

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

MICHELE ANDRESSA VIER WOLSKI

INFERÊNCIAS EVOLUTIVAS PARA DUAS ESPÉCIES DO GÊNERO *Omophoita*  
(COLEOPTERA, CHRYSOMELIDAE): DIFERENCIAÇÃO CARIOTÍPICA E  
MOLECULAR

PONTA GROSSA  
2014

MICHELE ANDRESSA VIER WOLSKI

INFERÊNCIAS EVOLUTIVAS PARA DUAS ESPÉCIES DO GÊNERO *Omophoita*  
(COLEOPTERA, CHRYSOMELIDAE): DIFERENCIAÇÃO CARIOTÍPICA E  
MOLECULAR

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

Orientadora: Prof. Dra. MARA CRISTINA DE ALMEIDA  
Co-orientador: Prof Dr. MARCELO RICARDO VICARI

PONTA GROSSA

2014

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

W867 Wolski, Michele Andressa Vier  
Inferências evolutivas para duas espécies do gênero *Omophoita* (coleoptera, Chrysomelidae): diferenciação cariotípica e molecular/ Michele Andressa Vier Wolski. Ponta Grossa, 2014.  
90f.

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mara Cristina de Almeida.

Co-Orientador: Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari.

1.Alticinae. 2.Morfologia do Edeago. 3.Filogenia. 4.DNAr 5S. 5.Diferenciação cariotípica. I.Almeida, Mara Cristina de. II. Vicari, Marcelo Ricardo. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em Ciências Biológicas. IV. T.

CDD: 581.38

# Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva

UEPG



PARANÁ

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



## ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº. 03/2014

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

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

Observação (se necessário)

Alteração de Título: sim  não

Novo título: \_\_\_\_\_

Ponta Grossa, 25 de fevereiro de dois mil e quatorze.

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mara Cristina de Almeida Matiello

Prof. Dr. Edison Zefa

Prof. Dr. Mateus Henrique Santos

Aos meus pais Aldemir Wolski e Elisete Vier.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos a todos que de maneira direta ou indireta contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa;

Agradeço imensamente ao meu pai Aldemir, você sempre foi meu alicerce, meu porto seguro, meu modelo a ser seguido. Agradeço pelos meus princípios, lembro-me das frases que me dizia ainda quando eu era criança: “estude que você vai longe”, “é muito feio mentir”, “quem tem amigos não precisa de mais nada” e na hora de dormir não faltava à frase “sonhe com a mamãe, com o papai e com os anjinhos” ou ainda nos ensinamentos práticos com o caderno de débito e crédito da mesada, com o qual aprendi a ser ‘pão dura’, quando me obrigava a pedir o que eu queria para os vendedores para que eu perdesse a vergonha, ou quando eu joguei um papel na rua e você me disse “imagina se cada pessoa que vem pra Faxinal arrancasse uma folha desta árvore, como ela ficaria? E se jogassem as folhas no chão como o chão ficaria? Tem certeza de que só um papel não faz mal?” Em fim tudo o que eu faço é na ânsia de te fazer orgulhoso, afinal não é fácil chegar perto de suas qualidades e superar suas expectativas. Papinho seu bebe lhe agradece e sim eu tenho um pai herói, te amo.

Mãe muito, muito, muito obrigada pelas “havaianas” na bunda, elas me deram limites, obrigado por sempre estar presente me dizendo o que era certo e o que é errado, como por exemplo, que surucucu e curucaca não são a mesma coisa. muitas vezes te tachei como carrasca, pois sobrava para você a punição, porém sei que necessária. Obrigada por aturar uma adolescente chata e um tanto rebelde, que ficava ainda mais irritada quando vinha orgulhosa lhe mostrar uma nota 9 e você dizia “da próxima vez tem de ser 10” e eu estudava muito mais para não te decepcionar. Não herdei seus lindos olhos azuis, pois sou filha de ET, mas tenho o mesmo rizo frouxo que transmite simpatia e serenidade do qual me orgulho. Obrigada por me ligar todos os dias e me acalmar nos dias ruins, por se importar com minha pesquisa mesmo sem saber nada sobre o assunto, perguntando sempre “e ai como que tá os bichinhos” e tem a paciência de escutar eu contando passo a passo do que eu estou fazendo, ou quando algo não dá certo me diz “calma, uma

hora vai dar certo, converse com a professora”. Obrigada mãe por se orgulhar de mim, pois vejo isso nos seus olhos brilhantes quando me olha. Posso dizer que não só tenho uma mãe, mas também uma amiga te amo.

Agradeço ao meu amor Alain Victor de Barros, pela paciência e calma ao lidar com alguém totalmente instável emocionalmente, você me dá animo para continuar e com muito humor alegre os meus dias, acredita que eu posso ir mais longe, coisa que nem eu confio muito. Obrigado por me ajudar no laboratório mesmo me provocando dizendo “você quando põem o jaleco vira uma onça” ou “TQPA”, obrigado pela ajuda com o photoshop e pela leitura critica do trabalho, amo você.

A minha irmã científica crespa Karina Coelho, tenho tudo a agradecer por escutar minhas reclamações, compartilhar do meu desespero e seguir firme e forte ao meu lado, afinal estamos juntas nesta, até na urucubaca hahah, espero que nossa amizade siga por longos anos e que juntas nos tornemos pesquisadoras de sucesso, eu acho. Beijos.

Gostaria de agradecer, de forma especial, à minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mara Cristina de Almeida, a quem admiro muito, que desde nossa primeira conversa confiou e acreditou em mim, mesmo eu vindo de uma Universidade sem muitos recursos me apoiou, e me ensinou lições que vou guardar com muito respeito e carinho. Agradeço pela atenção, pelos conhecimentos compartilhados, críticas, puxões de orelha e pela dedicação em minha pesquisa. Obrigado por tudo professora.

Agradeço também meu co-orientador, Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari, pela amizade e pela ajuda na realização da minha pesquisa, compartilhando novas ideias e conhecimentos que foram essenciais em todo meu trabalho.

Muito obrigada Prof. Dr. Mateus Henrique Santos que tão cedo chegou, e que tanto já contribuiu para esta pesquisa, obrigada por todos os muitos feitos, você mudou o rumo do trabalho!

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Viviane Nogaroto pela ajuda com a Biologia molecular, essenciais

nesse trabalho e por sempre estar disposta a me ajudar com um sorriso.

Ao Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni, agradeço por todo conhecimento compartilhado, sempre envolvido e interessado no meu trabalho.

Ao Miguel Airton Carvalho, agradeço pelo apoio técnico em minha pesquisa em todas as horas que precisei, por todas as brincadeiras e momentos de descontração.

Agradeço de coração a todos meus colegas de mestrado e de Laboratório, por todos os momentos de descontração e amizade no dia a dia de trabalho.

À Zoli Oliveira, por ser sempre tão prestativa na secretaria do mestrado.

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 estrutural para realização dessa pesquisa.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida, ao CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e a Fundação Araucária, pelo financiamento da pesquisa.

“Quem deseja ver o arco-íris, precisa aprender a gostar da chuva.”  
(O Aleph, Paulo Coelho)



“E um dia os homens descobrirão que esses discos voadores estavam apenas estudando a vidas dos insetos.”  
(Mario Quintana)

## RESUMO

Alticinae apresenta características cariotípicas muito interessantes quanto a variação do número diplóide, do sistema de determinação sexual e irregularidades meióticas. O número cromossômico mais frequente é de 11 ou 12 pares. As espécies de Oedionychina estudadas citogeneticamente possuem  $2n= 22,10II+X+Y$  com cromossomos sexuais gigantes. No que se refere à posição sistemática existem muitas divergências entre os estudos e problemas de identificação das espécies pertencentes aos vários gêneros. O estudo com técnicas mais refinadas e o mapeamento do DNA r 5S é recente em Coleoptera, e as poucas espécies de Alticinae estudadas mostram a presença de dois ou três pares autossômicos. Assim, este trabalho tem o objetivo de analisar citogeneticamente e propor as estratégias de diferenciação cariotípica para as espécies de *Omophoita communis* e *Omophoita sexnotata*. A análise citogenética dos indivíduos de duas populações de *O. communis* estudadas mostrou a ocorrência de grande variação no número diploide e morfologia cromossômica, sendo possível separá-las em dois citótipos. O citótipo I possui  $2n= 22$  e o citótipo II  $2n= 12$ , sendo essa variação é descrita pela primeira vez no gênero. Adicionalmente, o estudo da morfologia do edeago mostrou diferenças, indicando um provável padrão de diferenciação das duas espécies. A análise da árvore consenso da reconstrução filogenética também evidencia que os citótipos mostram agrupamentos diferentes e reforçam a hipótese de duas espécies. O estudo do mapeamento do gene DNAr 5S em *O. sexnotata* evidenciou a presença desse cluster em todos os cromossomos autossômicos, sendo esse padrão de dispersão nunca descrito em Coleoptera. Na literatura, a dispersão dos genes ribossomais está sempre relacionada com a presença de elementos transponíveis. O resultado do sequenciamento dos fragmentos de 5S ribossomal obtidos de cada cromossomo de *O. sexnotata* resultaram em sequências similares a RNAr 5S de *Drosophila melanogaster*, elemento transponível EnSpm, retropseudogene de 5S e microssatélite. Adicionalmente, a análise da estrutura secundária do RNAr 5S, mostrou que as sequências obtidas não são funcionais quando comparadas seus percentuais de energia livre em relação ao percentual da sequência original do RNAr 5S.

**Palavras-chave:** Alticinae, Morfologia do Edeago, Filogenia, DNAr 5S, diferenciação cariotípica, evolução.

## ABSTRACT

Alticinae presents karyotypic characteristics very interesting as the variation of the diploid number, sex determination system and meiotic irregularities. The most frequent chromosome number is 11 or 12 pairs. The species cytogenetically studied *Oedionychina* have  $2n = 22, 10 II + X + Y$  with giant sex chromosomes. In relation to the systematic position there are many divergence between the studies and problems of identification of species belonging to several genera. The study with more refined techniques and rDNA 5s mapping is recent in Coleoptera, and the few Alticinae species studied show the presence of two or three autosomal pairs. Thus, this study aims to analyze cytogenetically and propose strategies for the species karyotype differentiation of *Omophoita communis* and *Omophoita sexnotata*. Cytogenetic analysis of individuals of both populations of *O. communis* showed the existence of a large variation in diploid number and chromosome morphology, being possible to separate them into two cytotypes. Cytotype I presented  $2n = 22$  and cytotype II  $2n = 12$ , this variation is described for the first time in the genus. Additionally, the study of the morphology of the aedeagus showed differences, indicating a likely pattern of differentiation of the two species. The phylogenetic reconstruction consensus tree analysis also presented that cytotypes show different groupings and reinforce the hypothesis of two species. The 5S rDNA gene mapping of *O. sexnotata* showed the presence of this cluster in all autosomes, this dispersal pattern was never described in Coleoptera before. In the literature, the dispersion of ribosomal genes is always associated with the presence of transposable elements. The sequencing of 5S rRNA fragments obtained from each chromosome of *O. sexnotata* resulted in similar to 5S rRNA sequences of *Drosophila melanogaster* transposable element EnSpm, retropseudogene 5S and microsatellite. Additionally, analysis of the secondary structure of 5S rRNA showed that the sequences obtained are not functional compared their percentage of free energy with the percentage of the original sequence of the 5S rRNA.

**Keywords:** Alticinae, Aedeagus morphology, phylogeny, 5S rDNA, karyotype differentiation, evolution.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### MATERIAL E MÉTODOS

- Figura 1 - Exemplares estudados de Alticinae do gênero *Omophoita*. **A.** *O. communis* **B.** *O. sexnottata*. Escala = 1 cm..... 24
- Figura 2 - Mapa da região sul do Brasil mostrando os pontos de coleta. Ponto 1 corresponde à Ponta Grossa, Paraná e o ponto 2 corresponde à Nonoai, Rio Grande do Sul..... 25

### CAPÍTULO I

- Figura 1 - Células meióticas de indivíduo macho do Citótipo I de *Omophoita communis*, com coloração convencional. **A.** Cariótipo espermatogonial com  $2n = 22$  cromossomos. **B.** Metáfase I, presença de  $2n = 10II + X + y$ . Seta = constrição secundária. **C.** Metáfase II com complemento haplóide  $n = 10 + X$ . Escala = 10  $\mu\text{m}$ ..... 41
- Figura 2 - Células meióticas de um macho do Citótipo II de *Omophoita communis*, em coloração convencional. **A.** Cariótipo espermatogonial com  $2n = 12$  cromossomos. **B.** Metáfase I apresentando fórmula meiótica  $2n = 5II + X + y$ . **C.** Metáfase II com complemento haplóide  $n = 5 + X$ . Escala = 10  $\mu\text{m}$ ..... 42
- Figura 3 - Edeagos de *O. communis* do Citótipo I (**A, C, E, G, I**) e do Citótipo II (**B, D, F, H, J**). **A, B** - Vista lateral completa; **C, D** - Detalhe da região apical vista lateral; **E, F** - Vista frontal completa; **G, H** - Detalhe da região apical vista frontal; **I, J** - Detalhe da região apical vista posterior. Escala = 1.5mm..... 43

Figura 4 - Árvore consenso das relações filogenéticas obtida pelo método de máxima verossimilhança (MV). Bootstrap com 10000 interações..... 44

## CAPÍTULO II

Figura 1 - Metáfase espermatogonial de um exemplar macho de *Omophoita sexnotata* com  $2n=22$  cromossomos submetida à FISH com sonda de DNAr 5S (vermelho) contra corado com DAPI (azul). **A.** Cariótipo espermatogonial com DAPI. **B.** O mesmo cariótipo mostrando o mapeamento de cistron 5S em todos os cromossomos autossômicos. Escala= 10  $\mu$ m..... 54

Figura 2 - Gel de agarose a 2% mostrando a amplificação do DNAr 5S a partir dos clones dos cromossomos. M= marcador de peso Molecular (100pb). Número romano= número do cromossomo. Número arábico= número do clone..... 54

Figura 3 - Análise das sequências com o método dot plot. **A.** Sequência do clone 2 do cromossomo 2. **B.** Sequência do clone 4 do cromossomo 4. **C.** Sequência do clone 3 do cromossomo 5. **D.** cromossomo 9. Traços diagonais paralelos representam grau de repetitividade..... 55

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO II

Tabela 1	- Análise das sequências do gene DNAr 5S, tamanho em pares de bases (pb), caracterização e similaridade com sequências depositadas no Gene Bank (NCBI) ou GIRINST (Censor) e análise da sequência do RNA 5S em relação a energia livre ( $\Delta g$ ) obtida na plataforma mfold.....	56
----------	---	----

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
1.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	15
1.2	CITOGENÉTICA DE COLEOPTERA.....	16
1.2.1	Citogenética de Alticinae.....	18
1.3	DNA REPETITIVO.....	19
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
3.1	MATERIAL BIOLÓGICO.....	24
3.2	MÉTODOS.....	25
3.2.1	Citogenética Convencional.....	25
3.2.2	Estudo da morfologia do edeago.....	26
3.2.3	Análise Molecular.....	26
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
4.1	Capítulo I – Inferências evolutivas de <i>Omophoita communis</i> (Coleoptera, Alticinae) diferenciação citogenética, morfológica e molecular.....	31
4.2	Capítulo II - Diferenciação cariotípica em <i>Omophoita sexnotata</i> (Coleoptera, Alticinae) e dispersão do pseudogene DNAr 5S.....	45
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>57</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>58</b>
<b>7</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>73</b>
7.1	CITOGENÉTICA CONVENCIONAL.....	73
7.1.1	Metodologia para obtenção dos cromossomos a partir de gônadas segundo Almeida; Zacaro; Cella (2000).....	73
7.1.2	Coloração Convencional Segundo Giemsa.....	73
7.2	ESTUDO MORFOLÓGICO.....	73
7.2.1	Protocolo para dissecação do edeago segundo Smith (1979), com algumas modificações.....	73
7.3	CITOGENÉTICA MOLECULAR.....	74
7.3.1	Extração de DNA – (SAMBROOK e RUSSEL, 2001), com modificações.....	74
7.3.2	Reação em cadeia da polimerase (PCR), para o gene COI.....	75
7.3.3	Kit de amplificação Sigma- <i>GenomePlex Single Cell</i> (WGA 4).....	75
7.3.4	Reação em cadeia da polimerase (PCR), para o gene DNAr 5S.....	77
7.3.5	Clonagem.....	77
7.3.6	Hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH) (Pinkel, Straume e Gray, 1986).....	79
7.4	ANÁLISE COMPARATIVA DO COMPRIMENTO DOS CROMOSSOMOS	

	DOS CITÓTIPOS DE <i>O. communis</i> .....	82
7.4.1	Resultado do comprimento médio dos cromossomos de <i>O. communis</i> ....	82
7.4.2	Resultado da Análise de variância.....	83
7.5	ESTRUTURA SECUNDÁRIA DO RNA.....	84



## 1 INTRODUÇÃO

### 1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A ordem Coleoptera é uma das mais diversificadas e amplas dentro da classe Insecta, tanto em número de espécies quanto em tipos de ambientes que podem ser explorados por estas (RILEY et al., 2002). A ordem possui aproximadamente 358.000 espécies descritas taxonomicamente e agrupadas em 25.368 gêneros (COSTA, 2003). Esse número de espécies corresponde a cerca de 40% do total de insetos e 30% dos animais, constituindo a maior ordem do Reino Animal (LAWRENCE; BRITTON, 1994). No Brasil, aproximadamente 99 famílias, 4.319 gêneros e 26.122 espécies de Coleoptera já foram descritas taxonomicamente (COSTA, 2000).

Acredita-se que a diversidade e abundância dos Coleoptera estão relacionadas às características que permitiram a adaptação de indivíduos adultos a espaços apertados ou ambientes escondidos, inacessíveis para outros grupos, além de terem sido os primeiros insetos polinizadores das angiospermas (COSTA, 2000). Uma dessas características é a presença dos élitros, asas anteriores modificadas, os quais protegem os indivíduos contra desidratação, choques mecânicos e protege as asas membranosas; mantendo ainda a capacidade de voar (GRIMALDI; ENGEL, 2006). Segundo Lawrence; 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. Estas características pareadas ao fato de muitos indivíduos serem especialistas de pequeno tamanho pode ter contribuído para a grande diversidade de coleópteros (GRIMALDI; ENGEL, 2006).

O conhecimento taxonômico sobre os Coleoptera é muito desuniforme. Algumas famílias com representantes de importância econômica são mais estudadas do que outras famílias igualmente importantes e diversificadas. Esse fato, aliado à enorme diversidade de coleópteros, aumenta ainda mais a dificuldade para a obtenção de classificações consistentes e estabelecimento das relações filogenéticas (VANIN; IDE, 2002).

A grande maioria dos autores considera a ordem Coleoptera monofilética. Whiting et al. (1997) analisando dados morfológicos e moleculares apresentaram

evidências de que o grupo seria parafilético. Entretanto, em nova análise, ajustes metodológicos foram feitos resultando na sugestão da monofilia do grupo (WHEELER et al., 2001).

A monofilia das quatro subordens que compõem a ordem é consenso entre a maioria dos autores, pelo menos quando somente as formas viventes são consideradas (HANSEN, 1997), sendo elas: Archostemata, Adephaga, Myxophaga e Polyphaga (GILLOT, 2005).

Os estudos mais amplos que tratam da classificação dos coleopteros são os de Lawrence; Newton (1995) com pequenas modificações publicadas em Lawrence et al., (1999). Polyphaga é o clado mais diversificado, com mais de 90% das espécies conhecidas dos coleópteros, agrupado em 88 famílias e possui a maior diversidade, tanto morfológica como biológica (VANIN; IDE, 2002).

Dentre os Polyphaga encontra-se a família Chrysomelidae, a qual inclui 2.600 gêneros e 40.000 espécies, agrupadas em 15 subfamílias (COSTA, 2000; GILLOT, 2005; VANIN; IDE, 2002). Dentre essas subfamílias, Alticinae possui o maior número de espécies na Região Neotropical (BORROR; DeLONG'S, 2005), as quais ocorrem desde a região sul dos Estados Unidos até o sul do Chile com cerca de 8000 espécies descritas (GARCÍA, 1998), aproximadamente 290 espécies de Alticinae foram estudadas citogeneticamente (PETITPIERRE, 2006), a capacidade de dar grandes saltos, devido a seus fêmures posteriores robustos, e a presença de um testículo na região direita anterior do abdômen, são características marcantes dos indivíduos adultos desta subfamília (BORROR; DeLONG'S, 2005). A coloração, na maioria das espécies é constituída por um fundo escuro com manchas claras de cor variada (GILLOT, 2005; GRIMALDI; ENGEL, 2006).

## 1.2 CITOGENÉTICA DE COLEOPTERA

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

Segundo Smith; Virkki (1978) e Petitpierre (1996) o cariótipo de Coleoptera é formado principalmente por cromossomos metacêntricos de tamanho médio ou pequeno, apresentando em metáfases mitóticas tamanhos entre 0,5 e 6,5  $\mu\text{m}$ . O

menor número diploide descrito para Ordem foi de  $2n=4$ , em *Chalcolepidius zonatus* (FERREIRA et al., 1984) e o maior  $2n=64$ , em *Ditomus capito* (SERRANO, 1981) e *Disonycha bicarinata* (VIRKKI, 1988 a).

A fórmula cromossômica considerada primitiva para os Coleoptera foi originalmente postulada por Smith (1950) como sendo  $2n=20=9II+Xyp$  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 (SMITH; VIRKKI, 1978). Os mecanismos cromossômicos de determinação do sexo em Coleoptera são variáveis, podendo ser classificados em aquiasmáticos, como é o caso dos sistemas Xyp, Xnyp/nXyp, Xyc, X0 e X1+X2, ou quiasmáticos, como o neoXY, Xy, Xyr, X1X2Y e XY1Y2 (SMITH; VIRKKI, 1978).

Na subordem Polyphaga a determinação sexual mais frequente é do tipo Xyp. 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; VIRKKI, 1978).

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

Das 40.000 espécies de Chrysomelidae identificadas taxonomicamente, apenas 750 foram analisadas sob o ponto de vista citogenético, estas possuem variações quanto ao número cromossômico e aos tipos de sistemas de determinação sexual (VAIO; POSTIGLIONI, 1974). O maior número diplóide observado foi  $2n=64$  em *Disonycha bicarinata* e o menor foi  $2n=6$  em *Homoschema latitarsum* (SMITH; VIRKKI, 1978; VIRKKI 1988 a; VIRKKI; SANTIAGO-BLAY, 1996). Em Chrysomelidae os sistemas de determinação sexual mais frequentes são Xyp e X, porém, pode-se encontrar os sistemas Xyr, Xyc, XY, XXY, XXYY, Xny, nX+ny, nX+nY e neoXy.

A fórmula cromossômica considerada ancestral para Chrysomelidae é de  $2n = 24 = 22 + X + y$ . As divergências cariótipas observadas podem ter derivado ao longo do tempo, por redução ou aumento do número autossômico, principalmente por fissões cêntricas e inversões pericêntricas. Quanto ao sistema de determinação sexual, permanece o Xyp original ou o cromossomo yp é perdido (VIRKKI, 1988b; SMITH; VIRKKI, 1978).

### 1.2.1 Citogenética de Alticinae

A subfamília Alticinae mostra-se muito interessante para estudos evolutivos, pois muitas espécies possuem características cariotípicas variando quanto ao número cromossômico e tipo de sistema de determinação sexual, como por exemplo, as irregularidades no comportamento, tamanho e morfologia dos cromossomos sexuais em espécies relacionadas (VIRKKI, 1967, 1968, 1970; PETITPIERRE, 1988).

Petitpierre (1988; 2006) e Virkki (1970) descreveram que o número cromossômico mais frequente em Alticinae é 11 ou 12 pares, podendo ocorrer variações que representam a amplitude de variação da família, isto é,  $2n = 6 = 2II + neoXY$ , em *Homoschema latitarsum* até  $2n = 64 = 30II + X1y + X2X3$ , em *Disonycha bicarinata*. Vários autores propuseram que esse aumento pode ter ocorrido por fissões cêntricas ou variações no conteúdo de DNA nuclear (PETITPIERRE, 1988; PETITPIERRE; SEGARRA; JUAN, 1993; VIRKKI, 1988a).

Os representantes da subfamília Alticinae apresentam o complemento cromossômico e o comportamento dos cromossomos sexuais diferentes da maioria dos Coleoptera (SMITH; VIRKKI, 1978; VIRKKI, 1963). O cariótipo ancestral dos Polyphaga ( $2n = 20 = 9II + Xyp$ ) foi descrito somente em duas espécies de Alticinae, *Parasyphaea* sp. (Alticipini) e *Chaetocnema chlorophana* (Chaetocnemini) (PETITPIERRE et al., 1988; VIRKKI, 1978). Os autossomos, na maioria das espécies de Alticinae formam 10 bivalentes e o emparelhamento dos cromossomos sexuais é tardio ou inexistente, além disso, os cromossomos sexuais possuem diferentes orientações no fuso metafásico, com segregação pré ou pós-reducional. Somando-se a isso podem variar o tamanho e morfologia em espécies relacionadas, sugerindo uma formação recente e ainda não estabelecida (VIRKKI, 1963, 1964, 1967). Nesta subfamília foram descritos 18 tipos diferentes de sistemas de

determinação sexual, como, por exemplo,  $Xyp$ ,  $neoXY$ ,  $Xy$ ,  $XY$ ,  $X+Y$ ,  $X+ny$ ,  $X_1+X_2$ ,  $nXnY$ ,  $XpneoXneoYp$ ,  $X$ ,  $Xyy$ ,  $X_1X_2Y$ ,  $XXYY$ ,  $Xyr$ ,  $X_1Y+nX$ ,  $Xy+Y$  e  $X+ny$ , sendo o mais frequente  $X+y$  (VIRKKI, 1967, 1968).

Na tribo Oedionychini os cromossomos sexuais são muito maiores em relação aos das outras espécies, são assinápticos e possuem uma orientação atípica, porém com segregação regular (VIRKKI, 1968). Esta tribo inclui as subtribos Disonychina e Oedionychina (VIRKKI, 1970; VIRKKI; SANTIAGO-BLAY; CLARK, 1991). Estas subtribos se diferenciam cariotipicamente, os indivíduos de Oedionychina possuem número cromossômico  $2n= 22,10II+X+Y$  com cromossomos sexuais grandes e em Disonychina é mais variável, com cromossomos sexuais pequenos de diferentes associações, além de uma tendência no aumento do número cromossômico (PETITPIERRE, 1988; VIRKKI, 1988 b).

Smith; Virkki (1978); Virkki (1984) propõem que a origem do sistema de determinação sexual do tipo  $X+Y$  na subtribo Oedionychina, pode ter ocorrido por meio da incorporação dos genes dos cromossomos sexuais em um dos bivalentes autossômicos, já na subtribo Disonychina, parece ser o resultado de fusões de cromossomos sexuais múltiplos (VIRKKI, 1970). Adicionalmente, opinião de Virkki (1988), os diferentes tipos de sistema  $X+y$  possuem origem polifilética.

### 1.3 DNA REPETITIVO

Os DNAs repetitivos compõem uma grande quantidade dos genomas eucarióticos, podendo estar arranjados *in tandem* ou de maneira dispersa (SUMNER, 2003). 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 não codificantes são representados pelas classes de DNA satélite, minissatélite, microsatélite e elementos transponíveis (WESSLER, 2006). Por sua vez, os DNAs repetitivos codificantes são representados pelas famílias multigênicas como, por exemplo, as famílias de DNA ribossomais (NEI; ROONEY, 2005).

Análises moleculares do DNA heterocromático dos representantes da família

Tenebrionidae têm revelado DNAs satélite como componente principal, constituindo aproximadamente 50% do DNA genômico (UGARKOVIĆ; PLOHL, 2002). Estudos em *Chrysolina americana* e em *Xantogaleruca luteola*, pertencentes à família Chrysomelidae, relatam que DNAs satélites compreendem cerca de 10% do DNA genômico na heterocromatina pericentromérica (BAUSLONCAR; PAIC; UGARKOVIC, 2005).

Os minisatélites, apesar de não apresentarem uma definição padronizada, têm se mostrado importantes ferramentas em estudos genéticos devido a sua dinâmica evolutiva (MARTINS, 2007). Da mesma forma, poucos são os organismos com mapeamento físico de microsatélites (HATANAKA et al., 2002).

Os elementos transponíveis são sequências de DNA que se movem de um local para outro no genoma, e, frequentemente, se duplicam no processo. Podem ser classificados de duas formas (CAPY, et al., 1998), a primeira quanto à autonomia para a realização da transposição, sendo chamados de autônomos codificando as proteínas necessárias para a transposição, e elementos não autônomos se não codificam proteínas. Neste último caso, parecem “emprestar” funções enzimáticas necessárias de elementos autônomos presentes nas mesmas células (FESCHOTTE et al., 2002; OKADA, 1991). A segunda classificação refere-se ao mecanismo de transposição. A primeira classe é a dos retrotransposons, que utilizam um intermediário de RNA. Esta classe se subdivide em retrotransposons com LTRs (Ty1-copia e Gypsy-Ty3), que são semelhantes ao retrovírus, e os retrotransposons sem LTRs (LINEs e SINEs), que são chamados de retroposons. A segunda classe é a dos transposons, que utilizam o intermediário de DNA que transferem sequências para outro locus por um mecanismo de “cut-and-paste” catalisada por uma transposase, e possuem diversas subfamílias (XIONG; EICKBUSH, 1990).

As famílias multigênicas compreendem uma importante classe dos DNAs repetitivos, definida como codificantes, e correspondem à família dos DNAs ribossomais a qual está dividida 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).

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 (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 foram analisadas utilizando esse procedimento. A maioria dos trabalhos em relação à localização das Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs) é baseada na técnica de Impregnação pelo íon prata (ALMEIDA et al., 2010; CABRAL-DE-MELLO, MOURA; MARTINS, 2011; SCHNEIDER et al., 2007).

Na revisão sobre a localização de RONs em Coleoptera Schneider et al., (2007) observaram que, na maior parte das espécies, as Regiões Organizadoras de Nucléolo estão localizadas nos cromossomos autossômicos (82% em Adephaga e 63% em Polyphaga). Entretanto, os genes ribossomais podem estar presentes em cromossomos autossômicos, em cromossomos sexuais ou, ainda, em ambos (ALMEIDA et al., 2010; Cabral-de-Mello et al., 2011b; PROENÇA et al., 2004).

No que se refere ao mapeamento de gene DNAr 5S, poucos estudos foram realizados em insetos, diferentemente de outros grupos, como peixes, invertebrados marinhos e fungos (BARZOTTI et al., 2000; COLOMBA et al., 2002; DROUIN; MONIZ de SÁ, 1995; EIRÍN-LÓPEZ et al., 2004; VAHIDI et al., 1988; VITTURI et al., 2002; VITTURI et al., 2004). O mapeamento do cluster de DNAr 5S seria uma excelente ferramenta para o estudo da evolução cariotípica dos insetos (BARCISZEWSKA et al., 1995).

Em Coleoptera, igualmente a outros insetos, o mapeamento de DNAr 5S foi realizado em poucas espécies. Os primeiros trabalhos em Scarabaeidae mostraram que a localização desse gene é muito variável, podendo ser encontrado em apenas um par ou vários pares do complemento cromossômico (CABRAL-DE-MELLO et al., 2010; 2011a; MARTINS et al., 2006). Segundo Cabral-de-Mello et al. (2010, 2011a) a condição ancestral para Coleoptera é a presença de apenas um par cromossômico portador do gene 5S.

Na subfamília Alticinae o mapeamento de DNAr 5S em algumas espécies do gênero *Omophoita* foi realizado por Melo (2013) evidenciando a presença de um cluster associado a um par autossômico em *Omophoita octoguttata* e *Omophoita personata*, e dois clusters em dois pares autossômicos em *Omophoita magniguttis*.

A dispersão do cístron DNAr 5S tem sido relacionada em muitos organismos



com a presença de elementos transponíveis (GILLESPIE et al., 2006). Szafranski et al. (2003) descreveram um pseudogene 5S DNAr retrotransponível no genoma de *Dictyostelium discoideum* (Ameboidea) que contém em sua extremidade 3' uma sequência de 8 pb derivada da extremidade 3' de um retrotransposon LINE e uma cauda poliadenilada. Nesse retropseudogene ribossomal 5S faltam os primeiros 15 pb da sequência do gene selvagem DNAr5S, sugerindo que a transcrição reversa do RNA r5S não foi completada.

A distribuição variável do gene 5S em plantas vasculares foi parcialmente explicado pela atividade do retrotansposon Cassandra que possui fragmentos das sequências de rRNA 5S conservadas, promotores e terminadores de RNA polimerase (pol) III em suas longas repetições terminais (LTRs) (RUSLAN et al., 2008). Esse elemento, Cassandra é um exemplo de associação dos elementos transponíveis com os genes ribossomais.

Os elementos transponíveis podem interferir no genoma do hospedeiro, expandindo seu tamanho e complexidade, reorganizando o DNA genômico, mutando genes do hospedeiro e também alterando os níveis de expressão de genes vizinhos (ESNAULT et al., 2000; KAZAZIAN; MORAN, 1998; KAZAZIAN, 2000; OSTERTAG; KAZAZIAN, 2001; SMIT, 1999).



## 2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Considerando o pequeno número de espécies brasileiras analisadas citogeneticamente e as características cariotípicas muito variáveis, como número diplóide, tipos de sistema de determinação sexual e o tamanho dos cromossomos sexuais, os representantes da subfamília Alticinae são muito interessantes para estudos evolutivos.

Assim, este trabalho tem o objetivo de analisar citogeneticamente e propor as estratégias de diferenciação cariotípica para as espécies de *Omophoita communis* e *Omophoita sexnotata*.

Para isso pretendeu-se:

- 1- Analisar os cromossomos mitóticos e meióticos, para verificar o número diplóide e haplóide de cromossomos e a morfologia cromossômica de *Omophoita communis*;
- 2- Determinar o tipo de sistema de determinação sexual de *Omophoita communis*;
- 3- Construir uma filogenia molecular para os citótipos encontrados de *Omophoita communis*, a partir do sequenciamento dos genes mitocondrial (COI);
- 4- Diferenciar os citótipos de *Omophoita communis* através da análise do edeago;
- 5- Mapear o cístrons de DNAr 5S nos cromossomos de *Omophoita sexnotata*;
- 6- Determinar os mecanismos envolvidos na dispersão do DNAr 5S nos cromossomos autossômicos de *Omophoita sexnotata*.

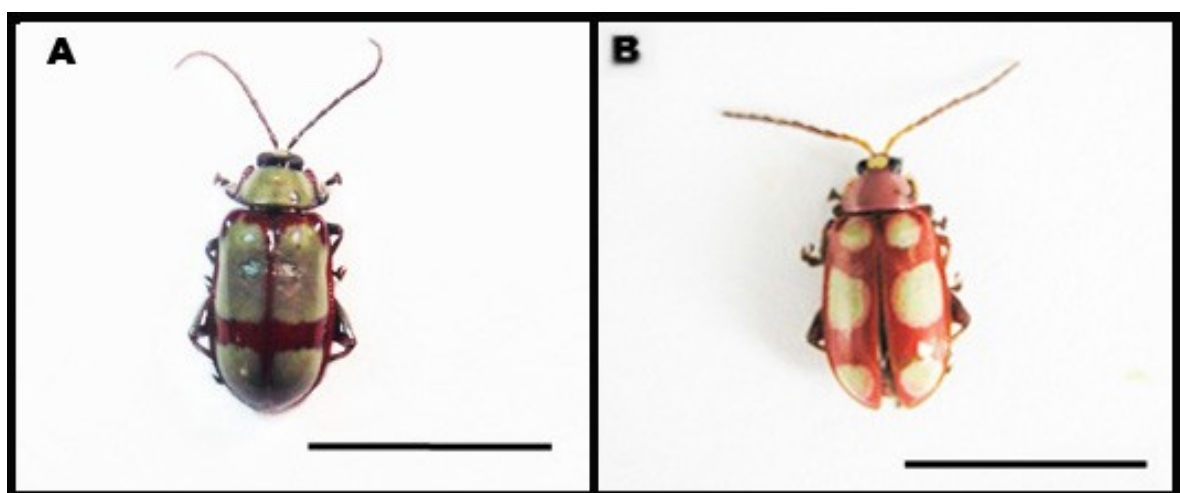
### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

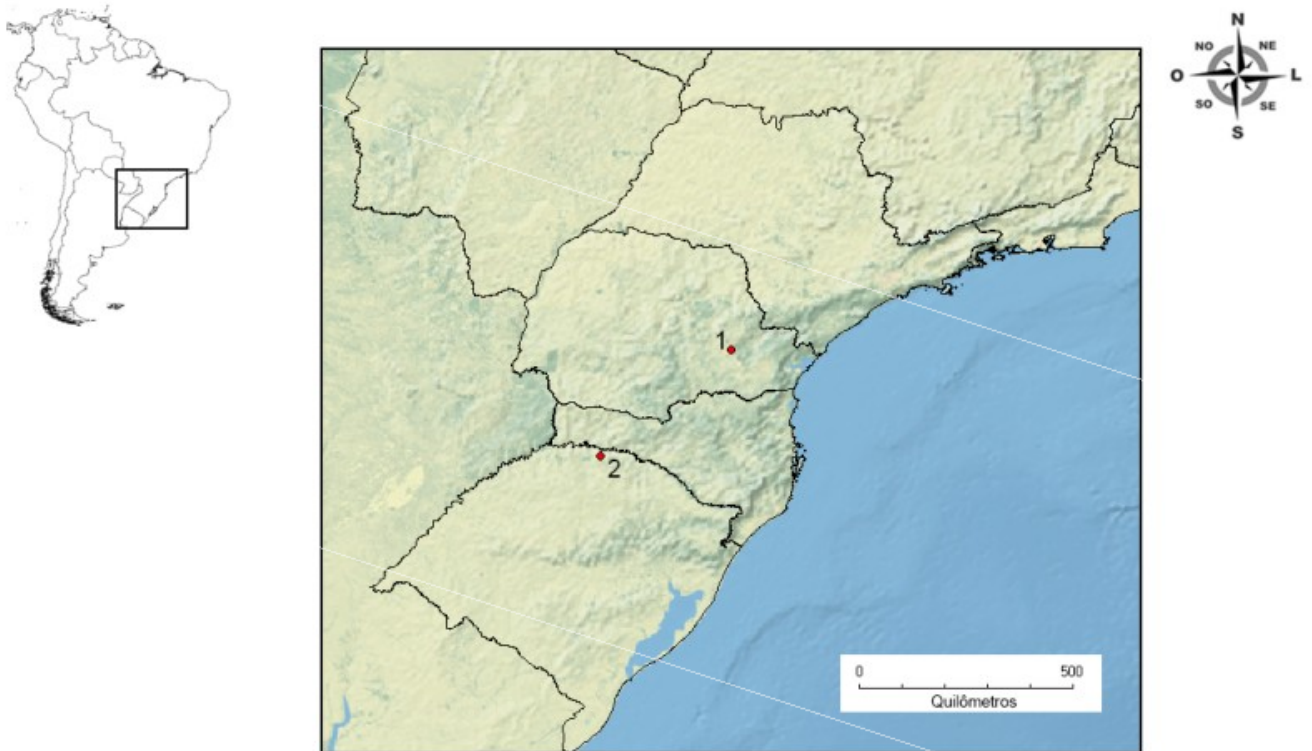
Os espécimes utilizados no estudo foram machos adultos pertencentes ao gênero *Omophoita* Chevrolat 1837 (Figura 1), coletados nas cidades de Ponta Grossa, Paraná (S 25° 07'10" e W 49°56'24") e Nonoai, Rio Grande do Sul (S 27° 23'25" e W 52°44'10") (Figura 2).

Para as preparações citogenéticas foram utilizadas as gônadas de *Omophoita communis* Bechyné 1958 (27 machos) e *Omophoita sexnotata* Harold 1876 (24 machos). Para a análise molecular foram utilizadas a cabeça, o pronoto e o terceiro par de pernas de *Omophoita communis* e *Omophoita octoguttata* Fabricius 1775. As sequências do gene COI das espécies *Omophoita sexnotata*, *Omophoita equestris* Fabricius 1787, *Omophoita sericella*, *Omophoita personata* Illiger 1807, foram obtidas do GenBank (NCBI) sob o número de acesso AF 479441.1, AF 479439.1, AF 479435.1, AF 479431.1, respectivamente. As sequências do gene COI das espécies *Diabrotica undecimpunctata* Barker 1984 (AY 242473.1) e *Allochroma* sp. Clark 1860 (AF 479422.1) foram obtidas do GenBank (NCBI) e utilizadas como grupo externo.

As determinações taxonômicas das espécies de *Omophoita* foram realizadas pelo pesquisador Carlos Campaner do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo.



**Figura 1-** Exemplos estudados de Alticinae do gênero *Omophoita*. **A.** *O. communis* **B.** *O. sexnotata*. Escala= 1 cm.



**Figura 2-** Mapa da região sul do Brasil mostrando os pontos de coleta. Ponto 1 corresponde à Ponta Grossa, Paraná e o ponto 2 corresponde à Nonoai, Rio Grande do Sul.

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 Citogenética Convencional

As preparações citológicas para o estudo dos cromossomos mitóticos e meióticos foram obtidas de testículos de indivíduos adultos. Os animais foram dissecados em solução fisiológica para insetos de acordo com a técnica descrita por Almeida; Zacaro; Cella (2000). As gônadas foram colocadas em uma placa de Petri contendo solução hipotônica (água de torneira), durante 5 minutos. Em seguida transferida para uma placa de Petri contendo fixador Carnoy I (metanol – ácido acético, na proporção 3:1), durante 30 minutos. Posteriormente foram maceradas sobre uma lâmina, juntamente com uma gota de ácido acético 60%, na sequência as lâminas foram secas em uma placa de metal a temperatura de 35<sup>o</sup> a 40<sup>o</sup> C (Anexo 7.1.1). As lâminas foram coradas convencionalmente, com solução de Giemsa 3%, por 12 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida lavadas em água destilada e secas ao ar (Anexo 7.1.2).

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. Estes foram numerados e os cromossomos emparelhados para facilitar a apresentação, obedecendo ao critério da razão de braços segundo a proposta de Levan; Fredga; Sandberg (1964).

O comprimento de cada cromossomo de cada população de *O. communis* foi obtido por meio do programa Easy Idio (DINIZ; XAVIER, 2006). Foram analisadas 40 células em metáfase II para cada população (Anexo 7.4). Os dados do comprimento médio dos cromossomos de cada população foram submetidos à análise de variância e o comprimento médio dos cromossomos foram comparados entre si pelo teste T a 5% de probabilidade no programa estatístico SASMAGRI (CANTERI et al., 2001) (Anexo 7.4.1).

### 3.2.2 Estudo da morfologia do edeago

A morfologia do edeago dos indivíduos de cada população de *O. communis* foi analisada em um estereomicroscópio Medilux MDL-F e em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da marca FEI, modelo Quanta 250, em sistema ambiental (baixo vácuo). O edeago foi dissecado segundo metodologia de Smith (1979) com modificações (Anexo 7.2.1), a estrutura foi retirada do abdômen e aquecida por aproximadamente um minuto em hidróxido de potássio (1:10) e, posteriormente, lavada em álcool 70% e guardada em glicerina.

### 3.2.3 Análise Molecular

a- Sequenciamento do gene COI e reconstrução da relação filogenética entre os citótipos de *O. comunis*.

A extração de DNA genômico dos exemplares de *O. comunis* e *O. octogutta* foi realizada segundo a técnica de Sambrook e Russel (2001) (Anexo 7.3.1), com adição de um passo inicial que consiste em macerar a cabeça e o pronoto em nitrogênio líquido.

Para a amplificação das sequências do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I (COI) foi realizada a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), com a utilização dos

*primers*: COI–Foward- 5' TAATTGGAGGATTTGGAATTG 3' e COI–Reverse- 5' CCTGGTAAAATTTAAAATATAAACTTC 3' (Anexo 7.3.2) (ALMEIDA et al., 2013).

O sequenciamento foi realizado a partir dos produtos finais de PCR, purificados com KIT de purificação Illustra TFX™ GE, conforme instruções do fabricante, em um sequenciador automático (ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer) armado com capilares de 50cm e polímero POP6 (Applied Biosystems).

Para cada indivíduo, as sequências “ forward ” e “ reverse ” foram corrigidas, comparadas e editadas pelo programa “Chromas Lite, 2.0”. Posteriormente, as sequências consenso foram alinhadas utilizando o programa “Clustal W, 1.8” (THOMPSON et al., 1994) presente no programa “Bioedit v 7.0.9” (HALL, 1999). Os pontos de mutação foram checados a olho, utilizando o programa “Chromas Lite, 2.0”, garantindo a fidelidade da posição dos nucleotídeos das sequências e, quando necessário, possíveis erros interpretados pelo alinhamento como mutação foram eliminados.

Para a escolha do melhor modelo de substituição nucleotídica que representa as amostras, foi utilizado o programa MEGA 6.05 (TAMURA et al., 2013), que segundo o critério Akaike gerou que o modelo Tamura 3-parâmetros é que melhor explica as diferenças entre as sequências. A reconstrução filogenética para identificar as possíveis relações entre os citótipos foi realizada no programa MEGA 6.05 (TAMURA et al., 2013) utilizando os modelos neighbour-joining (NJ) e máxima-verossimilhança (MV) com a opção "complete-deletion" e 10000 interações para bootstrap. As espécies *Diabrotica undecimpunctata* (AY 242473.1) e *Allochroma* sp. (AF 479422.1) foram usadas como grupo externo.

#### b- Obtenção, clonagem e sequenciamento do gene DNAr 5S

Os dez bivalentes autossômicos de *O. sexnotata* foram microdissectados individualmente, a partir de preparações citogenéticas em lamínulas, descrita anteriormente, com o auxílio de agulhas de vidro de 0,7 µm, em microscópio invertido, equipado com micromanipulador mecânico. Cada bivalente foi colocado separadamente em tubo tipo eppendorf e, posteriormente foi amplificado através do kit “Whole Genome Amplification” (WGA 4 – SIGMA) de acordo com as recomendações do fabricante (Anexo 7.3.3).

As ampliações do DNAr 5S de cada cromossomo foram realizadas utilizando-se os primers 5S\_F: 5'- AACGNCCATANCACGCTGNA - 3' e 5S\_R: 5' – AGCGGTCNCNCATCNANGTAC - 3' (Anexo 7.3.4) (MELO et al., 2013). Os produtos de PCR foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 1% corados com gelred Biotium® (1:1000). Posteriormente, o produto de PCR de cada cromossomo foi clonado separadamente (10 placas) no vetor pGEM (Promega®) e transformados na bactéria *Escherichia coli* DH5α (Gibco GBRL®). O isolamento e a purificação do DNA plasmidial de aproximadamente 10 colônias de cada placa (cromossomo) baseou-se no método de lise alcalina (Anexo 7.3.5). Os vários plasmídeos foram amplificados e aqueles com tamanhos diferentes foram enviados para sequenciamento (sequenciador automático - ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer). As sequências obtidas foram analisadas e editadas com o auxílio do programa BioEdit (HALL, 1999).

As sequências obtidas foram submetidas ao software Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (ALTSCHUL et al., 1990), presente no National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) e ao software CENSOR presente no Genetic Information Research Institute (GIRINST) (<http://www.girinst.org/censor/index.php>) (KOHANY et al., 2006), para a identificação de possíveis homologias entre genes de outros organismos.

A análise do padrão de repetitividade das sequências foi feita através do método dot plot utilizando o software Geneious 4.8 (DRUMMOND et al., 2009). Para a obtenção das estruturas secundárias do RNAr 5S (Anexo 7.5) e seus respectivos valores de energia livre ( $\Delta G$ ) as sequencias foram submetidas ao software mfold através da opção RNA folding from (<http://mfold.rutgers.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form>) (ZUKER, 2003).

#### c- Hibridação *in situ* fluorescente (FISH)

A hibridação *in situ* fluorescente (FISH) baseou-se na técnica descrita por Pinkel, Straume e Gray (1986), com algumas modificações (Anexo 7.3.6).

As lâminas foram tratadas previamente com RNase à 37°C durante uma hora, pepsina 0,005% a 37°C por 10 minutos e fixadas com paraformaldeído 4% por 10 minutos. Os cromossomos foram desnaturados em formamida 70% a 70° C, por quatro minutos, para a posterior adição da solução de hibridação contendo

formamida a 50%, sulfato de dextrano a 10%, 20XSSC, sondas desnaturadas com concentração de 400ng e água em um total de 40µl por lâmina. Após ficarem hibridando por 16 horas à 37°C, as lâminas foram lavadas com formamida 15% a 42°C e Tween 0,5%.

O sinal da sonda do DNAr 5S foi detectado por antidigoxigenina-rodamina (Roche®), e os cromossomos foram corados com 4'-6-diamidino-2-fenylindole (DAPI).

#### d- Análise cromossômica

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).

## **4 RESULTADOS**

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

### **4.1 CAPÍTULO I**

**Inferencias evolutivas de *Omophoita communis* (Coleoptera, Alticinae)  
diferenciação citogenética, morfológica e molecular**

### **4.2 CAPÍTULO II**

**Diferenciação cariotípica em *Omophoita sexnotata* (Coleoptera, Alticinae) e  
dispersão de pseudogene DNAr 5S**



#### 4.1 CAPÍTULO I

**Inferencias evolutivas de *Omophoita communis* (Coleoptera, Alticinae)  
diferenciação citogenética, morfológica e molecular**

## RESUMO

O gênero *Omophoita* é o mais estudado citogeneticamente entre os gêneros pertencentes à subtribo Oedionychina. A maior parte dos exemplares analisados possui cariótipo uniforme com  $2n= 22$  cromossomos e poucas espécies mostram variações do número diploide ou diferentes cromossomos sexuais. Na subfamília Alticinae existem problemas de identificação das espécies pertencentes a vários gêneros, somado as divergências na posição sistemática, como por exemplo, a monofilia de Alticinae em relação com Galerucinae. Assim, este trabalho tem como objetivo analisar duas populações de *Omophoita communis* por meio de análises citogenéticas convencionais, moleculares e morfológicas. Os dados citogenéticos mostraram a ocorrência de uma grande diferença no número diplóide e morfologia cromossômica, sendo possível separá-las em dois citótipos. O citótipo I evidencia fórmula cariotípica de  $2n= 22$  cromossomos e o citótipo II mostra o número diploide de  $2n= 12$  cromossomos, sendo esta variação é observada pela primeira vez no gênero *Omophoita*. A análise comparativa dos cromossomos mostrou que o tamanho médio dos cromossomos do citótipo II é 2,5 vezes o tamanho médio dos cromossomos do citótipo I, com isso, pode-se inferir um processo de derivação baseado em rearranjo cromossômico do tipo fusão. Adicionalmente, o estudo da morfologia do edeago mostrou que as genitálias apresentam diferenças na sua morfologia, indicando um provável padrão de diferenciação de duas espécies. A reconstrução filogenética através do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I também evidencia que os citótipos mostram diferenças em suas sequências. Considerando a hipótese dos citótipos serem duas espécies crípticas, uma possível explicação para características fenotípicas tão semelhantes seria a ocorrência de mimetismo.

**Palavras chave:** Rearranjos cromossômicos, Morfologia do edeago, Citocromo Oxidase I, Espécies crípticas, Mimetismo.

## INTRODUÇÃO

O gênero *Omophoita* pertence à subtribo Oedionychina, com cerca de 120 espécies estudadas sob o ponto de vista citogenético, sendo esta com o maior número de espécies analisadas dentro da família Alticinae (ALMEIDA; CAMPANER; CELLA, 2009; PETITPIERRE, 2006; SMITH; VIRKKI, 1978; VIRKKI, 1964; 1970; 1988b). A grande diversidade de espécies e gêneros encontra-se na região Neotropical, sendo a maioria dos gêneros endêmica da América do Sul (RILEY et al., 2002).

As espécies de *Omophoita* estudadas possui o número diploide  $2n = 22 = 20 + X + y$  e a fórmula meiótica  $2n = 10II + X + y$  (PETITPIERRE et al., 1988; SMITH; VIRKKI, 1978; VIRKKI et al., 1991; VIRKKI; SANTIAGO-BLAY, 1993); no entanto, três espécies constituem exceções em relação a estas características: *O. clerica* (VIRKKI, 1967a), que possui  $2n = 23 = 20 + V + J + I$  ( $V = y_2$ ;  $J = X$ ;  $I = y_1$ ), *O. inscipiens* (VIRKKI; SANTIAGO-BLAY, 1996) com  $2n = 23 = 20 + 1s + X + y$  e  $2n = 24 = 20 + 2s + X + y$  ( $s =$  cromossomos supranumerários) e *O. luneta*, a qual foi descrita com  $2n = 24 = 22 + X + y$  (PETITPIERRE et al., 1988) ou  $2n = 22 = 20 + X + y$  (SMITH; VIRKKI, 1978). Em relação à morfologia cromossômica são observadas espécies com todos os autossomos metacêntricos e outras com todos acrocêntricos, também existem espécies com autossomos metacêntricos e acrocêntricos. No entanto, os cromossomos sexuais de todas as espécies já estudadas são sempre metacêntricos (ALMEIDA, 2009; SMITH; VIRKKI, 1978, VIRKKI, 1989).

Os espécimes pertencentes à subfamília Alticinae são popularmente designados na literatura como "fleabeetles", isto é, besouros semelhantes a pulgas, devido a habilidade de dar grandes saltos. Possuem uma estrutura modificada no fêmur posterior que dentre outras autopomorfias, os distinguem dos demais grupos. No entanto, há muitas divergências na posição sistemática destes indivíduos. Bechyné (1966 apud VIRKKI, 1970) considerou, juntamente com outros taxonomistas, os "fleabeetles" como uma família separada (Alticidae). Crowson (1960) propôs que Alticinae é um grupo ramificado de Galerucinae, outra subfamília de Chrysomelidae, talvez mais relacionado com o gênero *Diabrotica*. No entanto, VIRKKI (1964), comparando os cariótipos de várias espécies de Galerucinae e Alticinae, não considerou essa última hipótese viável. Farrell (1998), Farrell; Sequeira (2004) e Gómez-Zurita et al., (2008) propuseram através de uma

combinação de dados morfológicos e moleculares que Alticinae e Galerucinae são grupo irmãos monofiléticos. Outra hipótese considera Alticinae como um grupo parafilético, enquanto suporta a monofilia de Galerucinae (CROWSON; CROWSON, 1996; DUCKETT et al., 2004; KIM et al., 2003; REID, 1995). Por outro lado, Lingafelter; Konstantinov (1999), através da análise cladística, utilizando caracteres morfológicos, propuseram a hipótese de monofilia entre Galerucinae e Alticinae, sendo este último grupo uma linhagem monofilética altamente derivada dentro de Galerucinae, ocupando o “status” de tribo. Além da problemática de posição sistemática dos Alticinae, outra questão refere-se aos problemas de identificação das espécies pertencentes a vários gêneros.

Considerando o pequeno número de espécies de Alticinae da fauna brasileira analisada citogeneticamente, bem como a grande variabilidade cariotípica em relação a número cromossômico, tipos de sistema cromossômico de determinação sexual e as divergências de classificação deste grupo, este trabalho tem como objetivo analisar duas populações de *Omophoita communis* por meio de análises citogenéticas convencionais, análise da genitália masculina e reconstrução da relação filogenética.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Foram analisados 27 indivíduos adultos de duas populações de *O. communis*, coletados nas cidades de Ponta Grossa, Paraná, Brasil (S 25° 07'10" e W 49°56'24") e de Nonoai, Rio Grande do Sul, Brasil (S 27° 23'25" e W 52°44'10"). Os exemplares foram identificados, taxonomicamente, pelo pesquisador Carlos Campaner do Museu de Zoologia, USP, SP, Brasil.

Os animais foram dissecados em solução fisiológica para insetos e as preparações realizadas de acordo com a metodologia descrita por Almeida; Zacaro; Cella (2000). A montagem dos cariótipos foi feita de acordo com o tamanho e a morfologia dos cromossomos, segundo a proposta de Levan; Fredga; Sandberg (1964).

O comprimento dos cromossomos para cada população de *O. communis* foi obtido por meio do programa Easy Idio (DINIZ; XAVIER, 2006). Foram analisadas 40 células em metáfase II para cada população. Os dados do comprimento médio dos cromossomos foram submetidos à análise de variância e comparados entre si pelo teste T a 5% de probabilidade no programa estatístico SASMAGRI (CANTERI et al.,

2001).

A morfologia do edeago de quatro indivíduos de cada população de *O. communis* foi analisada em um estereomicroscópio Medilux MDL-F e por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da marca FEI, modelo Quanta 250, em sistema ambiental (baixo vácuo). O edeago foi dissecado segundo metodologia de Smith (1979) com modificações, a estrutura foi retirada do abdômen e aquecida em hidróxido de potássio (1:10) e, posteriormente lavadas em álcool 70% e guardadas em glicerina.

Para as análises de reconstrução das relações filogenéticas foi sequenciada a porção inicial do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I (COI) de cinco indivíduos de cada população de *O. communis*. A extração de DNA genômico dos indivíduos foi realizada segundo a técnica de Sambrook; Russel (2001) com pequenas modificações, utilizando o tecido da cabeça, pronoto e fêmur, macerados em nitrogênio líquido. Para a amplificação das sequências foi realizada a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando os *primers*: COI-Foward- 5' TAATTGGAGGATTTGGA-ATTG 3'; COI-Reverse- 5' CCTGGTAAAATTAATAACTTC 3' (ALMEIDA et al., 2013). Cada reação foi realizada em um volume total de 100 µL, nas seguintes concentrações: 20 ng de DNA genômico, Tampão de reação 1X (200 mM Tris-HCl, pH 8,4, 500 mM KCl), 1 unidade de Taq DNA polymerase (Invitrogen), 1 pMol de cada primer, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTP (Invitrogen®). O processo de amplificação foi realizado em termociclador, nas seguintes condições: 95°C por 4 minutos, seguido de 35 ciclos com 3 passos, sendo o primeiro de 94°C por 60 segundos, o segundo de 53,3°C por 60 segundos para anelamento dos *primers* e o terceiro a 72°C. Finalmente um passo a 72°C por 10 minutos para renaturação e extensão final da fita de DNA. Os produtos finais de PCR foram purificados com KIT de purificação Illustra TFX™ GE, conforme instruções do fabricante, e enviados para sequenciamento em um sequenciador automático (ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer) armado com capilares de 50cm e polímero POP6 (Applied Biosystems).

Para cada indivíduo, as sequências “ forward ” e “ reverse ” foram corrigidas, comparadas e editadas pelo programa “Chromas Lite, 2.0”. Posteriormente as sequências consenso foram alinhadas, utilizando o programa “Clustal W, 1.8” (THOMPSON et al., 1994) presente no programa “Bioedit v 7.0.9” (HALL, 1999). Os pontos de mutação foram checados manualmente, utilizando o programa “Chromas

Lite, 2.0", garantindo a fidelidade da posição dos nucleotídeos das sequências e, quando necessário, possíveis erros interpretados pelo alinhamento como mutação foram eliminados.

Para a escolha do melhor modelo de substituição nucleotídica que representa as amostras, foi utilizado o programa MEGA 6.05 (TAMURA et al., 2013), que segundo o critério Akaike gerou que o modelo Tamura 3-parâmetros é que melhor explica as diferenças entre as sequências. A reconstrução filogenética para identificar as possíveis relações entre os citótipos foi realizada no programa MEGA 6.05 (TAMURA et al., 2013) utilizando os modelos neighbour-joining (NJ) e máxima-verossimilhança (MV) com a opção "complete-deletion" e 10000 interações para bootstrap. As espécies *Diabrotica undecimpunctata* (AY 242473.1) e *Allochroma* sp. (AF 479422.1) foram usadas como grupo externo.

## RESULTADOS

A análise citogenética dos indivíduos das duas populações de *Omophoita communis* estudadas evidenciou a ocorrência de uma grande variação interpopulacional no que se refere ao número diploide, morfologia cromossômica e fórmula meiótica, sendo possível separá-las em dois citótipos.

A análise de células mitóticas de *O. communis*, das populações de Ponta Grossa e Nonoai, citótipo I, mostrou que os indivíduos possuem número diploide  $2n=22$  cromossomos e fórmula cariotípica  $14m+4sm+4A$ , sendo o sistema de determinação sexual Xy com cromossomos sexuais gigantes. O estudo do cariótipo evidenciou a predominância de cromossomos metacêntricos, seis pares autossômicos (pares 1, 3, 4, 5, 9 e 10) e os cromossomos sexuais X e y. Além disso, dois pares são submetacêntricos (pares 2 e 6) e dois pares acrocêntricos (pares 7 e 8) (Figura 1 A). O estudo de células meióticas dos citótipos I evidenciou a fórmula meiótica  $2n=10II+X+y$ , com cromossomos sexuais assinápticos. O cromossomo y possui uma constrição secundária em um dos braços cromossômicos (Figura 1 B). A análise de células em metáfase II mostrou o complemento haplóide de  $n=10+X$  e  $n=10+y$  (Figura 1 C).

Os dados citogenéticos obtidos somente para os indivíduos da população de Nonoai, citótipo II, evidenciaram o número diplóide  $2n=12$  cromossomos e fórmula

cariotípica  $7m+4sm+1a$ , com sistema de determinação sexual  $Xy$ , sendo estes considerados grandes quando comparados aos das outras espécies de Coleoptera, porém, menor que do citótipo I. A morfologia cromossômica observada foi metacêntrica (pares 1, 4, 5 e X), submetacêntrica (pares 2 e 3) e acrocêntrica (cromossomo y) (Figura 2 A). O estudo das células meióticas evidenciou a fórmula  $2n= 5II+X+y$ , com cromossomos sexuais assinápticos em metáfases I (Figura 2 B). A análise de metáfases II evidenciou o complemento haplóide de  $n= 5+X$  e  $n= 5+y$  (Figura 2 C).

O estudo comparativo do comprimento médio dos cromossomos em metáfase II para os dois citótipos mostrou que o tamanho médio dos cromossomos do citótipo I é  $1,395 \mu m$  e do citótipo II é de  $3,405 \mu m$ . O resultado da análise de variância mostrou que esses valores são altamente significativos a 1%.

A análise da morfologia do edeago das populações de Ponta Grossa e Nonoai, citótipo I, mostrou um lobo-médio côncavo, com a porção apical de extremidade alargada, arredondada e levemente torneada em vista dorsal. Na porção apical em vista frontal possui estruturas afiladas e recurvadas (Figura 3B, D, F, H, J). O estudo da morfologia do edeago dos indivíduos da população de Nonoai, citótipo II, evidenciou o lobo-médio côncavo, com a extremidade apical afilada e ápice acuminado com estruturas retas e discretas (Figura 3A, C E, G, I).

As árvores consenso da reconstrução filogenética obtida pelos métodos de neighbour-joining e máxima verossimilhança mostraram a mesma topologia com quatro grupos. O primeiro grupo é suportado por um valor de bootstrap de 82%, incluindo indivíduos que apresentam o citótipo I e a espécie *Omophoita equestris*. Nesse agrupamento o citótipo I mostra uma subdivisão em dois ramos, evidenciando uma possível diferenciação genética entre os indivíduos. O segundo grupo com 96% de recuperação de valores de bootstrap, agrupa as outras espécies do gênero *Omophoita* (*O. sexnotata*, *O. perssonata*, *O. sericella* e *O. octoguttata*), mostrando uma possível parafilia. O terceiro grupo recupera 100% de valor de bootstrap e agrupa os citótipos I e II, subdividindo em dois ramos, sendo um com o citótipo II e o outro com o citótipo I e um indivíduo com o citótipo II. O quarto grupo, mais ancestral, refere-se às espécies do grupo externo (Figura 4).

## DISCUSSÃO

Os dados citogenéticos descritos na literatura para todos os representantes da subtribo Oedionychina e para as espécies do gênero *Omophoita* mostram número diplóide igual a 22 cromossomos e fórmula meiótica  $2n= 10II+X+y$  com cromossomos sexuais grandes e assinápticos, sendo essas características conservadas na subtribo (PETITPIERRE et al., 1988; SMITH; VIRKKI, 1978; VIRKKI, 1968, 1970, 1988; VIRKKI et al., 1991; VIRKKI; SANTIAGO-BLAY; CLARK, 1991; VIRKKI; SANTIAGO-BLAY, 1993). No entanto, variações do número diplóide já foram descritas no gênero sendo essas principalmente devido a fusões cêntricas, diminuindo o número diplóide e/ou à presença de cromossomos B, desta forma, aumentando o número cromossômico (PETITPIERRE et al., 1988; VIRKKI; SANTIAGO-BLAY, 1993).

Até o presente, três espécies constituem exceções, em relação a estas características, sendo *O. clerica* (VIRKKI, 1967a), com  $2n= 23= 20+V+J+I$  ( $V=y_2$ ;  $J=X$ ;  $I=y_1$ ), *O. insciens* (VIRKKI; SANTIAGO-BLAY, 1996), com  $2n= 23= 20+1s+X+y$  e  $2n= 24= 20+2s+X+y$  ( $s=$  cromossomo supernumerário) e *O. lunata*, que pode ter  $2n= 24= 22+X+y$  (PETITPIERRE et al., 1988) e  $2n= 22= 20+X+y$  (SMITH; VIRKKI, 1978). Neste sentido, os dados obtidos para espécimes do citótipo I, em relação ao número diplóide, ao tipo de sistema de cromossomos sexuais e fórmula meiótica estão de acordo com os já descritos para quase todos os representantes deste gênero e da subtribo Oedionychina. No entanto, a variação observada para o citótipo II, coletados na região de Nonoai, Rio Grande do Sul, está sendo descrita pela primeira vez no gênero *Omophoita*. Redução considerável no número diplóide de Oedionychina foi descrita em *Alagoasa parana*, com  $2n= 16II= 7II+X+y$  e *Alagoasa equestris* com  $2n= 12= 10+X+y$  (VIRKKI, 1978; VIRKKI; SANTIAGO-BLAY, 1993). Variações devido a fragmentos cromossômicos foram descritas em *Alagoasa arcifera*, os quais variam de 0 a 3 fragmentos, sendo  $2n= 16$  ou  $19= 7II+0-3fr+X+y$  (PETITPIERRE et al., 1988; VIRKKI; SANTIAGO-BLAY, 1993).

Através da comparação dos dados citogenéticos obtidos para os dois citótipos pode-se inferir uma derivação cariotípica baseada em rearranjos cromossômicos do tipo fusão, incluindo todos os autossomos do complemento. Essa possibilidade sustenta-se no fato de que o cariótipo proposto como basal para Alticinae é  $2n= 22= 20+X+y$  e também pelo fato dos cromossomos autossômicos do citótipo II ( $2n=12$ ;  $3.405 \mu\text{m}$ ) apresentarem 2,5 vezes o tamanho dos cromossomos autossômicos dos indivíduos com citótipo I ( $2n= 22$ ;  $1.395 \mu\text{m}$ ), sendo esta diferença estatisticamente



significativa a 1% de probabilidade. Outra possibilidade é que os citótipos correspondem a duas espécies crípticas.

Na opinião de Petitpierre (1997) a análise morfométrica dos cromossomos pode ser útil para mostrar diferenças quando os cariótipos de espécies relacionadas são muito semelhantes. Yadav; Pillai (1975) através da análise morfométrica dos cromossomos em metáfase mitótica demonstrou diferenças entre os cariótipos das espécies de *Cassida*. Diferenças no tamanho dos cromossomos de espécies com cariótipos diferentes também foram observadas por Hsiao; Hsiao (1983) para o gênero *Leptinotarsa*.

Adicionalmente, o estudo da morfologia do edeago mostrou que as genitálias masculinas são diferentes, limitando o funcionamento do mecanismo de cópula entre os citótipos, podendo sustentar uma diferenciação entre as duas possíveis espécies. Segundo Eberhard (1985) e Garnier et al. (2005) a morfologia da genitália masculina de insetos e animais com fecundação interna tem sido muito utilizada como um carácter de diferenciação de espécies relacionadas devido a rápida evolução. Fujiyama (1989) e Fujiyama; Takanashi (1994) identificaram variações no número diploide de *Chrysolina aurichalcea* de duas populações,  $2n= 32$ ,  $2n= 42$  e  $2n= 46$ , verificaram também diferenças na genitalia masculina e definiram as populações como subespécies.

A análise da árvore consenso da reconstrução filogenética a partir de sequências do gene COI, também evidenciou que os citótipos mostram agrupamentos diferentes, sendo o citótipo I agrupado com *Omophoita equestris* e em outro ramo está o citótipo II. Em um dos ramos da árvore filogenética, o citótipo I está agrupado com um indivíduo do citótipo II, estes compartilham caracteres mitocondriais que podem ser explicados por introgressão gênica do indivíduo do citótipo II (Figura 4). Evolutivamente supõe-se que existia uma população ancestral com número diploide  $2n= 22$  cromossomos que, por algum evento desconhecido se dividiu em duas populações (ramos 1 e 3), mantendo as características morfológicas e citogenéticas, porém com diferenciação mitocondrial. Uma das populações (ramo 3) através do tempo, sofreu uma diferenciação genética (mitocôndrial) e cariotípica por meio de rearranjos cromossômicos originando  $2n= 12$  cromossomos, porém mantendo a maioria das características fenotípicas ancestrais. No entanto essas populações diferenciaram morfológicamente (Edeago). Desta forma, os dados da reconstrução filogenética corroboram os dados da morfologia do edeago e

evidenciam a presença de duas espécies.

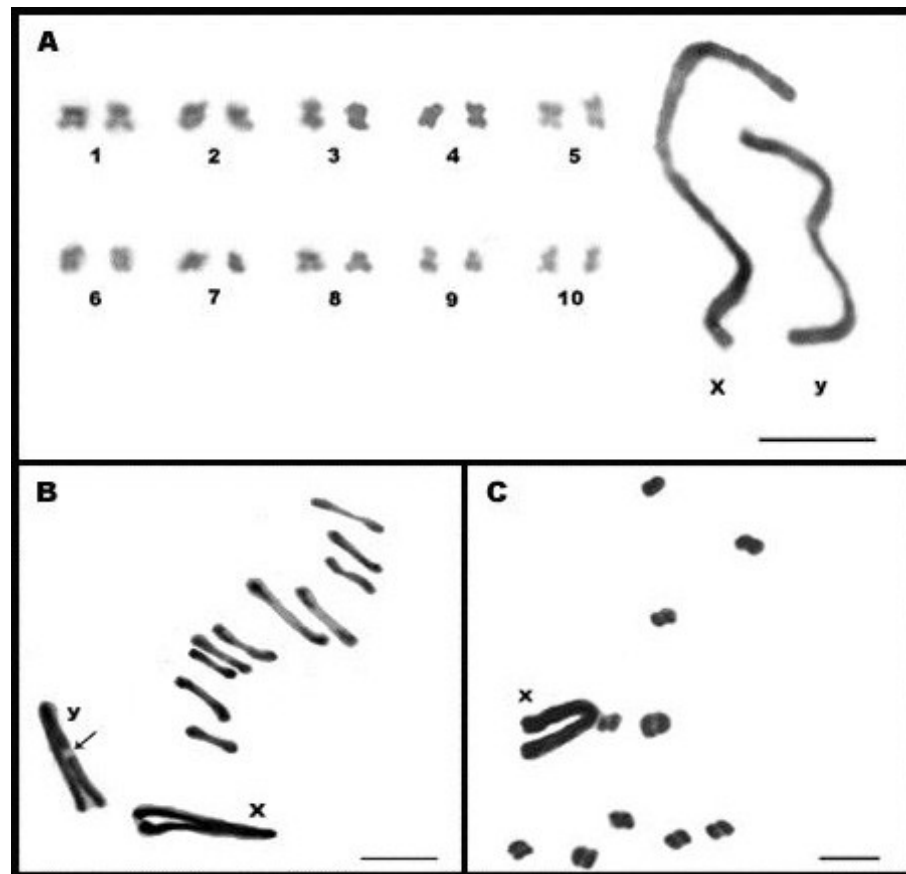
Campbell (2009) mostrou a ocorrência de introgressão entre *Diabrotica barber* e *Diabrotica longicornis*, evidenciando que espécies geneticamente distintas podem se reproduzir e gerar alguns descendentes híbridos. Além disso, a ocorrência em simpatria representa uma zona de hibridação e a variabilidade genética da introgressão pode ser benéfica e mantida por seleção natural.

Uma possível explicação para essas duas espécies apresentarem características fenotípicas tão semelhantes seria a ocorrência de mimetismo. Begossi e Benson (1988) e Del-Claro (1991) descrevem que mimetismo é muito frequente em Chrysomelidae, principalmente no gênero *Omophoita*. Neste caso, o mimetismo estaria relacionado com a coloração aposemática e/ou a produção de uma substância tóxica, tornando a espécie não palatável, sendo este último já descrito para *O. octoguttata* que se alimenta da planta *Peltodon radicans* (Labiatae), retirando e armazenando toxinas de suas plantas hospedeiras que podem provocar mal-estar, inquietação e vômitos em um predador, se este ingerir esta presa aposemática (DEL-CLARO, 1991).

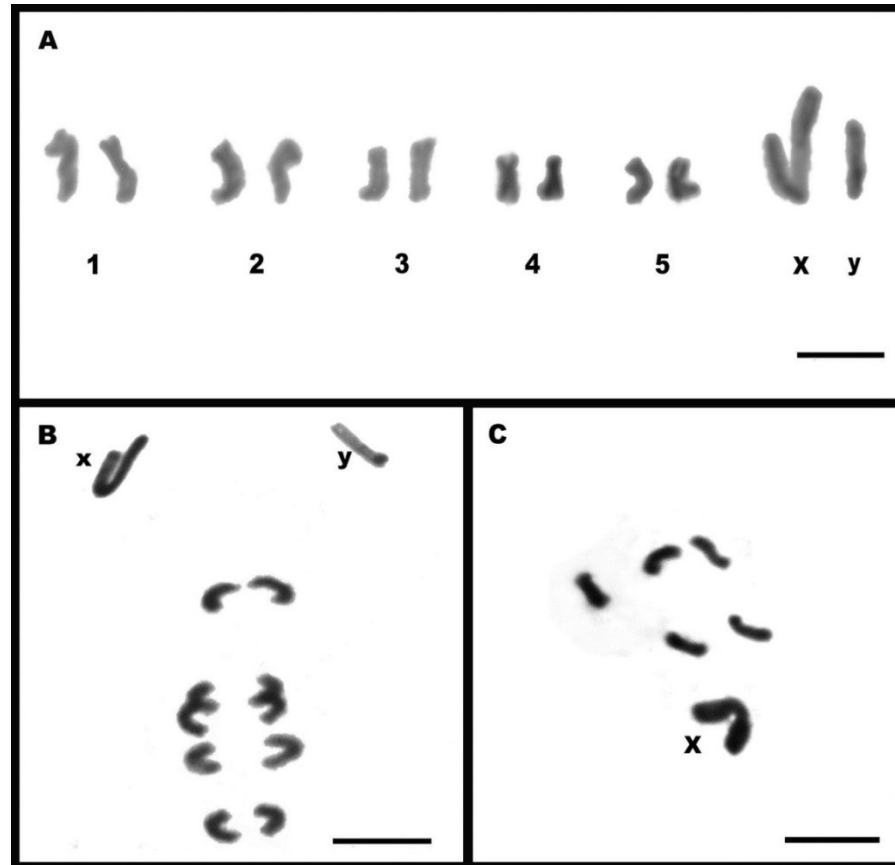
Os dados citogenéticos, morfológicos e moleculares suportam a hipótese de que são duas espécies crípticas diferenciadas em caracteres importantes no processo de isolamento reprodutivo.

## **Agradecimentos**

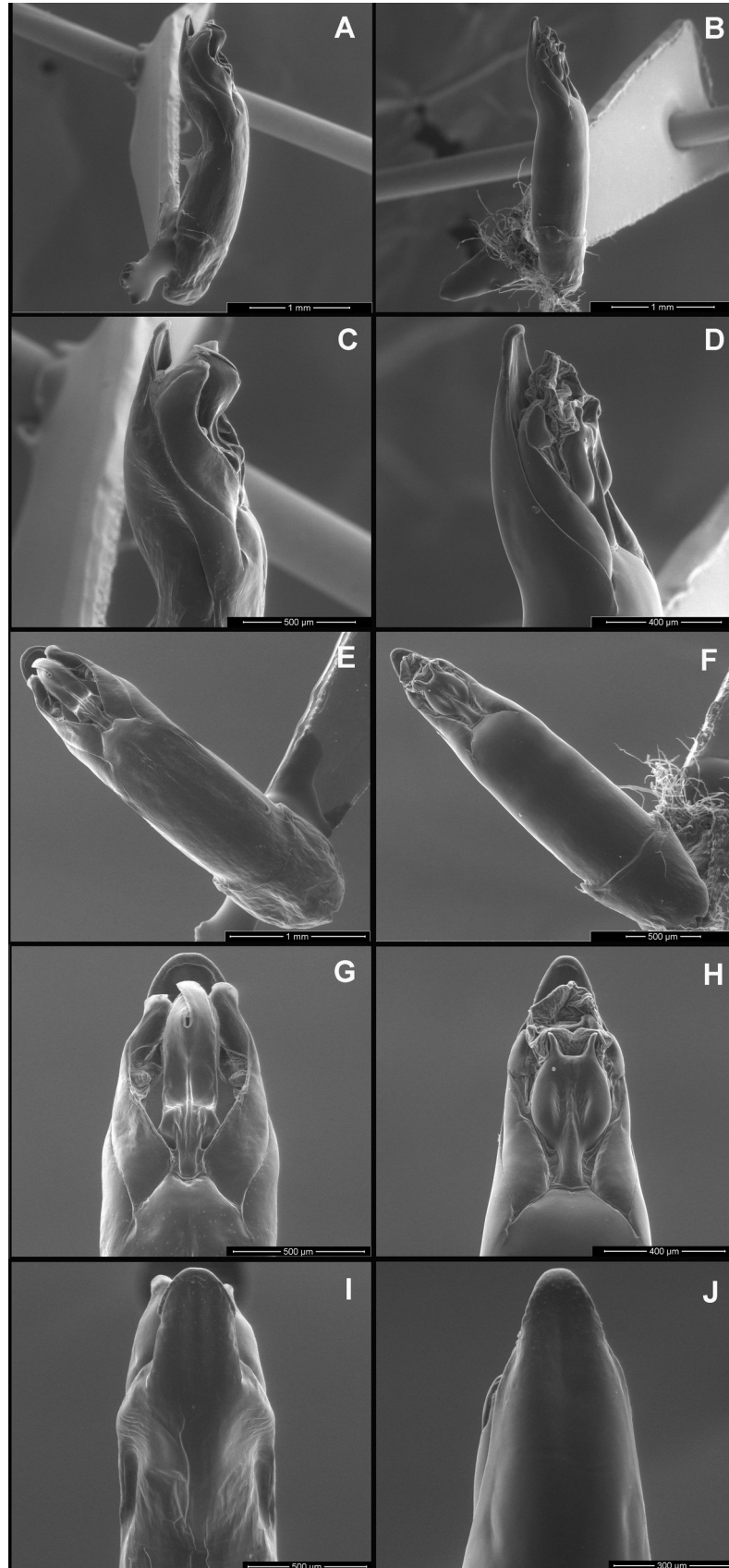
Este trabalho teve o apoio financeiro da Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPEs. Os autores agradecem a Dra. Angélica Maria Penteado-Dias, da Universidade Federal de São Carlos, coordenadora do INCT dos Hymenoptera Parasitoides da Região Sudeste Brasileira, a Dra. Luciana Bueno dos Reis Fernandes, da Universidade Federal de São Carlos pela análise no microscópio eletrônico de varredura (MEV) e a doutoranda Josiane Traldi, da Universidade Federal de São Carlos pelo apoio com as análises no MEV.



**Figura 1** – Células meióticas de macho do Citótipo I de *Omophoita communis*, com coloração convencional. **A.** Cariótipo espermatogonial com  $2n= 22$  cromossomos. **B.** Metáfase I, presença de  $2n= 10II+X+y$ . Seta = constrição secundária. **C.** Metáfase II com complemento haplóide  $n= 10+X$ . Escala= 10  $\mu$ m.



**Figura 2** – Células meióticas de um macho do Citótipo II de *Omophoita communis*, em coloração convencional. **A.** Cariótipo espermatogonial com  $2n = 12$  cromossomos. **B.** Metáfase I apresentando fórmula meiótica  $2n = 5II + X + Y$ . **C.** Metáfases II com complemento haplóide  $n = 5 + X$ . Escala = 10  $\mu\text{m}$ .



**Figura 3-** Edeagos de *O. communis* do Citótipo I (A, C, E, G, I) e do Citótipo II (B, D, F, H, J). A, B -Vista lateral completa; C, D - Detalhe da região apical vista lateral; E, F - Vista frontal completa; G, H - Detalhe da região apical vista frontal; I, J - Detalhe da região apical vista posterior. Escala= 1.5mm.

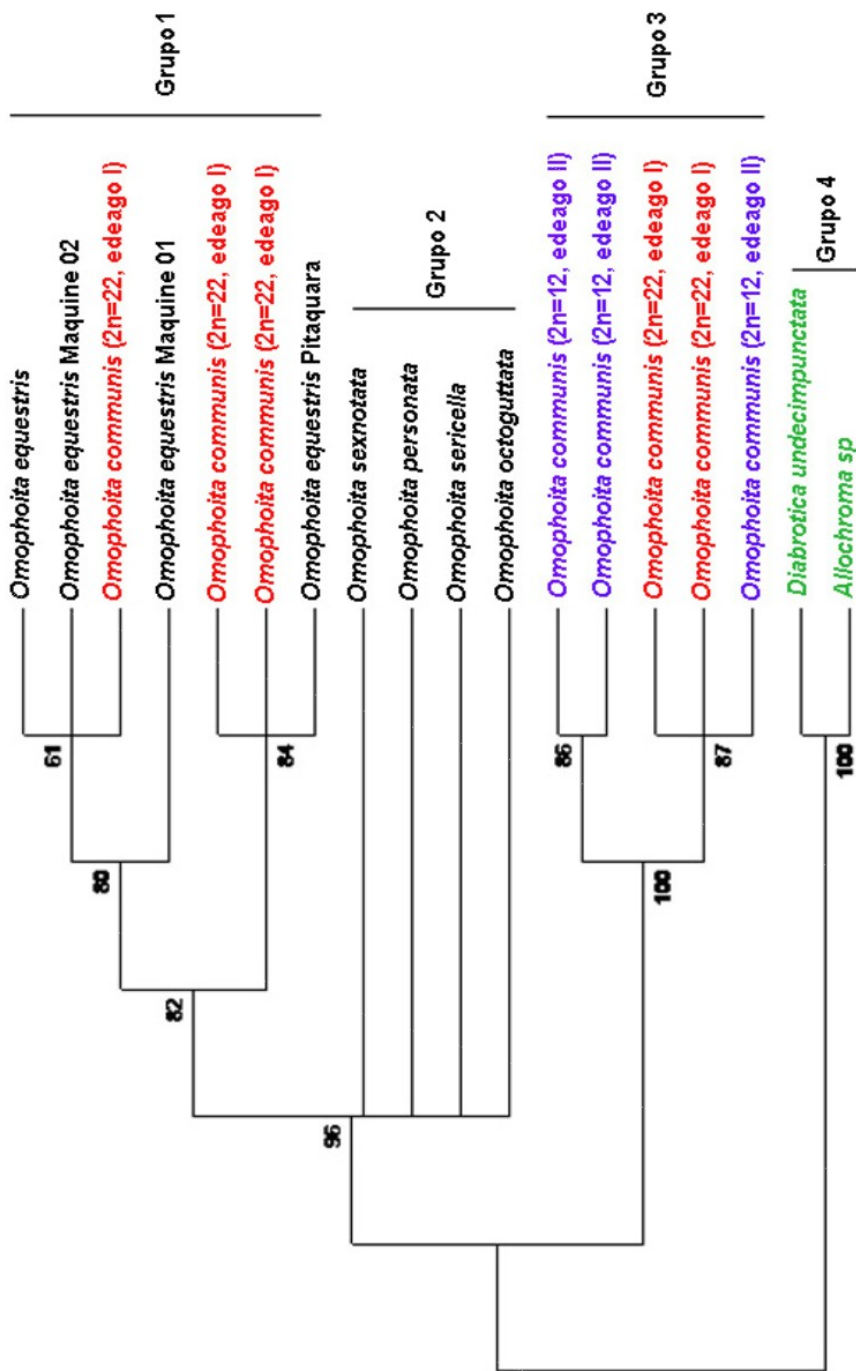


Figura 4- Árvore consenso das relações filogenéticas obtida pelo método de máxima verossimilhança (MV). Bootstrap com 10000 interações.

## 4.2 CAPÍTULO II

**Diferenciação cariotípica em *Omophoita sexnotata* (Coleoptera, Alticinae) e dispersão de pseudogene DNAr 5S**

## RESUMO

A organização e o mapeamento das famílias ribossomais são úteis marcadores e podem elucidar a variação do cariótipo e a organização genômica em diversos grupos de eucariotos. Poucas espécies de Coleoptera foram estudadas para a localização das famílias gênicas. O objetivo deste trabalho foi mapear o gene DNAr 5S nos cromossomos de *Omophoita sexnotata* e propor estratégias de dispersão desse gene no cariótipo. O mapeamento do DNAr 5S, evidenciou a presença do cluster em todos os cromossomos autossômicos do complemento, sendo esse padrão de dispersão descrito pela primeira vez em Coleoptera. A dispersão do cístron DNAr 5S foi descrita para alguns organismos, e nestes casos os autores relacionaram a dispersão dos genes ribossomais com a presença de elementos transponíveis. Para elucidar os mecanismos de dispersão do gene DNAr 5S dentro do genoma de *O. sexnotata*, os fragmentos de 5S ribossomal obtidos foram sequenciados, resultando em sequências similares a RNAr 5S de *Drosophila melanogaster*, elemento transponível EnSpm, retropseudogene de 5S e microsatélite. A análise das sequências utilizando o método dot plot evidenciou a presença de DNA repetitivo para os produtos clonados do cromossomo 2 (clone 2), 4 (clone 4), 5 (clone 3) 9. Adicionalmente, a análise da estrutura secundária do RNAr 5S, mostrou que as sequências obtidas não são funcionais quando comparadas ao percentual de energia livre da sequência original do RNAr 5S.

**Palavras chave:** Hibridação *in situ* Fluorescente, Famílias multigênicas, Dispersão do DNAr 5S, Estrutura secundária de RNA.



## INTRODUÇÃO

O gênero *Omophoita* é o segundo com o maior número de espécies analisadas do ponto de vista citogenético dentro da subtribo Oedionychina (19), onde todas as espécies ocorrem na região Neotropical. A maior parte das espécies analisadas possui cariótipo uniforme com  $2n = 22$  cromossomos e fórmula meiótica  $2n = 10II+X+y$ , com predominância de cromossomos metacêntricos (ALMEIDA; CAMPANER; CELLA, 2009; PETITPIERRE et al., 1988; SMITH; VIRKKI, 1978; VIRKKI, 1967, 1970, 1973, 1876, 1983, 1989; VIRKKI; SANTIAGO-BLAY; CLARK, 1991; VIRKKI; SANTIAGO-BLAY, 1996). A tribo Oedionychini possui como característica contrastante dos demais coleópteros a presença de cromossomos sexuais extremamente grandes e assinápticos (SMITH; VIRKKI, 1978; VIRKKI, 1968, 1970, 1988; VIRKKI; SANTIAGO-BLAY; CLARK, 1991).

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 foram analisadas utilizando esse procedimento (ALMEIDA et al., 2010; CABRAL-DE-MELLO et al., 2011b; GOLL et al., 2012; MELO et al., 2013). O estudo em mapeamento do DNAr 5S é recente em Coleoptera, segundo Cabral-de-Mello et al. (2010, 2011a) a condição ancestral para Coleoptera seria a presença de apenas um par cromossômico portador do gene 5S. Algumas espécies de Scarabaeidae e Tenebrionidae possuem apenas um par cromossômico portador do cístron (CABRAL- DE-MELLO et al., 2010; 2011a; GOLL et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2012). Em Alticinae, os primeiros trabalhos mostram dois pares portadores do gene 5S em *Omophoita magniguttis* e três em *Alagoasa florigera* (MELO et al., 2013).

A organização genômica do gene 5S foi estudada em diversos eucariotos, tais como peixes, *Drosophila*, *Xenopus*, e camundongo (HART; FOLK, 1982; LONG; DAWID, 1980; SILVA et al., 2011). Os primeiros pseudogenes de 5S foram descritos em *Xenopus* (JACQ; MILLER; BROWNLEE, 1977). A dispersão do cístron DNAr 5S foi descrita para alguns organismos, e nestes casos os autores relacionaram a dispersão com a presença de elementos transponíveis (CABRAL-DE-MELLO et al., 2011b; GILLESPIE, et al., 2006; YE et al., 2005). No genoma de *Dictyostelium discoideum* (Ameboidea) foi descrito um pseudogene DNAr 5S retrotransponível, sendo que este não possui os primeiros 15 pb da sequência do gene selvagem

DNAr 5S (SZAFRANSKI et al., 2003). Em plantas vasculares, o retrotransposon Cassandra, possui fragmentos das sequências de RNAr 5S conservadas, sendo esse elemento um exemplo da associação dos elementos transponíveis com genes ribossomais (RUSLAN et al., 2008).

Os elementos transponíveis (ETs) são segmentos de DNA capazes de se replicar e de se inserir em genes ou outras regiões genômicas, apresentando especificidade por genes repetitivos, pois estes possuem herança estável e evolução paralela aos ETs (BURKE, et al., 1998; KOJIMA; FUJIWARA, 2005; 2004; 2003). Uma vez que os genes ribossomais são altamente repetitivos, o efeito deletério da inserção do ET em uma unidade do gene de DNAr não interfere em sua expressão, embora o acúmulo de inserções pode causar mutações, deleções e alterar os níveis de expressão do gene (MALIK; EICKBUSH, 1999; FRANZ; KUNZ, 1981).

O mapeamento de genes ribossomais tem se mostrado uma ferramenta útil para questões de análises relacionadas à diversificação cariotípica e para o entendimento da evolução dos genomas de eucariotos (ALMEIDA et al., 2010). O objetivo deste trabalho foi mapear o gene DNAr 5S nos cromossomos de *Omophoita sexnotata* e identificar os mecanismos responsáveis pela dispersão desse gene no cariótipo.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Foram analisados 24 machos adultos de *O. sexnotata*, coletados em populações naturais na região do Passo do Pupo, Itaiacoca distrito do município de Ponta Grossa, Paraná, Brasil (25°07'10"S; 49°56'24"O e 25°07'20"S; 49°56'04"O). 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; Cella (2000). Essas preparações foram submetidas à Hibridação *in situ* fluorescente (FISH).

A FISH baseou-se na técnica descrita por Pinkel; Straume; Gray (1986), com modificações realizadas por Almeida et al. (2010). As sondas DNAr 5S foram obtidas por PCR marcado, empregando-se a Digoxigenina-11-dUTP (Roche®), a partir do gene parcial 5S de *Omophoita octoguttata* (Alticinae) clonado (MELO et al., 2013). Para o reconhecimento do sinal foi utilizado Antidigoxigenina-Rodamina (Roche®). Os cromossomos foram contracolorados com 4'-6-diamidino-2-

phenylindole (DAPI). 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).

Os dez bivalentes autossômicos de *O. sexnotata* foram microdissectados individualmente, a partir de preparações citogenéticas em lamínulas descritas anteriormente, com o auxílio de agulhas de vidro de 0,7 µm, em microscópio invertido equipado com micromanipulador mecânico. Cada bivalente foi colocado separadamente em tubo tipo eppendorf e posteriormente amplificado através do kit “Whole Genome Amplification” (WGA 4 – SIGMA), de acordo com as recomendações do fabricante.

As amplificações do DNAr 5S de cada cromossomo foram realizadas com os primers 5S\_F: 5'- AACGNCCATANCACGCTGNA - 3' e 5S\_R: 5' - AGCGGTCNCNCATCNANGTAC - 3' (MELO et al., 2013), em um volume total de 10 µL, contendo 20ng do produto de WGA 4, 1x tampão, 3.75mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM de dNTP, 1 pmol de cada primer e 1U/µL de *Taq* polimerase (Invitrogen®).

Os produtos de PCR foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 1% corados com gelred Biotium® (1:1000) e enviados para sequenciamento (sequenciador automático - ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer). Posteriormente, o produto amplificado de cada cromossomo foi clonado separadamente (10 placas) no vetor pGEM (Promega®) e transformado na bactéria *Escherichia coli* DH5α (Gibco GBRL®). O isolamento e a purificação do DNA plasmidial de aproximadamente 10 colônias de cada placa (cromossomo) baseou-se no método de lise alcalina. Os vários plasmídeos foram amplificados e aqueles que apresentaram tamanhos diferentes foram enviados para sequenciamento (sequenciador automático - ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer). As sequências obtidas foram analisadas e editadas com o auxílio do programa BioEdit (HALL, 1999).

As sequências obtidas foram submetidas ao software BLAST – Basic Local Alignment Search Tool, presente no National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) e ao software CENSOR presente no Genetic Information Research Institute (GIRINST) (<http://www.girinst.org/censor/index.php>) (KOHANY et al., 2006), para a identificação de possíveis homologias entre genes de outros organismos. A análise do padrão de

repetitividade das sequências foi obtida através do método dot plot utilizando o software Geneious 4.8 (DRUMMOND et al., 2009). Para a obtenção das estruturas secundárias do RNAr 5S e seus respectivos valores de energia livre ( $\Delta G$ ) as sequências foram submetidas ao software mfold através da opção RNA folding from (<http://mfold.rutgers.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form>) (ZUKER, 2003).

## RESULTADOS

A análise de células espermatogoniais de *O. sexnotata* submetidas a Hibridação *in situ* fluorescente, com a sonda de DNAr 5S evidenciou a presença desse cluster em todos os cromossomos autossômicos, na região proximal do braço curto (Figura 1), mostrando uma grande dispersão.

A análise do sequenciamento dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação do gene DNAr 5S de cada cromossomo, mostrou homologia com sequências repetitiva de 5S de *Drosophila melanogaster*, no entanto foram obtidas sequências com homologias ao elemento transponível EnSpm e, várias sequências que não tem homologia com sequências depositadas no Gene Bank, porém não mostraram identidade ao gene DNAr 5S (Tabela 1).

A amplificação dos clones obtidos de cada cromossomo evidenciou a presença de fragmentos de vários tamanhos, variando de 280pb a 350pb (Figura 2). O estudo das sequências obtidas a partir desses clones de DNAr 5S de cada cromossomo mostrou similaridade com sequências de retropseudogene 5S derivado de *Cavia porcellus* (preá), com sequências de microssatélite de *Sus scrofa* (javali) e também com sequências repetitivas de 5S de *Drosophila melanogaster* (Tabela 1).

A análise de todas as sequências obtidas, através do método dot plot utilizando o software Geneious 4.8.4, evidência que o clone 2 do cromossomos 2, o clone 4 do cromossomo 4, o clone 3 do cromossomo 5 e o produto de PCR do cromossomo 9 apresentam um padrão de linhas paralelas à diagonal principal, caracterizando um padrão de DNA repetitivo. O clone 4 do cromossomo 4 mostra menor grau de repetitividade (Figura 3).

A comparação das estruturas secundárias obtidas para cada sequência clonada com a estrutura secundária original do RNA 5S mostrou que somente os clones 1 do cromossomo 5 e o clone 2 do cromossomo 6 apresentaram estrutura próxima a original. Além disso, esses mesmos clones mostraram valores de energia

livre mais próxima do valor da energia livre do RNA 5S original. Todas as outras sequências mostraram valores muito diferentes (Tabela 1).

## DISCUSSÃO

A subtribo Oedionychina mostra-se muito interessante para estudos evolutivos, pois a maioria das espécies possuem características cariotípicas e citológicas conservadas e outras derivadas, quando comparadas à maioria dos coleópteros. A grande parte das espécies analisadas citogeneticamente possui número cariotípico uniforme com  $2n= 22$  cromossomos e cromossomos sexuais gigantes (PETITPIERRE, 1988, SMITH; VIRKKI, 1978; VIRKKI, 1984). Por outro lado, quando analisada com técnicas de citogenética molecular evidenciam que sua composição é variável entre as diferentes espécies (ALMEIDA et al., 2010).

Nos últimos anos, técnicas mais refinadas foram empregadas para análise, caracterização e diferenciação dos cromossomos em coleópteros (ALMEIDA et al., 2010; CABRAL- DE-MELLO et al., 2010; 2011a; GALIÁN; PROENÇA; VOGLER, 2007). Apesar da Hibridação *in situ* Fluorescente ser um eficiente e rotineiro método para localização de famílias gênicas em diversos organismos, poucas espécies de coleópteros foram analisadas sob este aspecto.

Os dados citogenéticos obtidos com relação a morfologia cromossômica e a fórmula meiótica de *O. sexnotata* são concordantes com a descrição de Almeida; Campaner; Cella (2009). Os indivíduos possuem  $2n= 22$  cromossomos e fórmula meiótica de  $2n= 10II+X+y$  (Figura 1 A). A morfologia dos autossomos é predominantemente metacêntrica, os cromossomos sexuais apresentam tamanhos diferentes entre si, sendo denominados X e y e são extremamente grandes e metacêntricos.

O resultado obtido com o mapeamento do gene ribossomal 5S mostrando a presença desse gene em todos os cromossomos autossômicos difere das descrições para Coleoptera presentes na literatura. Considerando a proposta de um par portador do DNAr 5S ser a condição basal, essa dispersão evidencia uma alta diferenciação no cariótipo de *O. sexnotata* (CABRAL-DE-MELLO et al., 2010, 2011a).

Cabral-de-Melo et al. (2010) usando a técnica de FISH com sonda de DNAr 5S descreveram um único par cromossômico (par 2) portador desse gene em

*Dichotomius germinatus* (Scarabaeidae). Goll et al. (2012), utilizando análise com células mitóticas de *Lagria villosa* (Tenebrionidae), com sonda de DNAr 5S mostrou a presença de um cluster no braço curto do par 4. Oliveira et al. (2012) estudando cinco espécies do gênero *Coprophanaeus* (Scarabaeidae) mapeou o cluster de DNAr 5S em um par autossômico em cada espécie do gênero.

O mapeamento de DNAr 5S em algumas espécies de *Omophoita* realizado por Melo et al. (2013) evidenciou a presença de um cluster associado a um par autossômico em *Omophoita octoguttata*, *Omophoita personata* e *Alagoasa coccinelloide*. Adicionalmente, os mesmos autores encontraram dois clusters em dois pares autossômicos em *Omophoita magniguttis* e a presença de três bivalentes portadores do cluster 5S em *Alagoasa florigera*. A ocorrência de uma grande dispersão do gene 5S no cariótipo em Aticinae foi descrita para *Systema tenuis* (Systemini); no entanto, essa espécie não apresenta esse gene em todos os cromossomos (MELO et al., 2013).

As sequências obtidas de cada cromossomo mostrou a similaridade com sequências de DNA repetitivo, retropseudogene e elementos transponíveis associados. Assim pode-se inferir que o processo de dispersão do gene DNAr 5S no cariótipo de *O. sexnotata* ocorreu por meio de transposon e que as sequências obtidas correspondem a pseudogenes de 5S. Essa inferência é sustentada pela análise da estrutura e funcionalidade do RNA que mostrou que as sequências analisadas não são funcionais. Portanto, qualquer interação dos genes ribossômicos e elementos transponíveis em termos de reorganização cromossômica parece ser de interesse evolutivo, porém, permanece largamente inexplorado. Uma série de trabalhos utilizando hibridação *in situ* mostrou vários exemplos de associação de elementos transponíveis no interior ou perto de DNAr 5S (BELYAYEV et al., 2001; 2005; RASKINA et al., 2004; 2008) .

Gillespie et al. (2006) estudando a estrutura e composição das sequências de RNAr em *Apis mellifera* (Hymenoptera) relatou a ocorrência do elemento R2 de retrotransposição nos pontos de inserção do DNAr. Cabral-de-Mello et al. (2011b) relacionou a dispersão do cistron DNAr 5S em gafanhotos, com a presença de elementos transponíveis.

A mobilidade de DNAr foi descrita em muitas espécies de plantas, e tanto a localização quanto o número de locais de DNAr parecem variar entre espécies estreitamente relacionadas. Raskina et al. (2004) propuseram que transposons

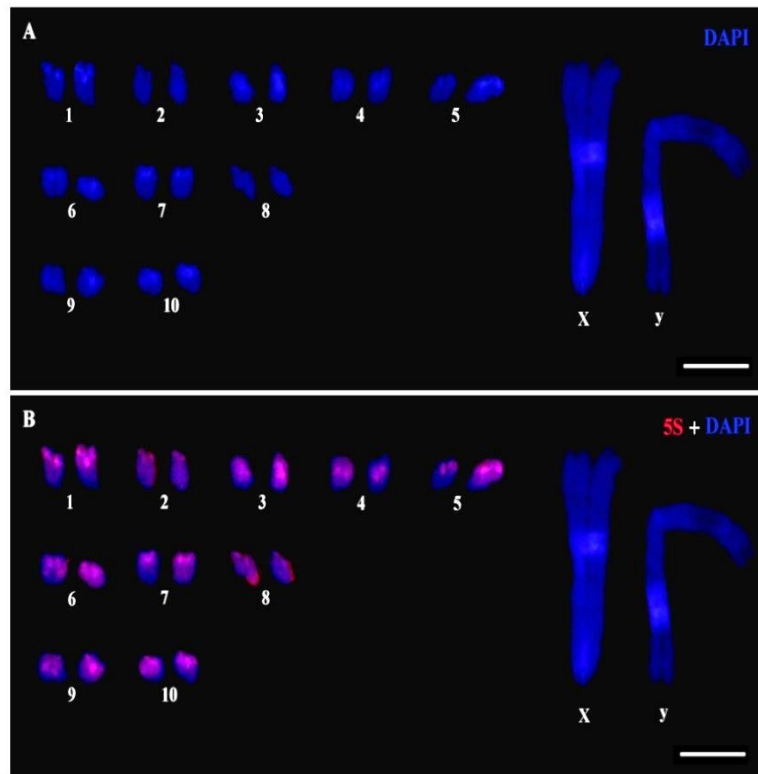
(En/Spm- like) podem estar envolvidos na disseção de DNAr, e demonstram ainda a capacidade de alguns transposons (*Helitrons*) em capturar os genes inteiros e movê-los para as diferentes partes do genoma (JIANG et al., 2004; LAI et al., 2005). Ruslan et al. (2008) associam a distribuição do gene 5S em plantas vasculares com a atividade do retrotansposon Cassandra.

A possível associação de elementos transponíveis a DNAr é devido a preferência de inserção dos ETs nas regiões repetitivas, pois, DNAr são alvos comuns para vários retrotransposons LINE e também para alguns transposons de Classe II. O acúmulo preferencial destes dois componentes dentro do mesmo contexto genômico, talvez tenha sido impulsionado ao longo do tempo por seleção contra inserções em outras partes do genoma, ou uma possível relação funcional entre a dispersão de elementos transponíveis e genes ribossomais (AVERBECK; EICKBUSH, 2005; RASKINA et al., 2008).

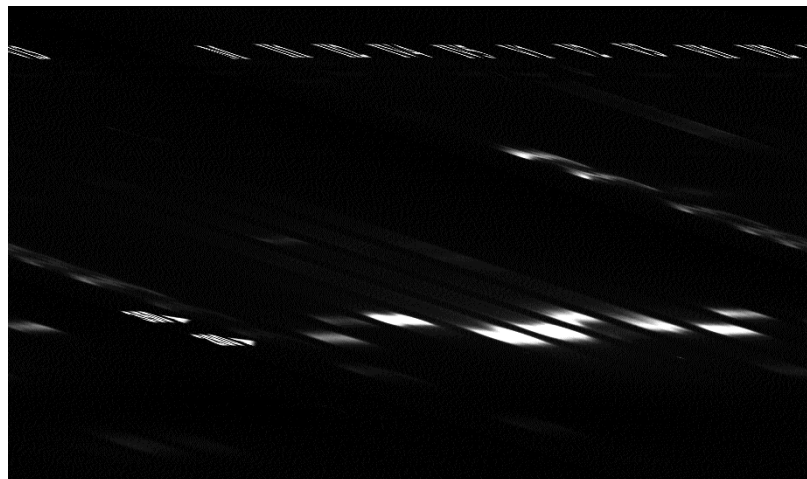
### **Agradecimentos**

Este trabalho teve apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq, da Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES.



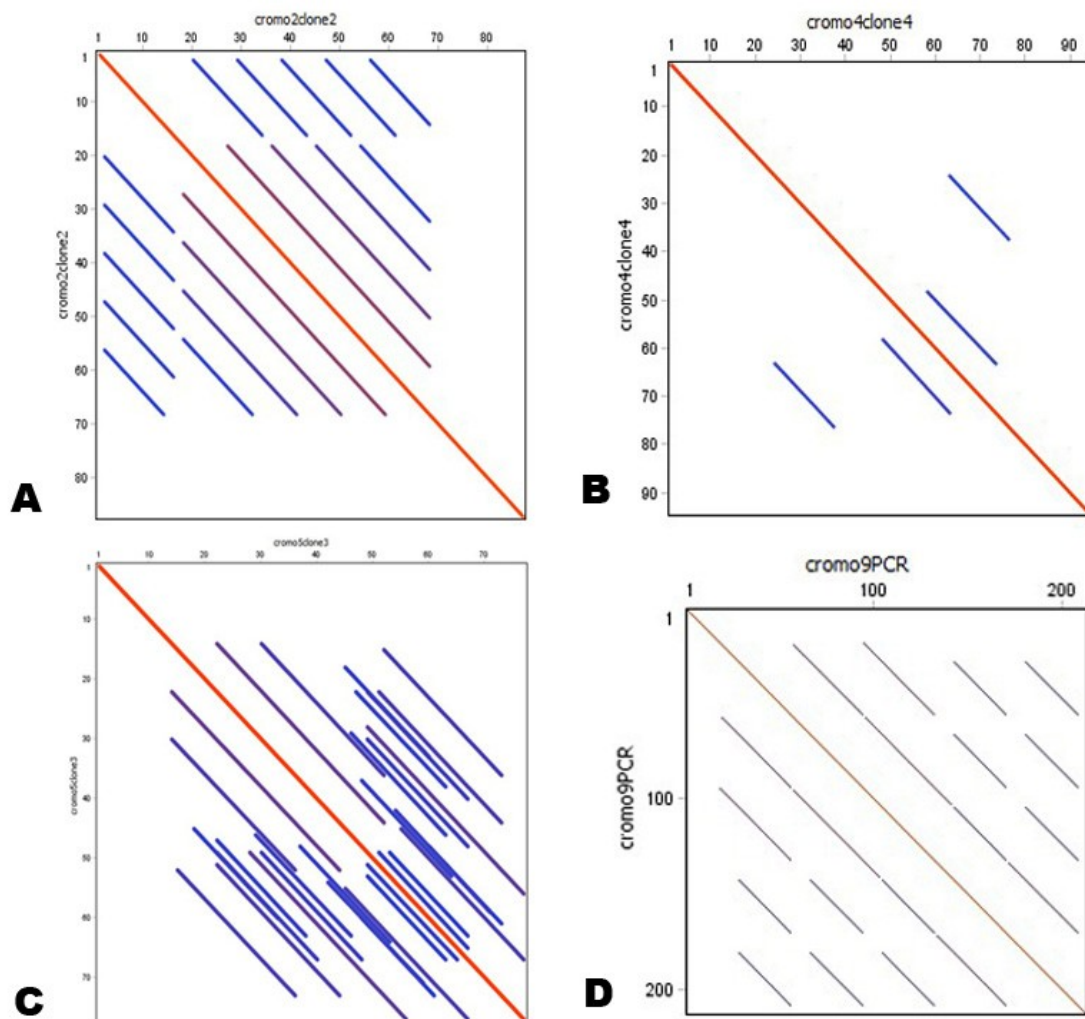


**Figura 1** - Metáfase espermatogonial de um exemplar macho de *Omophoita sexnotata* com  $2n=22$  cromossomos submetida à FISH com sonda de DNAr 5S (vermelho) contra corado com DAPI (azul) **A.** Cariótipo espermatogonial com DAPI. **B.** O mesmo cariótipo mostrando o mapeamento do cistron 5S em todos os cromossomos autossômicos. Escala= 10  $\mu$ m.



**Figura 2** - Gel de agarose a 2%, mostrando a amplificação do DNAr 5S a partir dos clones dos cromossomos. M= marcador de peso Molecular (100pb). Número romano= número do cromossomo. Número arábico= número do clone.





**Figura 3** - Análise das seqüências com o método dot plot. **A.** Seqüência do clone 2 do cromossomo 2. **B.** Seqüência do clone 4 do cromossomo 4. **C.** Seqüência do clone 3 do cromossomo 5. **D.** Seqüência do cromossomo 9. Traços diagonais paralelos representam grau de repetitividade.

**Tabela 1** – Análise das seqüências do gene DNAr 5S, tamanho em pares de bases (pb), caracterização e similaridade com seqüências depositadas no Gene Bank (NCBI) ou GIRINST (Censor) e análise da seqüência do RNA 5S em relação a energia livre ( $\Delta g$ ) obtida na plataforma

mfold.

Material	Tamanho pb	Caracterização	Similaridade	$\Delta g$ (kcal/mol)
5S	93	Sequencia repetitiva	5S_DM <i>Drosophila melanogaster</i> 83%	-33.90
Cromossomo 01	200	Desconhecido	-	-70.85 – -66.37
Cromossomo 02	98	Desconhecido	-	-69.05 – -63.95
Cromossomo 02 clone 01	40	Desconhecido	-	-11.90 – -11.80
Cromossomo 02 clone 02	87	Desconhecido	-	-16.80 – -15.03
Cromossomo 03	95	Desconhecido	-	-66.64 – -64.44
Cromossomo 04	54	Sequencia repetitiva	5S_DM <i>Drosophila melanogaster</i> 77%	-76.17
Cromossomo 04 clone 04	90	Retropseudogene	5S-derivado <i>Cavia porcellus</i> 91%	-
Cromossomo 04 clone 05	90	Retropseudogene	5S-derivado <i>Cavia porcellus</i> 92%	-
Cromossomo 05	60	Sequencia repetitiva	5S_DM <i>Drosophila melanogaster</i> 76%	-66.64 – -66.44
Cromossomo 05 clone 01	92	Sequencia repetitiva	5S_DM <i>Drosophila melanogaster</i> 84%	-24.86 – -23.03
Cromossomo 05 clone 03	77	Sequencia microsatelite	<i>Sus scrofa</i> clone KVL5077 78%	-
Cromossomo 06	60	Sequencia repetitiva	5S_DM <i>Drosophila melanogaster</i> 76%	-80.27 – -71.14
Cromossomo 06 clone 01	47	Desconhecido	-	1.90 – 1.00
Cromossomo 06 clone 02	92	Sequencia repetitiva	5S_DM <i>Drosophila melanogaster</i> 86%	-31.40 – -25.97
Cromossomo 06 clone 03	49	Desconhecido	-	-0.70 – -1.7
Cromossomo 07	69	Sequencia repetitiva	5S_DM <i>Drosophila melanogaster</i> 76%	-49.23 – -48.70
Cromossomo 08	58	Sequencia repetitiva	5S_DM <i>Drosophila melanogaster</i> 77%	-67.74 – -60.15
Cromossomo 09	49	Elemento Transponivel	EnSpm-1_TA 75%	-
Cromossomo 10	102	Desconhecido	-	-68.04 – -58.59

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foi analisado citogeneticamente *O. communis* de duas populações, as quais evidenciaram a ocorrência de variação interpopulacional, sendo possível separá-las em dois citótipos.

Os dados obtidos para espécimes do citótipo I  $2n= 22= 10II+X+y$ , estão de acordo com os já descritos para quase todos os representantes deste gênero e da subtribo Oedionychina. Os indivíduos do citótipo II possuem variações,  $2n= 12= 5II+X+y$ , sendo a redução observada pela primeira vez no gênero *Omophoita*. Pode-se inferir com as análises que rearranjos cromossômicos do tipo fusão entre os autossomos tenham ocorrido nessa espécie.

O estudo da morfologia do edeago mostrou que as genitálias masculinas são diferentes, possivelmente funcionando como barreira reprodutiva entre os citótipos. Adicionalmente a reconstrução filogenética a partir de sequências do gene COI, evidenciou que os citótipos mostram agrupamentos diferentes, desta forma, os dados da reconstrução filogenética corroboram os dados da morfologia do edeago e apontam a presença de duas espécies. Uma possível explicação para essas duas espécies apresentarem características fenotípicas tão semelhantes seria a ocorrência de mimetismo. Os dados citogenéticos, moleculares e morfológicos suportam a hipótese de que são duas espécies crípticas já diferenciadas com caracteres importantes no processo de isolamento reprodutivo.

O mapeamento físico do gene ribossomal 5S nos cromossomos de *Omophoita sexnotata* mostrou a presença desse gene em todos os cromossomos autossômicos diferindo das descrições para Coleoptera presentes na literatura. Uma vez que a presença de um único par cromossômico portador desse gene é considerado basal para Coleoptera, esse carótipo pode ser considerado altamente diferenciado.

As sequências obtidas de cada cromossomo mostrou a similaridade com sequências de DNA repetitivo, retropseudogene e elementos transponíveis associados. Desta forma, concluímos que o processo de dispersão do gene DNAr 5S no cariótipo de *O. sexnotata* foi por meio de transposon e que as sequências obtidas correspondem a pseudogenes de 5S.

## 6 REFERÊNCIAS

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.; CAMPANER, C.; CELLA. D.M. Cytogenetic of four *Omophoita* species (Coleoptera, Chrysomelidae, Alticinae): A comparative analysis using mitotic and meiotic cells submitted to the standard staining and C-banding technique. **Micron**, v.40, n. 5-6, p. 586-596, 2009.

ALMEIDA, M.C.; GOLL, L.G.; ARTONI, R.F.; NOGAROTO, V.; MATIELLO, R.R.; VICARI, M.R. Physical mapping of 18S rDNA cistron in species of the *Omophoita* genus (Coleoptera, Alticinae) using fluorescent in situ hybridization. **Micron**. v. 41 p. 729-34, 2010.

ALMEIDA, R. B. et al., **Super Árvores Filogenéticas para Galerucinae (Coleoptera: Chrysomelidae) e Siluriformes (Teleostei: Ostariophysii) Agrupando Dados Morfológicos e Moleculares**. 2013, Dissertação de mestrado (Biologia Evolutiva) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2013.

AVERBECK, K. T.; EICKBUSH, T. H. Monitoring the mode and tempo of concerted evolution in the *Drosophila melanogaster* rDNA locus. **Genetics**, 171: 1837–1846, 2005.

BARCISZEWSKA, M. Z. et al., The primary structure of *Harpalus rufipes* 5S ribosomal RNA – A contribution for understanding insect evolution. **Molecular Biology Reports**, v.21, n 3, p. 165-167, 1995.

BARZOTTI, R; et al., 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.

BAUS LONČAR, M.; PAIĆ, F.; UGARKOVIĆ, D. Molecular Cytogenetic Study of

Heterochromatin in Some Coleopteran Insects. **Entomol. Croat.** Vol. 9. Num. 1-2: 47 – 56, 2005.

BECHYNÉ, J.; SPRINGVOLÁ DE BECHYNÉ, B. Evidenz der bisher bekannten *Phenrica* arten (Col. Phytophaga, Alticinae), **Entomol. Tidskr.**, 87, p.142-170, 1966.

BEGOSSI, A.; BENSON, W. W. Host plants and defense mechanisms in Oedionychina (Alticinae). In **Biology of Chrysomelidae** (JOLIVER, P.; PETITPIERRE, E.; HSIAO, T. A.). Kluwer Acad. Publishers.

BELYAYEV, A.; RASKINA, O.; NEVO, E.; Chromosomal distribution of reverse transcriptase containing retroelements in two Triticeae species. **Chromosome, Res** 9: 129–136, 2001.

BELYAYEV, A.; RASKINA, O.; NEVO, E.; Variability of Ty3- gypsy retrotransposons chromosomal distribution in populations of two wild Triticeae species. **Cytogenet Genome, Res** 109:43–50, 2005.

BORROR, D. J.; DELONG, D. M. **Introduction to the Study of Insects.** 7. Ed. Thomson Brooks/ Cole, 864 p., 2005.

BURKE, W. D; et al., Are retrotransposons longterm hitchhikers? **Nature**, 392: 141–142, 1998.

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, D. C; et al., 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.

CAMPBELL, L. **Hybridization in *Diabrotica barberi* Smith and Lawrence and *Diabrotica longicornis* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae): Biology, behavior, field introgression, and a reevaluation of taxonomic status**. Dissertations and Student Research in Entomology Entomology, Department of. University of Nebraska at Lincoln, 2009.

CANTERI, M. G.; ALTHAUS, R. A.; VIRGENS FILHO, J. S.; GIGLIOTI, E. A.; GODOY, C. V. SASM - Agri : Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott - Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, V.1, N.2, p.18-24. 2001.

CAPY, P. et al., Dynamics and evolution of transposable elements. Austin, Texas: **Landes Bioscience**. 197p, 1998.

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

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

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. 2013.

CROWSON, R. A. The phylogeny of Coleoptera, **Ann. Ver. Entomol.** 5, 111-134, 1960.

CROWSON, R. A.; CROWSON, E. A. The phylogenetic relations of Galerucinae

Alticinae. In: JOLIVET, P. H.; COX, M. L. **Chrysomelidae Biology, vol. 1: The classification, Phylogeny and Genetics**. Amsterdam: SPB Publishing, p.97-118, 1996.

DEL-CLARO, K. Notes on mimicry between two tropical beetles in south-eastern Brazil. **J. Trop. Ecol.** 7, 407- 410, 1991.

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.

DRUMMOND, A. J.; ASHTON, B.; CHEUNG, M.; HELED, J.; KEARSE, M.; MOIR, R.; STONES-HAVAS, S.; THIERER, T.; WILSON, A. **GENEIOUS V4.8**, 2009.

DUCKETT, C.N.; GILLESPIE, J.J.; KJER, K.M. Relationships among the subfamilies of Chrysomelidae inferred from small subunit ribosomal DNA and morphology, with special emphasis on the relationship among the flea beetles and the galerucinae. In: JOLIVET, P.; SANTIAGO-BLAY, J.A.; SCHMITT, M. (eds.), *New Developments in the Biology of Chrysomelidae*. **SPB Academic Publishing**, the HAGUE, PP. 3–18, 2004.

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

EBERHARD, W. G. **Sexual selection and animal genitalia**. Harvard Univ. Press, Cambridge, MA, 1985.

EIRÍN-LÓPEZ; J. M.; et al., 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 “orphan” features. **Journal of Molecular Evolution**, v.58, p.131–144, 2004.

ESNAULT, C.; MAESTRE, J.; HEIDMANN, T. Human LINE retrotransposons generate processed pseudogenes. **Nat Genet**, 24:363–367, 2000.

FARRELL, B.D. Inordinate Fondness explained: Why are there so many beetles.



**Science**, 281, p.555-559, 1998.

FARRELL, B.D.; SEQUEIRA, A.S.; Evolutionary rates in the adaptive radiation of beetles on plants. **Evolution**, 58, 1984–2001, 2004.

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.

FESCHOTTE, C.; ZHANG, X.; WESSLER, S. R. Miniature inverted repeat transposable elements and their relationships to established DNA transposons. In: CRAIG NL, CRAIGIE R, GELLERT M, LAMBOWITZ AM (eds) **Mobile DNA II**. ASM Press, Washington, D.C., pp 1147–1157, 2002.

FRANZ, G.; KUNZ, W. Intervening sequences in ribosomal RNA genes and bobbed phenotype in *Drosophila hydei*. **Nature**, 292: 638–640, 1981.

FUJIYAMA, S. Species problems in *Chrysolina aurichalcea* (Mannerheim) with special reference to chromosome numbers. **Entomography**, 6: 443-452, 1989.

FUJIYAMA, S.; TAKANASHI, H. Geographic distribution of two types of chromosome number in *Chrysolina aurichalcea* complex and their phenotypic frequencies of the two color forms in Kanto district, Japan. **Ann. Environ. Sci. Shinshu Univ.**, 16: 53-58, 1994.

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.

GARNIER, S.; et al., When morphometry meets genetics: inferring the phylogeography of *Carabus solieri* using Fourier analyses of pronotum and male genitalia. **J. Evol. Biol.** 18:269–280, 2005.

GILLESPIE, J.J. et al., Characteristics of the nuclear (18S, 5.8S, 28S and 5S) and mitochondrial (12S and 16S) rRNA genes of *Apis mellifera* (Insecta: Hymenoptera):



structure, organization, and retrotransposable elements. **Insect Molecular Biology**, v 15, n. 5, p. 657-686, 2006.

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

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

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.

GÓMEZ-ZURITA, J. G.; HUNT, T.; VOGLER, A. P. Multilocus ribosomal RNA phylogeny of the leaf beetles (Chrysomelidae). **Cladistics**, 24, 34–50, 2008.

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.

HANSEN, M. Phylogeny and classification of the staphyliniform beetles families (Coleoptera). **Biologiske Skrifter, Det Kongelige Danske Videnskabernes Selskab**, 48:1-339, 1997.

HART, R. P.; FOLK, W. R. **J. Biol. Chem.** 257, 11706- 11711, 1982.

HATANAKA, T; HENRIQUE-SILVA, F; GALETTI JR., P.M. A polymorphic, telomeric-like sequence microsatellite in the Neotropical fish *Prochilodus*. **Cytogenetic and Genome Research**. v.98, p. 308-310, 2002.

HSIAO, T. H.; HSIAO, C . Chromosomal analysis of *Leptinotarsa* and *Labidomera* species (Coleoptera: Chrysomelidae). **Genetica**, 60: 139-150, 1983.

JACQ, C.; MILLER, J. R.; BROWNLEE, G. G. **Cell**, 12, 109- 120, 1977.

JIANG, N.; BAO, Z.; ZHANG, X.; EDDY, S. R.; WESSLER, S. R.; Pack-MULE transposable elements mediate gene evolution in plants. **Nature**, 431: 569–573, 2004.

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

KAZAZIAN, H. H. L1 retrotransposons shape the mammalian genome. **Science**, 289:1152–1153, 2000.

KAZAZIAN, H. H.; MORAN, J. V. The impact of L1 retrotransposons on the human genome. **Nat Genet**, 19:19–24, 1998.

KIM, S.J.; KJER, K.M.; DUCKETT, C.N. Comparison between molecular and morphological-based phylogenies of Galerucine / Alticine leaf beetles (Coleoptera: Chrysomelidae). **Insect Syst. Evol.** 34, 53–64, 2003.

KOHANY, O. et al., Annotation, submission and screening of repetitive elements in Repbase: repbaseSubmitter and Censor. **BMC Bioinformatics**, 7:474, 2006.

KOJIMA, K. K.; FUJIWARA, H. Evolution of target specificity in R1 clade non- LTR retrotransposons. **Mol Biol Evol**, 20: 351–361, 2003.

KOJIMA, K. K.; FUJIWARA, H. Crossgenome screening of novel sequence- specific non-LTR retrotransposons: various multicopy RNA genes and microsatellites are selected as targets. **Mol Biol Evol**, 21: 207–217, 2004.

KOJIMA, K. K.; FUJIWARA, H. Long-term inheritance of the 28S rDNA-specific

retrotransposon R2. **Mol Biol Evol**, 22: 2157–2165, 2005.

LAI, J.; LI, Y.; MESSING, J.; DOONER, H. K.; Gene movement by Helitron transposons contributes to the haplotype variability of maize. **Proc Natl Acad Sci USA**, 102: 9068–9073, 2005.

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

LAWRENCE, J. F.; et al., Beetles of the world: a key and information system for families and subfamilies. Version 1.0 for MSWindows. **Melbourne: CSIRO**, 1999.

LAWRENCE, J. F.; NEWTON, A. F. Families and subfamilies of Coleoptera (with selected genera, notes, references and data on family-group names) 1995. In: PAKALUK J; SLIPINSKI, S. A. (eds.). **Biology, Phylogeny, and classification of Coleoptera: Papers Celebrating the 80th Birthday of Roy A. Crowson**. Pp. 779-1092. Warszawa: Muzeum i Instytut Zoologii PAN, v. 2, VI +559-1092 pp.

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

LINGAFELTER, S. W.; KONSTANTINOV, A. S. The monophyly and relative rank of alticine and galerucine leaf beetles: a cladistics analysis using adult morphological characters (Coleoptera: Chrysomelidae). **Entomol. Scand**, 30, p. 397-416, 1999.

LONG, E. O.; DAWID, I. B. Repeated genes in Eukaryotes. **Annual Reviews Biochemistry**, v. 49, p. 727-264, 1980.

MALIK, H. S.; EICKBUSH, T. H. Retrotransposable elements R1 and R2 in the rDNA units of *Drosophila mercatorum*: abnormal abdomen revisited. **Genetics**, 151: 653–665, 1999.

MARTINS, C. et al., A tandemly repetitive centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) is derived from 5S DNA.

**Genetica**, v.127, n. 1-3, p 133-141, 2006.

MARTINS, C. Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. In: Pisano, E.; Ozouf-Costaz, C.; Foresti, F.; Kapoor, B. G. Fish Cytogenetics. New Hampshire. **Kapoor Science Publisher**. p.421-453, 2007.

MELO, G. B. et al., **Análise Citogenética e Molecular em Espécies da Subfamília Alticinae (Coleoptera: Chrysomelidae)**. 2013, Dissertação de mestrado (Biologia Evolutiva) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2013.

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

OKADA, N. SINEs. **Curr Opin Genet Dev**, 1:498–504, 1991.

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

OSTERTAG, E. M.; KAZAZIAN, H. H. Biology of mammalian L1 retrotransposons. **Annu Rev Genet**, 35:501–538, 2001.

PETITPIERRE E. The value of cytogenetics for the taxonomy and evolution of Leaf Beetles (Coleoptera, Chrysomelidae). **Miscel.lania Zoologica** 20.1, 1997.

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.

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

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

PETITPIERRE, E.; et al., Chromosome numbers and meioformulae of Chrysomelidae. In: Jolivet, E., Petitpierre, E., Hsiao, T.H. (Eds.), *Biology of Chrysomelidae*. **Kluwer Academic Publishers**, pp. 161 - 186, 1988.

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.

PROENÇA, S. J. R.; SERANO, 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.

RASKINA, O.; BELYAYEV, A.; NEVO, E. Activity of the En/ Spm- like transposons in meiosis as a base for chromosome repatterning in a small, isolated, peripheral population of *Aegilops speltoides* Tausch. **Chromosome, Res** 12: 153–161, 2004.

RASKINA, O.; et al., A. Repetitive DNA and chromosomal rearrangements: speciation-related events in plant genomes. **Cytogenet Genome, Res** 120:351–357, 2008.

REID, C. A. M. A cladistic analysis of subfamilial relationships in the Chrysomelidae *sensu lato* (Chrysomelidae) In: J. PAKALUL, S.; SLIPINSKI, A. **Biology, Phylogeny, and Classification of Coleoptera**. Warszawa: Muzeum i Institut Zoologi PAN, p.559-631, 1995.

RILEY, E. G.; et al., Chrysomelidae Latreille 1802. In: ARNETT, R. H.; THOMAS, M. C. **American Beetles**. CRC press, p. 617-691, 2002.

RUSLAN, K.; TANSKANEN, J.; CHANG, W.; ANTONIUS, K.; SELA, H.; PELEG, O.; SCHULMAN, A. H. Cassandra retrotransposons carry independently transcribed 5S RNA. **PNAS**, v105 n. 15 p. 5833-5838, 2008.

SAMBROOK, J. RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning**. 3rd edition. 3 vol. Cold Spring

Harbor Laboratory Press, New York, 2001.

SCHNEIDER, M. C.; et al., Chromosomal similarities and differences among four Neotropical Elateridae (Conoderini and Pyrophorini) and other related species, with comments on the NOR patterns in Coleoptera. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 45, p.308-316, 2007.

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

SMIT, A. F. A. Interspersed repeats and other moments of transposable elements in mammalian genomes. **Curr Opin Genet Dev**, 9:657–663, 1999.

SMITH, E. H. Techniques for the dissection and mounting of the male (aedeagus) and female (spermatheca) genitalia of the Chrysomelidae (Coleoptera). **The Coleopterists Bulletin**, 33, 93-103, 1979.

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

SMITH, S.G.; VIRKKI, N. Animal Cytogenetic. Berlin: **Gebruder Borntraeger**. 1978.

SILVA, M. Natural Triploidy In *Rhamdia Quelen* Identified By Cytogenetic Monitoring In Iguaçu Basin, Southern Brazil. **Environ Biol Fish**. 91:361–366, 2011.

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

SZAFRANSKI, K.; et al., Template jumping by a LINE reverse transcriptase has created a SINE-like 5S rRNA retropseudogene in *Dictyostelium* **Mol Gen Genomics**, 271: 98–102, 2003.

TAMURA, T.; SONE, M.; NAKAMURA, Y.; SHIMAMURA, T.; IMOTO, S.; MIYANO, S.; OKAZAWA, H. A restricted level of PQBP1 is needed for the best longevity of

Drosophila. **Neurobiol. Aging** 34(1): 356.e11--356.e20, 2013.

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.

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

VAIO, E. S.; Postiglioni, A. Stolaine Cassidines (Coleoptera, Chrysomelidae) With  $Xy_p$  Sex Chromosomes and a Derivative System  $X_pneo Xneo_y_p$ . **Canadian Journal of Genetics and Cytology**. 16(2): 433-440, 1974.

VAHIDI, H.; et al., 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 rediberoamericana de biogeografía y entomología sistemática PRIBES 2002**. Sociedad Entomológica Aragonesa (SEA) & Cytel, Zaragoza, 2002. pp. 193–205.

VIRKKI, N. High chromosome number and giant postreductional sex chromosomes in the beetle *Walterianella venusta* SCHAUFUS (SChrysomelidae, Alticinae). **J. Agr.Univ.** Puerto Rico 47: 154 296, 1963.

VIRKKI, N. On the cytology of some Neotropical Chrysomelids (Coleoptera). **Ann. Arad. Sci.** Fenn.-Ser . A I V 75: 1 – 25, 1964.

VIRKKI, N. Rapidallocyclic 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, 1967a.

VIRKKI, N. Orientation and segregation of asynaptic multiple sex chromosomes in the male *Omophoita clerica* ERICHSON (Coleoptera: Alticidae). – **Hereditas**, 57: 278-285, 1967b.

VIRKKI, N. Regular segregation of seven asynaptic sex chromosomes in the male of *Asphaera daniela* BECHYN (Coleoptera, Alticidae). **Caryologia**, 2: 47-51, 1968.

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

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

VIRKKI, N. Prophase of spermatocytes I in Oedionychina (Coleoptera). The **Journal of Agricultura oh the University of Puerto Rico**, v. LX, p. 661-674, 1976.

VIRKKI, N. Banding of Oedionychina (Coleoprera: Alticinae) chromosomes C- and Ag-Bands. **Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico**, v.67, p. 221-255, 1983.

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., p.71-76, 1984.

VIRKKI, N. The sex chromossomes of *Disonycha* (Coleoptera, Alticinae): Xy + nX systems. **Cytobios**, v53, p. 43-55, 1988a.

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



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

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

VIRKKI, N. SANTIAGO-BLAY, J. A. Chromosomes of some Puerto Rican flea beetles (Coleoptera: Chrysomelidae: Alticinae): multiple cytogenetic evolutionary tendencies in neotropics. **Juornal Zoological Evolution Research**, v. 32, 113-119, 1996.

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

VITTURI, R.; et al., rDNA (18S–28S and 5S) co-localization and linkage between ribosomal genes and (TTAGGG)<sub>n</sub> 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.; et al., Repetitive DNAs in the slug *Milax nigricans*: association of ribosomal (18S–28S and 5S rDNA) and (TTAGGG)<sub>n</sub> telomeric sequences in the slug *M. nigricans* (Mollusca: Gastropoda: Pulmonata). **Micron**, v.35, p.255–260, 2004.

WESSLER, S. R.. Eukaryotic Transposable Elements: Teaching Old Genomes New Tricks. **The Implicit Genome**. pp 138-165. 2006.

WHEELER, W. C; et al., The phylogeny of the extant hexapod orders. **Cladistics**, 2001.

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

WHITING, M. F; et al., The Strepsiptera problem: phylogeny of the *holometabolous*

insect orders inferred from 18S and 28S ribosomal DNA sequences and morphology. **Systematic Biology**, 46(1): 1-68, 1997.

XIONG, Y.; EICKBUSH, T. Origin and evolution of retroelements based upon their reverse transcriptase sequences. **EMBO, J** 9:3353–3362, 1990.

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. Karyological studies on four species of Cassidinae (Coleoptera: Chrysomelidae). *Genen Phaenen*, 18: 55-63, 1975.

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

ZUKER, M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. **Nucleic Acids Research**, 31 (13), 3406-3415, 2003.

## 7 ANEXOS

### 7.1 CITOGENÉTICA CONVENCIONAL

7.1.1 Metodologia para obtenção dos cromossomos a partir de gônadas segundo Almeida; Zacaro; Cella (2000).

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

#### 7.1.2 Coloração Convencional Segundo Giemsa

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

### 7.2 ESTUDO MORFOLÓGICO

7.2.1 Protocolo para dissecação do edeago segundo Smith (1979), ligeiramente modificado.

1. Aquecer o abdômen em solução 1:10 de hidróxido de potássio e água destilada por 2 ou 3 minutos, sem ferver;
2. Em água destilada fria, rebater os tergitos, abrindo o abdômen pela margem lateral esquerda;
3. Repetir o passo 1 até que o abdômen esteja amolecido;
4. Em água destilada fria separar a genitália do trato intestinal;
5. Enxaguar a genitália em etanol 70%;
6. Transferir a genitália para glicerina para estudo;
7. Montar o edeago em lâmina provisória para observação em estereomicroscópio.

### 7.3 CITOGENÉTICA MOLECULAR

#### 7.3.1 Extração de DNA – (SAMBROOK E RUSSEL, 2001), com modificações.

1. Colocar a cabeça, o pronoto e o fêmur em um tubo tipo Eppendorf e macerá-lo com nitrogênio líquido com auxílio de um bastão;
2. Adicionar 250  $\mu$ l de solução de lise (NaCl 0.4M, EDTA 0.1M pH 8.0, Proteinase K 100 g/ml, SDS 0.1%) e homogeneizar a amostra;
3. Colocar em banho-maria à temperatura de 50°C durante 1 hora e 30 minutos;
4. Adicionar 250  $\mu$ l de RNase (100 mg/ml) mantendo-o em banho-maria à 37°C por 1 hora, procedendo a leve agitação periódica;
5. Acrescentar 500  $\mu$ l de uma solução contendo fenol: clorofórmio: álcool isoamílico na proporção 50: 48: 2;
6. Agitar suavemente o tubo por 30 minutos;
7. Centrifugar o material por 10 minutos a 10.000 rpm;
8. Transferir com auxílio de pipeta o sobrenadante, sem a camada fenólica;
9. Adicionar NaCl 1M para a precipitação do DNA juntamente com 2 volumes de etanol gelado absoluto;
10. Inverter o tubo diversas vezes para a visualização do DNA;
11. Centrifugar o material por 5 minutos a 10.000 rpm e descartar o sobrenadante;
12. Adicionar 500  $\mu$ l de etanol 70% e deixar descansar por 5 minutos;
13. Centrifugar o material por 5 minutos a 10.000 rpm e descartar o sobrenadante;
14. Secar o DNA em estufa à 37°C overnight;
15. Ressuspender o DNA em 30  $\mu$ l de tampão TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM) ou água autoclavada e armazenar em freezer - 20°C.

#### 7.3.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR), para o gene COI.

Reagentes	Concentração de uso	Concentração final	Volume
H <sub>2</sub> O	-	-	45 µL
Tampão	10X	1	10 µL
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1,5 mM	3 µL
dNTP Mix	2 mM	0,2 mM	10 µL
Primer Forward	10 pMOL	1,5 pMOL	10µL
Primer Reverse	10 pMOL	1,5 pMOL	10µL
Taq Polimerase	(5 U/µL)	1 U/µL	2 µL
DNA	20 ng/µ	20 ng/µL	10 µL
Total			100 µL

**Programa:**

4 minutos a 95°C

1 minuto a 94°C

1 minuto a 53,3°C

1 minuto a 72°C

10 minutos a 72°C

4°C

35 ciclos

7.3.3 Kit de amplificação Sigma- *GenomePlex Single Cell* (WGA 4).

- Lise e fragmentação do Cromossomo

1- Isolar o cromossomo em um micro-tubo de 200µL;

2-Adicionar 9 µLde água no cromossomo;

3- Preparar a solução de fragmentação adicionando 2 µLde proteinase K e 32 µL de 10X *Single Cell Lysis e Fragmentation Buffer*;

4- Centrifugação do Tampão Lise;

5- Adicionar 1µL do tampão lise ao material e Misturar;

6- Aquecer a 99°C por quatro minutos;

7- Colocar no gelo e uma leve centrifugação.

- Preparação da Biblioteca

8- Adicionar 2 µL de *1X Library Preparation Baffer* para cada amostra;

- 9- Adicionar 1  $\mu\text{L}$  de solução estabilizadora e misturar;
- 10- Aquecer à  $95^{\circ}\text{C}$  por dois minutos;
- 11- Deixar no gelo por um minuto, centrifugar e recolocar no gelo por mais um minuto;
- 12- Adicionar 1  $\mu\text{L}$  de *Librari preparation enzyme*, misturar e centrifugar;
- 13- Em um termociclador incubar a solução por:

16 $^{\circ}\text{C}$  por 20 min

24 $^{\circ}\text{C}$  por 20 min

37 $^{\circ}\text{C}$  por 20 min

75 $^{\circ}\text{C}$  por 5 min

4 $^{\circ}\text{C}$

- 14- Ao retirar do termociclador e centrifugar. Esta reação pode ser armazenada à  $-20^{\circ}\text{C}$  por no Maximo três dias.

- Amplificação

- 15- Adicionar na reação 7,5 $\mu\text{L}$  de 10X *Amplification Master Mix*, 48,5 $\mu\text{L}$  de água, 5,0 $\mu\text{L}$  de *WGA DNA Polimerase*;
- 16- Misturar e centrifugar;
- 17- No termociclador incubar à  $95^{\circ}\text{C}$  por 3 min para a desnaturação, após por 25 ciclos de 30 seg à  $94^{\circ}\text{C}$ ; 5 min à  $65^{\circ}\text{C}$  e à  $4^{\circ}\text{C}$  final;
- 18- Ao termino estocar à  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior análise e purificação.

### 7.3.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR), para o gene DNAr 5S.

Reagentes	Concentração de uso	Concentração final	Volume
H <sub>2</sub> O	-	-	4,5 µL
Tampão	10X	1	1 µL
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	3,75 mM	0,75 µL
dNTP Mix	2 mM	0,2 mM	1µL
Primer Forward	10 pMOL	1 pMOL	1µL
Primer Reverse	10 pMOL	1 pMOL	1µL
Taq Polimerase	(5 U/µL)	1 U/µL	0,2 µL
DNA	20 ng/µ	20 ng/µL	1 µL
Total			10µL

**Programa:**

5 minutos a 94°C

1 minuto a 94°C

1 minuto a 56°C

1 minuto a 72°C

5 minutos a 72°C

4°C

35 ciclos

## 7.3.5 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 por 16 horas, centrifugá-la em um eppendorf por 30 segundos em velocidade máxima;



- 3- Adicionar 400 µl da solução I e centrifugar 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.

### 7.3.6 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 10mMHCl) a 37 C;
- 7- Lavar em PBS 1x durante 5 min mexendo 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 uma câmara escura e úmida a 37°C ;
- 15-Montar cada lâmina com 40 µl de solução de hibridação, cobrir com lamínula e deixar por 16 horas 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.

## 7.4 Análise comparativa do comprimento dos cromossomos dos citótipos de *O. communis*

### 7.4.1 Resultado do comprimento médio dos cromossomos de *O. communis*

rep	trat	media	rep	trat	media
1	2	3,2	1	1	1,5
2	2	2,6	2	1	1,3
3	2	3,4	3	1	1,3
4	2	3,4	4	1	1,2
5	2	3	5	1	1,3
6	2	3,2	6	1	1,3
7	2	3,8	7	1	1,3
8	2	3	8	1	1,8
9	2	3,4	9	1	1,6
10	2	3,2	10	1	1,3
11	2	3	11	1	1,6
12	2	3	12	1	1,5
13	2	3,8	13	1	1,2
14	2	2,6	14	1	1,5
15	2	4,4	15	1	1,8
16	2	3,4	16	1	1,5
17	2	3,8	17	1	1,3
18	2	4,4	18	1	1,4
19	2	3,4	19	1	1,2
20	2	4,4	20	1	1,5
21	2	3,4	21	1	2,1
22	2	2,2	22	1	1,2
23	2	3	23	1	1,1
24	2	3	24	1	1,7
25	2	2,6	25	1	1,5
26	2	4	26	1	1,3
27	2	4,4	27	1	1,3
28	2	4	28	1	1,6
29	2	3,6	29	1	1,4
30	2	2,6	30	1	1,4
31	2	3	31	1	1,2
32	2	3,2	32	1	1,4
33	2	2,8	33	1	1,2
34	2	3,2	34	1	1,3
35	2	3,8	35	1	1,2
36	2	4	36	1	1,3
37	2	3,4	37	1	1,3
38	2	3,6	38	1	1,2
39	2	3,6	39	1	1,4
40	2	4,4	40	1	1,3

### 7.4.2 Resultado da análise de variância

Número de tratamentos	2
Número de repetições	40
Delineamento	Inteiramente casualizado

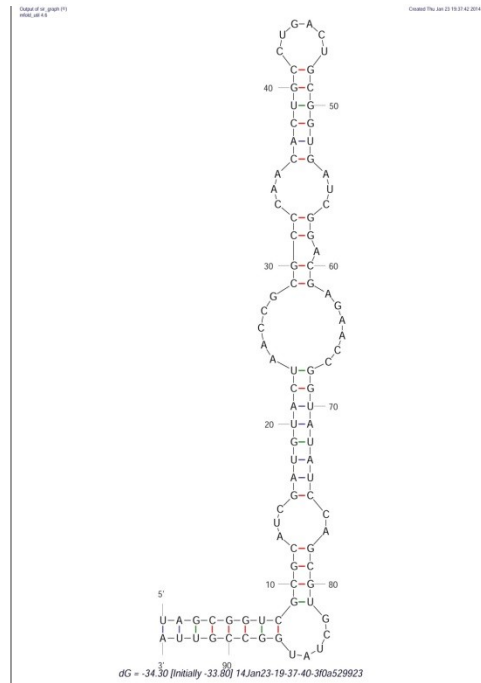
Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	F (5%)	F (1%)
Tratamentos	1	80,802	80,802	445,788371	8	3,96347223 6,9713957
Resíduo	78	14,138	0,1812564			
Total	79	94,94				
C.V.	17,74%					

significativo  
(1%)

Número de tratamentos	2		
Quadrado médio do resíduo	0,18125641		
Graus de liberdade do resíduo	78		
Número de repetições	40		
Grau de significância	5%		
Tratamento	Média	Repetições	Teste t
Trat. 02	3,405	40	a
Trat. 01	1,395	40	b
C.V.	17,74	%	
Dados não transformados			

## 7.5 ESTRUTURA SECUNDÁRIA DO RNA

### - RNAr 5S



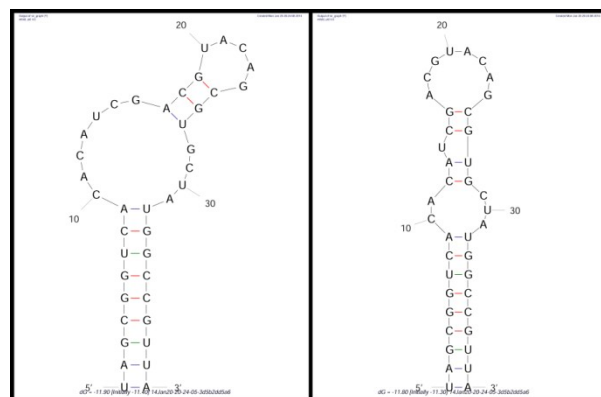
### - Cromossomo 01

---

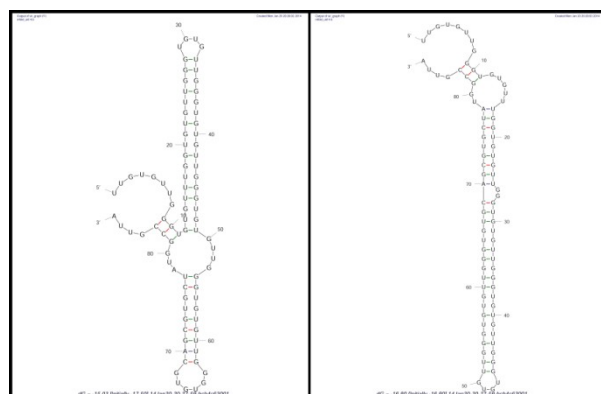
- Cromossomo 02

---

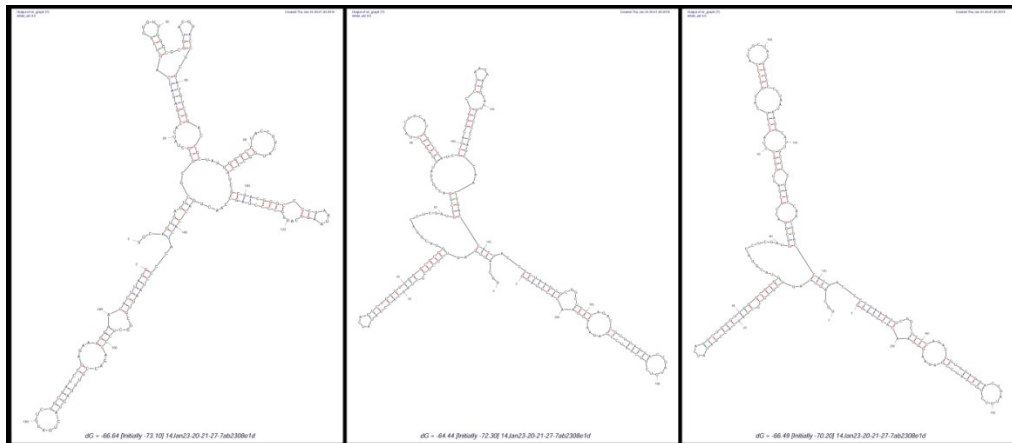
- Cromossomo 02 Clone 01



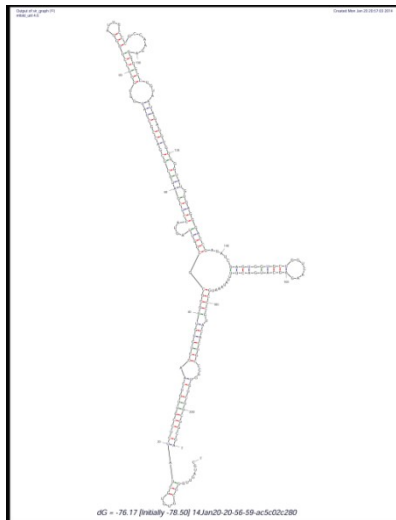
- Cromossomo 02 Clone 02



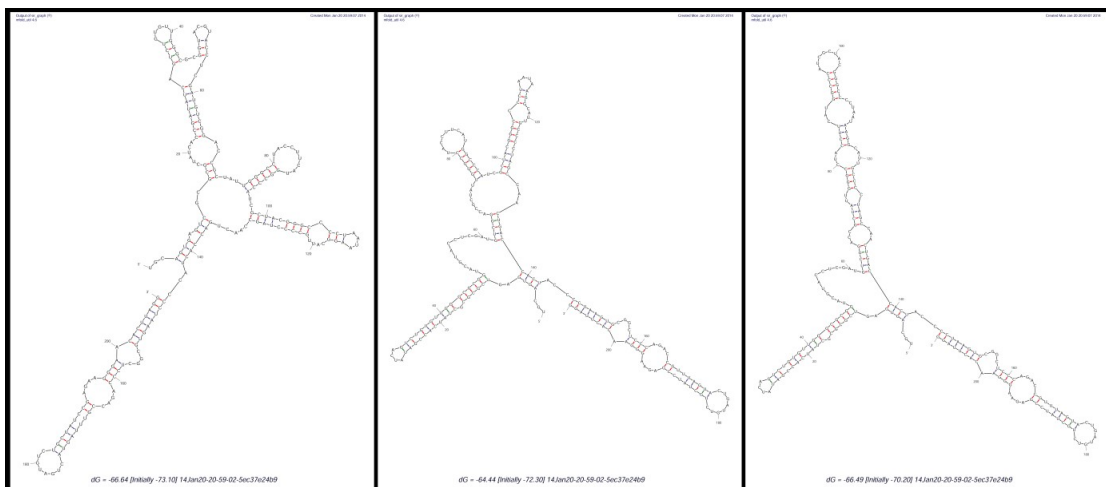
- Cromossomo 03



Cromossomo 04

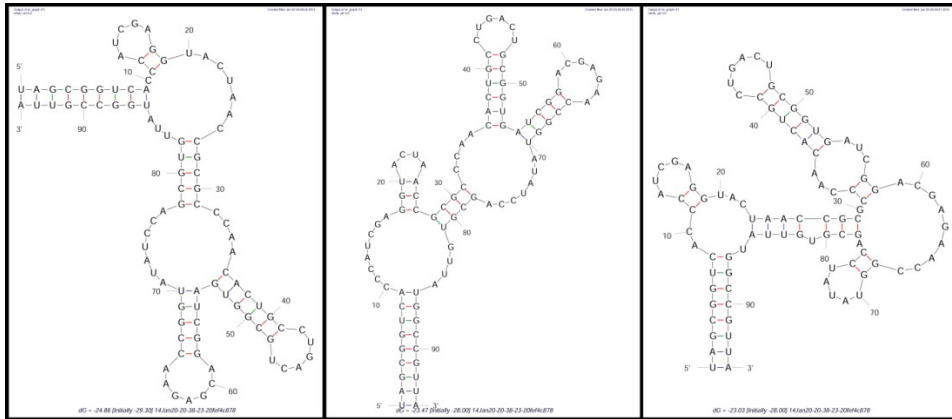


- Cromossomo 05



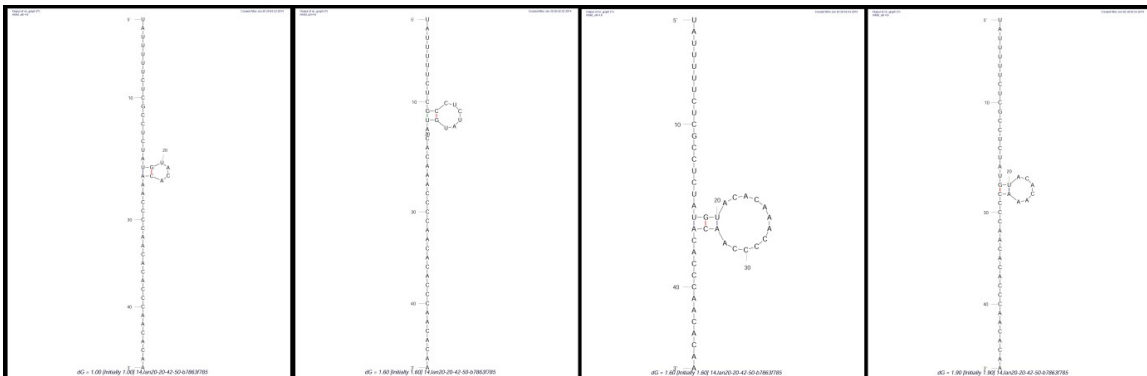


- Cromossomo 05 Clone 01

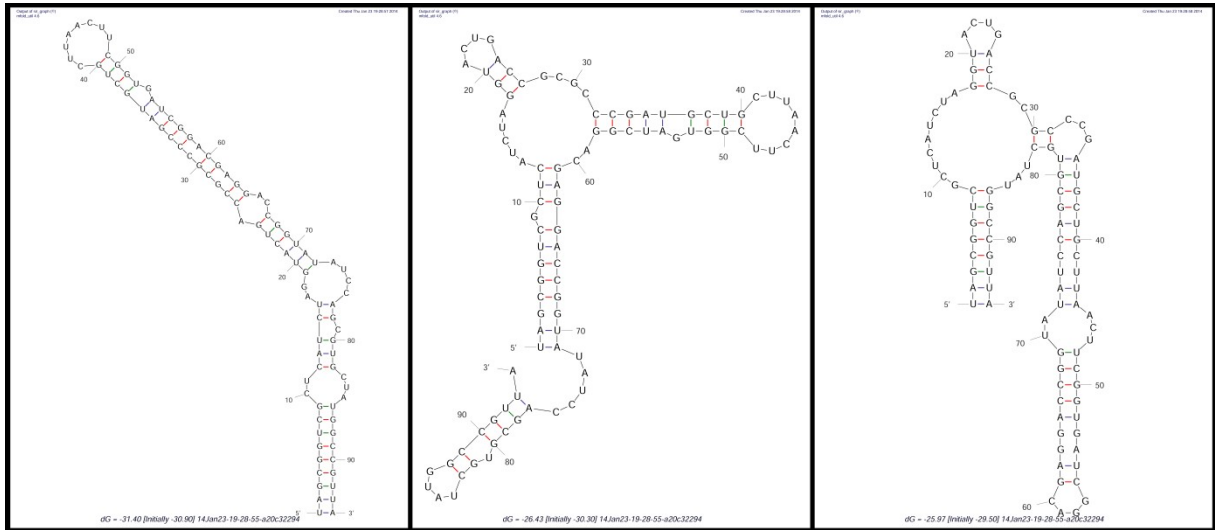


- Cromossomo 06

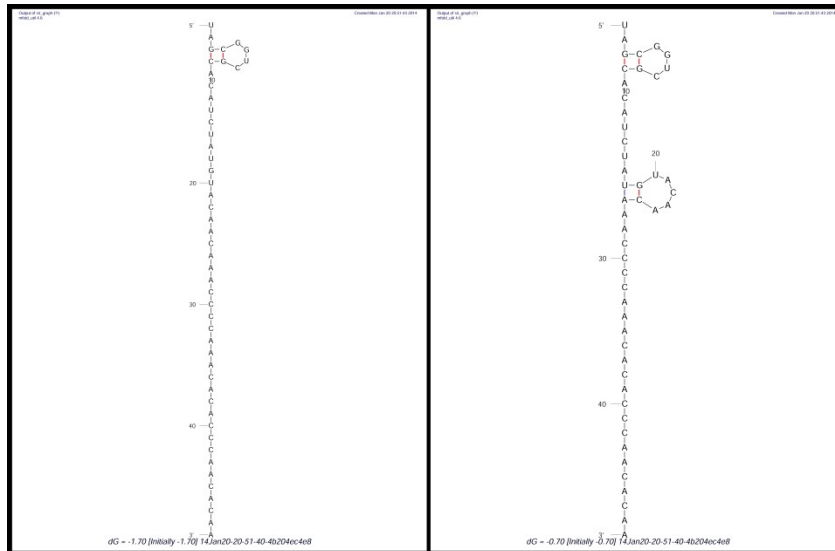
- Cromossomo 06 Clone 01



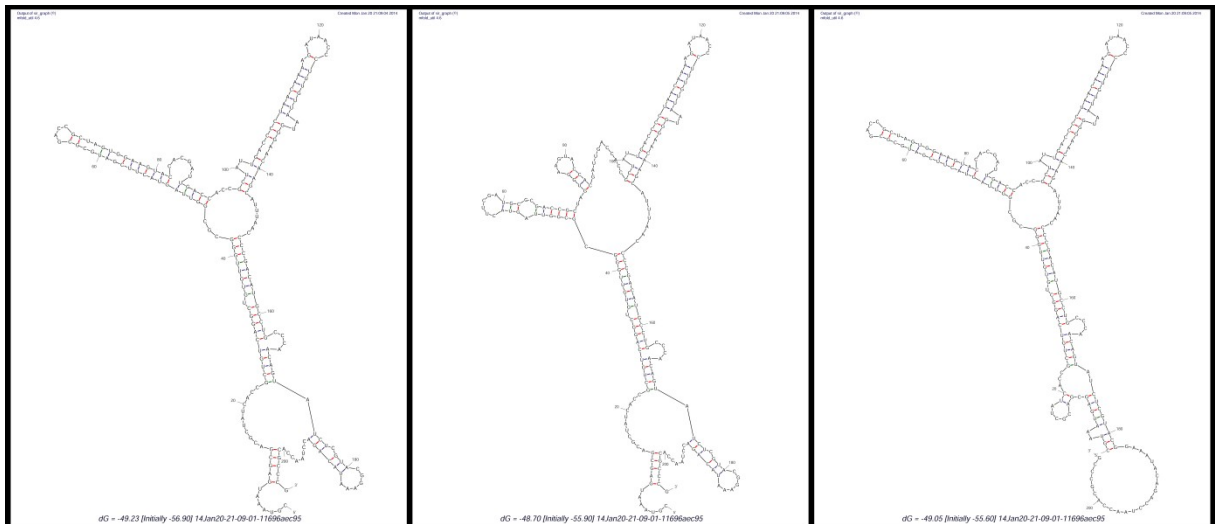
- Cromossomo 06 Clone 02



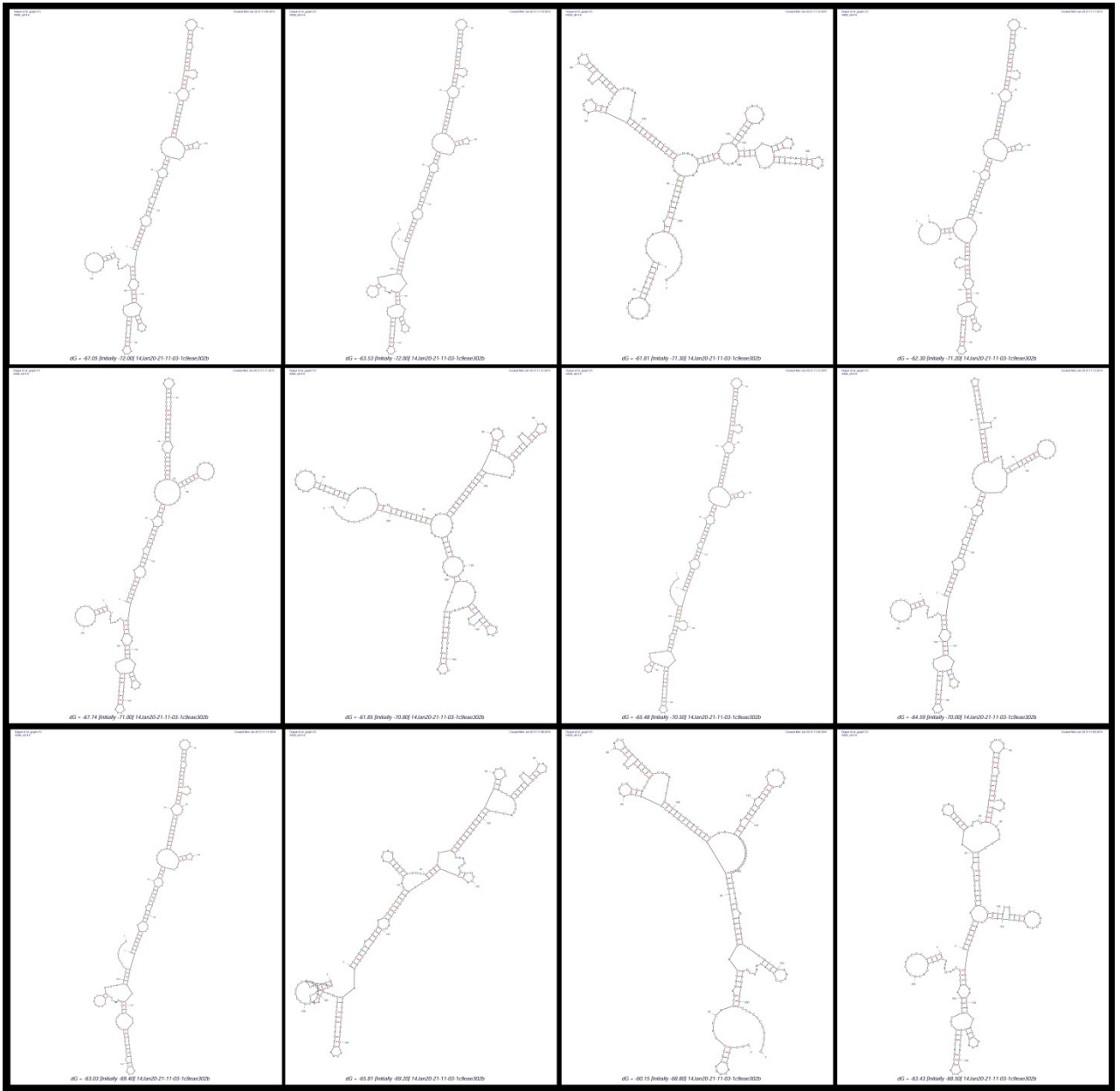
- Cromossomo 06 Clone 03



- Cromossomo 07



- Cromossomo 08



- Cromossomo 10

