

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

LUCAS ROSOLEN DE ALMEIDA MELLO

MECANISMOS ENVOLVIDOS NA ORIGEM DOS CROMOSSOMOS SEXUAIS
GIGANTES NO GENERO *OMOPHOITA* (COLEOPTERA, CHRYSOMELIDAE)

Ponta Grossa
2015

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

LUCAS ROSOLEN DE ALMEIDA MELLO

MECANISMOS ENVOLVIDOS NA ORIGEM DOS CROMOSSOMOS SEXUAIS
GIGANTES NO GÊNERO *OMOPHOITA* (COLEOPTERA, CHRYSOMELIDAE)

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

Orientadora: Profa. Dra. MARA CRISTINA DE ALMEIDA
Co-orientador: Prof. Dr. MATEUS HENRIQUE SANTOS

Ponta Grossa

2015

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

M527 Mello, Lucas Rosolen de Almeida
Mecanismos envolvidos na origem dos cromossomos sexuais gigantes no gênero *Omophoita* (Coleoptera, Chrysomelidae)/ Lucas Rosolen de Almeida Mello. Ponta Grossa, 2015.
83f.

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

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

Coorientador: Prof. Dr. Mateus Henrique Santos.

1.Fish. 2.Evolução. 3.Citogenética molecular. 4.SSRs. 5.Elementos transponíveis. I.Almeida, Mara Cristina de. II. Santos, Mateus Henrique. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Universidade Estadual do Centro-Oeste. Mestrado em Ciências Biológicas. IV. T.

CDD: 576.312



Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva



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



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº. 06/2015

Ata referente à Defesa de Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, uma Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa e a Universidade Estadual do Centro-Oeste, pelo candidato **Lucas Rosolen de Almeida Mello**.

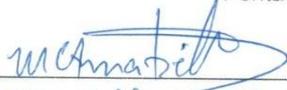
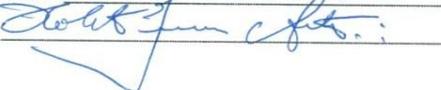
Aos vinte e sete dias do mês de fevereiro de dois mil e quinze, no auditório do Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, sob a presidência do Dra. Mara Cristina de Almeida em sessão pública, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação do (a) aluno (a) **Lucas Rosolen de Almeida Mello**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-área de concentração Biologia Evolutiva, visando o título de Mestre, constituída pelos: Dra. Mara Cristina de Almeida (Orientadora UEPG), Dra. Marielle Cristina Schneider (UNIFESP) e Dr. Roberto Ferreira Artoni (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: "**Mecanismos envolvidos na origem dos cromossomos sexuais gigantes no gênero *Omophoita* (Coleoptera, Chrysomelidae)**". Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento e a Comissão Examinadora considerou o (a) candidato (a) **APROVADO**. A Presidência ressaltou que a obtenção do título de Mestre está condicionada ao disposto da atual aprovação de outorga do Título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração em Biologia Evolutiva, **com validade de trinta dias**; 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, 27 de fevereiro de dois mil e quinze.

Profa. Dra. Mara Cristina de Almeida 
Profa. Dra. Marielle Cristina Schneider 
Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni 

Dedico este trabalho aos meus pais Edson e Ivanilde, e a toda minha família e amigos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que sempre me dá força nos momentos difíceis. A meus pais por todo apoio que me deram desde financeiro a emocional, me apoiando e me incentivando desde sempre, principalmente durante minha graduação até os dias de hoje, se não fosse eles eu não seria nada. Agradeço a eles por tudo, principalmente pela educação e princípios que me deram, eles são minha base, com os quais sempre posso contar e me inspirar, agradeço também a meus familiares que também contribuíram para minha jornada até aqui.

Agradeço também minha Orientadora Mara Cristina de Almeida por todo apoio que me deu, desde a graduação, me orientando no TCC, iniciação e agora mestrado, sempre com muita dedicação e paciência, sempre acessível quando precisei, me tratando sempre com um imenso respeito, cordialidade, carinho e dedicação, a quem acredito ser peça chave pro meu crescimento acadêmico, profissional, pessoal e moral.

Agradeço também a todos os professores do LABGEV, Professor Dr. Mateus Henrique Santos meu coorientador, Professor Dr. Roberto Ferreira Artoni, Professor Dr. Marcello Ricardo Vicari, Professora Dra. Viviane Nogaroto Vicari. Os quais considero como orientadores, sempre muito dedicados a todos os alunos, com muito respeito, dispostos a ensinar e dialogar, os quais nunca me faltaram quando precisei, sendo muito importantes para o bom andamento da minha pesquisa e do laboratório, tanto no âmbito profissional quanto moral. Agradeço também ao Miguel, pelo apoio técnico e pela descontração.

Agradeço também a meus colegas e amigos de laboratório, pelo bom relacionamento que temos, com muita parceria e trabalho em equipe, os quais nunca me negaram uma ajuda, sendo importantíssimos para o andamento da minha pesquisa.

Agradeço também a meus amigos pessoais que sempre me deram força, seja nos momentos difíceis ou felizes.

Agradeço à UEPG, ao programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, ao LABGEV por todo apoio para realização dessa pesquisa e à CAPES pela bolsa.

“O importante é não parar de questionar. A curiosidade tem sua própria razão de existência. Não se pode deixar de ficar admirado quando contempla os mistérios da eternidade, da vida, da maravilhosa estrutura da realidade. Basta que se busque compreender um pouco desse mistério a cada dia. Nunca perca a curiosidade... Não pare de se maravilhar.”

(Albert Einstein)

“Se o autor não se emociona com a sua própria criação, dificilmente pode esperar que outros o façam. Com franqueza, divirto-me com as minhas comédias mais do que o público.”

(Charlie Chaplin)

RESUMO

A ordem Coleoptera é a mais diversificada entre todos os seres vivos, existindo ampla possibilidades de estudos no que diz respeito à diversidade cariotípica e aos mecanismos de diferenciação. As espécies da subtribo Oedionychina (Alticinae; Chrysomelidae) são interessantes para estudos evolutivos, pois possuem cromossomos sexuais gigantes e assinápticos durante a meiose, podendo ser considerados altamente derivados. Assim, o objetivo do presente estudo foi propor os mecanismos moleculares envolvidos no processo de diferenciação e evolução dos cromossomos sexuais em espécies do gênero *Omophoita*. A análise de mapeamento, utilizando sondas de DNA C₀t-1 total (cinética de reassociação de DNA altamente e moderadamente repetitivo) mostrou marcações distribuídas em todos os cromossomos, especialmente nos cromossomos sexuais. A hibridação cruzada entre as espécies produziu um padrão de localização muito semelhante, evidenciando que a maior parte do genoma é compartilhada entre as espécies de *Omophoita*. Análise em conjunto dos resultados obtidos com bandas C, fluorocromos e C₀t-1 mostram que a heterocromatina das espécies em grande parte é composta de DNA repetitivo distribuída ao longo dos cromossomos sexuais e autossomos. O mapeamento cromossômico com sondas de microssatélites (SSRs) mostrou marcações conservadas para os autossomos e diversificadas para os cromossomos sexuais, evidenciando uma diferença de composição de SSRs dos cromossomos sexuais entre as espécies. Os resultados de hibridação com clones de elementos de transposição mostraram alguns padrões semelhantes aos obtidos com SSRs, podendo indicar que ao longo do processo evolutivo das espécies esses elementos estiveram presentes no processo de diferenciação. Considerando todos os resultados, pode se propor uma diferença de constituição nos cromossomos sexuais das espécies e, desta forma, inferir que os DNAs repetitivos tiveram um papel evolutivo na diferenciação desses cromossomos na subtribo.

Palavras-chave: FISH, evolução, citogenética molecular, C₀t-1, SSRs, elementos transponíveis

ABSTRACT

The order Coleoptera is the most diverse of all living beings, with a wide possibilities of studies with regards to the karyotype diversity and the mechanisms of differentiation. The species of the subtribe Oedionychina (Alticinae; Chrysomelidae) are interesting for evolutionary studies due to the giant sex chromosomes and asynaptic during meiosis, can be considered highly derivate. The objective of this study was to propose the molecular mechanisms involved in the differentiation process and evolution of sex chromosomes in the *Omophoita* genus. The Mapping analysis using DNA C_{0t-1} total (reassociation kinetics highly and moderately repetitive DNA) showed marks distributed in all chromosomes, especially in the sex chromosomes. The cross-hybridization among species produced a very similar location pattern, indicating that most of the genome is shared among species *Omophoita*. Analysis of the results obtained in conjunct with C-bands, fluorochromes and C_{0t-1} together show that the heterochromatin of the species is largely composed of repetitive DNA distributed throughout the autosomes and sex chromosomes. Chromosome mapping with microsatellite (SSRs) probes showed conserved patterns for autosomes, but diversified to sex chromosomes, showing difference in SSRs composition in the sex chromosomes, of the species. The results of hybridization with transposition element clones showed some similarities patterns to the SSRs markers, which may indicate that throughout the evolutive process of species these elements were present. Considering all results we can propose differences in the constitution of sex chromosomes of the species studied, thus, we can infer an evolutionary role of repetitive DNA in the differentiation of chromosomes in the subtribe.

Keywords: FISH, evolution, molecular cytogenetics, C_{0t-1} , SSRs, transposable elements

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

MATERIAL E MÉTODOS

Figura 1- Espécies de *Omophoita* analisadas: (A) *O. magniguttis* femea; (B) *O. octoguttata* macho; (C) *O. personata*, macho; (D) *O. sexnotata*, macho. Barra em A e B = 0,7 centímetros em C e D = 1,0 centímetros. Figura retirada e modificada de Almeida et al. (2009).....**23**

CAPÍTULO I

Figura 1 - Células meióticas de *Omophoita octoguttata* submetidas à bandamento-C (A) e coloração com fluorocromos CMA₃/DA/DAPI (B–H). **A**, metáfase I, cabeça de seta=coloração positiva centromérica, Box = cromossomos sexuais de outra metáfase I, as setas mostram heterocromatina. **B**, setas=DAPI positivo. **C**, cabeças de setas=CMA₃ positivo. **D**, sobreposição de imagens dos autossomos **B** e **C**; cabeças setas=coloração positiva. **E**, idiograma dos autossomos observados em **D**; seta=braço curto rico em AT e cabeça de seta=braço curto rico em GC. **F**, setas=DAPI positivo. **G**, cabeças seta=CMA₃ positivo. **H**, sobreposição de imagens **F** e **G** da anáfase II; setas=regiões AT positivas; cabeças de seta=regiões GC positivas. Barra=10 µm.....**39**

Figura 2 - Células meióticas de *Omophoita personata* submetidas a bandamento-C (A) e coloração com fluorocromo CMA₃/DA/DAPI (B-D). **A**, metáfase I; setas=heterocromatina centromérica. **B**, setas=DAPI positivo. **C**, cabeças de seta=CMA₃ positivo. **D**, sobreposição de imagens **B** e **C** da metáfase I, setas=regiões AT positivas e cabeças seta=regiões GC positivas. Box=cromossomos sexuais (X e Y) de outra célula. Barra=10 µm.....**40**

Figura 3 - Células meióticas de *Omophoita sexnotata* submetidas a bandamento-C (A) e coloração com fluorocromos CMA₃/DA/DAPI (B-D). **A**, metáfase I setas=heterocromatina centromérica, Box=visão detalhada de um cromossomo Y. **B**, setas=DAPI positivo. **C**, setas=CMA₃ positivo; e cabeças de seta=braços curtos GC positivos. **D**, sobreposição de imagens **B** e **C** da metáfase II, setas pequenas=regiões AT positivas e setas grandes=regiões GC positivas. Box=cromossomos X e Y; setas pequenas=regiões AT positivas, setas

grande=regiões GC positivas e cabeças de seta=bandas proximais GC positivas.
Barra=10 µm.....40

Figura 4 - Células meióticas de *Omophoita octoguttata* (**A, D, G**), *O. personata* (**B, E, H**) e *O. sexnotata* (**C, F, I**), submetida a hibridação cruzada utilizando o produto C_0t-1 total a partir de *O. octoguttata* em **A-C**, a partir de *O. personata* em **D-F**, e a partir de *O. sexnotata* em **G-I**. Setas=marcações puntiformes, cabeças de seta=marcas positivas. Barra=10 µm.....41

Figura 5 - Idiograma dos cromossomos sexuais (X esquerda, Y à direita) mostrando os diferentes padrões de marcações obtidos com bandas C, fluorocromos CMA₃/DA/DAPI e sondas de C_0t-1 de *Omophoita octoguttata*, *O. personata* e *O. sexnotata*. (●= centrômero, ■ = bandamento C, ■ = CMA₃, ■ = DAPI, ■ = DAPI + CMA₃, ■ = C_0t-1 marcações).....42

CAPÍTULO II

Figura 1 - Células meióticas de *Omophoita magniguttis* submetidas à FISH com sondas SSRs: **A e B** = CA₁₅; **D e E** = CAT₁₀; **G e H** = GAC₁₀; **J e K** = CAC₁₀; **M e N** = GAA₁₀, **P e Q** = GATA₈; **S e T** = GA₁₅. À direita Idiograma dos cromossomos sexuais e autossomos com os respectivos microssatélites (C, F, I, L, O, R e U). Setas = sinais positivos nos autossomos. Box = cromossomos de outra célula, ● = centrômero.....56

Figura 2 - Células meióticas de *O. octoguttata* submetidas à FISH com sondas SSRs: **A e B** = CA₁₅; **D e E** = CAT₁₀; **G e H** = GAC₁₀; **J e K** = CAC₁₀; **M e N** = GAA₁₀, **P e Q** = GATA₈; **S e T** = GA₁₅. À direita Idiograma dos cromossomos X e Y com os respectivos microssatélites (C, F, I, L, O, R e U). Setas = sinais positivos nos autossomos. Box = cromossomos sexuais (X e Y) de outra célula. ● = centrômero. Barra = 10 µm.....57

Figura 3 - Células meióticas de *O. personata* submetidos à FISH com sondas SSRs: **A e B** = CA₁₅; **D e E** = CAT₁₀; **G e H** = GAC₁₀; **J e K** = CAC₁₀; **M e N** = GAA₁₀; **P e Q** = GATA₈; **S e T** = GA₁₅. À direita Idiograma correspondem aos cromossomos sexuais e autossomos (C, F, I, L, O, R e U). Setas = sinais positivos nos autossomos. Box = cromossomos sexuais (X e Y) de outra célula, ● = centrômero. Barra = 10 µm.....58

Figura 4 - Células meióticas de *O. sexnotata* submetidas à FISH com sondas SSRs:

A e B = CA₁₅; **D e E** = CAT₁₀; **G e H** = GAC₁₀; **J e K** = CAC₁₀; **M e N** = GAA₁₀; **P e Q** = GATA₈; **S e T** = GA₁₅. À direita Idiograma correspondem aos cromossomos sexuais (C, F, I, L, O, R e U). Setas = sinais positivas nos autossomos. Box = cromossomos sexuais (X e Y) de outra célula, ● = centrômero. Barra = 10 μm.....59

Figura 5 - Idiogramas dos cromossomos sexuais e autossomos hibridados com as respectivas sondas SSRs nas espécies *Omophoita magniguttis*, *Omophoita octoguttata*, *Omophoita personata*, *Omophoita sexnotata*, representando os diferentes padrões de acúmulo dos microssatélites nesses cromossomos. ● = centrômero.....60

Figura 6 - Análise dos clones através do método dot plot. **A.** clone 4, **B.** clone 8, **C.** clone 9, traços diagonais paralelos representam grau de repetitividade.....60

Figura 7 - Células testiculares das espécies de *Omophoita* submetidas à FISH com sondas dos fragmentos dos retrotransposons clonados, clones 4, 8 e 9 obtidos de *O. octoguttata*. **A – D** células de *O. octoguttata*; **E** células *O. magniguttis*; **F** células de *O. personata*; **G – H** células de *O. sexnotata*. Barra = 10 μm.....61

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Localização cromossômica dos sinais de hibridação e acúmulo dos SSRs, nos cromossomos sexuais de *Omophoita magniguttis*, *Omophoita octoguttata*, *Omophoita personata* e *Omophoita sexnotata*. Marcações: Dispersas (D), pericentroméricas (P), Intersticial braço menor (Ip), Intersticial braço maior (Iq), Distal braço menor (Dp) e Distal braço maior (Dq).....55

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	CARACTERÍSTICAS CITOGENÉTICAS GERAIS DE ALTICINAE.....	15
1.2	HETEROCROMATINA E DNA REPETITIVO EM ALTICINAE	16
2	JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS	21
3	MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1	MATERIAL BIOLÓGICO	22
3.2	METODOLOGIAS	22
3.2.1	Citogenética Convencional.....	22
3.2.2	Citogenética Molecular	24
4	RESULTADOS	26
	CAPÍTULO I - Mapeamento físico de DNA repetitivo e evolução cariotípica em três espécies do gênero <i>Omophoita</i> (Coleoptera: <i>Alticinae</i>).....	27
	CAPÍTULO II - Mapeamento molecular de microssatélites e retrotransposons: evidência dos mecanismos evolutivos envolvidos na diferenciação dos cromossomos sexuais gigantes em <i>Omophoita</i> (Coleoptera: <i>Alticinae</i>)	43
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
7	ANEXOS	76

1 INTRODUÇÃO

Dentre a classe Insecta existem muitas ordens, no entanto, cinco delas se destacam por sua alta riqueza de espécies, sendo elas Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera e Hemiptera. A ordem Hymenoptera tem mais de 115.000 espécies descritas, Diptera e Lepidoptera têm em torno de 150.000 espécies descritas cada uma, e Hemiptera possui quase 100.000. Coleoptera é a maior e mais diversa entre elas (GULLAN e CRANSTON, 2010) sendo a mais rica e variada dentre os insetos e entre os organismos do planeta. A ordem Coleoptera possui aproximadamente 358.000 espécies e 25.500 gêneros descritos (COSTA, 2003). Esses valores correspondem a 40% do total de insetos e 30% dos animais, constituindo a maior ordem do Reino Animal (LAWRENCE e BRITTON, 1994). No Brasil são aproximadamente 99 famílias, 4319 gêneros e 26.122 espécies de coleópteros descritas taxonomicamente (COSTA, 2003).

Os coleópteros colonizaram o planeta há muito tempo, os mais antigos fósseis encontrados de besouros são do Permiano Inferior, que datam de 318 a 299 milhões de anos (BÉTHOUX, 2009). Nesses milhões de anos de evolução, os besouros são encontrados em quase todos os habitats naturais incluindo os aquáticos. Na vegetação ocorrem em quase toda a parte vegetativa, em algumas árvores podem ser encontrados desde sua casca até as flores, folhas, raízes, mesmo nas partes subterrâneas e no interior de galhas (GULLAN e CRANSTON, 2010).

Uma das razões do sucesso da ordem e de sua diversidade, provavelmente está relacionada a um conjunto de adaptações como o desenvolvimento dos élitros, que são asas anteriores muitas vezes resistentes, compactas e pesadamente esclerotizadas. Esta estrutura protege o organismo tanto contra dessecação quanto contra choques mecânicos, também protege e recobre as asas membranosas que são dobradas transversal e longitudinalmente. Outras adaptações são notáveis, como tamanho reduzido, protórax, incluindo o pronoto, que articulam livremente com o restante do tórax, pernas variadamente modificadas, com garras e estruturas adesivas, fases larvais com cabeça capsulada esclerotizada com mandíbulas opositoras e olhos compostos (GRIMALDI e ENGEL, 2006; GULLAN e CRANSTON, 2010).

A grande diversidade, as adaptações e as possibilidades de ocupação de

vários nichos possibilitaram aos coleópteros explorar uma vasta e diversificada alimentação, muitos dos besouros são micofagos, herbívoros, detritívoros ou polífagos. Outros atuam como predadores de outros invertebrados e até de pequenos vertebrados, assim como podem existir algumas espécies consideradas pragas de madeiras, pastagens, cereais, leguminosas e até mesmo materiais de origem animal seco, tais como peles e couro (GULLAN e CRANSTON, 2010).

A ordem Coleoptera agrupa quatro subordens, Archostemata, Adephaga, Myxophaga e Polyphaga (GILLOT, 2005). Polyphaga possui 90% das espécies de Coleoptera, distribuídas em 88 famílias e com a maior diversidade, tanto morfológica como biológica. A família Chrysomelidae pertencente à Polyphaga e inclui 2600 gêneros e 40.000 espécies, distribuídas em 15 subfamílias (COSTA et al., 1988; GILLOTT, 2005). Dentre as subfamílias de Chrysomelidae, Alticinae possui o maior número de espécies na Região Neotropical (BORROR e DELONG, 1988), os Alticinae compreendem 570 gêneros e mais de 10.000 espécies (SEENO e WILCOX, 1982).

Existe uma discussão sobre a relação da subfamília Alticinae com Galerucinae, alguns autores relacionam Alticinae como grupo irmão de Galerucinae, colocando Alticinae dentro de Galerucinae, onde ela passa a ser considerada tribo Alticini. Esta relação é a mais aceita atualmente, sendo reforçada por estudos moleculares, que estabelece uma monofilia recíproca entre Alticinae e Galerucinae (REID, 1995; GÓMEZ-ZURITA et al., 2008; GE et al., 2012). No entanto, essa ideia ainda é obscura por falta de mais estudos, não sendo de total consenso entre os autores.

Uma característica peculiar dos Alticinae é a sua capacidade de realizar grandes saltos, possibilitado pelo seu fêmur posterior dilatado, o que lhe permite fugir de predadores, por seus saltos eles também são conhecidos como besouros pulgas ou “flea beetles” (MAULIK, 1929; FURTH, 1980). O fêmur dilatado e a capacidade de saltar é a principal característica morfológica que os diferencia dos outros crisomelídeos (ARNETT et al., 2002).

Os alticinaes também tem uma interessante importância ecológica, podendo ser ditos como potenciais indicadores biológicos. Em áreas degradadas, áreas de sucessão primária e de bordas, observa-se uma maior quantidade amostral dos alticinaes do que em áreas mais preservadas (LINZMEIER et al., 2006).

Outra interação ecológica interessante é que algumas espécies de alticinaes

são consideradas impalatáveis, como, por exemplo, *Omophoita octoguttata*, provavelmente impalatável por armazenamento de compostos fenólicos de plantas (DEL-CLARO, 2004). Essa adaptação e interação inseto-planta de alguma forma beneficia essa espécie contra predadores. Além disso, outro evento que ocorre é a interação de mimetismo de *Adesmus colligatus* (Cerambycidae), palatável em relação a *O. octoguttata*, impalatável. O padrão de cores das duas espécies é bem semelhante, com isso o *A. colligatus* acaba se beneficiando contra predação, confundindo os possíveis predadores (DEL-CLARO, 2004). Isso mostra que uma espécie pode estar envolvida em várias interações ecológicas e evolutivas de grande valor para ciência, e que estudos nessas áreas, utilizando Alticinae como modelo podem ser promissores.

Além da importância ecológica, espécies de Alticinae também são importantes economicamente, pois muitas espécies têm sido identificadas como pragas agrícolas, de culturas como crucíferas (mostarda e colza), e especialmente de canola no noroeste da América do Norte (CAPINERA, 2008). As pragas mais prejudiciais são as espécies *Phyllotreta cruciferae*, *Phyllotreta striolata* (SOROKA et al., 2005; DOSDALL e MASON 2010), enquanto que no Centro e Sul da Europa, as espécies predominantes são *Phyllotreta nemorum* e *Phyllotreta undulata* (TRDAN et al., 2005). Na Eslovênia as espécies *Phyllotreta armoraceae*, *P. cruciferae* e *P. undulata* têm sido consideradas como as principais espécies de besouro praga de repolho (BRELIH et al., 2003). No Brasil, existem poucos estudos de espécies de Alticinae relacionados como pragas, em um trabalho realizado foram encontradas algumas espécies relacionadas à pragas, como *Omophoita cyanipennis*, *Omophoita* sp1 e *Omophoita* sp3 em culturas de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) e melancia (*Citrullus lanatus*) (COSTA et al., 2006).

Diante do exposto, espécies do gênero *Omophoita* pertencentes à subtribo Oedionychina subfamília Alticinae, endêmicas da região Neotropical (RILEY et al., 2002), são modelos interessantes e promissores para diversos estudos de diversidade, desde modelos ecológicos, evolutivos e citogenéticos. Em relação às características citogenéticas os Oedionychina, possuem características cromossômicas singulares. As espécies possuem os cromossomos sexuais com tamanho extremamente grande e assinápticos durante a meiose, sendo a fórmula meiótica $10II+X+y$. Desta forma, mostram uma gama de possibilidades de estudos citogenéticos e moleculares envolvidos na evolução cariotípica de seus

cromossomos sexuais gigantes.

1.1 CARACTERÍSTICAS CITOGENÉTICAS GERAIS DE ALTICINAE

Apesar do grande número de espécies na ordem Coleoptera, existe escassez de estudo de uma maneira geral, em relação aos estudos citogenéticos, pouco mais de 3.000 espécies foram estudadas, representando cerca de 1% de todas as espécies (PETITPIERRE, 1996). A grande maioria pertence às subordens Adephaga e Polyphaga (SMITH e VIRKKI, 1978).

Até o presente momento, em Coleoptera foi encontrado um amplo intervalo de número cromossômico, desde espécies com $2n=4$ em *Chalcolepidius zonatus* (FERREIRA et al., 1984) a $2n=64$ em *Ditomus capito* (SERRANO, 1981). A morfologia metacêntrica é predominante na maioria das espécies de Coleoptera e tem sido considerada como característica ancestral para Polyphaga (SMITH e VIRKKI 1978). Os cromossomos são metacêntricos de tamanho médio ou pequeno, apresentando em metáfases mitóticas tamanhos variando entre 0,5 a 6,5 μ m (PETITPIERRE, 1996).

A fórmula basal proposta como ancestral para Polyphaga é de $2n=20=9II+Xy_p$, com isso acredita-se que a evolução cariotípica dos Coleoptera ocorra principalmente por fissões centroméricas seguidas de inversões pericentroméricas, o que explicaria o aumento do número de cromossomos e a prevalência de cromossomos metacêntricos em relação à fórmula ancestral (SMITH e VIRKKI, 1978; VIRKKI, 1984).

Os mecanismos cromossômicos de determinação do sexo em Coleoptera são variáveis, podendo ser classificados em aquiasmáticos, como é o caso dos sistemas Xy_p , Xny_p/nXy_p , Xy_c , $X0$ e X_1+X_2 , $X+y$ ou quiasmáticos, como o neoXY, Xy , Xy_r , X_1X_2Y e XY_1Y_2 (SMITH e VIRKKI, 1978). Na subtribo Oedionychina, as espécies possuem cromossomos sexuais de tamanho extremamente grande e assinápticos durante a meiose, número diplóide igual a 22, fórmula meiótica $10II+X+y$, como é o caso das espécies do gênero *Omophoita*. A variabilidade morfológica dos cromossomos autossômicos observados sempre envolve a ocorrência de cromossomos metacêntricos e acrocêntricos, o que parece ser uma característica dessa subtribo (SMITH e VIRKKI, 1978; VIRKKI, 1988, 1989; PETITPIERRE et al.,

1988; SEGARRA e PETITPIERRE, 1990; VIRKKI et al., 1991 ; VIRKKI e SANTIAGO-BLAY, 1993).

Almeida et al. (2009) descreveram citogeneticamente quatro espécies do gênero *Omophoita* (*Omophoita magniguttis*, *Omophoita octoguttata*, *Omophoita personata* e *Omophoita sexnotata*), sendo observado $2n=22=20+X+y$ e fórmula meiótica, $10II+X+y$, semelhantes à outras espécies do mesmo gênero e outras espécies relacionadas e concordante com estudos anteriores (SMITH e VIRKKI, 1978; PETITPIERRE et al., 1988; VIRKKI et al., 1991; VIRKKI e SANTIAGO-BLAY, 1993). A morfologia autossômica observada foi acrocêntrica em *O. magniguttis* e *O. octoguttata*, metacêntrica em *O. personata* e predominantemente metacêntrica em *O. sexnotata*, e em todas essas espécies, os cromossomos sexuais são metacêntricos. Nesse trabalho os autores propuseram que as diferenças na morfologia cromossômica observadas foram devido à ocorrência de inversões pericêntricas.

A perda de homologia entre os cromossomos sexuais das espécies Alticinae acredita ser um evento antigo, pois tanto a tribo basal Alticini, bem como a mais derivada subtribo Oedionychina não apresentam sinapses entre os cromossomos sexuais (VIRKKI, 1972).

1.2 HETEROCROMATINA E DNA REPETITIVO EM ALTICINAE

Os estudos sobre localização da heterocromatina constitutiva em Coleoptera mostram uma ocorrência preferencial de banda C na região centromérica, podendo ocorrer também nas regiões intersticiais e teloméricas de todos os cromossomos autossômicos. Porém, a ocorrência nas regiões teloméricas é menos frequente. Nos cromossomos sexuais, a presença de heterocromatina constitutiva é variável, podendo ocorrer somente na região pericentromérica ou ao longo de todo o comprimento cromossômico, de acordo com o grau de diferenciação cromossômica da espécie (ALMEIDA et al., 2000, ROZEK et al., 2004).

Segundo Rozek et al. (2004) a maioria dos besouros possui uma pequena quantidade de heterocromatina. Pequenos blocos são fracamente observados em estágios paquitênicos, fracamente ou imperceptíveis em metáfases mitóticas ou meióticas. Esses resultados de regiões heterocromáticas foram obtidos com a

técnica de obtenção de bandas C, em cromossomos de 32 espécies de Coleoptera pertencentes a diferentes famílias: entre elas Elateridae, Cantharidae, Oedemeridae, Cerambycidae, Anthicidae, Chrysomelidae, Attelabidae e Curculionidae.

A família Chrysomelidae é caracterizada principalmente por uma pequena quantidade de heterocromatina. Os poucos estudos realizados na subfamília Alticinae mostraram uma localização, preferencialmente centromérica, característica comum em Coleoptera (SMITH e VIRKKI, 1978; VIRKKI, 1978; VIRKKI, 1983; ROZEK et al., 2004; SCHNEIDER et al., 2006; ALMEIDA et al., 2006, 2009).

Para Alticinae, estudos sobre a ocorrência de heterocromatina foram realizados em somente sete espécies (VIRKKI, 1983, ALMEIDA et al., 2006, 2009). Virkki (1983), estudando cromossomos mitóticos e meióticos em quatro espécies de Alticinae (*Omophoita annularis*, *O. personata*, *O. octoguttata* e *Alagoasa januarina*), submetidos à técnica de bandamento C, observou a ocorrência de bandas pericentroméricas em todos os cromossomos do complemento e adicionais nos cromossomos sexuais, variando em número, posição e intensidade de marcação. Padrões pericentroméricos também foram descritos em estudos com espécies de *Omophoita* por Almeida et al. (2009), observados em bivalentes autossômicos e cromossomos sexuais de *O. magniguttis* e *O. sexnotata*.

Em relação aos cromossomos sexuais gigantes em Alticinae, alguns eventos, como numerosos rearranjos cromossômicos, translocações autossômicas e mudanças na quantidade constitutiva de heterocromatina, têm sido propostos para explicar a origem desta classe especial de cromossomos gigantes em Alticinae (SMITH e VIRKKI, 1978). No entanto, os dados sobre a composição e o processo de diferenciação destes cromossomos não foram realizados até o presente momento.

Estudos em geral mostram que a heterocromatina é importante para estruturação cromossômica e que esta é composta por vários tipos de DNAs repetitivos. Os DNAs repetitivos são componentes dos genomas de eucariotos, representados por repetições em tandem como DNAs satélite (DNAsat), minissatélite e microsatélite, e repetições dispersas como elementos de transposição (TEs), transposons e retrotransposons (CHARLESWORTH et al., 1994).

As repetições em tandem ocorrem sob a forma de interações de unidades de repetição pequenas a partir de um único par de bases até milhares de pares de bases de nucleotídeos (ELLEGRÉN, 2004). Existem diversas classificações dessas repetições em tandem, como os microsatélites sequências de repetições simples

(SSRs), que são repetições de 1 a 6 nucleotídeos. Repetições de unidades mais longas formam os minissatélites, com aproximadamente 10 a 60 pb, e ainda sequências maiores como os DNAs satélites, que apresentam cerca de 100 a 300 pares de base (pb) de comprimento (TIMBERLAKWE, 1978; JEFFREYS *et al.*, 1985; WALSH, 2001).

DNA satélite e SSRs podem ser organizados em grupos de 100-10.000 repetições em tandem e têm sido associados principalmente com heterocromatina constitutiva. Clusters de repetições em tandem e TEs podem formar padrões de heterocromatina espécie específicos e cromossomo específicos (RASKINA *et al.*, 2007; CUADRADO e JOUVE, 2007). Os SSRs são amplamente utilizados como marcadores moleculares devido aos elevados níveis de polimorfismo no número de repetições, podendo gerar uma grande diversidade de estudos (LECLERCQ *et al.*, 2010).

Várias evidências têm demonstrado que a distribuição genômica de SSRs não é aleatória, provavelmente por causa de seus efeitos sobre a organização da cromatina, regulação da atividade genética, recombinação, replicação de DNA, ciclo celular, entre outras funções (LI *et al.*, 2002).

Expansão no genoma é uma propriedade geral da maioria dos SSRs, porém seus mecanismos estão bem longe de serem completamente compreendidos. Um dos modelos mais bem estabelecidos da expansão de microssatélites envolve o deslizamento de replicação (ELLEGREN, 2004). Outra ideia de expansão e dispersão é devido à interferência dos TEs. Nestes casos, os SSRs interagem especialmente com elementos transponíveis, como, por exemplo, ocorre em humanos e mamíferos de uma maneira geral, pois os SSRs estão associados especialmente com retrotransposons não-LTR, como elementos SINE (ARCOT *et al.*, 1995; RAMSAY *et al.*, 1999; KELKAR *et al.*, 2011). Além disso, estudos de Kejnovsky *et al.* (2013) indicaram também que as matrizes de microssatélites são alvos de inserções de TEs.

Os TEs como transposons e retrotransposons, são sequências que podem estar repetidos milhares de vezes no genoma (SUMMER, 2003). Segundo Wicker *et al.* (2007), os TEs estão distribuídos em quase todos os genomas de eucariotos, representando vários tipos de elementos móveis de DNA, os quais são distribuídos em duas classes de acordo com seu mecanismo de transposição, os descritos como TEs classe I (copiar e colar) ou TEs classe II (cortar e colar). TEs de Classe I

representam os retrotransposons, os quais são copiados em duas fases, eles são transcritos a partir do DNA para o RNA e o RNA produzido é então reversamente transcrito para DNA através da enzima transcriptase reversa, este DNA copiado é então inserido numa nova posição no genoma.

A Classe II representa os transposons e a movimentação desses não envolve RNAs intermediários. As transposições são catalisadas por diversas enzimas transposases. As transposases fazem um corte em zigue-zague no DNA, resultando em uma cadeia simples 5' ou 3' de DNA cortado, que é então ligado a uma nova região no genoma. Estes processos envolvem a atividade enzimática da DNA polimerase para preenchimento da região complementar na fita cortada e de uma DNA ligase, que liga a região açúcar-fosfato do DNA cortado na nova região a ser inserida no DNA (WICKER et al., 2007).

Os TEs podem ser autônomos e não autônomos, os autônomos se movimentam sem auxílio de outros elementos, pois são capazes de codificar todo o seu aparato enzimático para se dispersarem, enquanto TEs não autônomos se utilizam de produtos codificados de outros TEs, ou de outras regiões codificadoras do DNA para sua movimentação no genoma (WICKER et al., 2007).

DNAs repetitivos podem servir como possíveis regiões de rearranjos cromossômicos (CHEN et al., 2010). Muitos dados sugerem que grandes rearranjos cromossômicos estruturais, como deleções, duplicações, translocações e inversões, são muitas vezes associadas com regiões heterocromáticas compostas de DNA repetitivo, e que frequentemente aparecem nas fronteiras entre heterocromatina e eucromatina (BADAEVA et al., 2007). Sendo assim, um complexo de DNA repetitivo pode desempenhar um papel importante na modificação do genoma, ao mesmo tempo a evolução da DNA repetitivo pode resultar em rearranjos cromossômicos que, por sua vez, podem causar mudanças no DNA repetitivos, processos esses interdependentes (ELDER e TURNER, 1995).

Acredita-se também que a evolução dos cromossomos sexuais nas espécies de um modo geral, foi a partir de um par de autossomos (OHNO, 1967). A evolução desses cromossomos foi devido à perda de homologia entre seus pares cromossômicos, os quais se especializaram em função do sexo. Com a perda de homologia houve redução da transferência de material genético entre cromossomos sexuais e com o tempo tornando-os geneticamente distintos, com níveis mais baixos de recombinação. Essa falta de recombinação poderia resultar em cromossomos

sexuais assinápticos e no acúmulo de diversos tipos de elementos repetitivos como SSRs, TEs entre outros, nesses cromossomos (RICE, 1984; CHARLESWORTH, 2002; CHARLESWORTH et al., 2005).

O acúmulo de elementos repetitivos, em um cromossomo sexual pode torná-lo o maior cromossomo do genoma, como provavelmente ocorreu no cromossomo Y da planta *Silene latifolia* (KEJNOVSKY, 2009). O contrário também pode ocorrer, como a diminuição progressiva do tamanho do cromossomo Y em mamíferos (MATSUBARA, et al., 2006).

O estudo de DNA repetitivo tem sido empregado em algumas espécies de Coleoptera principalmente com o objetivo de localização dos DNAs repetitivos codificantes, como genes ribossomais (GALIÁN et al., 1995; DE LA RÚA et al., 1996; PROENÇA; SERRANO; COLLARES-PEREIRA, 2002a, 2002b; BIONE et al., 2005ab; CABRAL-DE-MELLO et al., 2010, 2011a; GOLL et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2012) e de genes das histonas (CABRAL-DE-MELLO et al., 2010, 2011a). Além disso, evidenciar a composição de bases e a localização de monômeros de DNA satélites (DNA sat). Sequências de DNA sat foram estudadas em poucas espécies de Chrysomelidae, *Chrysolina americana* e *Xanthogaleruca luteola* (LORITE et al., 2001, 2002) e *Chrysolina carnifex* (PALOMEQUE et al., 2005).

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A ordem Coleoptera é muito diversificada em relação aos cromossomos sexuais, são conhecidos os sistemas aquiasmáticos divididos em Xy_p , Xny_p/nXy_p , Xy_c , $X0$ e X_1+X_2 , $X+y$ e os quiasmáticos, como o neoXY, Xy , Xy_r , X_1X_2Y e XY_1Y_2 . Alguns tipos de cromossomos sexuais são muito raros, como, por exemplo aquele encontrado nas espécies da subtribo Oedionychina (Alticinae; Chrysomelidae), os quais são gigantes e assinápticos durante a meiose. Desta forma, esse sistema $X+y$ é intrigante evolutivamente, podendo ser considerado modelo de estudo em relação à origem e diferenciação de cromossomos sexuais.

Objetivo Geral

O objetivo do presente estudo foi propor mecanismos moleculares envolvidos no processo de diferenciação e evolução dos cromossomos sexuais em espécies do gênero *Omophoita* (*Omophoita magniguttis*, *Omophoita octoguttata*, *Omophoita personata* e *Omophoita sexnotata*).

Objetivos Específicos

1. Mapear cromossomos das espécies de *Omophoita* com sondas totais de DNAs altamente repetitivos e moderadamente repetitivos baseada na técnica de DNA C_0t-1 total, comparando as regiões hibridadas entre as espécies;
2. Verificar a possível homeologia, considerando a hibridação cromossômica cruzada, com as sondas de DNA repetitivos nos cromossomos das espécies do gênero *Omophoita*;
3. Caracterizar regiões de heterocromatina nos cromossomos dessas espécies, por meio da técnica de bandamento C e fluorocromos, relacionando as regiões entre as espécies.
4. Mapear cromossomos das espécies com sondas SSRs conhecidas, comparando e caracterizando as regiões hibridadas entre as espécies.
5. Propor os possíveis mecanismos moleculares envolvidos no processo de diferenciação e evolução dos cromossomos sexuais no gênero *Omophoita* através dos resultados obtidos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Para o estudo foram utilizados indivíduos machos de quatro espécies: sendo 28 indivíduos de *Omophoita magniguttis*, 53 de *Omophoita octoguttata*, 33 de *Omophoita personata* e 34 de *Omophoita sexnotata* (Figura 1), pertencentes à ordem Coleoptera, subfamília Alticinae. Os exemplares foram coletados em populações naturais no município de Ponta Grossa, PR, Brasil (25°07'10"S e 49°56'24" W) e Nonoai, RS (27°21'21" S, 52° 45' 58" W).

As preparações citológicas para o estudo dos cromossomos foram obtidas a partir das gônadas de indivíduos adultos. As partes da cabeça, do pronoto e o terceiro par de pernas foram estocados em álcool etílico para a extração de DNA. Para identificação das espécies, alguns indivíduos adultos foram enviados ao especialista Carlos Campaner do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo – MZUSP.

3.2 METODOLOGIAS

3.2.1 Citogenética Convencional

Os animais foram dissecados em solução fisiológica para insetos, para preparações citológicas foram utilizadas gônadas de adultos as quais foram hipotonizadas, fixadas, maceradas em lâminas e secas em placa de metal a 40°C, segundo a metodologia descrita por Almeida, Zacaro e Cella (2000) (Anexo – 7.1.1). Para determinar o padrão de heterocromatina constitutiva foi utilizada a técnica de obtenção de bandas C descrita por Fernández et al. (2002) (Anexo – 7.1.2).

Adicionalmente as lâminas foram submetidas à coloração de fluorocromos segundo Schweizer et al. (1983), para verificação de regiões ricas em bases AT utilizou-se o fluorocromo 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) e para as bases ricas em GC o fluorocromo cromomicina A3 (CMA₃), ambos combinados com o contracorante distamicina A (DA) (Anexo – 7.1.3). As melhores células mitóticas e

meióticas, com coloração convencional e diferencial, foram fotografadas em um microscópio de epifluorescência Olympus BX41. As imagens foram capturadas com uma câmera Olympus DP-71 12 Mega pixels.

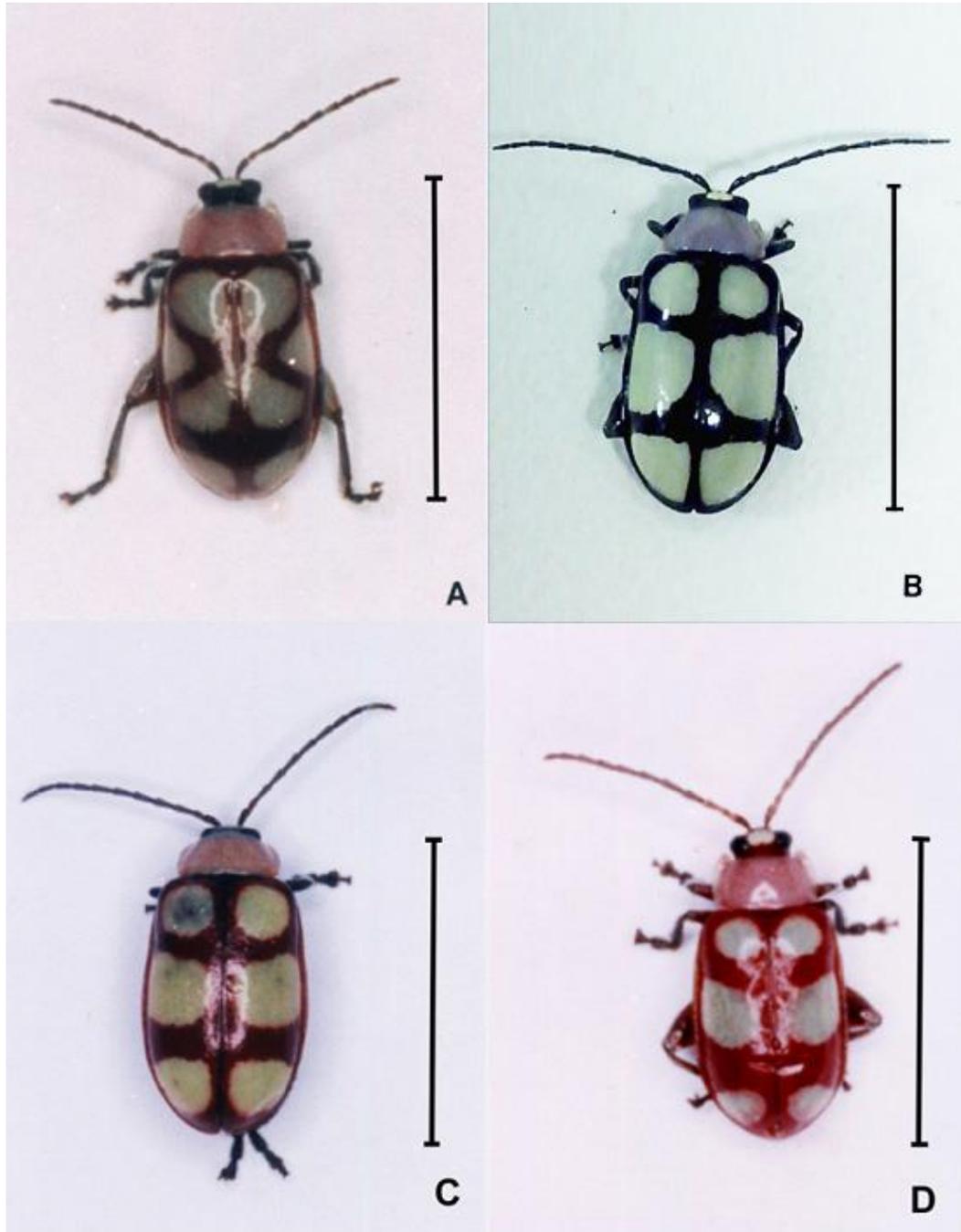


Figura – 1. Espécies de *Omophoita* analisadas: (A) *O. magniguttis* fêmea; (B) *O. octoguttata* macho; (C) *O. personata*, macho; (D) *O. sexnotata*, macho. Barra em A e B = 0,7 centímetros em C e D = 1,0 centímetros. Figura retirada e modificada de Almeida (2001).

3.2.2 Citogenética Molecular

- Extração de DNA, prospecção, clonagem e seleção de DNAs repetitivo

Para a extração de DNA, foi utilizado o protocolo de Murray e Thompson (1980), com algumas modificações. O DNA foi extraído através de maceração com nitrogênio líquido utilizando-se cabeça, pronoto e fêmur do 3º par de pernas (Anexo – 7.2.1).

A prospecção de DNA repetitivo via cinética de reassociação foi baseada na técnica de DNA C_{0t-1} total (DNA enriquecido com sequências alta e moderadamente repetitivas) segundo Zwick et al. (1997) (Anexo – 7.2.2). O DNA genômico foi diluído brevemente, para uma concentração final de 300 ng/ μ L em uma solução de NaCl 0,3 mol/L. A amostra foi tratada em autoclave (121°C, 1,034 x 10⁵ Pa), por 5 minutos, afim de obter fragmentos entre 100 e 1000 pb. O DNA foi então desnaturado a 95 °C por 10 minutos e colocado a 65°C para re-anelamento, e posteriormente tratado com nuclease S1 (Promega) a 37 °C por 8 minutos. Os fragmentos de DNA obtidos foram usados como sondas de C_{0t-1} total para hibridização *in situ* fluorescente (FISH) em três espécies.

Parte dos fragmentos obtidos para *O. octoguttata* foram usados como sondas de C_{0t-1} total para FISH, e a outra parte foi purificada utilizando-se o Kit Axy Prep PCR Cleanup Kit (Axygen, Bioscience), seguindo as instruções do fabricante. As amostras de DNA purificadas foram ligadas ao plasmídeo pMOS, utilizando-se o kit de clonagem (blunt ended PCR cloning kit) seguindo as instruções do fabricante. Após a reação de ligação, foram utilizadas células de *Escherichia coli* DH5 α CaCl₂ competentes (Gibco.Brl Life Technologies) para a transformação (Anexo – 7.2.3).

Para a seleção dos clones de interesse, os DNAs extraídos das colônias bacterianas recombinantes (brancas) foram sujeitos a uma amplificação para a conferência da correta inserção do fragmento de DNA de interesse ao vetor pMOS. O ensaio foi realizado por reação em cadeia da polimerase (PCR) com os primers e ciclos programados no termociclador específicos a pMOS. Os plasmídeos recombinantes foram sequenciados usando um sequenciador automático (ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer) armado com capilares de 50 cm e polímero POP6 (Applied Biosystems).

Na análise das sequências nucleotídicas, utilizou-se o software BLAST –

Basic Local Alignment Search Tool (ALTSCHUL et al., 1990), presente no National Center for Biotechnology Information (NCBI) disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/> e o software CENSOR, presente no Genetic Information Research Institute (GIRINST) disponível em: <http://www.girinst.org/censor/index.php> (KOHANY et al., 2006), para a identificação de possíveis identidades com sequências de outros organismos. Para análise das sequências quanto à repetitividade foi utilizado o método de dot plot com o software Geneious 4.8.4 (DRUMMOND et al., 2009).

- Hibridação *in situ* fluorescente (FISH)

A hibridização foi realizada segundo Pinkel et al. (1986) (Anexo – 7.2.4) com pequenas modificações descritas por Almeida et al. (2010). As condições de hibridação foram de alta exstringência (2,5 ng/uL de sondas, formamida deionizada 50%, sulfato de dextrano 10%, 2XSSC a 37°C overnight). Após a hibridização, as lâminas foram lavadas em 15% formamida/0,2XSSC a 42°C por 20 min, 0,1XSSC a 60°C por 15 min, e 4XSSC / 0,05% Tween em temperatura ambiente por 10 minutos, este último constituído por duas lavagens de 5 minutos.

As sondas utilizadas estavam em uma concentração de pelo menos 300ng. As sondas de fragmentos de DNA geradas pela técnica C_{0t} -1-total foram marcadas com Bio-Nick translation e Dig-Nick translation. A obtenção das sondas para os clones de interesse de *O. octoguttata* a serem utilizadas, foram através de amplificação dos clones por PCR (Polymerase Chain Reaction) marcada com biotina 14-dATP (Invitrogen) ou digoxigenina 11-dATP. As sondas SSRs di, tri e tetranucleótidos específicos foram marcadas com biotina durante síntese na extremidade 5' (Sigma, St. Louis, MO, EUA), SSRs: (CA)₁₅, (CAT)₁₀, (GAC)₁₀, (CAC)₁₀, (GAA)₁₀, (GATA)₈, (GA). Para a detecção do sinal da biotina utilizou-se Streptavidina (Sigma) e para detecção da digoxigenina utilizou-se anti digoxigenina (Roche).

Os cromossomos foram contracolorados com DAPI (0,2mg/ml) montado em uma solução anti-fade. As melhores células foram fotografadas em um microscópio de epifluorescência Olympus BX41. As imagens foram capturadas com uma câmera Olympus DP-71 12 Mega pixels.

4 RESULTADOS

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

CAPÍTULO I

Mapeamento físico de DNA repetitivo e evolução cariotípica em três espécies do gênero *Omophoita* (Coleoptera: Alticinae)

CAPÍTULO II

Mapeamento molecular de microssatélites e retrotransposons: evidência dos mecanismos evolutivos envolvidos na diferenciação dos cromossomos sexuais gigantes em *Omophoita* (Coleoptera: Alticinae)

CAPÍTULO I

Mapeamento físico de DNA repetitivo e evolução cariotípica em três espécies do gênero *Omophoita* (Coleoptera: Alticinae)

Artigo publicado no periódico Italian Journal of Zoology em 2014 (Anexo – 7.3).

Resumo

A ordem Coleoptera possui espécies modelo para estudos em evolução, como os Alticinae, com seus cromossomos sexuais gigantes. Assim, o objetivo do presente estudo foi propor os mecanismos moleculares envolvidos no processo de diferenciação e evolução dos cromossomos sexuais em espécimes de *Omophoita*. As análises utilizando sondas geradas através C_0t_1 cinética de reassociação mostrou marcadores distribuídos em todos os cromossomos, especialmente os cromossomos sexuais. Em conclusão, sequências repetitivas são distribuídas em todos os cromossomos sexuais e autossomos, demonstrando que a heterocromatina da espécie é em grande parte composta por DNA repetitivo. A hibridação cruzada entre as espécies produziu um padrão de coloração muito semelhante para as sondas. Assim, concluiu-se que a maior parte de DNA repetitivo do genoma das espécies de *Omophoita* é compartilhada, mostrando que a heterocromatina em grande parte é composta de DNA repetitivo distribuída ao longo dos cromossomos sexuais e autossomos.

Palavras Chave: FISH, heterocromatina, citogenética molecular, C_0t_1

Introdução

O gênero *Omophoita* pertencente à tribo Oedionychini é endêmico da região Neotropical (RILEY et al., 2002). As espécies da tribo possuem características cromossômicas singulares, como cromossomos sexuais com tamanho extremamente grande e assinápticos durante a meiose, $2n=22$, fórmula meiótica $10II+X+Y$ e cariótipo com predominância de cromossomos metacêntricos.

A variabilidade morfológica dos cromossomos observada sempre envolve a ocorrência de cromossomos metacêntricos e acrocêntricos, o que parece ser uma característica dessa tribo (SMITH e VIRKKI, 1978; VIRKKI, 1988, 1989; PETITPIERRE et al., 1988; SEGARRA e PETITPIERRE, 1990; VIRKKI et al., 1991; VIRKKI e SANTIAGO-BLAY, 1993). A morfologia metacêntrica também tem sido descrita para a maioria das espécies de Coleoptera, sendo considerada como característica ancestral (SMITH e VIRKKI 1978). Almeida et al. (2009) descreveram a morfologia cromossômica para quatro espécies do *Omophoita*, e as diferenças observadas foram explicadas pela ocorrência de inversão pericêntrica. A perda de homologia entre os cromossomos sexuais das espécies Alticinae parece ser um evento antigo considerando que a tribo basal Alticini, bem como a subtribo derivada Oedionychina não possuem sinapses entre os cromossomos sexuais (VIRKKI, 1972).

A heterocromatina possui uma variedade de tipos de DNAs repetitivos, os quais são importantes para estruturação cromossômica. Os DNAs repetitivos são componentes dos genomas de eucariotos, são representados por repetições em tandem como DNAs satélite (DNAsat), minissatélite e microssatélite, e também por elementos repetitivos dispersos como transposons e retrotransposons (CHARLESWORTH et al., 1994).

Os estudos sobre heterocromatina constitutiva em Coleoptera mostram uma localização preferencial na região centromérica, podendo ocorrer também nas regiões intersticiais e teloméricas, porém com menor frequência. Nos cromossomos sexuais, a heterocromatina constitutiva tem ocorrência variável, podendo aparecer somente na região pericentromérica ou ao longo de todo o comprimento cromossômico, de acordo com o grau de diferenciação cromossômica da espécie (ALMEIDA et al., 2000, ROZEK et al., 2004). Algumas famílias possuem grande

quantidade de heterocromatina, como em Elateridae, Cantharidae e Tenebrionidae (ROZEK et al., 2004; SCHNEIDER et al., 2006).

Existem dados de bandamento C para espécies de várias famílias de Coleoptera, no entanto para Alticinae somente sete espécies foram estudadas (VIRKKI, 1983, ALMEIDA et al., 2006, 2009). Virkki (1983), estudando cromossomos mitóticos e meióticos em quatro espécies de Alticinae (*Omophoita annularis* Illiger 1807, *Omophoita personata* Illiger 1807, *Omophoita octoguttata* Fabricius 1775 e *Alagoasa Januaria* Bechyné 1955), submetidos à técnica de bandamento C, observou a ocorrência de bandas pericentroméricas em todos os cromossomos do complemento e adicionais nos cromossomos sexuais, variando em número, posição e intensidade de marcação.

O uso de fluorocromos base específico tem sido empregado em algumas espécies de Coleoptera, com o objetivo de evidenciar a composição de bases das regiões heterocromáticas reveladas ou não pelas técnicas usuais de bandamento C e de heterocromatinas associadas ou coincidentes com as regiões organizadoras de nucléolo (NOR) (ENNIS, 1974; JUAN et al., 1991; PLOHL et al., 1993; MAFFEI et al., 2001; MOURA et al., 2003; VITTURI et al., 2003; BIONE et al., 2005a,b; ALMEIDA et al., 2006; SCHNEIDER et al., 2007; GOLL et al., 2013). O conhecimento sobre a natureza química da cromatina torna possível a inferência das prováveis funções de determinadas regiões, uma vez que os segmentos de DNA ricos em sequências de bases GC estão relacionados ao emparelhamento e recombinação gênica durante a meiose, a “housekeeping genes”, como aqueles das NORs, sendo mais susceptíveis a quebras. Por outro lado, as sequências de bases AT altamente repetitivas estão vinculadas a organização estrutural do material genético e a eventos de início de replicação e transcrição (SUMNER, 2003).

Em Coleoptera, o emprego da coloração por fluorocromos base-específico, especialmente a Cromomicina A3 (CMA₃) e o 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), está restrito a algumas famílias, tais como Chrysomelidae (ALMEIDA et al., 2006), Coccinellidae (MAFFEI et al., 2001), Elateridae (SCHNEIDER et al., 2007), Geotrupidae (VITTURI et al., 1999; COLOMBA et al., 2004), Lucanidae (COLOMBA et al., 2000a), Scarabaeidae (COLOMBA et al., 2000b; COLOMBA et al., 1996, 2006; MOURA et al., 2003; VITTURI et al., 2003; BIONE et al., 2005a,b) e Tenebrionidae (JUAN et al., 1991; PLOHL et al., 1993; GOLL et al., 2013). Até o presente momento

existe somente um trabalho utilizando fluorocromos em Alticinae (ALMEIDA et al., 2006).

O estudo de DNA repetitivo tem sido empregado em algumas espécies de Coleoptera, com o objetivo de localização de genes ribossomais (GALIÁN et al., 1995; DE LA RÚA et al., 1996; PROENÇA; SERRANO; COLLARES-PEREIRA, 2002a, 2002b; BIONE et al., 2005ab; CABRAL-DE-MELLO et al., 2010, 2011a; GOLL et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2012), genes das histonas (CABRAL-DE-MELLO et al., 2010, 2011a) e evidenciar a composição de bases e a localização de monômeros de DNA satélites (DNA sat) e ainda, estudar a evolução destas sequências (JUAN et al., 1993a,b; UGARKOVIC et al., 1996; PONS et al., 1997; LORITE et al., 2000, 2002; PONS et al., 2002; PONS, 2004; MRAVINAC & PLOHL, 2007; WANG et al., 2008). Sequências de DNA sat foram estudadas em poucas espécies de Chrysomelidae, *Chrysolina americana* Linnaeus 1758 e *Xanthogaleruca luteola* Müller 1766 (LORITE et al., 2001, 2002) e *Chrysolina carnifex* Fabricius 1792 (PALOMEQUE et al., 2005). Até o presente momento, não existem registros sobre o estudo de DNA sat em espécies de Alticinae.

DNA repetitivo tem sido identificado como um possível agente de rearranjo cromossômico em várias espécies. Exemplos incluem DNAsat, onde sua amplificação e movimento no cromossomos tem sido bem documentado em certos organismos (HAMILTON et al, 1990;. MODI 1993), bem como elementos de transposição (TEs) (CÁCERES et al., 1999), o qual desempenham um papel na evolução cariotípica (WICHMAN et al., 1992;. HAMILTON, 1992;. YANG et al, 1997;. GARAGNA et al., 2001;. MARCHAL et al., 2004). Assim, devido à mobilidade das sequências repetitivas estas são marcadores citogenéticos interessantes para estudos da evolução dos rearranjos cromossômicos em muitos organismos. Nesse sentido, a amplificação do genoma através de sequências repetitivas, tais como, DNA sat, e TEs, poderia estar relacionada com a evolução dos cromossomos sexuais gigantes em Alticinae, especialmente na subtribo Oedionychina. Com isso o objetivo do presente estudo foi investigar a diferenciação e evolução dos cromossomos sexuais em espécies do gênero *Omophoita* (Alticinae) usando DNA repetitivo (C_0t-1 total), bandas C, fluorocromos de base específicos.

Material e métodos

- Preparações citológicas

Os exemplares de *Omophoita octoguttata*, *Omophoita personata* e *Omophoita sexnotata* Harold 1876 foram coletados em populações naturais de Itaiacoca, PR, Brasil (25°07'10"S e 49°56'24" W), e identificados por Carlos Campaner do Museu de Zoologia, USP, SP.

Para preparações citológicas foram utilizadas gônadas de insetos adultos as quais foram dissecadas em solução fisiológica para insetos, hipotonizadas e fixadas em Carnoy I de acordo com Almeida et al. (2000). As lâminas foram submetidas à técnica de fluorocromos segundo Schweizer et al. (1983), para verificação de regiões ricas em bases AT utilizou-se o fluorocromo 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) e para as bases ricas em GC o fluorocromo cromomicina A3 (CMA₃) ambos combinados com o contracorante distamicina A (DA). Posteriormente, as mesmas lâminas foram submetidas à técnica de obtenção de bandas C, segundo Fernández et al. (2002). Na sequência, as lâminas foram hibridadas com a fração de C₀t-1 total.

-Extração de DNA e prospecção de DNA repetitivo

Para a extração de DNA, foi utilizado o protocolo de Murray e Thompson (1980), com algumas modificações. O DNA foi extraído através de maceração com nitrogênio líquido utilizando-se cabeça, pronoto e fêmur do inseto.

A prospecção de DNA repetitivo nas três espécies foi via cinética de reassociação, baseada na técnica de DNA C₀t-1 total (DNA enriquecido com sequências altamente e moderadamente repetitivas) segundo Zwick et al. (1997). O DNA genômico foi diluído para uma concentração final de 300 ng/μL em uma solução de NaCl 0,3 mol/L. A amostra foi tratada em autoclave (121°C, 1,034 x 10⁵ Pa) por 5 minutos afim de obter fragmentos entre 100 e 1000 pb. O DNA foi então desnaturado a 95°C por 10 minutos e colocado a 65°C para re-anelamento, e posteriormente tratado com nuclease S1 (Promega) a 37°C por 8 minutos. Os fragmentos de DNA obtidos foram usados como sondas de C₀t-1 total para hibridização *in situ* fluorescente (FISH) para as três espécies.

- Hibridação *in situ* fluorescente (FISH)

Para Hibridação *in situ* fluorescente (FISH), os fragmentos de DNA gerados pela técnica de C_0t -1-total e utilizados como sondas foram marcados com Bio-Nick translation e Dig-Nick translation de acordo com instruções do fabricante. Para a detecção do sinal da biotina utilizou-se Streptavidina (Sigma) e para detecção da digoxigenina utilizou-se anti digoxigenina (Roche).

A hibridização foi realizada segundo Pinkel et al. (1986), com pequenas modificações descritas por Almeida et al. (2010). As condições de hibridação foram de alta extrinência (2,5 ng/uL de sondas, formamida deionizada 50%, sulfato de dextrano 10%, 2XSSC a 37°C overnight). Após a hibridização, as lâminas foram lavadas em 15% formamida/0,2XSSC a 42°C por 20 min, 0,1XSSC a 60°C por 15 min, e 4XSSC / 0,05% Tween em temperatura ambiente por 10 minutos, este último constituído por duas lavagens de 5 minutos.

Os cromossomos foram contracolorados com DAPI (0,2mg/ml). As melhores células foram fotografadas em um microscópio de epifluorescência Olympus BX41. As imagens foram capturadas com uma câmera Olympus DP-71 12 Mega pixels.

Resultados

- Cariótipos, bandas C e coloração com fluorocromos

A análise meiótica convencional foi consistente com padrões previamente descritos para *Omophoita octoguttata*, *Omophoita personata* e *Omophoita sexnotata* (ALMEIDA et al., 2009). As espécies analisadas possuem $2n=10II+X+Y$, com cromossomos sexuais gigantes e assinápticos, mas com segregação regular. Além disso, o estudo confirmou o padrão de bandas C na região centromérica da maioria dos autossomos descrito para *O. sexnotata* e *Omophoita magniguttis* Bechyné (1955) (ALMEIDA et al. 2009). Células meióticas das três espécies analisadas foram submetidas à bandamento C e mostraram semelhante distribuição da heterocromatina constitutiva, com padrões de blocos na região pericentromérica da maioria dos autossomos (Figuras 1A, 2A e 3A). No entanto, *O. octoguttata* exibiu a maior quantidade de heterocromatina na região pericentromérica (Figura 1A). Os

cromossomos sexuais exibiram diferentes padrões de bandas C para as espécies analisadas. *Omophoita octoguttata* apresentou heterocromatina na região centromérica e intersticial em um braço do cromossomo X, enquanto o cromossomo Y mostrou bandas intersticiais em seu braço longo e uma banda terminal em seu braço curto (Figuras 1A box, 5). A espécie *O. personata* apresentou bandas C na região centromérica do cromossomo X, enquanto o cromossomo Y mostrou bandas mais proeminentes nas regiões terminais de um braço e na região intersticial do braço oposto (Figuras 2A, 5). A espécie *O. sexnotata* exibiu bandas heterocromática nas regiões centroméricas e terminais do cromossomo X, enquanto o cromossomo Y mostrou bandas intersticiais em seu braço longo e uma banda terminal em seu braço curto (Figuras 3A, 5).

A coloração com fluorocromos (CMA₃/DA/DAPI) mostrou pequenos blocos ricos em bases AT (DAPI +) no centrômero e nas regiões heterocromáticas dos autossomos das três espécies estudadas (Figuras 1F, H, 2B e 3B). Além disso, pelo menos um cromossomo ou bivalente inteiramente rico em bases GC foi observado nas três espécies analisadas (Figuras 1G, H, 2C, 3C e D). Além disso, *O. personata* mostrou um bivalente inteiramente rico em bases AT (Figura 2B e D), *O. octoguttata* mostrou um cromossomo com braço curto rico em bases AT e outro par com braço curto rico em bases GC (Figura 1B-E), e *O. sexnotata* mostrou um par de cromossomos com braço curto rico em bases GC (Figura 3C e D, cabeça de seta).

Quanto aos cromossomos sexuais, *O. octoguttata* mostrou blocos ricos em bases GC nas regiões terminais do cromossomo X, bem como blocos intersticiais ricos em bases AT; o cromossomo Y mostrou blocos intercalados ricos em bases GC e AT na região intersticial e terminal (Figuras 1F–H, 5). Em *O. personata*, os cromossomos X e Y mostraram marcações ricas em bases AT e GC em suas regiões pericentroméricas, enquanto o cromossomo Y também mostrou a região terminal rica em bases AT (Figuras 2B, D box, 5). Em *O. sexnotata*, os cromossomos X e Y apresentaram blocos ricos em bases AT e GC em suas regiões terminais e pericentroméricas, além de blocos ricos em bases AT na região intersticial no cromossomo Y (Figuras 3B-D, 5). Uma banda adicional proximal rica em bases GC também foi encontrada em ambos os cromossomos sexuais (Figuras 3C e D, cabeça de seta box, 5).

A hibridação de C_0t-1 DNA total das três espécies contra seus próprios cromossomos revelou um padrão de marcação pericentromérico na maioria dos bivalentes (Figura 4), padrão semelhante ao de distribuição de heterocromatina. No entanto, pequenas diferenças entre as espécies foram observadas. Em *O. octoguttata*, três bivalentes mostraram marcações puntiformes na região pericentromérica (Figura 4A), diferindo do padrão de bandas C.

Em *O. personata* (Figura 4E) e *O. sexnotata* (Figura 4I), este padrão puntiforme foi semelhante em apenas um ou dois bivalentes, respectivamente. Adicionalmente, um bivalente foi quase totalmente marcado em *O. personata* e dois bivalentes em *O. sexnotata*. Para os cromossomos sexuais, o cromossomo X em *O. octoguttata* (Figuras 4A, 5) apresentou marcação fraca na região centromérica, enquanto as regiões terminais foram fortemente marcadas; marcações também foram observadas ao longo de um dos braços do Y. O cromossomo X em *O. personata* (Figuras 4E, 5) e *O. sexnotata* (Figuras 4I, 5) mostrou marcação nas regiões pericentroméricas e terminais; além disso, um braço deste cromossomo foi também marcado intersticialmente em *O. sexnotata*. A marcação não foi evidente para o cromossomo Y de *O. personata* e *O. sexnotata*.

A hibridação cruzada com DNA C_0t-1 total mostrou marcação na região pericentromérica dos autossomos em todas as espécies, independente da sonda utilizada (Figura 4B-D, F-H). Marcações adicionais ao longo de quase todos os bivalentes foram observadas em *O. personata* (Figura 4B, H) e *O. sexnotata* (Figura 4C, F). Além disso, um bivalente quase inteiramente sem marcação foi observado em *O. octoguttata* pela hibridação com sondas de DNA C_0t-1 total de *O. personata* e *O. sexnotata* (Figura 4D,G). Os cromossomos X nas espécies apresentaram um padrão de marcação semelhante na região pericentromérica para cada hibridação cruzada (Figura 4B-D, F-H). No entanto, as marcações foram claramente observadas nas extremidades dos braços do cromossomo X em *O. octoguttata* (Figura 4D, G) e *O. sexnotata* (Figura 4C, F).

O cromossomo Y em *O. personata* e *O. octoguttata* exibiram um padrão de marcação ao longo de um dos braços quando hibridados com o DNA C_0t-1 cruzado entre as espécies (Figura 4B, D). O cromossomo Y de *O. sexnotata* mostrou ligeira marcação na região centromérica e terminais quando hibridado com o DNA C_0t-1 total a partir de *O. octoguttata* (Figura 4C) e *O. personata* (Figura 4F).

Discussão

Os cromossomos sexuais extremamente grandes e assinápticos em *Oedionychina* podem ser características derivadas (ALMEIDA et al., 2009). Esta opinião é corroborada se considerarmos o sistema de cromossomos do tipo Xyp da subordem Polyphaga como condição basal (SMITH e VIRKKI, 1978), bem como a ocorrência deste sistema sexual nas subfamílias Chrysomelinae e Galerucinae, as quais são mais estreitamente relacionados à Alticinae. Algumas sugestões, como numerosos rearranjos cromossômicos, translocações autossômicas para os cromossomos sexuais e as mudanças na quantidade de heterocromatina constitutiva, já têm sido propostas para explicar a origem desta classe especial de cromossomos (BRANCO, 1973; SMITH e VIRKKI, 1978). No entanto, os dados sobre a composição e o processo de diferenciação destes cromossomos não estão disponíveis.

A família Chrysomelidae é caracterizada principalmente por uma pequena quantidade de heterocromatina (ROZEK et al., 2004; SCHNEIDER et al., 2006). Os poucos estudos realizados em Alticinae mostraram uma localização de heterocromatina, preferencialmente centromérica, uma característica comum em Coleoptera (VIRKKI 1983; ALMEIDA et al. 2006, 2009). Desta forma, os dados obtidos para as três espécies analisadas, estão de acordo com os resultados descritos para outras espécies da subfamília no que se refere ao padrão pericentromérico da heterocromatina nos cromossomos autossômicos.

As marcações de bandamento C adicionais nos cromossomos sexuais para as três espécies são também consistentes com dados descritos por Virkki (1983) para *O. octoguttata* e *O. personata*, bem como espécies que são taxonomicamente relacionadas com Alticinae (ALMEIDA et al., 2006, 2009). Nesse sentido, essa diversidade de marcações em relação ao padrão de distribuição da heterocromatina em Coleoptera poderia representar uma diferenciação cariotípica no grupo.

Segundo Almeida et al. (2006), a presença de heterocromatina sobre os cromossomos sexuais poderia estar relacionada com a origem do sistema de determinação sexual representando o material remanescente dos cromossomos fusionados durante a evolução.

Em relação à composição da heterocromatina, a presença de DNA com sequências de bases AT altamente repetitiva na região centromérica (bandas C +)

comum às três espécies analisadas, também foi encontrada nos cromossomos de outras espécies relacionadas (ALMEIDA et al., 2006) bem como em alguns Tenebrionidae e Scarabaeidae (JUAN et al., 1991; PLOHL et al., 1993; MOURA et al., 2003; COLOMBA et al., 2006). Por outro lado, Cabral-de-Mello et al. (2011b) tem descrito a presença de heterocromatina pericentromérica rica em composição de bases GC no gênero *Dichotomius* (Scarabaeidae), propondo a ocorrência de compartimentalização da heterocromatina nas espécies desse gênero.

Adicionalmente, a presença de cromossomos inteiramente ricos em bases GC é compartilhada entre as três espécies, bem como os cromossomos ricos em bases AT em *O. personata*, o que não tem sido descrito para outras espécies de Chrysomelidae. Além disso, a presença de blocos ricos em bases GC no braço curto de cromossomos em *O. octoguttata* e *O. sexnotata* poderiam indicar uma diferenciação cariotípica entre as espécies do gênero *Omophoita*. No que se referem às marcações diferenciais observadas nos cromossomos sexuais, os DNAs repetitivos de diferentes composições estão presentes nesses cromossomos e estão provavelmente relacionados ao seu processo evolutivo. Nesse sentido, as composições de DNAs repetitivos obtidas neste estudo também poderiam explicar a diversificação da morfologia cromossômica descrita na literatura para espécies de *Omophoita* (VIRKKI, 1983; ALMEIDA et al., 2009.).

O uso de técnica de DNA C_0t-1 total mostrou um padrão mais preciso e complementar de distribuição de heterocromatina nas espécies analisadas. De acordo com Cabral-de-Mello et al. (2011b), os estudos baseados exclusivamente em bandamento C pode levar a descrições errôneas de homogeneidade entre os cariótipos. Assim, de acordo com os autores, o método DNA C_0t-1 total pode oferecer suporte a análise genômica completa.

Neste sentido, a presença de heterocromatina e fluorocromo DAPI-positivo, e sua correspondência com a fração de C_0t-1 na região pericentromérica, sugerem a ocorrência de DNA altamente repetitivo em sequências de bases AT nesta região cromossômica nas três espécies. No entanto, a hibridação fraca para C_0t-1 total de sondas em certos cromossomos sugere que a heterocromatina é composta de um baixo número de cópia de sequências ou classes de DNAs repetitivos diferentes. Tal variação na composição da heterocromatina também foi observada em Scarabaeidae (CABRAL-DE-MELLO et al., 2011b). Para os cromossomos sexuais, as diferenças na localização, composição e hibridação do C_0t-1 total indicam

diferenciação da heterocromatina entre tais cromossomos das três espécies de *Omophoita*. A variação em composição e hibridação para certos cromossomos destas espécies indica diferenciação da heterocromatina em *Omophoita*.

Hibridação cruzada entre as espécies produziram um padrão de marcação semelhante para as sondas nas regiões pericentroméricas. Assim, podemos concluir que a maior parte de regiões repetitivas do genoma é compartilhada entre as espécies de *Omophoita*, mostrando que as regiões conservadas de sequências repetitivas são distribuídas ao longo dos cromossomos sexuais e autossomos. Além disso, a heterocromatina para estas espécies é em grande parte composto por DNA repetitivo compartilhado. Diferentes tipos de DNA repetitivo podem estar diretamente ligados à heterocromatinização e evolução dos cromossomos sexuais gigantes do gênero *Omophoita* e subtribo Oedionychina. Isso poderia também estar relacionado com o processo de diferenciação autossômica.

Por isso, técnicas mais refinadas podem ajudar a elucidar os processos de diferenciação cromossômica entre espécies relacionadas com alguma uniformidade cariotípica. De acordo com Cabral-de-Mello et al. (2011b), o método de DNA C_0t-1 total é uma ferramenta ideal para estudos comparativos sobre genomas, diversidade cariotípica e evolução do genoma em insetos pois este grupo não possui bibliotecas disponíveis, sondas cromossômicas ou genomas sequenciados.

Agradecimentos

Este estudo foi apoiado pela Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq. Os autores são gratos ao especialista Carlos Campaner por sua ajuda na identificação das espécies.

Referências Bibliográficas

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

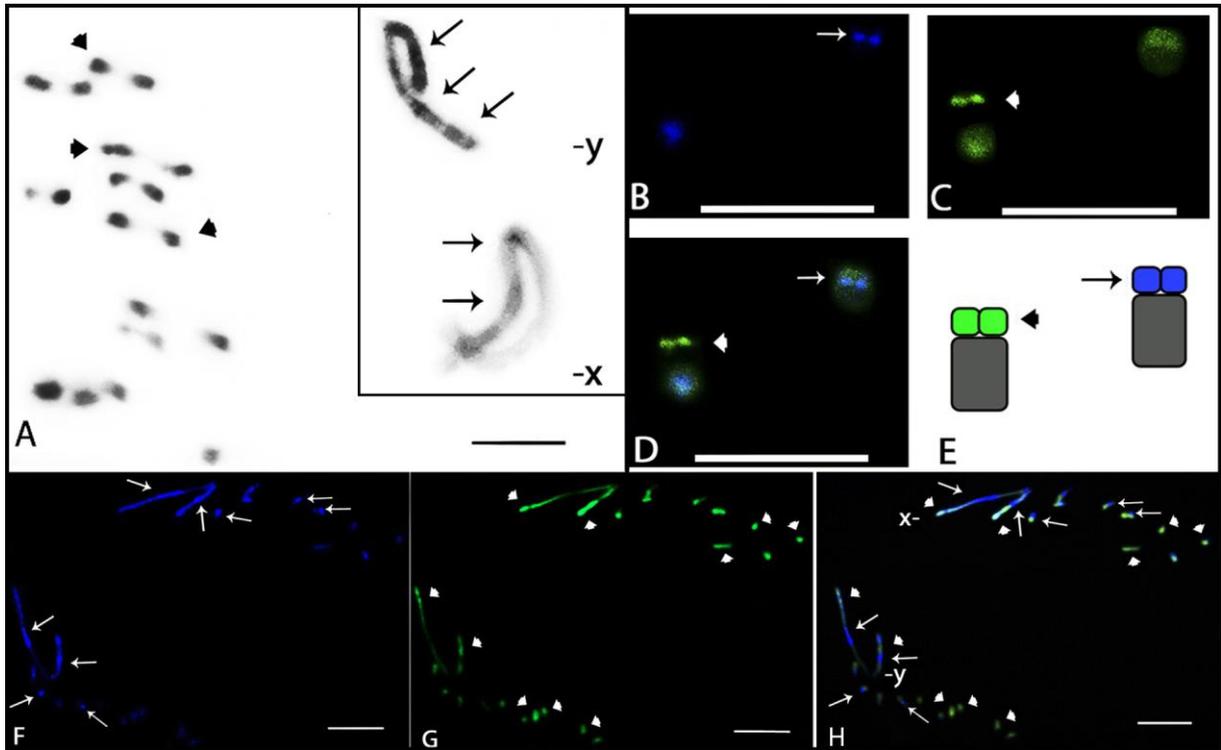


Figura 1. Células meióticas de *Omophoita octoguttata* submetidas à bandamento-C (A) e coloração com fluorocromos CMA₃/DA/DAPI (B–H). **A**, metáfase I, cabeça de seta=coloração positiva centromérica, Box = cromossomos sexuais de outra metáfase I, as setas mostram heterocromatina. **B**, setas=DAPI positivo. **C**, cabeças de setas=CMA₃ positivo. **D**, sobreposição de imagens dos autossomos **B** e **C**; cabeças setas=coloração positiva. **E**, idiograma dos autossomos observados em **D**; seta=braço curto rico em AT e cabeça de seta=braço curto rico em GC. **F**, setas=DAPI positivo. **G**, cabeças seta=CMA₃ positivo. **H**, sobreposição de imagens **F** e **G** da anáfase II; setas=regiões AT positivas; cabeças de seta=regiões GC positivas. Barra=10 µm.

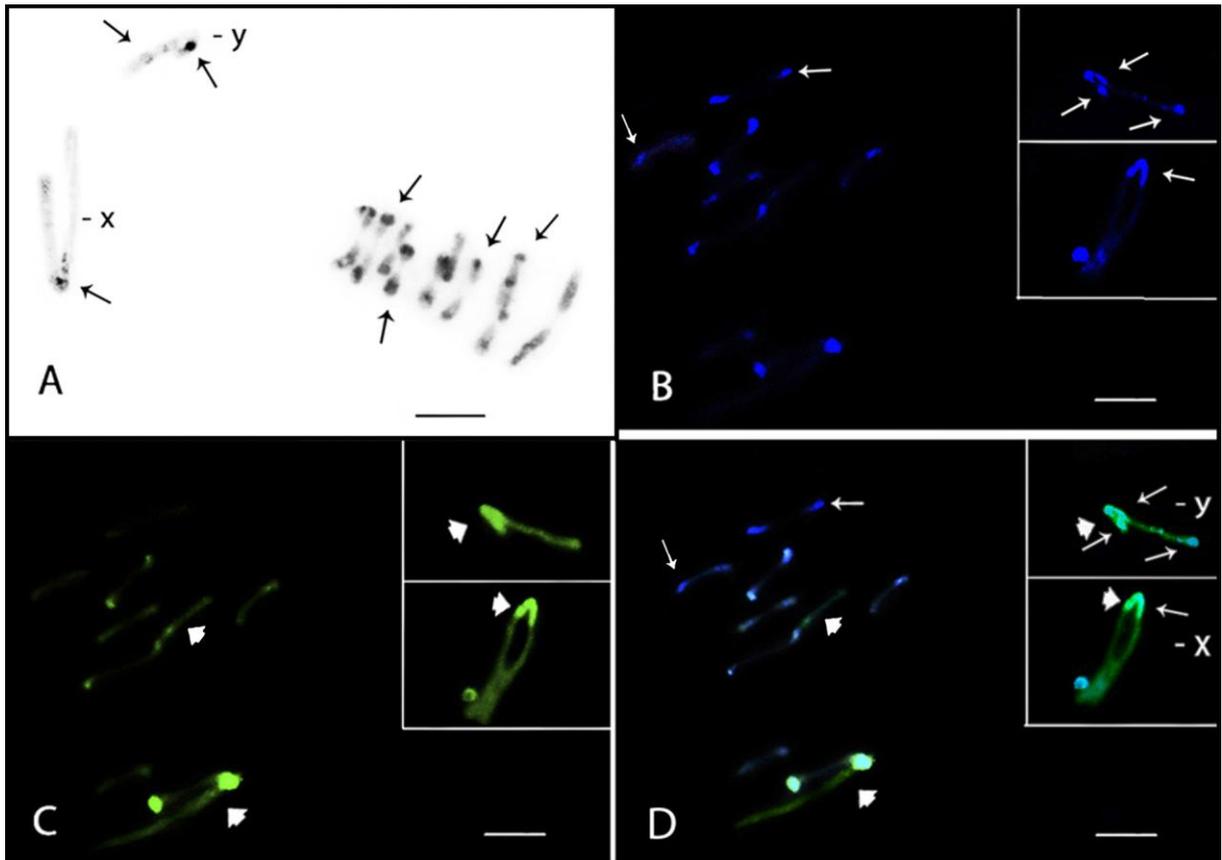


Figura 2. Células meióticas de *Omophoita personata* submetidas a bandamento-C (A) e coloração com fluorocromo CMA₃/DA/DAPI (B-D). A, metáfase I; setas=heterocromatina centromérica. B, setas=DAPI positivo. C, cabeças de seta=CMA₃ positivo. D, sobreposição de imagens B e C da metáfase I, setas=regiões AT positivas e cabeças seta=regiões GC positivas. Box=cromossomos sexuais (X e Y) de outra célula. Barra=10 µm.

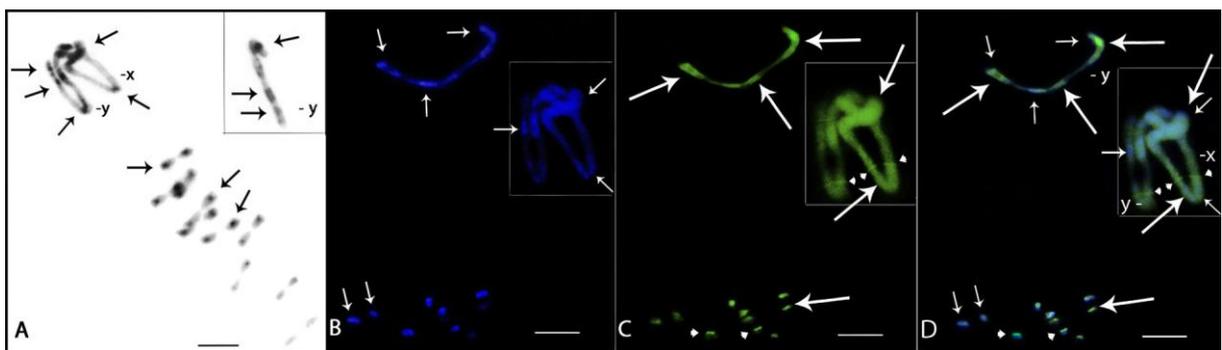


Figura 3. Células meióticas de *Omophoita sexnotata* submetidas a bandamento-C (A) e coloração com fluorocromos CMA₃/DA/DAPI (B-D). A, metáfase I setas=heterocromatina centromérica, Box=visão detalhada de um cromossomo Y. B, setas=DAPI positivo. C, setas=CMA₃ positivo; e cabeças de seta=braços curtos GC positivos. D, sobreposição de imagens B e C da metáfase II, setas pequenas=regiões AT positivas e setas grandes=regiões GC positivas. Box=cromossomos X e Y; setas pequenas=regiões AT positivas, setas grande=regiões GC positivas e cabeças de seta=bandas proximais GC positivas. Barra=10 µm.

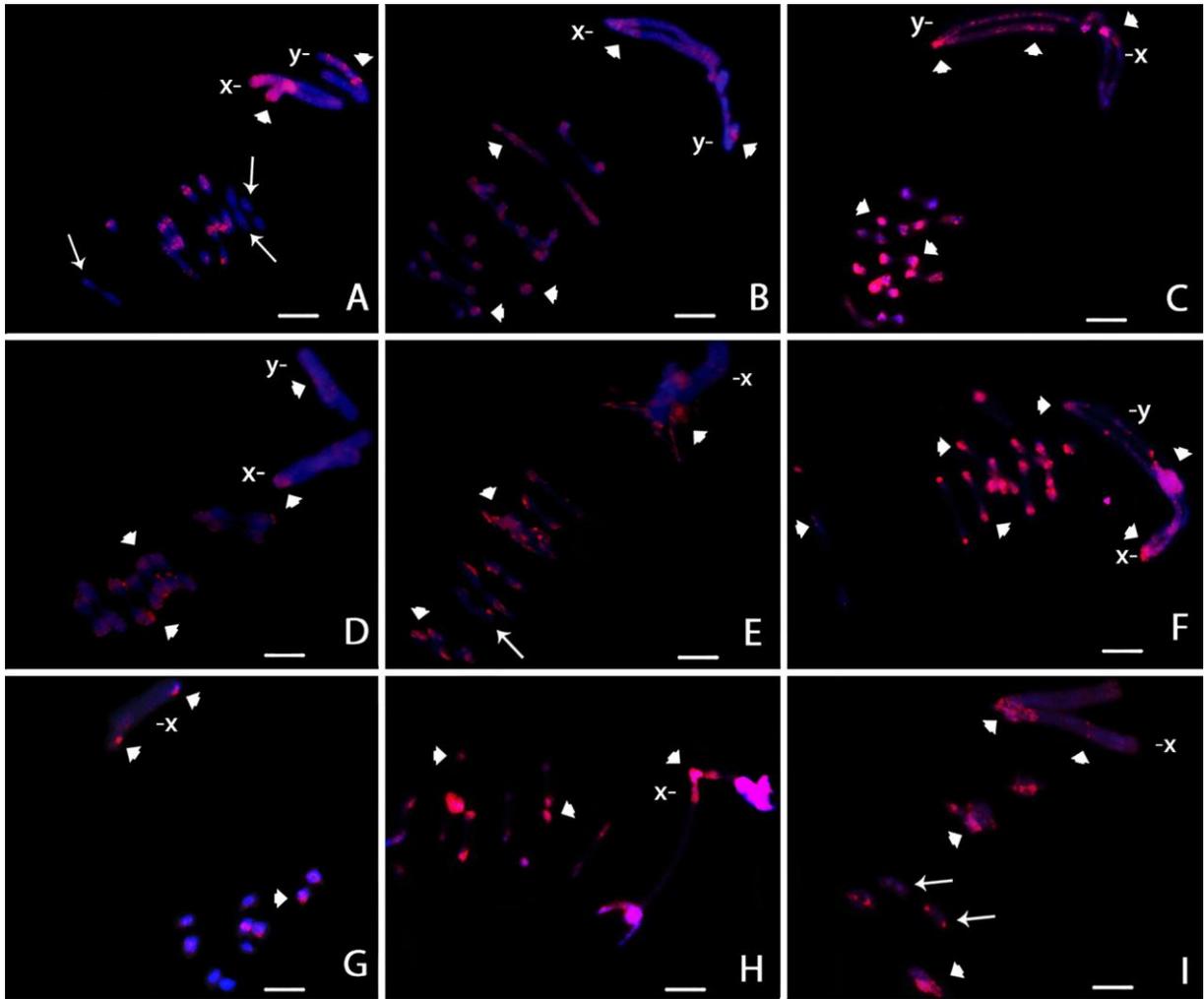


Figura 4. Células meióticas de *Omophoita octoguttata* (A, D, G), *O. personata* (B, E, H) e *O. sexnotata* (C, F, I), submetida a hibridação cruzada utilizando o produto C_0t-1 total a partir de *O. octoguttata* em A-C, a partir de *O. personata* em D-F, e a partir de *O. sexnotata* em G-I. Setas=marcações puntiformes, cabeças de seta=marcas positivas. Barra=10 μ m.

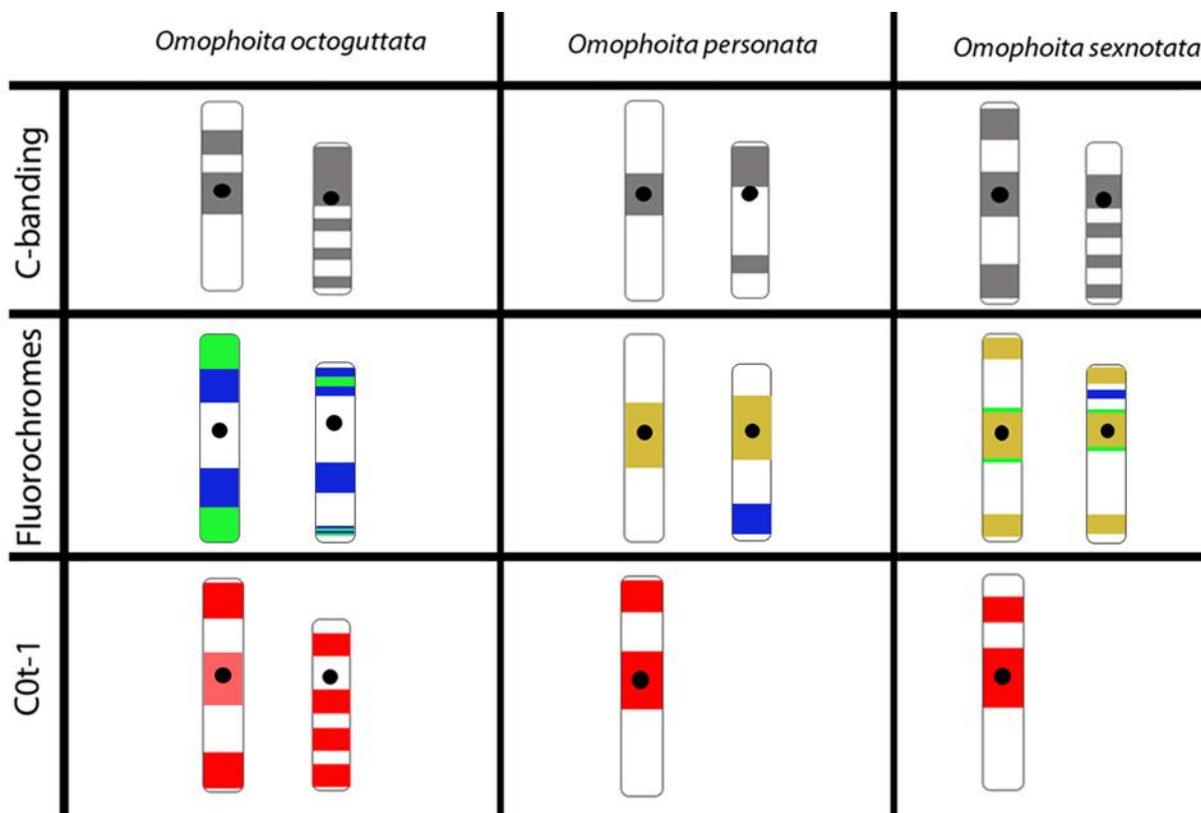


Figura 5. Idiograma dos cromossomos sexuais (X esquerda, Y à direita) mostrando os diferentes padrões de marcações obtidos com bandas C, fluorocromos CMA₃/DA/DAPI e sondas de C₀t-1 de *Omophoita octoguttata*, *O. personata* e *O. sexnotata*. (● = centromero, ■ = bandamento C, ■ = CMA₃, ■ = DAPI, ■ = DAPI + CMA₃, ■ = C₀t-1 marcações).

CAPÍTULO II

Mapeamento molecular de microssatélites e retrotransposons: evidência dos mecanismos evolutivos envolvidos na diferenciação dos cromossomos sexuais gigantes em *Omophoita* (Coleoptera: Alticinae)

Resumo

Os estudos de microssatélites (SSRs) são amplamente utilizados como marcadores moleculares, pois apresentam elevado nível de polimorfismo e são amplamente distribuídos nos genomas. Por sua plasticidade os SSRs também tem sido estudado em mapeamento cromossômico de diversas espécies. A literatura ainda mostra que muitos elementos de transposição (TE) têm sido identificados por influenciarem rearranjos cromossômicos, formação e movimentação de DNAs satélites, sendo interessantes estudos em conjunto de TEs e SSRs para pesquisas evolutivas. Assim, o objetivo do estudo foi propor alguns mecanismos evolutivos envolvidos na diferenciação e origem dos cromossomos sexuais gigantes de espécies do gênero *Omophoita*, por meio da caracterização molecular desses cromossomos, utilizando a FISH com sondas de DNAs repetitivos. As hibridações com sondas SSRs (CA)₁₅, (CAT)₁₀, (GAC)₁₀, (CAC)₁₀, (GAA)₁₀, (GATA)₈, (GA)₁₅, realizadas em células meióticas de quatro espécies de *Omophoita*, mostraram padrões de marcação conservados para os autossomos, porém essas marcações mostraram-se bem diversificadas em relação aos cromossomos sexuais, sugerindo uma diferença de constituição nos cromossomos sexuais entre as espécies. A clonagem e análise das sequências obtidas com a técnica de C₀t-1 evidenciaram a presença de retrotransposons. As hibridações dos clones com fragmentos de retrotransposons mostraram marcações dispersas em todos os cromossomos das espécies, padrão de acúmulos semelhantes aos obtidos com SSRs, sugerindo possível relação entre eles, desta forma, pode se inferir um papel evolutivo dos DNAs repetitivos na diferenciação desses cromossomos no gênero.

Palavras chave: FISH, evolução cariotípica, citogenética molecular, microssatélites (SSRs), retrotransposons, *Omophoita*

Introdução

Dentre as subfamílias de Chrysomelidae, Alticinae possui o maior número de espécies na Região Neotropical (BORROR e DELONG, 1988), compreendendo cerca de 570 gêneros e mais de 10.000 espécies (SEENO e WILCOX, 1982). No Brasil existe uma alta biodiversidade de alticinaes, apresentando grande potencial para pesquisas, como estudos ecológicos, desde indicadores biológicos (LINZMEIER et al., 2006), estudos de pragas agrícolas (COSTA et al., 2006) a estudos citogenéticos e moleculares (ALMEIDA et al., 2006, 2009; MELLO et al., 2014). A subtribo Oedionychina contem gêneros endêmicos da região Neotropical como, por exemplo, *Omophoita* (RILEY et al., 2002).

Citogeneticamente as espécies de *Omophoita* possuem características cromossômicas peculiares, como cromossomos sexuais com tamanho extremamente grande e assinápticos durante a meiose, $2n=22$, fórmula meiótica $10II+X+Y$, mostrando grande possibilidades para estudos citogenéticos e moleculares envolvidos na evolução cariotípica de seus cromossomos sexuais gigantes, como demonstrado por Almeida et al. (2009, 2010) e Mello et al. (2014, artigo I do presente trabalho).

A heterocromatina é um importante componente de estruturação cromossômica, composta por uma ampla quantia de DNAs repetitivos, na maioria dos casos esta relacionada aos centrômeros e telômeros. Estudos clássicos de heterocromatina com a técnica de obtenção de bandas C foram realizados em somente sete espécies de Alticinae (VIRKKI, 1983, ALMEIDA et al., 2006, 2009). Virkki (1983), estudando cromossomos mitóticos e meióticos em quatro espécies de Alticinae (*Omophoita annularis*, *O. personata*, *O. octoguttata* e *Alagoasa januarina*), observou a ocorrência de bandas pericentroméricas em todos os cromossomos do complemento e adicionais nos cromossomos sexuais, variando em número, posição e intensidade de marcação. Padrões pericentroméricos e adicionais também foram descritos em estudos com espécies de Alticinae por Almeida et al. (2006, 2009), observados em bivalentes autossômicos e cromossomos sexuais de *Paranaita opima*, *O. magniguttis* e *O. sexnotata*.

Os genomas de um modo geral estão repletos de sequências de repetições simples ou em tandem, podendo ocorrer como unidades pequenas ou milhares de pares de bases de nucleotídeos. Existem diversas classificações dessas repetições

em tandem, como os microssatélites (SSRs) sequência de repetições simples, que são repetições mono, di, tri, tetranucleotídeos até seis (hexa-nucleotídeos). Repetições de unidades mais longas formam os minissatélites, e ainda maiores os DNAs satélites (ELLEGREN, 2004).

Além de repetições em tandem, existem os elementos de repetição dispersos, como os elementos de transposição (TEs), classificados em transposons e retrotransposons. Os TEs são sequências que podem estar repetidas milhares de vezes no genoma, porém arranjados de forma dispersa (SUMMER, 2003). Esses TEs, DNAs satélites e SSRs têm sido associados principalmente com heterocromatina constitutiva em clusters, os quais podem formar padrões de heterocromatina espécie específicos e cromossomo específicos (RASKINA et al. 2007; CUADRADO e JOUVE, 2007).

Os DNAs repetitivos podem servir como possíveis regiões de rearranjos cromossômicos, como deleções, duplicações, translocações e inversões, em localizações entre os limites da heterocromatina e eucromatina (SUMNER 2003, BADAIEVA et al., 2007, CHEN et al., 2010). A literatura ainda mostra que muitos elementos de transposição têm sido associados com a ocorrência de rearranjos cromossômicos, formação e movimentação de DNAs satélites. Desta forma, evidencia que esse grupo de DNA repetitivo tem grande relevância em estudos sobre evolução cromossômica e do genoma. Alguns trabalhos têm mostrado a influência dos elementos de transposição na heterocromatinização de cromossomos e no processo de diferenciação e origem dos cromossomos sexuais (STEINEMANN e STEINEMANN 2005; KAISER e BACHTROG, 2010). Além disso, estão envolvidos na evolução da heterocromatina, a qual pode ter sido formada em resposta a elementos transponíveis invasivos, os quais formam centros de nucleação heterocromática, propagando a heterocromatina e silenciando genes flancadores.

Vários trabalhos têm gerado evidências mostrando que a distribuição genômica dos SSRs não é aleatória, provavelmente por causa de seus efeitos sobre a organização da cromatina, regulação da atividade genética, recombinação, replicação de DNA, ciclo celular, entre outras funções (LI et al., 2002). Exemplos desses efeitos funcionais são as sequências microssatélites GATA, onde se acredita estar envolvida de alguma forma com cromossomos sexuais de várias espécies, sendo abundantes em cromossomos sexuais heteromórficos de espécies de vertebrados (JONES E SINGH, 1981), desde répteis (O'MEALLY et al., 2010) a

mamíferos. Em humano os SSRs GATA presente no cromossomo Y desempenham um papel na marcação dos limites de domínios da cromatina (SUBRAMANIAN, 2003). Descobriu-se também, que os SSRs GATA têm atividade bloqueadora e ativadora em células humanas e de *Drosophila*. Desta forma, essas atividades poderiam explicar o acúmulo dos SSRs em organismos complexos (KUMAR et al., 2013).

Estudos mostram que o acúmulo e dispersão de elementos repetitivos podem interferir no tamanho dos cromossomos sexuais, podendo torna-los menores como o Y em mamíferos (MATSUBARA, et al., 2006) ou o maior cromossomo do genoma, como, por exemplo, o cromossomo Y da planta *Silene latifolia* (KEJNOVSKY, 2009). Assim eventos como esses poderiam estar envolvidos na evolução dos cromossomos sexuais gigantes no gênero *Omophoita*. Desta forma, o objetivo do estudo foi propor os mecanismos evolutivos envolvidos na diferenciação e origem dos cromossomos sexuais gigantes de espécies do gênero *Omophoita*, através da caracterização molecularmente desses cromossomos, utilizando a FISH com sondas de DNAs repetitivos.

Material e Métodos

- Preparações citológicas

Para o estudo foram utilizados indivíduos machos de quatro espécies: sendo 26 indivíduos de *Omophoita magniguttis*, 53 de *Omophoita octoguttata*, 33 de *Omophoita personata* e 34 de *Omophoita sexnotata*, pertencentes à ordem Coleoptera, subfamília Alticinae. Os exemplares foram coletados em populações naturais no município de Ponta Grossa, PR, Brasil (25°07'10"S e 49°56'24" W) e Nonoai, RS (27°21'21" S, 52° 45' 58" W). os quais foram identificados por Carlos Campaner do Museu de Zoologia, USP, SP.

Para preparações citológicas foram utilizadas gônadas de insetos adultos as quais foram dissecadas em solução fisiológica para insetos, hipotonizadas e fixadas em Carnoy I, segundo Almeida et al. (2000).

- Extração de DNA e prospecção de DNA repetitivo

A extração de DNA de *O. octoguttata* seguiu o protocolo de Murray e Thompson (1980), com algumas modificações, utilizando a cabeça, o pronoto e o fêmur do terceiro par de pernas, macerados em nitrogênio líquido. A prospecção de DNA repetitivo foi via cinética de reassociação, baseada na técnica de DNA C₀t-1 (DNA enriquecido com sequências altamente e moderadamente repetitivas) segundo Zwick et al. (1997). O DNA genômico foi diluído brevemente, para uma concentração final de 300 ng/μL em uma solução de NaCl 0,3 mol/L. A amostra foi tratada em autoclave (121°C, 1,034 x 10⁵ Pa), por 5 minutos, afim de obter fragmentos entre 100 e 1000 pb. O DNA foi então desnaturado a 95°C por 10 minutos e colocado a 65°C para re-anelamento, e posteriormente tratado com nuclease S1 (Promega) a 37°C por 8 minutos.

Os fragmentos obtidos foram purificados utilizando o Kit Axy Prep PCR Cleanup Kit (Axygen, Bioscience), seguindo as instruções do fabricante. As amostras de DNA purificadas foram ligadas ao plasmídeo pMOS, utilizando o kit de clonagem (blunt ended PCR cloning kit) seguindo as instruções do fabricante. Para transformação foram utilizadas células de *Escherichia coli* DH5α CaCl₂ competentes (Gibco.Brl Life Technologies). Os clones de interesse foram selecionados através de PCR a partir de colônias recombinantes (brancas) utilizando primers e ciclos específicos para pMOS. Os plasmídeos recombinantes foram sequenciados usando um sequenciador automático (ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer) armado com capilares de 50 cm e polímero POP6 (Applied Biosystems).

Na análise das sequências nucleotídicas dos clones de interesse, utilizou-se o software BLAST – Basic Local Alignment Search Tool (ALTSCHUL et al., 1990), presente no National Center for Biotechnology Information (NCBI) disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/> e o software CENSOR, presente no Genetic Information Research Institute (GIRINST) disponível em: <http://www.girinst.org/censor/index.php> (KOHANY et al., 2006), para a identificação de possíveis identidades sequências de outros organismos. Para análise das sequências quanto à repetitividade foi utilizado o método de dot plot com o software Geneious 4.8.4 (DRUMMOND et al., 2009).

- Hibridação *in situ* fluorescente (FISH)

As células meióticas das quatro espécies analisadas foram submetidas à técnica de FISH com sondas de microssatélites específicos marcados com biotina durante síntese na extremidade 5' (Sigma, St. Louis, MO, EUA) como SSRs di, tri e tetranucleótidos: (CA)₁₅, (CAT)₁₀, (GAC)₁₀, (CAC)₁₀, (GAA)₁₀, (GATA)₈, (GA)₁₅. Além disso, foram realizadas hibridações com clones de interesse, obtidos de fragmentos C₀t-1 total de *O. octoguttata*. As sondas dos clones foram obtidas por PCR (Polymerase Chain Reaction) marcado com biotina 14-dATP (Invitrogen) ou digoxigenina 11-dATP.

A hibridização foi realizada segundo Pinkel et al. (1986), com pequenas modificações descritas por Almeida et al. (2010). As condições de hibridação foram de alta exstringência realizada com pelo menos 300 ng (2,5 ng/uL de sondas, formamida deionizada 50%, sulfato de dextrano 10%, 2XSSC a 37°C overnight). Após a hibridização, as lâminas foram lavadas em 15% formamida/0,2XSSC a 42°C por 20 min, 0,1XSSC a 60°C por 15 min, e 4XSSC / 0,05% Tween em temperatura ambiente por 10 minutos. Este último constituído por duas lavagens de 5 minutos. Para a detecção e amplificação do sinal da biotina utilizou-se Streptavidina (Sigma) e para detecção da digoxigenina utilizou-se anti digoxigenina (Roche). Os cromossomos foram contracolorados com DAPI (0,2 mg/ml) montado em uma solução anti-fade. As melhores células foram fotografadas em um microscópio de epifluorescência Olympus BX41. As imagens foram capturadas com uma câmera Olympus DP-71 12 Mega pixels. As fotos obtidas foram montadas em pranchas e as cores originais foram substituídas com o auxílio de editor de imagens Adobe Photoshop CS5, para uma melhor visualização sem que houvesse alteração nos resultados.

Resultados

A análise de células meióticas das quatro espécies *Omophoita magniguttis*, *Omophoita octoguttata*, *Omophoita personata*, e *Omophoita sexnotata*, mostrou $2n=10II+X+Y$, cromossomos sexuais gigantes e assinápticos, porém com segregação regular. Os dados citogenéticos foram concordantes com a descrição

realizada por Almeida et al. (2009).

As análises dos cromossomos autossômicos das quatro espécies mostraram marcações pericentromérica na maioria dos bivalentes com as sondas SSRs: (CA)₁₅, (CAT)₁₀, (GAC)₁₀, (CAC)₁₀, (GATA)₈, (GA)₁₅ (Figuras 1-4 setas). A hibridação com o microssatélite (GAA)₁₀ mostrou um padrão diferente para as espécies *Omophoita magniguttis* e *Omophoita personata*, sendo que apenas um bivalente foi marcado na região pericentromérica (Figuras 1 M-O e 3 M-O, setas). Em *O. octoguttata* todos os bivalentes mostraram marcações pericentromérica (Figuras 2 M-O, setas), em *O. sexnotata* nenhum autossomo apresentou marcações (Figura 4 M-O, setas) com a sonda (GAA)₁₀.

Os resultados das hibridações com os diferentes SSRs nos cromossomos sexuais mostraram padrões bem variados nas quatro espécies (Figura 5, Tabela1). Marcações pericentroméricas e distais foram as mais comuns entre as espécies. Marcações dispersas ao longo dos cromossomos foram obtidas com quatro SSRs. O microssatélite (CA)₁₅ mostrou-se disperso no cromossomo X e y de *O. magniguttis*, *O. personata* e *O. sexnotata*. O SSR (GA)₁₅ apresentou-se disperso no X de *O. magniguttis* e *O. octoguttata* e na porção intersticial estendendo-se até a terminal em um dos braços do y em *O. magniguttis*. O SSR (CAC)₁₀ mostrou-se disperso no X de *O. personata* e no X e y de *O. sexnotata*. Além disso, marcações dispersas com o SSR (GAC)₁₀ foram observadas nas regiões distais de ambos os braços do cromossomo X de *O. sexnotata* (Figura 5).

Marcações bem evidentes nos cromossomos sexuais das quatro espécies foram obtidas com o SSR (GATA)₈. Acúmulos na região pericentromérica foram observados no cromossomo X das quatro espécies. Nos braços cromossômicos foram visualizados diferentes acúmulos na região distal e intersticial entre as espécies. A hibridação no cromossomo y foi bem evidente, mostrando acúmulos semelhantes em grande parte do braço longo em *O. magniguttis* e *O. octoguttata* e do braço curto em *O. personata* e *O. sexnotata* (Figura 5). Outro acúmulo interessante foi com o SSR (GAA)₁₀ mostrando marcações no cromossomo X e y de *O. octoguttata* e marcações somente em um dos braços do X de *O. sexnotata*. Nenhuma marcação foi observada nos cromossomos sexuais de *O. magniguttis* e *O. personata*.

A análise das sequências clonadas mostrou três clones informativos e com padrões de marcação através da FISH. Essas sequências mostraram identidade

com retrotransposons de outros invertebrados, o clone 4 mostrou 86% de identidade com o TAHRE de *Drosophila melanogaster*. O clone 8 apresentou 94% de identidade com o Kiri de *Aedes aegypti*; clone 90% de identidade com o retrotransposon PERERE2_SMED de platyhelminthes. Os dados obtidos com o método dot plot mostraram que as sequências dos clones apresentam um padrão de linhas paralelas a diagonal, caracterizando um padrão de DNA repetitivo (Figura 6).

A hibridação *in situ* utilizando os fragmentos de TEs clonados obtidos de *O. octoguttata* nos cromossomos da própria espécie e de outras do gênero (*O. magniguttis*, *O. personata* e *O. sexnotata*) mostrou marcações dispersas nos cromossomos sexuais e autossomos de todas as espécies (Figura 7).

Discussão

As informações citogenéticas descritas na literatura para 102 espécies pertencentes à subtribo Oedionychina, mostram uma homogeneidade cariotípica. De acordo com os dados, aproximadamente 80% as espécies apresentam $2n=22=20+X+Y$, cromossomos sexuais gigantes assinápticos.

As variações observadas referem-se a alterações na morfologia dos autossomos, podendo ocorrer cariótipos com predominância de metacêntricos ou acrocêntricos (SMITH e VIRKKI, 1978; VIRKKI, 1989; PETITPIERRE et al., 1988; VIRKKI e SANTIAGO-BLAY, 1993; ALMEIDA et al., 2006,2009). No entanto, dados obtidos com técnicas mais refinadas como hibridação *in situ*, fluorocromos têm evidenciado que embora o cariótipo seja similar, sua composição é diferente (ALMEIDA et al., 2010; MELLO et al., 2014, artigo I presente trabalho).

Os resultados mostram uma intensa dispersão e propagação de di, tri, tetra nucleotídeos SSRs e de retrotransposons no genoma das quatro espécies de *Omophoita*. Microssatélites foram encontrados em praticamente todos os cromossomos, tanto nos autossomos quanto cromossomos sexuais. Esses resultados também foram observados em outros grupos, como Orthoptera (MILANI E CABRAL-DE-MELLO, 2014), em vertebrados, por exemplo, em lagarto (POKORNA' et al., 2011) e em plantas (KUBAT et al., 2008). A ocorrência desses SSRs é comum nos genomas de eucariotos sendo um dos componentes mais presentes e dinâmicos (ELLEGREN, 2004). No entanto, esse é o primeiro trabalho que utiliza hibridação e

mapeamento com microssatélites em Coleoptera.

O padrão pericentromérico conservado obtido para os autossomos nas quatro espécies do gênero *Omophoita* em relação aos microssatélites (GA)₁₅, (GAC)₁₀, (GATA)₈, (CAT)₁₀, (CA)₁₅ e (CAC)₁₀, é coincidente com as regiões de heterocromatina, obtidas com bandas C em *Omophoita*, e com as regiões de DNAs repetitivos, obtidos com a técnica de C₀t-1 e fluorocromos (ALMEIDA et al., 2009; MELLO et al., 2014).

No que se refere aos cromossomos sexuais (Figura 5) os resultados, mostram uma diversificação de marcações, não sendo observado um padrão conservado entre as quatro espécies para os diferentes SSRs, apenas alguns possuem acúmulos semelhantes entre uma ou outra espécie. O acúmulo da maioria dos SSRs na região pericentromérica e distal nos cromossomos sexuais foi o evento mais frequente de marcações, resultados coincidentes com os dados obtidos com os padrões de Banca C descritos por Almeida et al. (2009) e com os resultados de C₀t1 e fluorocromos descritos por Mello et al. (2014). Esses resultados estão de acordo com outros estudos que afirmam que a heterocromatina constitutiva tem ocorrência variável nos cromossomos sexuais, podendo aparecer somente na região pericentromérica ou ao longo de todo o comprimento cromossômico, de acordo com o grau de diferenciação cromossômica da espécie (ALMEIDA et al., 2000; ROZEK et al., 2004).

Algumas hibridações evidentes foram obtidas com o SSR (GATA)₈, nas quais todos os cromossomos sexuais das quatro espécies foram bem marcados, sendo o cromossomo Y com mais acúmulos. Marcações similares foram observadas em *O. magniguttis* e *O. octoguttata*, porém em *O. personata* e *O. sexnotata* esse mesmo padrão está presente de forma invertida, o que pode ser dado por uma inversão ou acúmulo, levando a um aumento diferencial dos braços. Esse resultado pode evidenciar uma divergência entre espécies bem próximas dentro de um mesmo gênero. O acúmulo de sequências SSRs GATA nos cromossomos sexuais é frequentemente encontrado em espécies com cromossomos sexuais heteromórficos, como vertebrados (JONES e SINGH, 1981), répteis (O'MEALLY et al., 2010) e mamíferos (SUBRAMANIAN, 2003).

Kumar et al. (2013) demonstraram, que os SSRs GATA podem ativar ou bloquear a expressão em células humanas e de *Drosophila*, em domínios funcionais no genoma, apresentando estreita associação com genes reguladores do

desenvolvimento. Segundo os autores, isso poderia explicar porque os SSRs, especialmente o GATA, pode ter se acumulado em grande parte do genoma das espécies. Desta forma, reforçando a ideia de que os DNAs repetitivos não são DNA lixo, podendo constituir elementos funcionais relevantes do complexo dos genomas.

Os resultados coincidentes de dispersão entre os SSRs (GA)₁₅, (CAC)₁₀, (CA)₁₅ e os clones obtendo os fragmentos de TEs evidencia uma associação entre esses DNAs repetitivos e alta dispersão destes no genoma das espécies. Essa associação encontrada reforça a ideia de uma dispersão conjunta. Segundo Kejnovsky et al. (2013) os TEs e os SSRs são altamente relacionados, assim o mais provável é que essa dispersão possa estar relacionada à TEs, os quais podem estar carreando ou movimentando as sequências SSRs por inserções em regiões em tandem, o que de uma maneira geral pode estar levando a dispersão diferente no genoma dessas espécies.

Os resultados observados com o SSR (GAA)₁₀ foram mais variáveis, mostrando marcações na região pericentromérica de autossomos ou acúmulos nos cromossomos sexuais. Essa grande diferença de marcações poderia também ser explicada pela presença de outros TEs, diferentes daqueles encontrados neste trabalho.

Expansão é uma propriedade geral da maioria dos microssatélites, mas seus mecanismos estão bem longe de serem completamente compreendidos. Um dos modelos bem estabelecidos da expansão de microssatélites envolve o deslizamento de replicação (ELLEGREN, 2004), ou interferência dos TEs, através da associação dos SSRs com esses elementos (ARCOT et al., 1995; RAMSAY et al., 1999; KELKAR et al., 2011).

A possível origem dos cromossomos sexuais é a partir de um par de autossomos (OHNO, 1967), com perda de homologia, especialização em função do sexo, e redução do crossing-over, deixando-os geneticamente heterogêneos. Essa falta de sinapse e recombinação possibilita o acúmulo de diversos tipos de elementos repetitivos como SSRs, TEs entre outros nesses cromossomos. Acredita-se esse processo ocorreu com o cromossomo y da planta *Silene latifolia* (RICE, 1984; CHARLESWORTH, 2002; CHARLESWORTH et al., 2005; KEJNOVSKY, 2009). Nesse sentido, esse processo de expansão e associação com TEs poderia estar relacionada com a origem e diferenciação dos cromossomos sexuais em *Omophoita*, resultando em perda total de sinapse e homologia. Assim, comparações

com outras espécies de outros gêneros relacionados com ou sem cromossomos sexuais gigantes poderiam ajudar no entendimento de processos evolutivos deste grupo.

Nesse sentido, eventos como esses poderiam estar envolvidos na evolução dos cromossomos sexuais gigantes presente nessas espécies e possivelmente em outras espécies da subtribo *Oedionychina*. Desta forma, pode-se inferir, que o acúmulo e dispersão de SSRs ao longo do tempo, nas quatro espécies e sua possível associação a TEs e outros DNAs repetitivos, provavelmente influenciaram no tamanho e, conseqüentemente, a evolução dos cromossomos sexuais gigantes em *Omophoita* (*Oedionychina*).

Agradecimentos

Este estudo foi apoiado pela Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq. Os autores são gratos ao especialista Carlos Campaner por sua ajuda na identificação das espécies.

Referências Bibliográficas

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

Tabela 1 – Localização cromossômica dos sinais de hibridação e acúmulo dos SSRs, nos cromossomos sexuais de *Omophoita magniguttis*, *Omophoita octoguttata*, *Omophoita personata* e *Omophoita sexnotata*. Marcações: Dispersas (D), pericentroméricas (P), Intersticial braço menor (Ip), Intersticial braço maior (Iq), Distal braço menor (Dp) e Distal braço maior (Dq).

Espécies	<i>O. magniguttis</i>						<i>O. octoguttata</i>						<i>O. personata</i>						<i>O. sexnotata</i>						
		D	P	I _p	I _q	D _p	D _q	D	P	I _p	I _q	D _p	D _q	D	P	I _p	I _q	D _p	D _q	D	P	I _p	I _q	D _p	D _q
(CA) ₁₅	X	+	+			+	+		+		+	+	+	+	+			+	+	+	+			+	+
	Y		+	+	+	+	+			+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
(CAT) ₁₀	X		+		+				+			+	+		+			+	+		+	+	+	+	
	Y		+	+	+	+	+			+	+		+		+			+			+				+
(GAC) ₁₀	X			+	+	+	+		+		+				+			+	+	+	+		+		+
	Y		+		+		+		+	+	+	+	+		+	+					+				+
(CAC) ₁₀	X		+	+		+	+		+			+	+	+	+			+	+	+	+			+	+
	Y		+	+	+							+		+		+	+	+	+	+	+	+		+	+
(GAA) ₁₀	X								+			+	+											+	+
	Y								+	+		+	+												
(GATA) ₈	X		+			+	+		+			+	+		+				+		+		+	+	+
	Y				+	+	+				+	+	+		+	+	+	+	+			+		+	+
(GA) ₁₅	X	+	+					+	+							+	+	+	+		+			+	+
	Y	+		+	+	+			+	+	+	+	+			+	+		+		+			+	+

Fonte: O autor

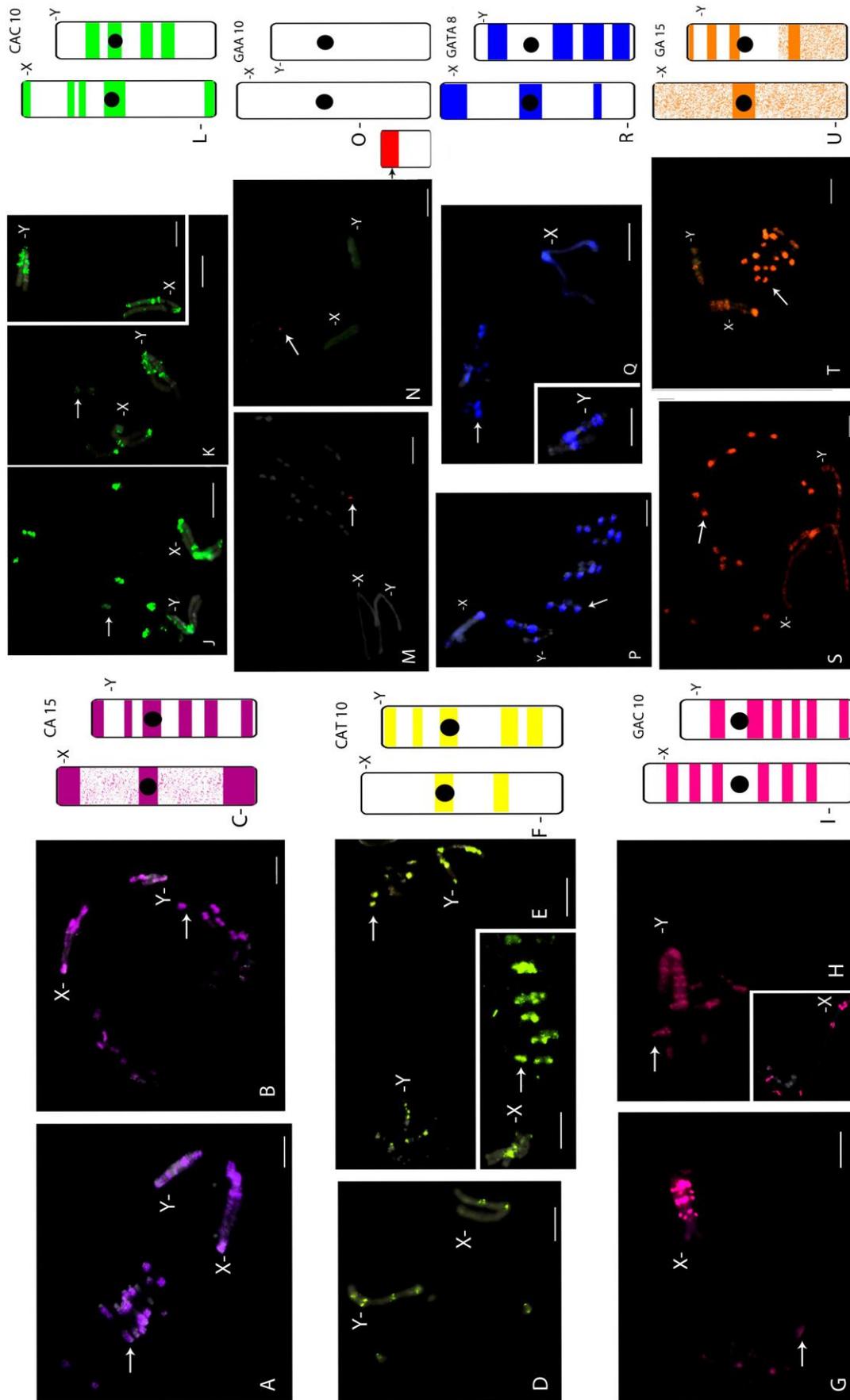


Figura 1. Células meióticas de *Omophoita magniguttis* submetidas à FISH com sondas SSRs: **A e B** = CA₁₅; **D e E** = CAT₁₀; **G e H** = GAC₁₀; **J e K** = CAC₁₀; **M e N** = GAA₁₀; **P e Q** = GATA₈; **S e T** = GA₁₅. A direita Idiograma dos cromossomos sexuais e autossomos com os respectivos microssatélites (C, F, I, L, O, R e U). Setas = sinais positivos nos autossomos. Box = cromossomos de outra célula, ● = centrômero. Barra= 10 µm.

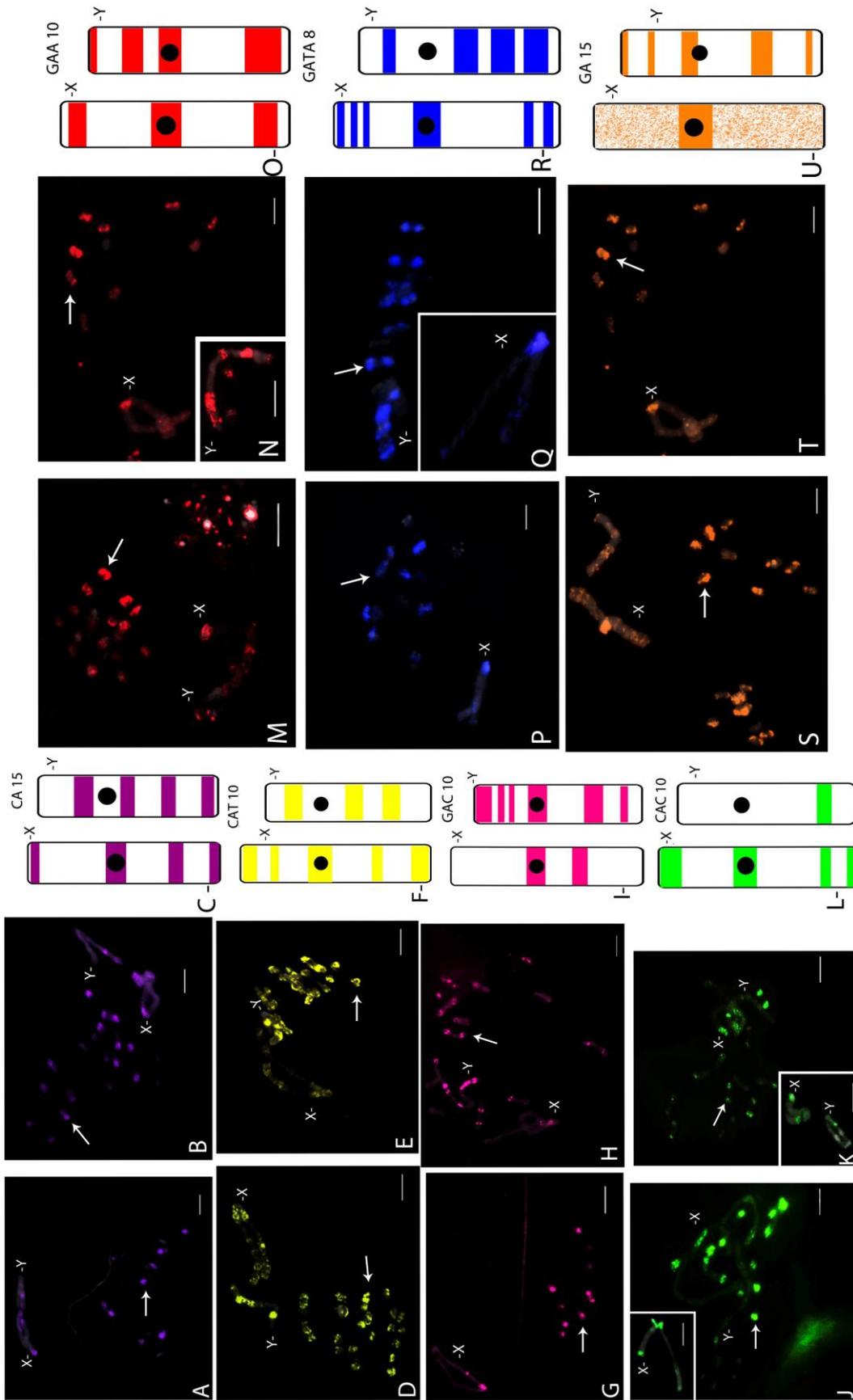


Figura 2. Células meióticas de *O. octoguttata* submetidas à FISH com sondas SSRs: **A e B** = CA₁₅; **D e E** = CAT₁₀; **G e H** = GAC₁₀; **J e K** = CAC₁₀; **M e N** = GAA₁₀; **P e Q** = GATA₈; **S e T** = GA₁₅. À direita Ideogramas dos cromossomos X e Y com os respectivos microsatélites (C, F, I, L, O, R e U). Setas = sinais positivos nos autossomos. Box = cromossomos sexuais (X e Y) de outra célula. ● = centrômero. Barra = 10 μm.

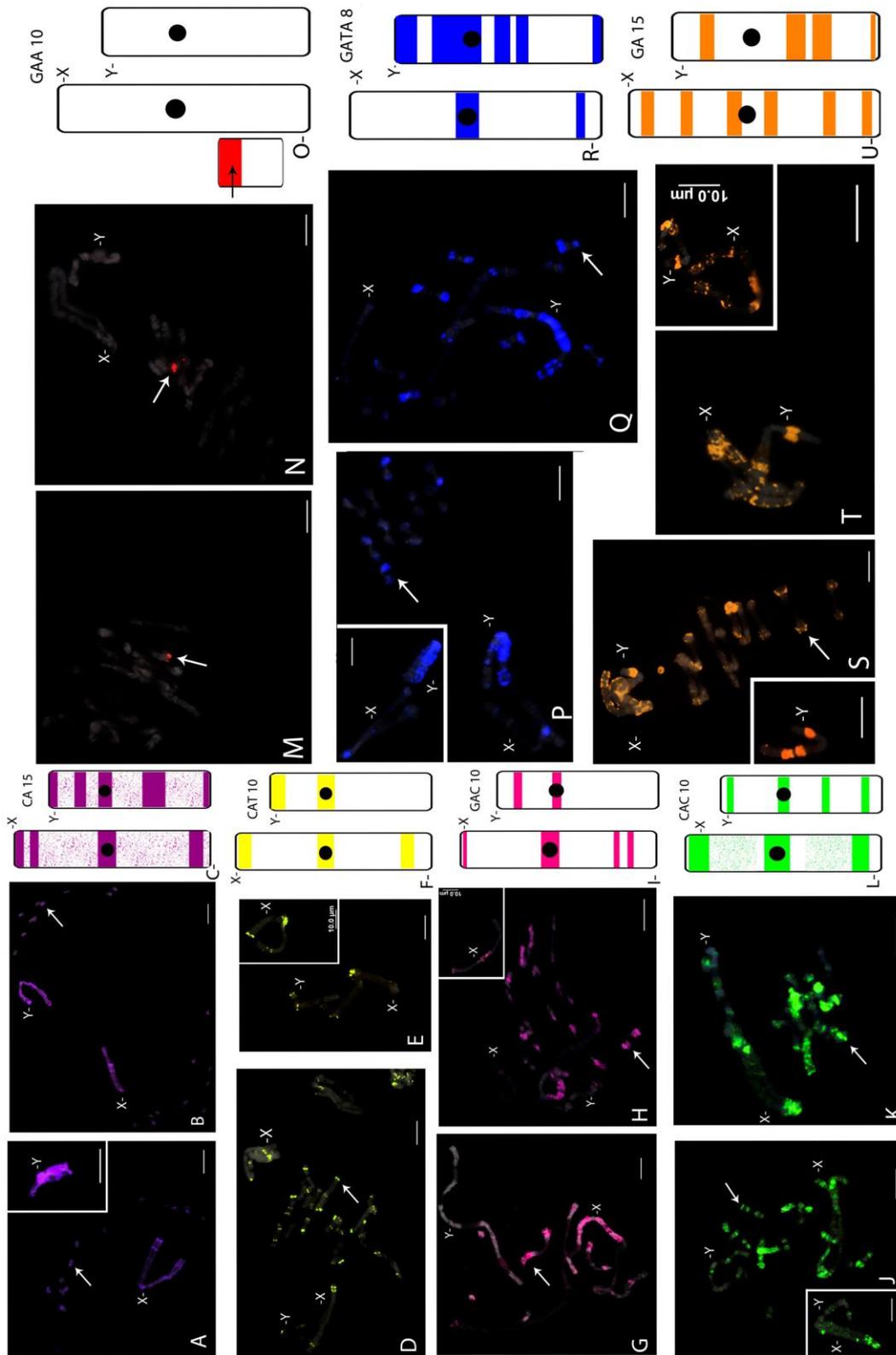


Figura 3. Células meióticas de *O. personata* submetidos à FISH com sondas SSRs: **A e B** = CA₁₅; **D e E** = CAT₁₀; **G e H** = GAC₁₀; **J e K** = CAC₁₀; **M e N** = GAA₁₀; **P e Q** = GATA₈; **S e T** = GA₁₅. À direita Idiograma correspondem aos cromossomos sexuais e autossomos (C, F, I, L, O, R e U). Setas = sinais positivos nos autossomos. Box = cromossomos sexuais (X e Y) de outra célula, ● = centrômero. Barra = 10 µm.

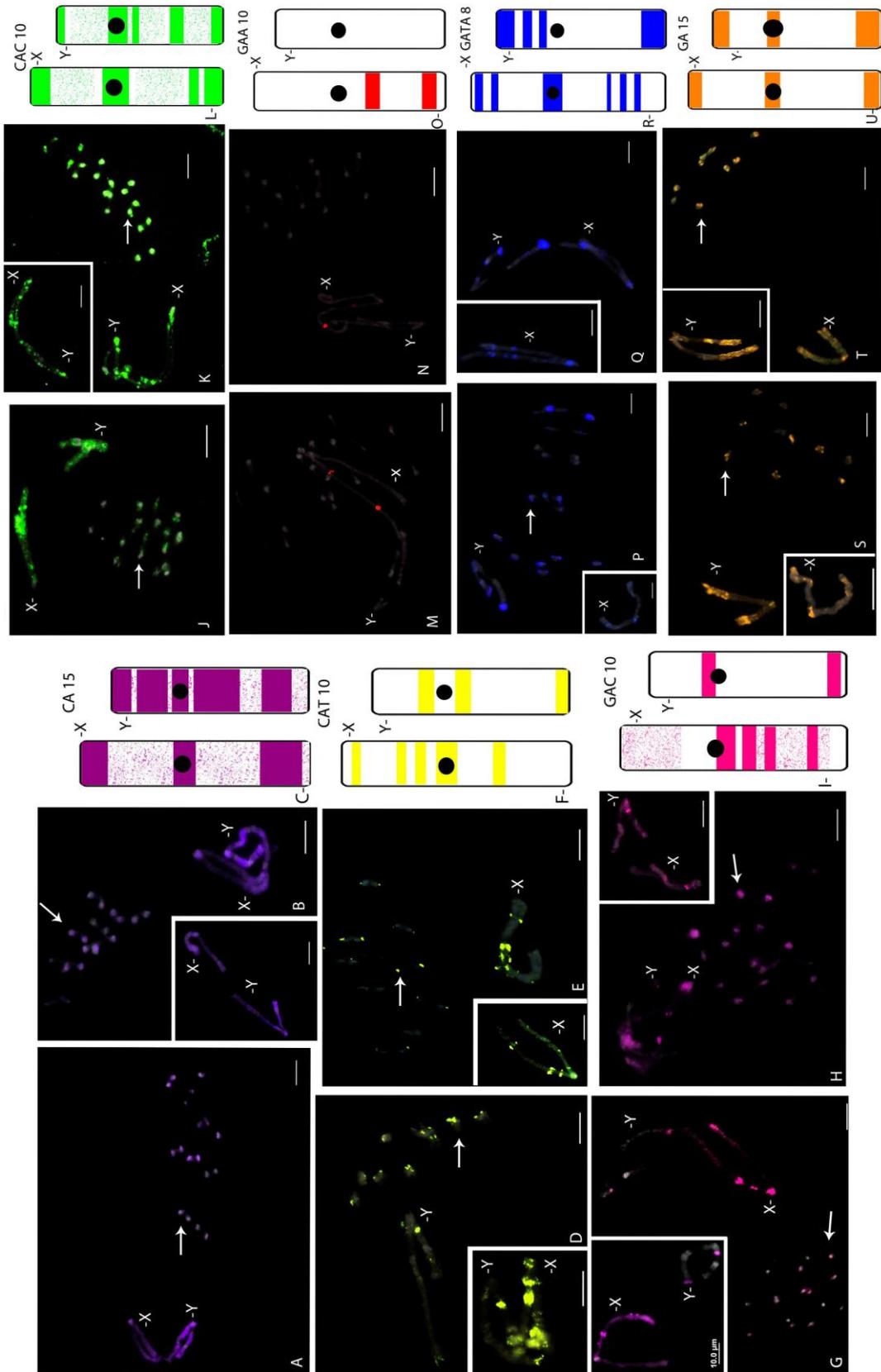


Figura 4. Células meióticas de *O. sexnotata* submetidas à FISH com sondas SSRs: **A e B** = CA₁₅; **D e E** = CAT₁₀; **G e H** = GAC₁₀; **J e K** = CAC₁₀; **M e N** = GAA₁₀; **P e Q** = GATA₈; **S e T** = GA₁₅. À direita Idiograma correspondem aos cromossomos sexuais (C, F, I, L, O, R e U). Setas = sinais positivos nos autossomos. Box = cromossomos sexuais (X e Y) de outra célula, ● = centrômero. Barra = 10 µm.

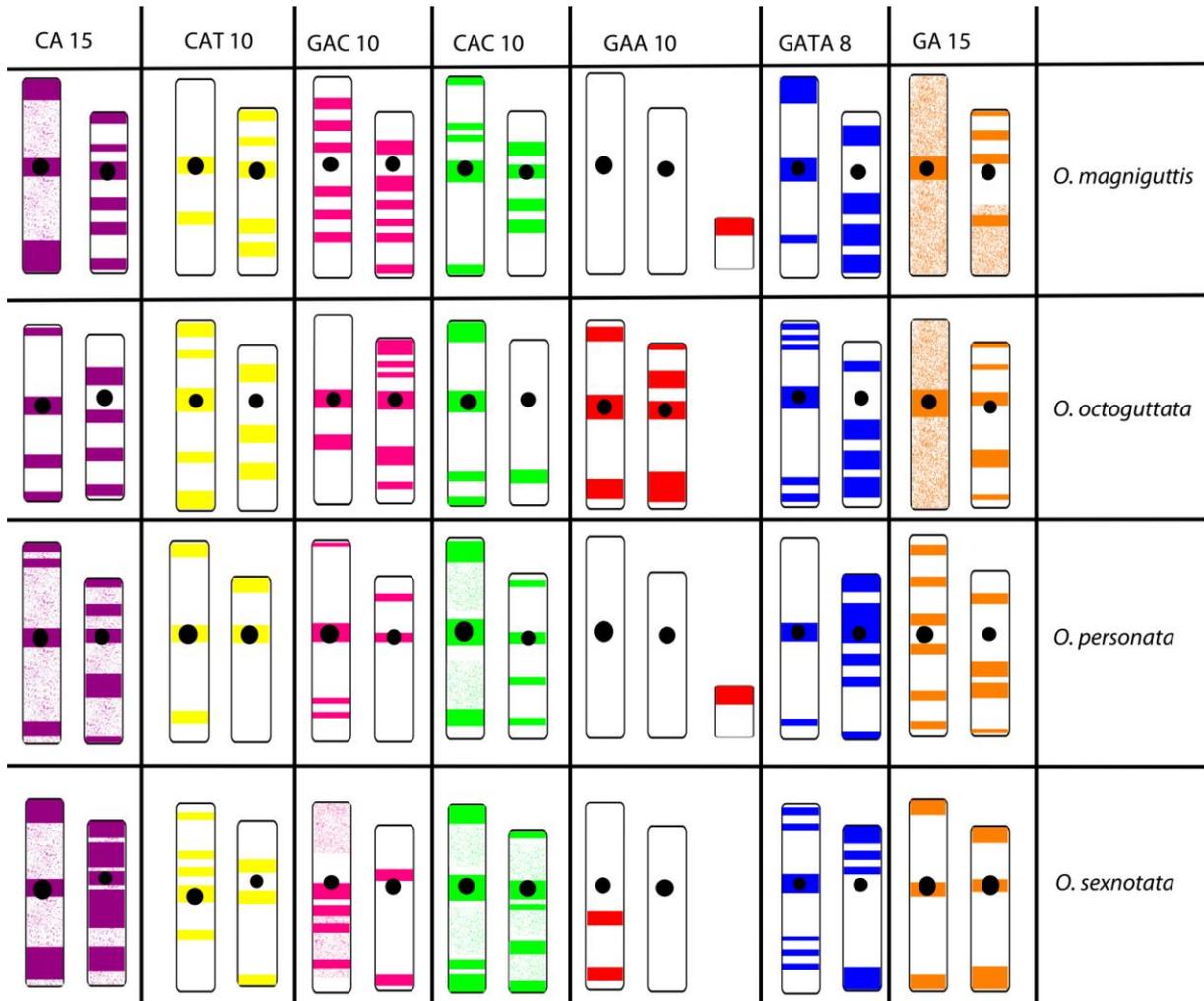


Figura 5 - Idiogramas dos cromossomos sexuais e autossomos hibridados com as respectivas sondas SSRs nas espécies *Omophoita magniguttis*, *Omophoita octoguttata*, *Omophoita personata*, *Omophoita sexnotata*, representando os diferentes padrões de acúmulo dos microssatélites nesses cromossomos. ● = centrômero

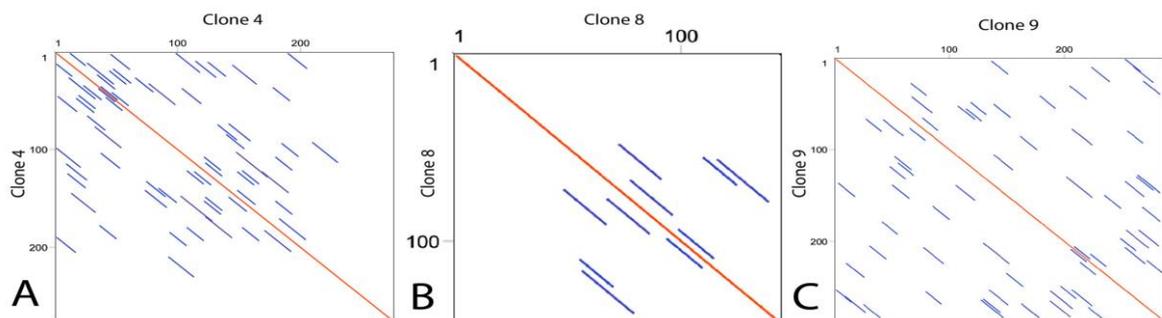


Figura 6 -Análise dos clones através do método dot plot. **A.** sequência do clone 4, **B.** sequência do clone 8, **C.** sequência do clone 9, traços diagonais paralelos representam grau de repetitividade.

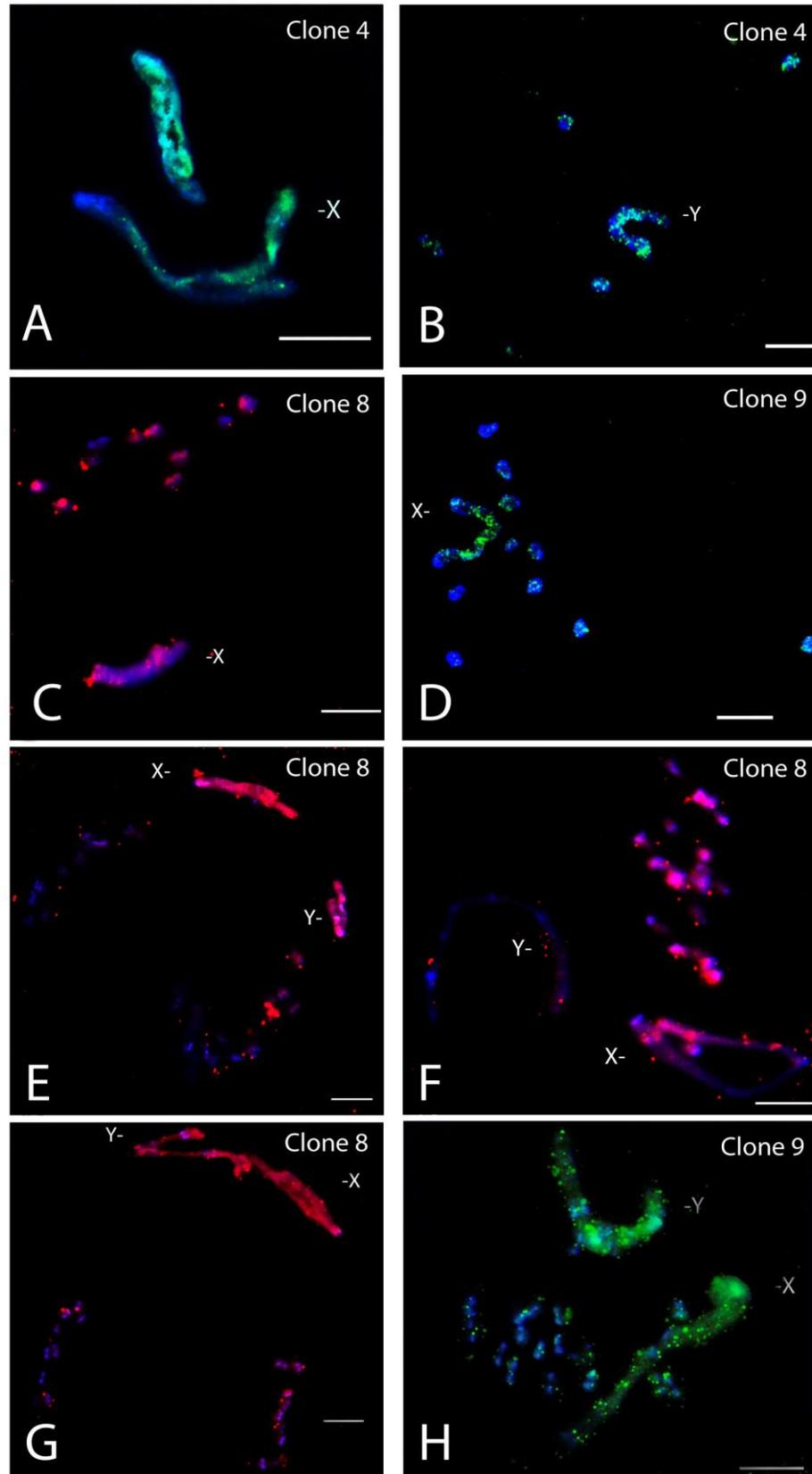


Figura 7. Células testiculares das espécies de *Omophoita* submetidas à FISH com sondas dos fragmentos dos retrotransposons clonados; clones 4, 8 e 9 obtidos de *O. octoguttata*. **A – D** células de *O. octoguttata*; **E** células *O. magniguttis*; **F** células de *O. personata*; **G – H** células de *O. sexnotata*. Barra = 10 μ m.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho foi analisado ao nível citogenético molecular, espécies do gênero *Omophoita*, contribuindo para os estudos da evolução cromossômica da subfamília Alticinae (Chrysomelidae), além de fornecer informações sobre dados citogenéticos moleculares escassos na literatura para Coleoptera.

Nos estudos comparativos da heterocromatina para estas espécies, foi mostrado que a mesma em grande parte é composta por DNA repetitivo compartilhada entre as espécies, hibridações cruzadas produziram um padrão nas regiões pericentroméricas. Com isso pode se dizer que grande parte do genoma é compartilhado entre as espécies de *Omophoita*, mostrando que as regiões conservadas de sequências repetitivas são distribuídas ao longo dos cromossomos sexuais e autossomos.

Para os cromossomos sexuais foram obtidas diferenças na localização, composição e hibridação do C_0t-1 , podendo indicar diferenciação da heterocromatina entre tais cromossomos nas espécies de *Omophoita*. Além disso, diferentes tipos de DNA repetitivo podem estar diretamente ligados à heterocromatinização e rearranjo dos cromossomos sexuais gigantes.

Com o estudo do mapeamento de sequências SSRs, obteve-se um resultado semelhante em alguns pontos com o mostrado pelo C_0t-1 , mas as diferenças mostradas nas hibridações com sondas SSRs foram bem mais expressivas, não mostrando um padrão geral de marcações entre as espécies, somente algumas regiões mais frequentemente marcadas como as regiões pericentroméricas.

Levando-se em consideração todos os resultados obtidos e comparando-os com outros trabalhos, pode se entender que eventos de rearranjos ligados a DNAs repetitivos poderiam estar envolvidos na evolução dos cromossomos sexuais gigantes na subtribo. Acúmulo e dispersão de SSRs ao longo do tempo e sua possível associação a TEs e outros DNAs repetitivos, podem favorecer rearranjos cromossômicos, provavelmente influenciando o tamanho e, conseqüentemente, a evolução dos cromossomos sexuais gigantes em *Omophoita*.

Estudos com sequências repetitivas se mostram promissoras para estudos evolutivos em geral, mais estudos moleculares envolvendo principalmente DNAs

repetitivos, como os TEs, com toda sua plasticidade, podem ser a chave para novas pesquisas e descobertas importantes no que diz respeito diversidade e evolução de uma maneira geral, como em Coleoptera onde os estudos são bem escassos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALMEIDA M.C. Estudos citogenéticos em 14 espécies de Alticinae (Coleoptera, Polyphaga, Chrysomelidae): heterocromatina constitutiva e regiões organizadoras de nucléolo. 2001. 84 f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, 2001.

ALMEIDA, M.C; CAMPANER, C.; CELLA, D.M. Karyotype characterization, constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions of *Paranaita opima* (Coleoptera, Chrysomelidae, Alticinae). **Genet Mol Biol** 29:475-481, 2006.

ALMEIDA, M.C.; CAMPANER, C; CELLA, D. M. Cytogenetics of four *Omophoita* species (Coleoptera, Chrysomelidae, Alticinae): A comparative analysis using mitotic and meiotic cells submitted to the standard staining and C-banding technique. **Micron** 40:586–596, 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** 41:729-34, 2010. doi:10.1016/j.micron.2010.06.008.

ARCOT, S.S.; WANG, Z.; WEBER, J.L.; DEININGER, P.L, BATZER, M.A. Alu repeats: A source for the genesis of primate microsatellites. **Genomics** 29:136–144,1995.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.**, v.215, p. 403-410, 1990.

ARNETT, R.H.; THOMAS, M.C.; SKELLEY, P.E.; FRANK, J.J. American Beetles. Polyphaga: Scarabaeoidea through Curculionoidea. **vol II. CRC Press, Boca Raton, CA**, 2002.

BADAEVA, E.D.; DEDKOVA, O.S.; GAY, G.; PUKHALSKYI, V.A.; ZELENIN, A.V.; BERBARD, S.; BERBARD, M. Chromosomal rearrangements in wheat: their types and distribution. **Genome**. 50:907–926, 2007. doi: 10.1139/G07-072.

BÉTHOUX, O. "The earliest beetle identified". **Journal of Paleontology** 83: 931–937. doi:10.1666/08-158.1, 2009.

BIONE, E.; CAMPAROTO, M.L.; SIMÕES, Z.L.P. A study of the constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions of *Isocopris inhiata* and *Diabrostis mimas* (Coleoptera: Scarabaeidae, Scarabaeinae) using C-banding, AgNO₃ staining and FISH techniques. **Genet Mol Biol** 28:111–116, 2005a.

BIONE, E.; MOURA, R.C.; CARVALHO, R.; SOUZA, M.J. Karyotype, C- and fluorescence banding pattern, NOR location and FISH study of five Scarabaeidae (Coleoptera) species. **Genet Mol Biol** 28:376–381, 2005b.

BORROR, D.J., DeLONG, D.M. Introdução ao estudo dos insetos. São Paulo: **Edgard Blücher Ltda**, 1988.

BRELIH, S.; DÖBERL, M.; DROVENIK, B.; PIRNAT, A. Gradivo za favno hroščev (Coleoptera) Slovenije. Prispevek. Polyphaga: Chrysomeloidea (Phytophaga): Chrysomelidae: Alticinae. Materialien zur Käferfauna (Coleoptera) Beitrag: Polyphaga: Chrysomeloidea (Phytophaga): Chrysomelidae: Alticinae. Slovenian: **Scopolia**. 50:1–279, 2003.

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** 104:393-400, 2010. doi: 10.1007/s10709-011-9551-7.

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. **Cytogenet Gen Res** 134:127–135, 2011a. doi:10.1159/000326803.

CABRAL-DE-MELLO, D.C.; MOURA, R.C.; MELO, A.S.; MARTINS, C. Evolutionary dynamics of heterochromatin in the genome of *Dichotomius* beetles based on chromosomal analysis. **Genetica** 139: 315–325, 2011b. doi:10.1007/s10709-011-9551-7.

CÁCERES, M.; RANZ, J.M.; BARBADILLA, A.; LONG, M.; RUIZ, A. Generation of a widespread *Drosophila* inversion by a transposable element. **Science** 285: 415–418. 1999.

CAPINERA, J.L. Capinera Encyclopedia of Entomology (second ed.), vols. 1–4 The Netherlands. **Springer Dordrecht** pp. 4346, 2008.

CHARLESWORTH, B.; SNLEGOWSKI, P.; STEPHAN, W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature** 371:215-220, 1994.

CHARLESWORTH, B. The evolution of chromosomal sex determination. In Genetics and Biology of Sex Determination. Edited by: Novartis Foundation. **John Wiley and**

sons Ltd 207-224, 2002.

CHARLESWORTH, D.; CHARLESWORTH, B.; MARAIS, G. Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes. **Heredity**, 95:118–128, 2005. doi: 10.1038/sj.hdy.6800697

CHEN, J. M.; COOPER, D. N.; FEREC, C.; KEHRER-SAWATZKI, H.; PATRINOS, G. P. Genomic rearrangements in inherited disease and cancer. **Semin. Cancer Biol.** 20: 222–233, 2010.

COLOMBA, M.S.; MONTERESINO, E.; VITTURI, R.; ZUNINO, M. Characterization of mitotic chromosomes of the scarab beetles *Glyphoderus sterquilinus* (Westwood) and *Bubas bison* (L.) (Coleoptera: Scarabaeidae) using conventional and banding techniques. **Biol Zent BI** 115:58-70, 1996.

COLOMBA, M.S.; VITTURI, R.; ZUNINO, M. Karyotype analysis, banding, and fluorescent *in situ* hybridization in the Scarab beetle *Gymnopleurus sturni* McLeady (Coleoptera, Scarabaeoidea, Scarabaeidae). **J Hered** 31:260-264, 2000a.

COLOMBA, M.S.; VITTURI, R.; ZUNINO, M. Chromosome analysis and rDNA FISH in the stag beetle *Dorcus parallelipipedus* L. (Coleoptera, Scarabaeoidea, Lucanidae). **Hereditas** 133:249-253, 2000b.

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

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

COSTA, C.; VANIN, S.A.; CASARI-CHEN, S.A. Larvas de Coleoptera do Brasil. Museo de Zoologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 1988.

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: julho. 2014.

COSTA, J. N. M.; SALLET, L. A. P.; SOUZA, F. F.; GAMA, F. C.; TEIXEIRA, C. A. D. Crisomelídeos associados às culturas do feijão comum (*Phaseolus vulgaris* (L.) e melancia (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum & Nakail) em Rondônia. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Rondonia ISSN** 42: p. 13, 2006.

CUADRADO, A.; JOUVE, N. The nonrandom distribution of long clusters of all possible classes of trinucleotide repeats in barley chromosomes. **Chromosome Res** 15:711–720,2007.

DE LA RÚA, P.; SERRANO, J.; HEWITT, G.M.; GALIÁN, J. Physical mapping of rDNA genes in the ground beetle *Carabus* and related genera (Carabidae: Coleoptera). **J Zool Syst Evol Res** 34:95-101, 1996.

DEL-CLARO, K. Comportamento Animal - Uma introdução à ecologia comportamental. Jundiaí SP: Distribuidora / Editora - **Livraria Conceito**, 2004.

DOSDALL, L. M.; MASON, P. G. Key pests and parasitoids of oilseed rape or canola in North America and the importance of parasitoids in integrated management. In: Williams IH, editor. Biocontrol-based integrated management of oilseed rape pests. **Dordrecht: Springer** p. 167–213, 2010.

DRUMMOND, A. J.; ASHTON, B.; CHEUNG, M.; HELED, J.; KEARSE, M.; MOIR, R.; STONES-HAVAS, S.; THIERER, T.; WILSON, A. **Geneious v4.8**, 2009. Disponível em: <<http://www.geneious.com>.>

ELLEGREN, H. Microsatellites: Simple sequences with complex evolution. **Nature Rev Genet** 5:435–445, 2004. doi: 10.1038/nrg1348

ELDER, J.F.; TURNER, B.J. Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes **Q Rev Biol** 70: 297–320, 1995.

ENNIS, T. J. Chromosome structure in *Chilocorus* (Coleoptera, Coccinellidae). I. Fluorescent and Giemsa banding patterns. **Can J Genet Cytol** 16:651-661, 1974.

FERNÁNDEZ, R.; BARRAGÁN, M. J. L.; BULLEJOS, M, MARCHAL, J.A.; DÍAZ DE LA GUARDIA, R.; SÁNCHEZ, A. New C-band protocol by heat denaturation in the presence of formamide. **Hereditas** 137:145-148, 2002.

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.

FURTH, D.G. Inter-generic differences in the metafemoral apodeme of flea beetles (Chrysomelidae: Alticinae). **Syst. Entomol** 5:263–271, 1980.

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

GARAGNA, S.; MARZILIANO, N.; ZUCCOTTI, M.; SEARLE, J. B.; CAPANNA, E.; REDDI, C. A. Pericentromeric organization at the fusion point of mouse Robertsonian

translocation chromosomes. **Proc Natl Acad Sci USA** 98:171-175, 2001.

GE, D.; GÓMEZ-ZURITA, J.; CHESTERS, D.; YANG, X, VOGLER, A.P. Suprageneric systematics of flea beetles (Chrysomelidae: Alticinae) inferred from multilocus sequence data. **Mol. Phylogenet. Evol** 62: 793-805, 2012.

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

GOLL, L. G.; ARTONI, R. F.; VICARI, M. R.; NOGAROTO, V.; PETITPIERRE, E.; ALMEIDA, M. C. Cytogenetic Analysis of *Lagria villosa* (Coleoptera, Tenebrionidae): Emphasis on the Mechanism of Association of the Xy p Sex Chromosomes. **Cytogenet Genome Res** 139:29-35, 2013.doi: 10.1159/000341674.

GÓMEZ-ZURITA, J.; HUNT, T.; KOPLIKU, F.; VOGLER, A.P. Recalibrated tree of leaf beetles (Chrysomelidae) indicates independent diversification of angiosperms and their insect herbivores. **PLoS ONE** 2: e360, 2008.

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

GULLAN, P.J.; CRANSTON P. The Insects. An Outline of Entomology ,4ed., **Wiley**,p.4 2010.

HAMILTON, M. J.; HONEYCUTT, R. L.; BAKER, R. J. Intragenomic movement, sequence amplification and the concerted evolution in satellite DNA in harvest mice, *Reithrodontomys*: evidence from in situ hybridization. **Chromossoma** 99:321-329, 1990.

HAMILTON, M. J.; HONG, G.; WICHMAN, H. A. Intragenomic movement and concerted evolution of satellite DNA in *Peromyscus*: evidence from *in situ* hybridization. **Cytogenet Cell Genet** 60:40-44, 1992.

JEFFREYS, A.J.; WILSON, V.; THEIN, S.L. (1985). Hypervariable minisatellite regions in human DNA. **Nature**. 314:67-74.

JONES, K.W.; SINGH, L. Conserved repeated DNA sequences in vertebrate sex chromosomes. *Hum Genet* 1981, 58:46-53.

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

JUAN, C.; PONS, J.; PETITPIERRE, E. Localization of tandemly repeated DNA

sequences in beetle chromosomes by fluorescent *in situ* hybridization. **Chromosome Res** 1:167-174, 1993a.

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

KAISER, V.; BACHTROG, D. Evolution of sex chromosomes in Insects. **Annual Review of Genetics**, v.44, p.91-112, 2010.

KEJNOVSKY, E.; HOBZA, R.; CERMAK, T.; KUBAT, Z.; VYSKOT, B. The role of repetitive DNA in structure and evolution of sex chromosomes in plants. **Heredity** 103: 533–541, 2009.

KEJNOVSKY, E.; MICHALOVOVA, M.; STEFLOVA, P.; KEJNOVSKA, I.; MANZANO, S.; HOBZA, R.; KUBAT, Z.; KOVARIK, J.; JAMILENA, M.; VYSKOT, B. Expansion of microsatellites on evolutionary young Y chromosome. **PLoS One** 8:e45519, 2013.

KELKAR, Y.D.; ECKERT, K. A.; CHIAROMONTE, F.; MAKOVA, K.D. A matter of life or death: How microsatellites emerge in and vanish from the human genome. **Genome Res** 21: 2038–2048, 2011.

KOHANY, O.; GENTLES, A. J.; HANKUS, L.; JURKA, J. Annotation, submission and screening of repetitive elements in Repbase: RepbaseSubmitter and Censor. **BMC Bioinformatics**, Oct v. 25, p.7-474, 2006.

KUBAT, Z.; HOBZA, R.; VYSKOT, B.; KEJNOVSKY, E. Microsatellite accumulation on the Y chromosome in *Silene latifolia*. **Genome** 51:350-356, 2008.

KUMAR, R. P.; KRISHNAN, J.; SINGH, N. P.; SINGH, L.; MISHRA, R. K. GATA simple sequence repeats function as enhancer blocker boundaries. **nature** 4:1844, 2013. DOI: 10.1038/ncomms2872.

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

LECLERCQ, S.; RIVALS, E.; JARNE, P. DNA slippage occurs at microsatellite loci without minimal threshold length in humans: a comparative genomic approach. **Genome Biol Evol.** 2:325–335, 2010.

LI, Y.C.; KOROL, A.B.; FAHIMA, T.; BEILES, A.; NEVO, E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. **Mol Ecol** 11:2453–2465, 2002.

LINZMEIER, A. M.; RIBEIRO-COSTA, C. S.; MARINONI, R. C. Fauna de Altícini (Newman) (Coleoptera, Chrysomelidae, Galerucinae) em diferentes estágios sucessionais na Floresta com Araucária do Paraná, Brasil: diversidade e estimativa de riqueza de espécies. **Rev. Bras. entomol. [online]** vol.50, n.1, pp. 101-109, 2006. <http://dx.doi.org/10.1590/S0085-56262006000100015>.

LORITE, P.; PALOMEQUE, T.; GARNERÍA, I.; PETITPIERRE, E. Characterization and chromosome location of satellite DNA in the leaf beetle *Chrysolina americana* (Coleoptera, Chrysomelidae). **Genetica** 110: 143-150, 2000.

LORITE, P.; PALOMEQUE, T.; GARNERÍA, I. M.; PETITPIERRE, E. Characterization and chromosome location of satellite DNA in the leaf beetle *Chrysolina americana* (Coleoptera, Chrysomelidae). **Genetica** 110:143-150, 2001.

LORITE, P.; CARRILLO, J. A.; GARNERÍA, I.; PETITPIERRE, E.; PALOMEQUE, T. Satellite DNA in the elm leaf beetle, *Xanthogaleruca luteola* (Coleoptera, Chrysomelidae): characterization, interpopulation analysis, and chromosome location. **Cytogenet Genome Res** 98:302-307, 2002.

MAFFEI, E. M. D.; FRAGOSO, D. B.; POMPOLO, S. G.; SERRÃO, J. E. Morphological and cytogenetical studies on the female and male reproductive organs of *Eriopis connexa* Mulsant (Coleoptera, Polyphaga, Coccinellidae). **Neth J Zool** 51:483-496, 2001.

MARCHAL, J. A.; ACOSTA, M. J.; NIETZEL, H.; SPERLING, K.; BULLEJOS, M.; DÍAZ DE LA GUARDIA, R.; SÁNCHEZ, A. X chromosome painting in *Microtus*: origin and evolution of the giant sex chromosomes. **Chromosome Res** 12:767–776, 2004.

MAULIK, S. On the structure of the hind femur in halticine beetles. **Proc. Zool. Soc. London** 2, 305–308, 1929.

MELLO, L. R. A.; TASIOR, D.; GOLL, L. G.; ARTONI, R. F.; VICARI, M. R.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M. C. Physical map of repetitive DNA and karyotype evolution in three species of the genus *Omophoita* (Coleoptera: Alticinae). **Italian Journal of Zoology** 1-9, 2014. DOI: 10.1080/11250003.2014.882995

MILANI, D.; CABRAL-DE-MELLO, D.C. Microsatellite organization in the grasshopper *Abracris flavolineata* (Orthoptera: Acrididae) revealed by FISH mapping: remarkable spreading in the A and B chromosomes. **PLoS One** 9:e97956, 2014.

MODI, W. S. Comparative analyses of heterochromatin in *Microtus*: sequence Heterogeneity and localized expansion and contraction of satellite DNA arrays. **Cytogenet Cell Genet** 62:142-148, 1993.

MOURA, R. C.; SOUZA, M. J.; MELLO, N. F.; LIRA-NETO, A. C. Karyotypic

characterization of representatives from Melolonthinae (Coleoptera: Scarabaeidae): karyotypic analysis, banding and fluorescent *in situ* hybridization (FISH). **Hereditas** 138:200-206, 2003.

MRAVINAC, B.; PLOHL, M. Satellite DNA junctions identify the potential origin of new repetitive elements in the beetle *Tribolium madens*. **Gene** 394:45-52, 2007.

MATSUBARA, K.; TARUI, H.; TORIBA, M.; YAMADA, K.; NISHIDA-UMEHARA, CH.; AGATA, K.; MATSUDA, Y. Evidence for different origin of sex chromosomes in snakes, birds, and mammals and stepwise differentiation of snake sex chromosomes. **Proc Natl Acad Sci USA** 103:18190-18195, 2006.

MURRAY, M. G.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Res** 19:4321-4325, 1980.

OHNO, S. Sex Chromosomes and Sex Linked Genes. Springer- **Verlag: New York**, 1967.

OLIVEIRA, S. G.; CABRAL-DE-MELLO, D. C.; ARCANJO, A. P.; XAVIER, C. SOUZA, M. J.; MARTINS, C.; MOURA, R. C. Heterochromatin, Sex Chromosomes and rRNA Gene Clusters in *Coprophanaeus* Beetles (Coleoptera, Scarabaeidae). **Cytogenet Genome Res** 138:46-55, 2012.doi: 10.1159/000339648.

O'MEALLY, D.; PATEL, H. R.; STIGLEC, R.; SARRE, S. D.; GEORDES, A.; GRAVES, J.; EZAZ, T. Non-homologous sex chromosomes of birds and snakes share repetitive sequences. **Chromosome Res** 18:787-800, 2010.

PALOMEQUE, T.; LÓPEZ, M. M.; CARRILO, J. A.; LORITE, P. Characterization and evolutionary dynamics of a complex family of satellite DNA in the leaf beetle *Chrysolina carnifex* (Coleoptera, Chrysomelidae). **Chromosome Res** 13:795-807, 2005.

PETITPIERRE, E.; SEGARRA, C.; YADAV, J.S.; VIRKKI, N. 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.

PETITPIERRE, E. Molecular cytogenetics and taxonomy of insects, with particular reference to the Coleoptera. **International Journal of Insect Morphology and Embryology**. Vol. 25, n. 1/2, p. 115-133, 1996.

PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proc Natl Acad Sci USA** 83:2934-2938, 1986.

PLOHL, M.; LUCIJANIC-JUSTIC, V.; UGARKOVIC, D.; PETITPIERRE, E.; JUAN, C. Satellite DNA and heterochromatin of the flour beetle *Tribolium confusum*. **Genome** 36:467-475, 1993.

POKORNA', M.; KRATOCHVI', L. L.; KEJNOVSKY', E. Microsatellite distribution on sex chromosomes at different stages of heteromorphism and heterochromatinization in two lizard species (Squamata: Eublepharidae: *Coleonyx elegans* and Lacertidae: *Eremias velox*). **BMC Genetics** 12: 90, 2011.

PONS, J.; BRUVO, B.; JUAN, C.; PETITPIERRE, E.; PLOL, M.; UGARKOVIC, D. Conservation of satellite DNA in species of the genus *Pimelia* (Tenebrionidae, Coleoptera). **Gene** 205:183-190, 1997.

PONS, J.; PETITPIERRE, E.; JUAN, C. Evolutionary dynamics of satellite DNA family PIM357 of the genus *Pimelia* (Tenebrionidae, Coleoptera). **Mol Bio Evol** 19:1329-1340, 2002.

PONS, J. Evolution of diploid chromosome number, sex-determining systems, and heterochromatin in Western Mediterranean and Canarian species of the genus *Pimelia* (Coleoptera: Tenebrionidae). **J Zool Syst Evol Res** 42:81–85, 2004.

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

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

RAMSAY, L.; MACAULAY, M.; CARDIE L.; MORGANTE, M.; DEGLI IVANISSEVICH, S. Intimate association of microsatellite repeats with retrotransposons and other dispersed repetitive elements in barley. **Plant J** 17: 415–425, 1999.

RASKINA, O.; BARBER, J.C.; NEVO, E.; BELYAYEV, 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* (Chrysomeloidea). In: Pakaluk, J., Slipinski, S. (Eds.), *Biology, Phylogeny and Classification of Coleoptera: Papers Celebrating the 80th Birthday of Roy A. Crowson*. **Muzeum i Instytut Zoologii Pan**, Warszawa, pp. 1559–1631, 1995.

RICE, W.R. Sex chromosomes and the evolution of sexual dimorphism. **Evolution** 38:735-742, 1984.

- RILEY, E. G.; CLARK, S. M.; FLOWERS, R.W.; GILBERT, A.J. Family 124. Chrysomelidae. In: Arnett RH, Thomas MC, Skelley PE, Frank JH (Eds.), V.2, American Beetles. Polyphaga: Scarabaeoidea through Curculionoidea. **CRC Press, London**, pp. 617–691, 2002.
- ROZEK, M.; LACHOWSKA, D.; PETITPIERRE, E.; HOLECOVA, M. C-bands on chromosomes of 32 beetle species (Coleoptera: Elateridae, Cantharidae, Oedemeridae, Cerambycidae, Chrysomelidae and Curculionidae). **Hereditas** 140:1–10, 2004.
- SCHNEIDER, M. C.; ALMEIDA, M. C.; ROSA, S. P.; COSTA, C.; CELLA, D. M. Evolutionary chromosomal differentiation among four species of *Conoderus* Eschscholtz, 1829 (Coleoptera, Elateridae, Agrypninae, Conoderini) detected by standard staining, C-banding, silver nitrate impregnation, and CMA3/DA/DAPI staining. **Genetica** 128:333-346, 2006.
- SCHNEIDER, M. C.; ROSA, S. P.; ALMEIDA, M. C.; COSTA, C.; CELLA, D. M. Chromosomal similarities and differences among four Neotropical Elateridae (Conoderini and Pyrophorini) and other related species, with comments on the NOR patterns in Coleoptera. **J Zool Syst Evol Res** 45:308-316, 2007. doi:10.1111/j.1439/0469.2006.00398.x.
- SCHWEIZER, D.; MENDELAK, M.; WHITE, M.; J. D.; CONTRERAS, N. Cytogenetics of the parthenogenetic grasshopper *Warramaba virgo* and its bisexual relatives. X. Pattern of fluorescent banding. **Chromosoma** 88:227–236, 1983.
- SEGARRA, C.; PETITPIERRE, E. Chromosomal survey in three genera of Alticinae (Coleoptera, Chrysomelidae). **Cytobios** 64: 169–174, 1990.
- SEENO, T.N., WILCOX, J.A. Leaf Beetle Genera (Coleoptera: hrysomelidae). pp. 126–156, 1982.
- SERRANO, J. Chromosome numbers and karyotype evolution of Caraboidea. **Genetica**, v.55, p.51-60, 1981.
- SMITH, S.G. The cyto-taxonomy of Coleoptera. **The Canadian Entomologist**, v.82, p.58-68, 1950.
- SMITH, S. G.; VIRKKI, N. Coleoptera. In: John, B. (Ed.), Animal Cytogenetic. Gebru der Borntraeger, **Berlin, Stuttgart**, p. 366pp. 1978.
- SOROKA, J. J.; BARTELT, R.J.; ZILKOWSKI, B.W.; COSSE, A.A. Responses of flea beetle *Phyllotreta cruciferae* to synthetic aggregation pheromone components and host plant volatiles in field trials. **J Chem Ecol** 31: 1829–1843, 2005.

SUBRAMANIAN, S.; MISHRA, R. K.; SINGH, L. Genome-wide analysis of Bkm sequences (GATA repeats): predominant association with sex chromosomes and potential role in higher order chromatin organization and function. **Bioinformatics** 19: 681–685, 2003.

SUMNER, A. T. Chromosomes: organization and function, 1st edn. **Blackwell Publishing company**, London. 2003.

STEINEMANN, S.; STEINEMANN, M. Retroelements: tools for sex chromosome evolution. **Cytogenet and Genome Res**, v. 110, p.134–143, 2005.

TIMBERLAKWE, E. Low repetitive DNA content in *Aspergillus nidulans*. **Science** 202:973- 975, 1978.

TRDAN, S.; VALIC, N.; ŽNIDARCIC, D.; VIDRIH, M.; BERGANT, K.; ZLATIC, E.; MILEVOJ, L. The role of Chinese cabbage as trap crop for flea beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) in production of white cabbage. **Sci Horticult**. 106:12–24, 2005.

UGARKOVIĆ, D.; DURAJLIJA, S.; PLOHL, M. Evolution of *Tribolium madens* (Insecta, Coleoptera) satellite DNA through DNA inversion and insertion. **J Mol Evol** 42:350–358, 1996.

VIRKKI, N. Contraction stage and formation of the distance sex bivalent in *Oedionychina* (Coleoptera, Alticidae). **Hereditas** 71: 259–288, 1972.

VIRKKI, N. Banding of *Oedionychina* (Coleoptera: Alticinae) chromosomes C- and Ag-bands. **J Agric Univ PR** 67:221–255, 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. 1984, p.71-76.

VIRKKI, N. The sex chromosomes of *Disonychina* (Coleoptera, Alticinae): Xy + nX systems. **Cytobios** 53: 43–55, 1988.

VIRKKI, N. Proximal vs. distal collochores in coleopteran chromosomes. **Hereditas** 110: 101–107, 1989.

VIRKKI, N.; MAZZELLA, C.; DENTON, A. Silver staining of the coleopteran Xyp sex bivalent. **Cytobios** 67: 45–63, 1991.

VIRKKI, N.; SANTIAGO-BLA, J. A. Trends of karyotype evolution in Neotropical *Oedionychina* (Coleoptera: Chrysomelidae: Alticinae). **Hereditas** 119: 263–283, 1993.

VITTURI, R.; COLOMBA, M.; VOLPE, N.; LANNINO, A.; ZUNINO, M. Evidence for male X0 sex-chromosome system in *Pentodon bidens punctatum* (Coleoptera Scarabaeoidea: Scarabaeidae) with X-linked 18S-28S clusters. **Genes Genetic Syst** 78:427-432, 2003.

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

WALSH, J.B. Genome Evolution: Overview. **Enciclop. of life sciences**, 2001

WANG, S.; LORENZEN, M. D.; BEEMAN, R. W.; BROWN, S. J. Analysis of repetitive DNA distribution patterns in the *Tribolium castaneum* genome. **Genome Biol** 9:1-14, 2008.doi:10.1186/gb-2008-9-3-r61.

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

WICHMAN, H. A.;VAN DEN BUSSCHE, R. A.; HAMILTON, M. J.; BAKER, R. J. Transposable elements and the evolution of genome organization in mammals. **Genetica** 86:287-293, 1992.

WICKER, T.; SABOT, F.; HUA-VAN, A.; BENNETZEN, J.L.; CAPY, P.; CHALHOUB, B.; FLAVELL, A.; LEROY, P.; MORGANTE, M.; PANAUD, O.; PAUX, E.; SANMIGUEL, P.; SCHULMAN, A.H. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. **Nat Rev Genet** 8:973-982, 2007.

YANG, F, O'BRIEN, P.C.M.; WIENBERG, J.; FERGUSON-SMITH, M.A. A reappraisal of the tandem fusion theory of karyotype evolution in the Indian muntjac using chromosome painting. **Chromosome Res** 5:109-117, 1997.

ZWICK, M. S.; HANSON, R. E.; MCKNIGHT, T. D.; NURUL-ISLAM-FARIDI, M.; STELLY, D. M. A rapid procedure for the isolation of C0t-1 DNA from plants. **Genome** 40:138-142, 1997.

7 ANEXOS

7.1 CITOGENÉTICA CONVENCIONAL

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

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

7.1.2 Técnica de obtenção de Bandas C segundo Fernández et al. (2002)

1. Desnaturar os cromossomos na lâmina em formamida 70% a 70° C por 5 minutos;
2. Incubar lâmina com formamida 50% em tampão 2XSSC (pH 7.3) por uma hora em estufa a 37° C;
3. Incubar a lâmina em tampão 2XSSC (pH 7.3), por 45 minutos, à temperatura de 60°C;
4. Submeter a lâmina à coloração com Iodeto ou Giemsa.

7.1.3 Tripla coloração com o fluorocromo Cromomicina (CMA3), Distamicina (DA) e 4 6-Diamino-fenil-indol (DAPI), segundo Schweizer (1983), com algumas modificações

1. Colocar cerca de 80 µl de solução de cromomicina sobre cada lâmina, cobrir com uma lamínula e deixar por uma hora em temperatura ambiente no escuro;
2. Escorrer a lamínula e lavar a lâmina em tampão McIlvaine em seguida lavar com água e secar levemente;
3. Colocar cerca de 80 µl de solução de distamicina 0,1 mg/ml sobre cada lâmina, cobrir com uma lamínula e deixar por 15 minutos em temperatura ambiente no escuro;

4. Escorrer a lamínula e lavar a lâmina em tampão McIlvaine em seguida lavar com água e secar levemente;
5. Colocar cerca de 80 µl de solução DAPI 0,2 µg/ml sobre cada lâmina, cobrir com uma lamínula e deixar por 15 minutos em temperatura ambiente no escuro;
6. Lavar a lâmina em tampão McIlvain, secar ao ar e cobrir com lamínula em meio de montagem glicerol/ McIlvain. Esperar 3 dias para estabilizar e analisar;
7. Opcional a lâmina pode ser montada com DAPI/Antifading, quando no passo 3 devemos usar 80 µl, retirar o excesso com papel filtro, podendo ser analisada após 15 minutos.

7.2 CITOGENÉTICA MOLECULAR

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

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

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

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

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

Guardar o tampão de extração em temperatura ambiente.

1. Em um tubo de 1,5mL colocar o tecido (cabeça, pronoto e fêmures), 180µL de tampão sem CTAB, 120µL de CTAB 5%, 15µL de proteinase K (10mg/mL) e 5µL de DTT (1M) ou 5µL de B mercaptoetanol.
2. Colocar a 50°C por 10 horas (overnight) ou até que o tecido esteja totalmente digerido;
3. Adicionar 10µL de RNase (10mg/mL);
4. Colocar a 37°C, em banho-Maria, por 2 horas;
5. Adicionar 600µL de clorofórmio;
6. Inverter os tubos suavemente durante 5 minutos;
7. Centrifugar a 8.000 rpm por 5 min a 4°C;
8. Retirar sobrenadante e transferir para um novo tubo;
9. Adicionar 600 µL de etanol 100% gelado e deixar a -20°C por 2 horas;
10. Centrifugar a 14.000 rpm por 15 min a 4°C.

11. Descartar o sobrenadante;
12. Lavar o pellet com 200µL de etanol 70% gelado;
13. Centrifugar por 3 min a 10.000 rpm a 4 °C ;
14. Descartar o sobrenadante;
15. Lavar o pellet com 200 µL de etanol 100% gelado;
16. Centrifugar por 3 min a 10.000 rpm a 4 °C;
17. Descartar o sobrenadante;
18. Deixar secar na estufa a 37°C;
19. Ressuspender em 40µL de água mili-Q ou TE.

7.2.2 Técnica C₀t-1 (DNA enriquecido com seqüências alta e moderadamente repetitivas) Cinética de reassociação do DNA, segundo Zwick et al., 1997

1. Diluir o DNA genômico 100-500 (200-300) ng/µL em 0,3 NaCl;
2. Colocar 200 µL (ou 150) de DNA diluído em tubos de 1,5 mL (com rosca);
3. Autoclavar por 5 minutos a 1.4 atm/120°C, (deixar chegar no verde, colocar no médio e contar 5 min.);
4. Colocar em gelo imediatamente;
5. Aplicar 5 µL do DNA autoclavado em gel de agarose 1%, 90V 30 min, para checar o tamanho dos fragmentos obtidos (ideal 100 a 10000 pb);
6. Desnaturar 3 alíquotas (tubos 0, 1, 5) com 45 µL do DNA autoclavado em banho 95°C por 10 minutos; (ferver no beker no fogo)
7. Passar os tubos para o gelo por 10 segundos, acrescentar 5,5µl de tampão 10x, levar o tubo ao banho maria 65°C por 3 min., em seguida acrescentar 0,2 µl de S1 nuclease e incubar a 37°C por 8 min:

Tubo 0 tratar imediatamente com :

- 5,5 µL de tampão 10X (para vol final de 50 µL)
- 0,15 µL de S1 nuclease
- Incubar a 37°C por 8 minutos;

Tubo 1 colocar em banho maria 65°C por 1 minuto para renaturação; após 1 min

- 5,5 µL de tampão 10X (para vol final de 50 µL)
- 0,15 µL de S1 nuclease
- Incubar a 37°C por 8 minutos;

Tubo 5 colocar em banho maria 65°C por 5 minuto para renaturação; após 5 min

-5,5 µL de tampão 10X (para vol final de 50 µL)

-0,15 µL de S1 nuclease

-Incubar a 37°C por 8 minutos;

Calculo da nuclease S1

1 U : 1 µg DNA

8. Congelar imediatamente em nitrogênio líquido;
9. Adicionar igual volume de fenol/clorofórmio (1:1), misturar os 2 antes;
10. Centrifugar por 5 min a 13000 rpm. Coletar a fase aquosa e passar para um tubo novo;
11. Precipitar o DNA com 1 décimo do volume de acetato de sódio e 2,5 volumes de etanol absoluto gelado;
12. Deixar no freezer a - 75° C por 30 min;
13. Centrifugar por 15 min a 15000 rpm a 4° C. Secar e ressuspender em 12µl de água Mili-Q autoclavada;
14. Checar o DNA em gel de agarose 1%.
15. Após a verificação do DNA em gel de agarose, utilizar 1µl do DNA renaturado para ligar a vetores plasmidais para posterior clonagem

Observação: Ligar a autoclave antes, fechar a tampa no máximo , quando sair o vapor atarraxar a válvula, deixar atingir em 1 atm, marcar 3 min no máximo da autoclave, após 3 min, abrir a valvula até sair o vapor, e coloca gelo até o próximo passo

7.2.3 Clonagem

Transformação

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

Mini preparação Plasmidial

Solução I:

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

Solução II:

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

Solução III:

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

Pré-inóculo: Picar uma colônia bacteriana com um palito autoclavado e fazer o pré-inóculo em 5 ml de LB líquido (adicionar antibiótico de interesse). Deixar cultura a

200 rpm overnight a 37°C.

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

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

Preparação das Lâminas e Hibridação

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

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

Lavagens

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

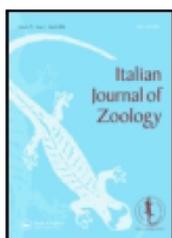
Detecção e amplificação do Sinal

18. Incubar as lâminas em tampão 5% NFDM/4xSSC por 15 minutos;
19. Lavar 2 x 5min com Tween 0,5%/4xSSC, ambiente;
20. Incubar as lâminas com 90 µl de FITC (0,1 µl FITC/100 µl NFDM) durante 30 min em câmara úmida e escura, a temperatura ambiente;
21. Lavar 3 x 5min com Tween 0,5%/4xSSC, ambiente;
22. Incubar com 90 µl de anti-avidina (1 µl anti-avidina/100 µl de NFDM) durante 30 min em câmara úmida e escura, a temperatura ambiente;
23. Lavar 3 x 5min com Tween 0,5%/4xSSC, ambiente;
24. Incubar as lâminas com 90 µl de FITC (0,1 µl FITC/100 µl NFDM) durante 30 min em câmara úmida e escura, a temperatura ambiente.
25. Lavar 3 x 5min com Tween 0,5%/4xSSC, ambiente;
26. Incubar com 90 µl de anti-avidina (1 µl anti-avidina/100 µl de NFDM) durante 30 min em câmara úmida e escura, a temperatura ambiente;
27. Lavar 3 x 5min com Tween 0,5%/4xSSC, ambiente ;
28. Incubar as lâminas com 90 µl de FITC (0,1 µl FITC/100 µl NFDM) durante 30 min em câmara úmida e escura, a temperatura ambiente;
29. Lavar 3 x 5min com Tween 0,5%/4xSSC, ambiente;
30. Desidratar em álcool 70 (descartar), 85 e 100%, 5 min. cada;

Montagem da Lâmina

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

7.3 Artigo publicado no periódico Italian Journal of Zoology em 2014



Italian Journal of Zoology

Publication details, including instructions for authors and subscription information:
<http://www.tandfonline.com/loi/tizo20>

Physical map of repetitive DNA and karyotype evolution in three species of the genus *Omophoita* (Coleoptera: Alticinae)

L. R. A. Mello^a, D. Tasiar^a, L. G. Goll^a, R. F. Artoni^a, M. R. Vicari^a, V. Nogaroto^a & M. C. Almeida^a

^a Setor de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética, Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Biologia Evolutiva, UEPG, Ponta Grossa, Paraná, Brazil

Published online: 12 Feb 2014.

To cite this article: L. R. A. Mello, D. Tasiar, L. G. Goll, R. F. Artoni, M. R. Vicari, V. Nogaroto & M. C. Almeida, Italian Journal of Zoology (2014): Physical map of repetitive DNA and karyotype evolution in three species of the genus *Omophoita* (Coleoptera: Alticinae), Italian Journal of Zoology, DOI: [10.1080/11250003.2014.882995](https://doi.org/10.1080/11250003.2014.882995)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/11250003.2014.882995>