3 de outras espécies depositadas no GenBank. (Acessos: AJ566027.1, EU048316.1, EU048314.1 E EU048315.1).

A

B

Figura 2 – A. Sequência consenso parcial do gene DNAr 5S de *Lagria villosa* com 94 pares de bases. **B.** Alinhamento parcial do gene de DNAr 5S de *L. villosa* com sequências de DNAr 5S de outras espécies depositadas no GenBank. Acessos: (GQ443312.1 E X83208.1).

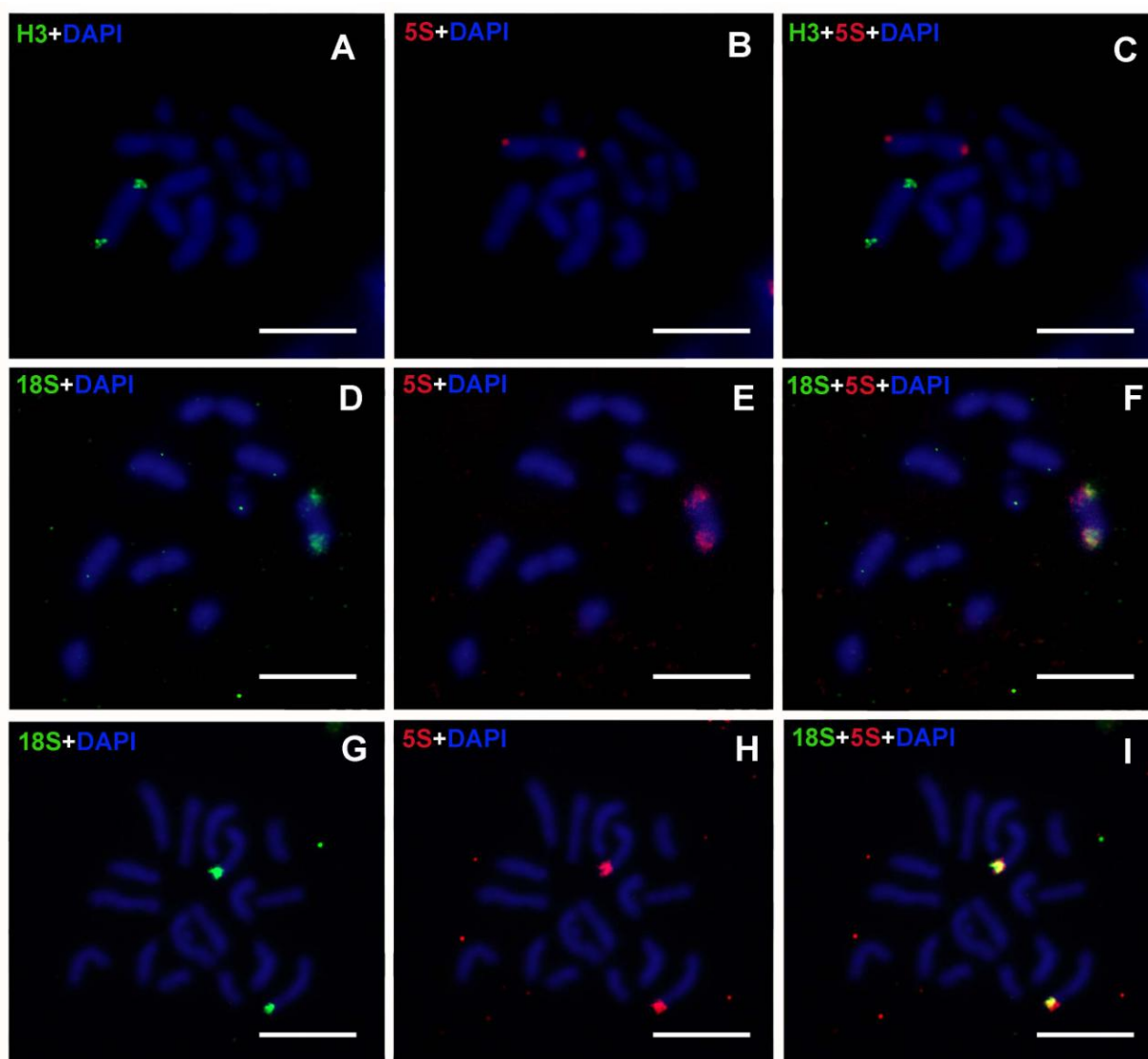


Figura 3 – Células metafásicas de *Lagria villosa* submetidas a FISH com sondas DNAr 18S (verde), DNAr 5S (Vermelho) e histona H3.(Verde) **A.** e **B.** Metáfase I submetida a dupla-FISH com sondas DNAr 5S e histona H3. **C.** Sobreposição das imagens vistas em **A.** e **B.** mostrando os cístrons, DNAr 5S e histona H3, estão em pares autossômicos diferentes **D.** e **E.** Metáfase I submetida a dupla-FISH com sondas DNAr 5S e 18S. **F.** Sobreposição das imagens vistas em **D.** e **E.** mostrando que os cístrons ribossomais são sintênicos **G.** e **H.** Metáfase mitótica submetida a dupla-FISH com sondas DNAr 5S e 18S. **I.** Sobreposição das imagens vistas em **G.** e **H.** confirmando a colocalização dos cístrons ribossomais. Escala=10 μ m

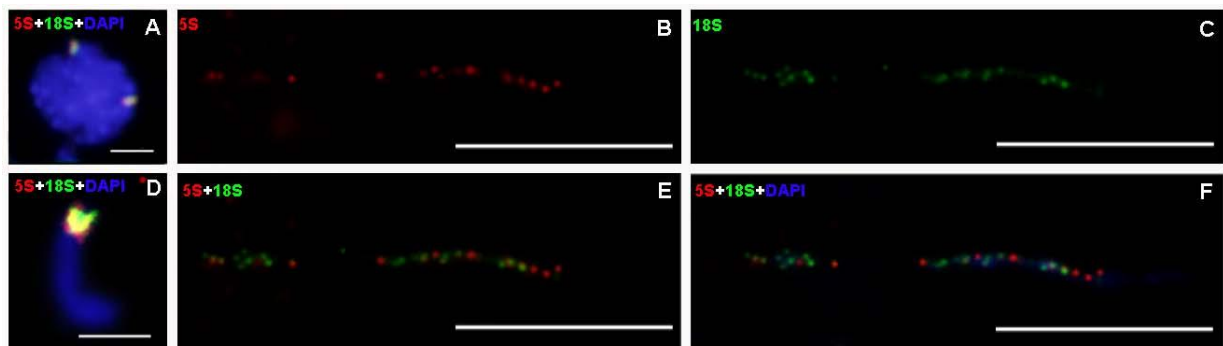


Figura 4 – Dupla-FISH com sondas ribossomais de DNAr 5S (Vermelho) e DNAr 18S (Verde) em *L. villosa*. **A.** núcleo interfásico com sítios sobrepostos **D.** cromossomo metafásico mostrando os sítios ribossomais colocalizados no braço curto do par submetacêntrico 4. **B, C, E, e F** Dupla-fiber-FISH cromática em células de gônada pré-fixadas, mostrando em **E e F** que os sítios sintênicos e colocalizados são inter espaçados. **A. e D.** Escala = 5 μ m. **B. C. E. e F.** Escala = 10 μ m.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho foi analisado ao nível citogenético a espécie *Lagria villosa* (Tenebrionidae), contribuindo para os estudos da evolução cromossômica dessa família, além de fornecer mais informações sobre a subfamília Lagriinae, da qual os dados citogenéticos, presentes na literatura, são escassos.

Entre as diferenciações cromossômicas observadas em *L. villosa* foi descrita a redução de um par autossômico em relação ao cariótipo ancestral proposto para a ordem Coleoptera ($2n=20=9II+Xy_p$). É possível que o processo de fusão cêntrica entre os autossomos tenha ocorrido nessa espécie, uma vez que esse processo é proposto como sendo um dos responsáveis pelas modificações cariotípicas em Tenebrionidae. Outra diferenciação no cariótipo dessa espécie foi a alteração da morfologia metacêntrica para acrocêntrica e submetacêntrica para a maioria dos cromossomos. Essa mudança na morfologia cromossômica pode ter ocorrido por rearranjos do tipo inversão pericêntrica.

Assim como descrito para Tenebrionidae, a espécie *L. villosa* apresentou uma grande quantidade de heterocromatina em todos os cromossomos e predominância nas regiões pericentroméricas, com exceção do cromossomo y_p . No entanto, não se exclui a possibilidade de haver heterocromatina nesse cromossomo. Neste sentido, a utilização de técnicas como a FISH, utilizando sondas de DNAs repetitivos, poderia ajudar a elucidar a evolução cromossômica do sistema Xy_p . Ainda é pouco claro o mecanismo envolvido no reconhecimento, associação e posterior segregação cromossômica do X e y_p durante a meiose dos Coleoptera. Os estudos em espécies onde não ocorre sinapse e recombinação são relevantes para descobrir os mecanismos alternativos que possam promover corretamente a posterior segregação cromossômica durante a meiose I.

A diferença na localização das regiões organizadoras de nucléolo detectada pela FISH nos autossomos e pela impregnação pelo íon prata nos cromossomos sexuais já foi descrita para muitas espécies com sistema Xy_p , isso se deve ao fato de técnica de impregnação pelo íon prata ter afinidade a uma substância argirofílica

presente no lúmen do bivalente sexual. Os experimentos realizados para testar a natureza do material presente no lúmen do bivalente Xy_p mostraram que a composição dessa substância é proteica. Estes resultados estão de acordo com Virkki *et al.* (1991), os quais sugeriram que o material encontrado no lúmen do Xy_p seria uma substância argirofílica, semelhante as proteínas do Complexo Sinaptonêmico. Essa hipótese é reforçada através dos resultados obtidos com microscopia eletrônica, os quais mostraram um aumento gradual do material eletrondenso associado aos elementos axiais dos cromossomos X_p e y_p , indicando uma possível agregação de proteínas.

O mapeamento físico mostrando a associação interespaçada entre os DNAs ribossomais (45S e 5S), observado para *L. villosa*, é descrita pela primeira vez para ordem Coleoptera. Os dados disponíveis sobre esse tipo de associação, ou mesmo entre outras famílias gênicas, ainda são escassos, porém já é possível notar interessantes padrões de organização molecular desses DNAs, sendo relatada na literatura a associação entre 45S/histona H3, 5S/histona e agora neste presente trabalho a associação 45S e 5S. Além disso, a associação entre os cístrons 45S e 5S poderia ser uma evidencia para a proposta de fusão entre dois pares de cromossomos em *L. villosa*.

Os diferentes tipos de associação entre famílias gênicas nos Coleoptera, revelam um campo promissor de estudos na citogenéticas evolutiva, principalmente com a utilização e desenvolvimento de técnicas que permitam melhor abordar e inferir sobre a posição desses DNAs, por exemplo a utilização de técnicas como Southern Blot ou Fiber-FISH. A utilização desta última no presente trabalho, mostrou ser um eficiente método para responder questões que envolvam tais DNAs pois aumentou consideravelmente a resolução do mapeamento físico da dupla FISH, o que permitiu demonstrar que os genes ribossomais estão dispostos de maneira intercalar no cromossomo.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, M.C.; ZACARO, A.A.; CELLA, D.M. Cytogenetic analysis of *Epicauta atomaria* (Meloidae) and *Palembus dermestoides* (Tenebrionidae) with Xy_p sex determination system using standart staining, C-bands, NOR and synaptonemal complex microspreading techniques. **Hereditas**, v.133, p.147-157, 2000.

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. 729-34, 2010.

ANDREWS, M.T.; VAUGHN, J.C.; PERRY, B.A.; BAGSHAW, J.C. Interspersion of histone and 5S RNA genes in *Artemia*. **Gene**, v.51, p.61–67, 1987.

AKSOY, S.; SHAY, G.L.; VILLANUEVA, M.S.; BEARD, C.B.; RICHARDS, F.F. Spliced leader RNA sequences of *Trypanosoma rangeli* are organized within the 5s rRNA encoding genes. **Gene**, v.113, p.239-243, 1992.

BARROS, A.V.; SCZEPANSKI, T.S.; CABRERO, J.; CAMACHO, J.P.M.; VICARI, M.R.; ARTONI, R.F. Fiber FISH reveals different patterns of high-resolution physical mapping for repetitive DNA in fish. **Aquaculture**, v.322-323, p.47–50, 2011.

BARZOTTI, R.; PELLICCIA, F.; BUCCIARELLI, E.; ROCCHI, A. Organization, nucleotide sequence, and chromosomal mapping of a tandemly repeated unit containing the four core histone genes and a 5S rRNA gene in an isopod crustacean species. **Genome**, v.43. p.341–345, 2000.

BAHER, M. Vergleichende Untersuchungen am Skelett und an der Coxalmuskulatur des Prothorax der Coleoptera. Ein Beitrag zur Klärung der phylogenetischen

Beziehungen der Adephaga (Coleoptera, Insecta). **Zoologica**, v.44, p.1–76, 1979.

BEUTEL, R.G.; HAAS, F. Phylogenetic relationships of the suborders of Coleoptera (Insecta). **Cladistics**, v.16, p.103–141. 2000.

BIONE, E.; CAMPAROTO, M.L.; SIMÕES, Z.L.P. A study of the constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions of *Isocopris inhiata* and *Diabroctis mimas* (Coleoptera: Scarabaeidae, Scarabaeinae) using C-banding, AgNO₃ staining and FISH techniques. **Genetics and Molecular Biology**, v.28, p.111-116, 2005.

BISOI, M.R.; PATNAIK, S.C. A chromosome study of seven species of Indian Coleoptera (Meloidae, Tenebrionidae and Coccinellidae). **Caryologia**, v. 41, p.309-321, 1988.

BOUCHARD, P.; LAWRENCE, J.F.; DAVIES, A.E.; NEWTON, A.F. Synoptic Classification of the World Tenebrionidae (Insecta: Coleoptera) With a Review of Family-Group Names. **Annales Zoologici** (Warszawa), v.55, p.499-530, 2005.

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

CABRAL-DE-MELLO, D.C.; MARTINS, C. 2010. Breaking down the genome organization and karyotype differentiation through the epifluorescence microscope lens: insects and fish as models. pp. 658-669. In: MÉNDEZ-VILAS, A.; DÍAZ, J. (Eds.). **Microscopy: Science, Technology, Applications and Education**.

CABRAL-DE-MELLO, D.C.; MOURA, R.C.; MARTINS, C. Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the beetle *Dichotomius geminatus* provides the first evidence for an association of 5S rRNA and histone H3 genes in insects, and repetitive DNA similarity between the B chromosome and A complement. **Heredity**, v.104, p.393-400, 2010.

CABRAL-DE-MELLO, 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, CABRERO, J.; LÓPEZ-LEÓN, M.D.; CAMACHO, J.P. 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 multigene families and heterochromatin. **BMC Genetics**, v.12, p.2–12, 2011c.

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

CABRERO, J.; LÓPEZ-LEÓN, M.D.; TERUEL, M.; CAMACHO, J.P. Chromosome mapping of H3 and H4 histone gene clusters in 35 species of acridid grasshoppers. **Chromosome research**, v.17, p.397–404, 2009.

COSTA, C. Estado de conocimiento de los Coleoptera neotropicales. **Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa (Versión Eletronica)** 32. 2003. Disponível em: < <http://www.sea-entomologia.org/aracnet/11/01/index.htm> > acessado em: ago. 2010.

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

COLOMBA, M.S.; VITTURI, R.; CASTRIOTA, L.; BERTONI, A.; LIBERTINI, A. FISH mapping of 18S 28S and 5S ribosomal DNA, (GATA)_n and (TTAGGG)_n telomeric repeats in the periwinkle *Melarhaphe neritoides* (Prosobranchia, Gastropoda, Caenogastropoda). **Heredity**, v.88, p.381–384, 2002.

COLOMBA, M.S.; VITTURI, R.; VOLPE, N.; LANNINO, A.; ZUNINO, M. Karyotype, banding and rDNA FISH in the scarab beetle *Anoplotrupes stercorosus* (Coleoptera Scarabaeoidea: Geotrupidae). Description and comparative analysis. **Micron**, v.35, p.717–720, 2004.

COLOMBA, M.S.; VITTURI, R.; LIBERTINI, A.; GREGORINI, A.; ZUNINO, M. Heterochromatin of the scarab beetle, *Bubas bison* (Coleoptera: Scarabaeidae) II. Evidence for AT-rich compartmentalization and a high amount of rDNA copies. **Micron**, v.37, p.47–51, 2006.

DE LA FUENTE, R.; PARRA, M.T.; VIERA, A.; CALVENTE, A.; GÓMEZ, R.; SUJA, J.A.; RUFAS, J.S.; PAGE, J. Meiotic pairing and segregation of achiasmate sex chromosomes in Eutherian Mammals: The role of SYCP3 protein. **Plos Genetics**, v.3, p.2122-2134, 2006.

DE LA RÚA, P.; SERRANO, J.; HEWITT, G.M.; GALIÁN, J. Physical mapping of rDNA genes in the ground beetle *Carabus* and related genera (Carabidae: Coleoptera). **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v.34, p.95-101, 1996.

DRETS, M.E., CORBELL, E., FOLLE, G.A. C-banding and non-homologous associations. **Chromosoma**, v.88, p.249-55, 1983.

DROUIN, G.; SÉVIGNI, J.-M.; MCLARES, I.A.; HOFMAN, J.D.; DOOLITTLE, W.F. Variable arrangement of 5S ribosomal genes within the ribosomal DNA repeats of arthropods. **Molecular Biology and Evolution**, v.9, p.826–835, 1992.

DROUIN, G.; MONIZ DE SÁ, M. The concerted evolution of 5S ribosomal genes linked to the repeated units of other multigene families. **Molecular Biology and Evolution**, v.12, p.481–493, 1995.

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

EIRÍN-LÓPEZ, J.M.; RUIZ, M.F.; GONZÁLEZ-TIZÓN, A.M.; MARTÍNEZ, A.; SÁNCHEZ, L.; MÉNDEZ, J. Molecular evolutionary characterization of the mussel *Mytilus* histone multigene family: first record of a tandemly repeated unit of five histone genes containing an H1 subtype with “orphon” features. **Journal of Molecular Evolution**, v.58, p.131–144, 2004.

ENGEL, J.D.; DODGSON, J.B. Histone genes are clustered but not tandemly repeated in the chicken genome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.78, p.2856-2860, 1981.

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

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.231-39, 1984.

GALIÁN, J.; SERRANO, J.; DE LA RÚA, P.; PETITPIERRE, E. and JUAN, C. Localization and activity of rDNA genes in tiger beetles (Coleoptera: Cicindelidae). **Heredity**, v.74, p.524-530, 1995.

GALIÁN, J.; HUDSON, P. Cytogenetic analysis of Australian tiger beetles (Coleoptera: Cicindelidae): chromosome number, sex-determining system and localization of rDNA genes. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v.37, p.1–6, 1999.

GALIÁN, J.; PROENÇA, S.J.R.; VOGLER, A.P. Evolutionary dynamics of autosomal-heterosomal rearrangements in a multiple-X chromosome system of tiger beetles (Cicindelidae). **BMC Evolutionary Biology**, v.7, p.1-10, 2007.

GALLO, D. et. al. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 920p, 2002.

GILLOTT, C. **Entomology**, Dordrecht: Springer. 831p. 2005.

GÓMEZ-ZURITA, J.; PONS, J.; PETITPIERRE, E. The evolutionary origin of a novel karyotype in *Timarcha* (Coleoptera, Chrysomelidae) and general trends of chromosome evolution in the genus. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v.42, p.332-341, 2004.

GRIMALDI, D.; ENGEL M. S. **Evolution of the Insects**. New York: Cambridge University Press, 755 p, 2006.

HALL, T.A. BioEdit: A User-friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**. n. 41, p. 95 – 98, 1999.

HOLECOVÁ, M.; ROZEK, M. and LACHOWSKA, D. The first cytogenetic on *Laena reitteri* Weise, 1877 (Coleoptera, Tenebrionidae, Lagriinae) with notes on karyotypes of darkling beetles. **Folia biologica (Kraków)**, v. 56, p. 213-217, 2008.

HOWELL, W.M.; BLACK, D.A. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**, v.36, p.1014-15, 1980.

JOHN, B.; LEWIS, K.R. Nucleolar controlled segregation of the sex chromosomes in beetles. **Heredity**, v.15, p.431-39, 1960.

JOHN, B., SHAW, D.D. Karyotype variation in dermestid beetles. **Chromosoma**, v.20, p.371-85, 1967.

JOHN, B. **Meiosis**. Great Britain: Cambridge University Press. 1990, 396p.

JUAN, C.; PETITPIERRE, E. A chromosome survey of North African and Eastern Mediterranean tenebrionids (Coleoptera). **Cytobios**, v.54, p.85-94, 1988.

JUAN, C.; PETITPIERRE, E. C-banding and DNA content in seven species of Tenebrionidae (Coleoptera). **Genome**, v.32, p.834-39, 1989.

JUAN, C.; PETITPIERRE, E.; OROMÍ, P. Chromosomal analyses on tenebrionides (Coleoptera) from the Canary Islands. **Cytobios**, v.57, p.33-41, 1989.

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

JUAN, C.; GOSÁLVEZ, J.; PETITPIERRE, E. Improving beetle karyotype analysis: restriction endonuclease banding of *Tenebrio molitor* chromosomes. **Heredity**, V.65, p.157-62, 1990.

JUAN, C.; GONSALVEZ, J.; MEZZANOTTE, R.; PETITPIERRE, E. Cytological and biochemical characterization of the in situ endonuclease digestion of fixed *Tenebrio molitor* chromosomes. **Chromosoma**, v.100, p.432–438, 1991.

JUAN, C.; E. PETITPIERRE. 1991. Chromosome numbers and sex-determining mechanisms in Tenebrionidae (Coleoptera). pp. 167-76. In: Zunino, M., Belles X. and Blas M. (eds.) **Advances in Coleopterology**, European Association of Coleopterology, Barcelona.

JUAN, C.; PONS, J.; PETITPIERRE, E. Localization of tandemly repeated DNA sequences in beetle chromosomes by fluorescent in situ hybridization. **Chromosome Research**, v.1, p.167-74, 1993.

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

KAPLAN F.S.; MURRAY, J.; SYLVESTER, J.E.; GONZALEZ, I.L.; O'CONNOR, 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.

KLAUSNITZER, B. Probleme der Abgrenzung von Unterordnungen bei den Coleoptera. **Entomology Staatliches Museum für Tierkunde in Dresden**, v.40, p.269–275, 1975.

KUKALOVÁ-PECK, J.; LAWRENCE, J.F. Evolution of the hind wing in Coleoptera. **The Canadian Entomologist**, v.125, p.181–258, 1993.

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

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

LIFTON, R.P.; GOLDBERG, M.L.; KARP, R.W.; HOGNESS, D.S. The organization of the histone genes in *Drosophila melanogaster*: Functional and evolutionary implications. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**. v.42, p.1047-1051, 1977.

LOIDL, J.; JONES, G.H. Synaptonemal complex spreading in *Allium*. I. Triploid *A. sphaerocephalon*. **Chromosoma**, v.73, p.420-8, 1986.

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

MAFFEI, E.M.D.; POMPOLO, S.G.; CAMPOS, L.A.O.; PETITPIERRE, E. Sequential FISH analysis with rDNA genes and Ag-NOR banding in the lady beetle *Olla v-nigrum* (Coleoptera, Coccinellidae). **Hereditas**, v.135, p.13-18, 2001.

MAFFEI, E.M.D.; POMPOLO, S.G.; PETITPIERRE, E. C-banding and fluorescent *in situ* hybridization with rDNA sequences in chromosomes of *Cycloneda sanguinea* Linnaeus (Coleoptera, Coccinellidae). **Genetics and Molecular Biology**, v.27, p.191-195, 2004.

MARTINEZ, J.L.; MORAN, P.; GARCIA-VAZQUEZ, E.; PENDÀS, A.M. Chromosomal localization of the major and 5S rRNA genes in the European eel (*Anguilla anguilla*). **Cytogenetics and Cell Genetics**, v.73, p.149–152, 1996.

MARTÍNEZ-NAVARRO, E.M.; SERRANO, J.; GALIÁN, J. Chromosome evolution in ground beetles: localization of the rDNA loci in the tribe Harpalini (Coleoptera, Carabidae). **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v.42, p.38-43, 2004.

MARTINS, V.G. The chromosomes of five species of scarbaeidae (Polyphaga, Coleoptera). **Naturalia**, v.19, p.89-96, 1994.

MARINONI, R.C.; GANHO, N.G.; MONNE, M.L.; MERMUDES, J.R.M. **Hábitos alimentares em Coleoptera (Insecta)**. Riberão Preto: Editora 121 Holos, p 63, 2001.

MERKL, O. Redescription of *Lagria* (Apteronympha) *tenenbaumi* Pic, 1929, with a checklist of the Western Palaearctic species of the genus *Lagria* F. (Coleoptera: Tenebrionidae: Lagriini). **Proceedings of the Russian Entomological Society**, v.77, p.219–225, 2006.

MOURA, R.C., SOUZA, M.J., MELLO, N.F., LIRA-NETO, A.C. Karyotypic characterization of representatives from Melolonthinae (Coleoptera: Scarabaeidae): karyotypic analysis, banding and fluorescent in situ hybridization (FISH). **Hereditas**, v.138, p.200-206, 2003.

MOURA, L.A. 2007. Coleópteros terrestres. pp. 210-229. In: BECKER, F.G.; RAMOS, R.A.; MOURA, L.A. (Eds.). **Biodiversidade. Regiões da Lagoa do Casamento e dos Butiazaís de Tapetes**. Ministério do Meio Ambiente e Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, Brasília, 387 p.

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

NAGODA, N.; FUKUDA, A.; NAKASHIMA, Y.; MATSUO, Y. Molecular characterization and evolution of the repeating units of histone genes in *Drosophila americana*: coexistence of quartet and quintet units in a genome. **Insect Molecular Biology**, v.14, p.713–717, 2005.

NEI, M.; ROONEY, A.P. Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. **Annual Review of Genetics**, v.39, p.121–152, 2005.

PAGE, S.L.; HAWLEY, R.S. The genetics and molecular biology of the synaptonemal complex. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**., v.20, p.525–58, 2004.

PALMER, M.; PETITPIERRE, E. New chromosomal findings on Tenebrionidae (Coleoptera) from the Western Mediterranean. **Caryologia**, v.50, p.117-123, 1997.

PETITPIERRE, E., JUAN, C., PONS, J., PLOHL, M., UGARKOVIĆ, D. Satellite DNA and constitutive heterochromatin in tenebrionid beetles. In: BRANDHAM, P. E.; BENNETT, M. D. (Eds.) **Kew Chromosome Conference IV**, pp. 351-362, Royal Botanic Gardens, Kew. 1995.

PETITPIERRE, E. Molecular cytogenetics and taxonomy of insects, with particular reference to the Coleoptera. **International Journal of Insect Morphology and Embryology**. Vol. 25, n. 1/2, p. 115-133, 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, n. 9, p. 2934–2938, 1986.

PISANO, E.; GHIGLIOTTI, L. Ribosomal genes in notothenioid fishes: focus on the chromosomal organisation. **Marine Genomics**, v.2, p.75–80, 2009.

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

PONS, J.; PETITPIERRE, E.; JUAN, C. Characterization of the heterochromatin of the darkling beetle *Misolampus goudoti*: cloning of two satellite DNA families and digestion of chromosomes with restriction enzymes. **Hereditas**, v.119, p.179–185, 1993.

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

PONS, J. Evolution of diploid chromosome number, sex-determining systems, and heterochromatin in Western Mediterranean and Canarian species of the genus *Pimelia* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v.42, p.81-85, 2004.

POSTIGLIONI, A.; BRUM-ZORRILLA, N. Non-relationship between nucleolus and sex chromosome system Xy, in *Chelymorpha variabilis* Boheman (Coleoptera: Chrysomelidae). **Genetica**, v.77, p.137-41, 1988.

POSTIGLIONI, A.; STOLL, M.; BRUM-ZORRILLA, N. Haploid karyotype analysis of *Chelymorpha variabilis* Boheman (Coleoptera, Chrysomelidae) with microspreading techniques. **Revista Brasileira de Genética**, v.14, p.653-60, 1991.

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

PROENÇA, S.J.R.; SERRANO, A.R.M.; COLLARES-PEREIRA, M.J. Cytogenetic variability in genus *Odontocheila* (Coleoptera, Cicindelidae): karyotypes, C-banding, NORs and localization of ribosomal genes of *O. confuse* and *O. nodicornis*. **Genetica**, v.114, p.237–245, 2002b.

PROENÇA, S.J.R.; GALIÁN, J. Chromosome evolution in the genus *Cicindela*: Physical mapping and activity of rDNA loci in the tiger beetles species *Cicindela littoralis* and *C. flexuosa*. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v.41, p.227-232, 2003.

PROENÇA, S.J.R.; SERRANO, A.R.M.; COLLARES-PEREIRA, M.J. Cytogenetic variability in three species of the genus *Cicindela* (s.l.) (Coleoptera, Cicindelidae):

Karyotypes and localization of 18S rDNA genes. **Genetics and Molecular Biology**, v.27, p.555-560, 2004.

RAAP, A.K. Advances in fluorescence in situ hybridization. **Mutation Research**, v.400, p.287–298, 1998.

RAAP, A.K.; FLORIJN, R.J.; BLONDEN, L.A.J.; WIEGANT, J.; VAANDRAGER, J.; VROLIJK, H.; DUNNEN, J.; TANKE, H.J.; van Ommen, G. Fiber FISH as a DNA mapping tool. **Methods: A Companion to Methods in Enzymology**, v.9, p.67–73, 1996.

ROEHRDANZ, R.; HEILMANN, L.; SENECHAL, P.; SEARS, S.; EVENSON, P. Histone and ribosomal RNA repetitive gene clusters of the boll weevil are linked in a tandem array. **Insect Molecular Biology**, v.19, p. 463–471, 2010.

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

RUBERTI, I.; FRAGAPANE, P.; PIERANDREI-AMALDI, P.; BECCARI, E.; AMALDI, F.; BOZZONI, I.; Characterization of histone genes isolated from *Xenopus laevis* and *Xenopus tropicalis* genomic libraries. **Nucleic Acids Research**, v.10, p.1544-1550, 1982.

SCHMEKEL, K.; WAHRMAN, J.; SKOGLUND, U.; DANEHOLT, B. The central region of the synaptonemal complex in *Blaps cribosa* studied by electron microscope tomography. **Chromosoma**, v.102, p.669-681, 1993.

SCHNEIDER, M. C.; ROSA, S. P.; ALMEIDA, M. C.; COSTA, C. and 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.

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

SERRANO, J. Chromosome numbers and karyotype evolution of Caraboidea. **Genetica**, v.55, p.51-60, 1981.

SMITH, S.G. The cyto-taxonomy of Coleoptera. **The Canadian Entomologist**, v.82, p.58-68, 1950.

SMITH, S.G.; Evolutionary changes in the sex chromosomes of Coleoptera. **Genetica**, v.25, p.522-4, 1951.

SMITH, S.G. The cytology of some tenebrionid beetles (Coleoptera). **Journal Morphology**, v. 91, p. 325-364, 1952.

SMITH, S.G. The cytology of some tenebrionid beetles (Coleoptera). **Journal of Morphology**, v.91, p.325-64, 1953.

SMITH, S.G.; VIRKKI, N. **Animal cytogenetic**, v.3, Insecta 5. Coleoptera. Gebruder Borntraeger. Berlin. 1978. 366p.

SUMNER, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**. 75: 304-306, 1972.

SUMNER, A.T. **Chromosome Banding**. London: Unwin Hyman, 433p, 1990.

SUMNER, A.T. **Chromosomes Organization and Function**. Blackwell Publishing: North Berwick, 287p, 2003.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment Through Sequence Weighting,

Position-specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice. **Nucleic Acids Research**, n. 22, p. 4673 – 4680, 1994.

TRIPLEHORN, C. A.; N. F. JOHNSON. **Borror and DeLong's Introduction to the Study of Insects**. Belmont: Thomson Brooks/Cole, 864p, 2005.

UGARKOVIĆ, D.; PLOHL, M.; PETITPIERRE, E.; LUCIJANIĆ-JUSTIĆ, V.; JUAN, C. *Tenebrio obscurus* satellite DNA is resistant to cleavage by restriction endonucleases in situ. **Chromosome Research**, v.2, p.217-223, 1994.

UGARKOVIĆ, D.; DURAJLIJA, S.; PLOHL, M. Evolution of *Tribolium madens* (Insecta, Coleoptera) satellite DNA through DNA inversion and insertion. **Journal of Molecular Evolution**, V.42, P.350–358. 1996.

UGARKOVIĆ, D., PLOHL, M., Variation in satellite DNA profiles – Causes and effects. **EMBO Journal**. v.21, p.5955-5959, 2002.

VAHIDI, H.; CURRAN, J.; NELSON, D.W.; WEBSTER, J.M.; MCCLURE, M.A.; HONDA, B.M. Unusual sequences, homologous to 5s RNA, in ribosomal DNA repeats of the nematode *Meloidogyne arenaria*. **Journal of Molecular Evolution**, v.27, p.222–227, 1988.

VANIN A.S.; IDE S. Classificação comentada de Coleoptera. In: Costa C.; Vanin S.A.; Lobo J.M.; Melic A. (eds) **Proyecto de red Iberoamericana de biogeografía y entomología sistemática PRIBES 2002**. Sociedad Entomológica Aragonesa (SEA) & Cyted, Zaragoza, 2002. pp. 193–205.

VICARI, M.R.; ARTONI, R.F.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C. Colocalization of repetitive DNAs and silencing of major rRNA genes. A case report of the fish *Astyanax janaeirensis*. **Cytogenetic and Genome Research**, v.122, p.67–72, 2008.

VIRKKI, N. Rapid allocyclic changes in the centric and arm segment of the X chromosome in meiosis of male *Omophoita superba* Weise (Coleoptera, Alticidae).

Hereditas, v.58, p.262-264, 1967.

VIRKKI, N. Chromosomes in evolution of Coleoptera. In: SHARMA, A. K.; SHARMA, A. (eds.) **Chromosomes in Evolution of Eukaryotic Groups**. CRC Press, Boca Raton, FL. 1984, p.71-76.

VIRKKI, N.; MAZZELLA, C.; DENTON, A. Silver staining of the coleopteran Xy_p sex bivalent. **Cytobios**, v. 67, p. 45-63, 1991.

VITTURI, R.; CATALANO, E.; SPARACIO, I.; COLOMBA, M.S. and MORELLO, A. Multiple-chromosome sex systems in the darkling beetles *Blaps gigas* and *Blaps gibba* (Coleoptera, Tenebrionidae). **Genetica**, V. 97, p.225-233, 1996.

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

VITTURI, R.; COLOMBA, M.; PIRRONE, A.M.; MANDRIOLI, M. rDNA (18S–28S and 5S) co-localization and linkage between ribosomal genes and (TTAGGG)_n telomeric sequence in the earthworm *Octodrilus complanatus* (Annelida: Oligochaeta: Lumbricidae) revealed by single- and double-colour FISH. **The Journal of Heredity**, v.93, p.279–282, 2002.

VITTURI, R.; SINEO, L.; VOLPE, N.; LANNINO, A.; COLOMBA, M. Repetitive DNAs in the slug *Milax nigricans*: association of ribosomal (18S–28S and 5S rDNA) and (TTAGGG)_n telomeric sequences in the slug *M. nigricans* (Mollusca: Gastropoda: Pulmonata). **Micron**, v.35, p.255–260, 2004.

ZACARO, A.A.; ALMEIDA, M.C.; CELLA, D.M. Recombination nodules in coleopteran species: *Palembus dermestoides* (Tenebrionidae) and *Epicauta atomaria* (Meloidae). **Cytogenetic and Genome Research**, v.103, p.185-191, 2003.

ZHANG, Z.; SCHWARTZ, S.; WAGNER, L.; MILLER, W. A Greedy Algorithm for

Aligning DNA Sequences. **Journal of Computational Biology**. v. 7, n.1–2, p. 203 – 514, 2000.

YADAV J. S.; PILLAI R. K. Chromosome number and sex determining mechanism in twenty eight species of Coleoptera. **The Coleopterists Bulletin**, v.16, p20-22, 1974a.

YADAV J. S.; PILLAI R. K. Karyological studies on Tenebrionidae (Coleoptera). **Zoologischer Anzeiger Jena**. V.193, p.323-331, 1974b.

YADAV, J.S.; PILLAI, R.K. Evolution of karyotype in Tenebrionidae (Coleoptera: Insecta). **Proceedings of the Dunn Dobzhansky Symposium in Genetics.**, p. 280-290, 1976.

YADAV J. S., PILLAI R. K., KARAMJEET Chromosome numbers of Tenebrionidae (Polyphaga: Coleoptera). **Biologia**, v.26, p.31-42, 1980.

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

YADAV, J.S.; PILLAI, R.K.; YADAV, A.S. Karyological analysis of six species of Tenebrionidae (Coleoptera, Polyphaga). **Folia biologica (Kraków)**, v.42, p.23-26, 1994.

WATT, J. C. A revised subfamily classification of Tenebrionidae (Coleoptera). **New Zealand Journal of Zoology**, v.1, p.381-452, 1974.

WEBB, G.C.; WHITE, M.J.D.; CONTRERAS, N.; CHENEY, J. Cytogenetics of the parthenogenetic grasshopper *Warramabal* (formely *Moraba*) *virgo* and its bisexual relatives. IV. Chromosomes banding studies. **Chromosoma**, v.67, p.309-39, 1978.

WEITH, A. The fine structure of euchromatin and centromeric heterochromatin in *Tenebrio molitor* chromosomes. **Chromosoma**, v.91, p.287-296, 1985.

WHITE, M.J.D. **Animal Cytology and Evolution**. London: Willian Clowes & Sons, 1973. 916p.

WOLF, K.W. The structure of the Xy_p sex chromosome complex in male meiosis of two beetle: *Tenebrio molitor* (Tenebrionidae) and *Chrysolina graminis* (Chrysomelidae). **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.53, p.162-167, 1997.

7 Anexos

7.1 Citogenética Convencional

7.1.1 Metodologia para estudo de cromossomos de obtidas a partir de gônadas descrita por Almeida *et al.* (2000).

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

7.1.2 Obtenção de metáfases para estudo de cromossomos mitóticos segundo Webb *et al.* (1988)

As preparações citológicas, para o estudo de cromossomos mitóticos, foram realizadas a partir das gônadas, de acordo com a técnica descrita por WEBB *et al.* (1978), com algumas modificações, descritas a seguir:

1. Dissecar os ovos em solução fisiológica para insetos, retirar o órgão e transferi-lo para um frasco, contendo colchicina 0,05% (em solução fisiológica para insetos), durante 2 horas;
2. acrescentar um volume de água de torneira igual ao de colchicina, por 15 minutos;
3. adicionar 10 gotas de fixador Carnoy I (metanol - ácido acético, na proporção 3:1), durante 5 minutos;
4. transferir os órgãos para uma placa de Petri, contendo fixador Carnoy I durante 30 minutos, no mínimo;
5. macerar o órgão, juntamente com uma gota de ácido acético 45%, sobre uma lâmina;

6. secar a lâmina em uma placa de metal à temperatura de 35 a 40°C.

7.1.3 Coloração Convencional Segundo Giemsa

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

7.1.4 Coloração Diferencial

7.1.4.1 Técnica de impregnação pelo íon prata das regiões organizadoras de nucléolo segundo Howell & Black (1980), com algumas modificações.

1. Colocar sobre a lâmina uma gota de solução coloidal reveladora (1g de gelatina Merck ou comercial, dissolvida em 50 ml de água destilada e 0,5 ml de ácido fórmico) e duas gotas de solução de nitrato de prata (50%);
2. cobrir com uma lamínula e incubar em câmara úmida, durante 5 minutos, à temperatura de 67°C;
3. lavar em água destilada e secar ao ar.

7.1.4.2 Técnica de obtenção de Bandas C segundo Sumner (1972)

1. lavar a lâmina, duas vezes, em solução de ácido clorídrico (0.1N), à temperatura ambiente;
2. tratar a lâmina com solução de hidróxido de bário octahidratado a 5%, durante 3 segundos, à temperatura de 30°C;
3. lavar a lâmina, duas vezes, em solução de ácido clorídrico (0.1N), à temperatura ambiente;
4. lavar a lâmina várias vezes em água destilada, secar ao ar;
5. lavar a lâmina em tampão 2XSSC (pH 7.3), à temperatura ambiente;
6. incubar a lâmina em tampão 2XSSC (pH 7.3), por 30 minutos, à temperatura de 60°C;
7. lavar a lâmina várias vezes com água destilada, secar ao ar;

8. submeter a lâmina à coloração com Giemsa.

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

1. seguir o procedimento para obtenção das preparações;
2. colocar sobre a lâmina, contendo o material, 100 µl de solução de Cromomicina A3 (5mg de Cromomicina A3 + 5ml de água destilada + 5 ml de tampão McIlvaine + 2,37mg de MgCl₂), cobrir com lamínula e deixar no escuro por 60 minutos;
3. a seguir, escorrer a lamínula e lavar com um jato de água corrente, para retirar o excesso do corante;
4. mergulhar a lâmina em uma cubeta contendo tampão McIlvaine deixar por 15 minutos e secar ao ar;
5. colocar a lâmina em uma cubeta contendo solução de DAPI (0,3 µl/ml), recém preparada, durante 15 minutos, no escuro;
6. lavar a lâmina com um jato de água corrente, para retirar o excesso do fluorocromo;
7. mergulhar a lâmina em uma cubeta contendo tampão McIlvaine, por 5 minutos e secar ao ar;
8. colocar sobre a lâmina uma gota de meio de montagem (25ml de tampão MacIlvaine + 25 ml de glicerol + 125 µl de MgCl₂) e cobrir com lamínula.
9. analisar o material ao microscópio de fluorescência depois de aproximadamente 15 dias ou mais (tempo para a estabilização dos fluorocromos).

7.1.6 Análise Cromossômica

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

7.2 Citogenética Molecular

7.2.1 Extração de DNA segundo MURRAY e THOMPSON, (1980), com modificações.

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

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

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

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

Guardar o tampão de extração em temperatura ambiente.

1. Em um tubo de 1,5mL colocar o tecido (cabeça, pronoto e fêmures), 180µL de tampão sem CTAB, 120µL de CTAB 5%, 15µL de proteinase K (10mg/mL) e 5µL de DTT (1M) ou 5µL de B mercaptoetanol.
2. Colocar a 50°C por 10 horas (overnight) ou até que o tecido esteja totalmente digerido;
3. Adicionar 10µL de RNase (10mg/mL);
4. Colocar a 37°C, em banho-Maria, por 2 horas;
5. Adicionar 600µL de clorofórmio;
6. Inverter os tubos suavemente durante 5 minutos;
7. Centrifugar a 8.000 rpm por 5 min a 4°C;
8. Retirar sobrenadante e transferir para um novo tubo;
9. Adicionar 600 µL de etanol 100% gelado e deixar a -20°C por 2 horas;
10. Centrifugar a 14.000 rpm por 15 min a 4°C.
11. Descartar o sobrenadante;
12. Lavar o pellet com 200µL de etanol 70% gelado;
13. Centrifugar por 3 min a 10.000 rpm a 4 °C ;
14. Descartar o sobrenadante;
15. Lavar o pellet com 200 µL de etanol 100% gelado;
16. Centrifugar por 3 min a 10.000 rpm a 4 °C;
17. Descartar o sobrenadante;
18. Deixar secar na estufa a 37°C;
19. Ressuspender em 40µL de água mili-Q ou TE.

7.2.2 Clonagem

Transformação

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

PLAQUEAR:

8. derreter LB ágar e 2 fazer placas com 20 ml de ágar + antibiótico de interesse
9. (Opcional!) Uso de plasmídeos com diferenciação de colônias azul/branco: utilizando a alça de Drigalsky, espalhar sobre a placa 50 µl de IPTG (200 mM) e 40 µl de X-GAL (0,2%).
10. Centrifugar a cultura de bactérias por 2 minutos a 5000 rpm, descartar 600 µl de meio e mexer para dissolver o pellet formado e espalhar com a alça de Drigalsky sobre a placa;
11. Deixar placa na estufa 37°C overnight;
12. Crescidas as colônias bacterianas, vedar as placas com parafilm e deixá-las na geladeira 4°C.

Mini preparação Plasmidial

Solução I:

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

Solução II:

- 600 µl de NaOH 1M

- 300 µl de SDS 10%
- 2100 µl água

Solução III:

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

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

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

7.2.3 Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) (Pinkel, Straume e Gray, 1986)

Preparação das Lâminas e Hibridação

1. Lavar as lâminas em tampão PBS 1x durante 5 min. em temperatura ambiente;
2. Desidratar as lâminas em série alcoólica 70, 85 e 100%, 5 min cada;
3. Incubar as lâminas em 100 µl de RNase (0,4% RNase/2xSSC) a 37 °C por 1h em câmara úmida com água milli-Q;
4. Lavar 3 x por 5 min em 2xSSC;
5. Lavar durante 5 min em PBS 1x.
6. Incubar as lâminas por 10 min em solução de pepsina 0,005% (em 10mM HCl) a 37 °C;
7. Lavar em PBS 1x durante 5 min (shaker) a temperatura ambiente;
8. Fixar em paraformaldeído 4% durante 10 min a temperatura ambiente;
9. Lavar em PBS 1x por 5 min;
10. Desidratar as lâminas em série alcoólicas (70,85, 100 %) por 5 min cada; voltar cada álcool em seu frasco.
11. Simultaneamente a desidratação em série alcoólica desnaturar a solução de hibridação a 100°C por um período de 10 min e passá-la imediatamente ao gelo;
12. Desnaturar o DNA cromossômico com formamida 70% em 2xSSC a 70°C por 4 min;
13. Desidratar o material em série alcoólica 70, 85 e 100% durante 5 min cada.
14. Preparar a câmara úmida a 37°C ;
15. Montar cada lâmina com 40 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 min cada;
17. Lavar durante 5 min em solução de Tween 0,5%/4xSSC, ambiente;

Detecção e amplificação do Sinal

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

23. Lavar 3 x 5min com Tween 0,5%/4xSSC, ambiente;
24. Incubar as lâminas com 90 µl de FITC (0,1 µl FITC/100 µl NFDM) durante 30 min em câmara úmida e escura, a temperatura ambiente.
25. Lavar 3 x 5min com Tween 0,5%/4xSSC, ambiente;
26. Incubar com 90 µl de anti-avidina (1 µl anti-avidina/100 µl de NFDM) durante 30 min em câmara úmida e escura, a temperatura ambiente;
27. Lavar 3 x 5min com Tween 0,5%/4xSSC, ambiente ;
28. Incubar as lâminas com 90 µl de FITC (0,1 µl FITC/100 µl NFDM) durante 30 min em câmara úmida e escura, a temperatura ambiente;
29. Lavar 3 x 5min com Tween 0,5%/4xSSC, ambiente;
30. Desidratar em álcool 70 (descartar), 85 e 100%, 5 min. cada;

Montagem da Lâmina

31. Misturar 200 µl de antifading mais 1 µl de DAPI - 4'-6 diamidino - 2 - phenilindole (50 µg/ml).
32. Colocar 25 µl da solução e cobrir com lamínula. Guardar no escuro

7.3 Microscopia eletrônica de Transmissão

7.3.1 Técnica segundo LOIDL & JONES (1986), com algumas modificações:

1. Dissecar e retirar os testículos e, em um pedaço de Parafilm, macerá-los com lâmina de barbear;
2. gotejar 3 a 4 gotas de lipsol (0.5%) em uma lâmina, previamente revestida com uma película plástica (passar a lâmina em uma solução contendo 100 ml de clorofórmio P.A. e 0.7g de plástico "Falcon"), adicionar o macerado testicular (1 gota) e esperar alguns segundos (20-40);
3. em seguida colocar de 7 a 8 gotas de solução contendo paraformaldeído a 4% e sacarose 0.1M;
4. deixar a lâmina secar, aproximadamente 24 horas, passá-la rapidamente (40 segundos) em água destilada e secar ao ar.

7.3.2 Contraste dos Microestendidos Celulares

Posteriormente, as lâminas contendo os microestendidos celulares, foram

impregnadas pelo nitrato de prata como descrito no (Anexo 6.1.3.1), com substituição da lamínula por um tecido de nylon (Nybold 3XXX - 300 ou 68 GC - 243).

Foram utilizadas telinhas de cobre (50 mesh) como suporte da película plástica contendo os microestendidos celulares, obtidos com as técnicas descritas anteriormente.

7.4 Artigo publicado no periódico Micron em 2010.

Micron 41 (2010) 729–734



Physical mapping of 18S rDNA cistron in species of the *Omophoita* genus (Coleoptera, Alticinae) using fluorescent *in situ* hybridization

Mara Cristina Almeida^{a,*}, Leonardo Gusso Goll^b, Roberto Ferreira Artoni^a, Viviane Nogaroto^a, Rodrigo Rodrigues Matiello^c, Marcelo Ricardo Vicari^a

^a Universidade Estadual de Ponta Grossa, UEPG, Setor de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética, Av. Carlos Cavalcanti, n. 4748, 84030-900 Ponta Grossa, Paraná, Brazil

^b UEPG, Setor de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética, Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Biologia Evolutiva, Av. Carlos Cavalcanti, n. 4748, 84030-900 Ponta Grossa, Paraná, Brazil

^c UEPG, Setor de Ciências Agrárias e de Tecnologia, Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade, Av. Carlos Cavalcanti, n. 4748, 84030-900 Ponta Grossa, Paraná, Brazil