ANÁLISE CITOGENÉTICA EM ESPÉCIES DO GÊNERO *ALAGOASA* (COLEOPTERA, CHRYSOMELIDAE, ALTICINAE)

Raylen Pereira de Ramos (UEPG), Jhon Alex Dziechciarz Vidal, Mara Cristina de Almeida, e-mail: almeidamara@uol.com.br
Universidade Estadual de Ponta Grossa, Departamento de Biologia Molecular, Estrutural e Genética

Ciências Biológicas, Genética.

Palavras-chave: meiose, número diploide, cariótipo.

Resumo
Os estudos citogenéticos mostram grande variação no número diploide e nos tipos de determinação sexual em Alticinae. Nesse grupo os cromossomos sexuais possuem um comportamento com inúmeras irregularidades no emparelhamento, na orientação e na segregação. Além disso, podem ter tamanhos e morfologia diferentes em espécies relacionadas, sugerindo uma formação recente e ainda não estabelecida. O objetivo deste trabalho foi a caracterização cromossômica, a distribuição e o mapeamento das regiões repetitivas (rDNAs) em duas espécies do gênero *Alagoasa* (Alticinae). As preparações citológicas foram realizadas a partir da retirada e maceração das gônadas de adultos e coradas com Giemsa 3%. Os genes ribossomais foram localizados por hibridação *in situ* fluorescente (FISH), utilizando sondas de rDNA 18S e 5S. As espécies estudadas possuem número cromossômico 2n=20=22+X+y, cromossomos sexuais X e y grandes e assinápticos. Os rDNA 18S e 5S são sintênicos e colocalizados para *A. coccineloide* e para *A. florígera*.

Introdução
A família Chrysomelidae agrupa 15 subfamilias (COSTA et al., 1988; GILLOT, 1995, LINGAFELTER, 2001). Dentre essas, a subfamília Alticinae possui o maior número de espécies na Região Neotropical (BORROR & DeLONG, 1988). De todas as 40.000 espécies de Chrysomelidae identificadas taxonomicamente, aproximadamente 290 espécies de Alticinae foram analisadas sob o ponto de vista citogenético (SMITH & VIRKKI, 1978; PETITPIERRE et al., 1988) e destas, apenas 56 são encontradas no Brasil (SMITH & VIRKKI, 1978). Nos Alticinae existe uma grande variação no número diploide e nos tipos de determinação sexual, por exemplo, *Homoschema latitarsum* possui 2n = 6 (2II+neoXY), e por outro lado, *Disonycha bicarinata* possui 2n = 64 (30II+X1Y+X2X3) (VIRKKI, 1988).
Os representantes Alticinae apresentam o comportamento dos cromossomos sexuais com inúmeras irregularidades no emparelhamento, na orientação e na segregação e podem ter tamanhos e morfologia diferentes em espécies relacionadas, sugerindo uma formação recente e ainda não estabelecidas (VIRKKI, 1964). Nas espécies Neotropicais, os cromossomos sexuais são muito maiores em relação aos das outras espécies, principalmente na tribo Oedionychini (VIRKKI, 1968), na qual esses cromossomos são assinápticos e possuem uma orientação atípica, porém com segregação regular.
Schneider et al. (2007) observaram por meio de uma revisão que a maioria das espécies de Coleoptera, possuem as Regiões Organizadoras de Nuclélolo (RON) nos cromossomos autossômicos; com isso, inferem que essa localização em um par

autossômico representa uma condição ancestral para essa ordem (Schneider et al., 2007; Cabral-de-Melo; Moura; Martins, 2010, 2011).
O objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização cromossômica e o mapeamento das regiões repetitivas (rDNAs) em duas espécies do gênero *Alagoasa*.

Material e Métodos
No presente trabalho foram utilizados indivíduos adultos de duas espécies do gênero *Alagoasa,* sendo dois indivíduos de *Alagoasa coccineloide* e quatro de *Alagoasa florigera,* que se encontravam armazenados no laboratório de Genética e Evolução da Instituição. Para o estudo dos cromossomos foram obtidas células a partir de testículos desses indivíduos segundo ALMEIDA, et al. (2000). Os genes de rDNA foram localizados por hibridação *in situ* fluorescente (FISH), segundo PINKEL et al. (1986), utilizando uma sonda de rDNA 18S e 5S, descrita para *Omophoita octoguttata* (Coleoptera). As sondas foram marcadas por meio de uma reação de PCR empregando-se a adenina biotinilada (16 dUTP–biotin-Roche), com posterior detecção pela streptavidina Alexa-fluor (Molecular Probes) para o gene 18S e digoxigenina 11-dUTP (Roche) e detecção por antidigoxigenina rhodamina (Roche) para o gene 5S. Os cromossomos foram contracorados com DAPI montado em uma solução anti-fade.

Resultados e Discussão
O estudo de células metafásicas I evidenciou 2n=22=20+X+y e a fórmula meiótica 2n=10II+X+y, para ambas as espécies estudadas. Na metáfase I de *A. coccineloide* (Figura 1A, 1B e 1C) e de *A. florigera* (Figura 2A, 2B e 2C) observou-se cromossomos sexuais X e y gigantes, sendo o X metacêntrico e o y submetacêntrico. Os cromossomos sexuais em *A. coccineloide* apresentam orientação sintélica e em *A. florigera* a orientação é anfilética. Além disso, nas duas espécies estudadas estes cromossomos são assinápticos durante toda a fase da meiose e apresentam dois bivalentes com segregação precoce. No entanto, a segregação de todos os cromossomos é regular. Os resultados encontrados estão de acordo com os descritos anteriormente por VIRKKI (1964, 1968, 1988) para outras espécies do gênero.
As células meióticas de *A. coccineloide* submetidas a hibridação *in situ* fluorescente com sondas de rDNA 18s e 5S mostraram marcações em um bivalente autossômico e a sobreposição das imagens evidenciou que os cístrons ribossomais são sintênicos e colocalizados (Figuras 1D, 1E e 1F). As células meióticas de *A. florigera* evidenciaram marcação em três bivalentes autossômicos em metáfases I (Figuras 2D e 2E) e a sobreposição das imagens mostra que os cístrons são sintênicos e colocalizados (Figuras 2F).
Os trabalhos realizados em Alticinae evidenciam diferentes resultados para a localização do gene 5S, segundo Gillespie et al. (2006) a dispersão do mesmo tem sido relacionada com elementos transponíveis em vários organismos. A localização dos cínstrons ribossomais nos cromossomos autossômicos estão de acordo com a descrição da literatura apresentada anteriormente.

ISSN 1676-0093

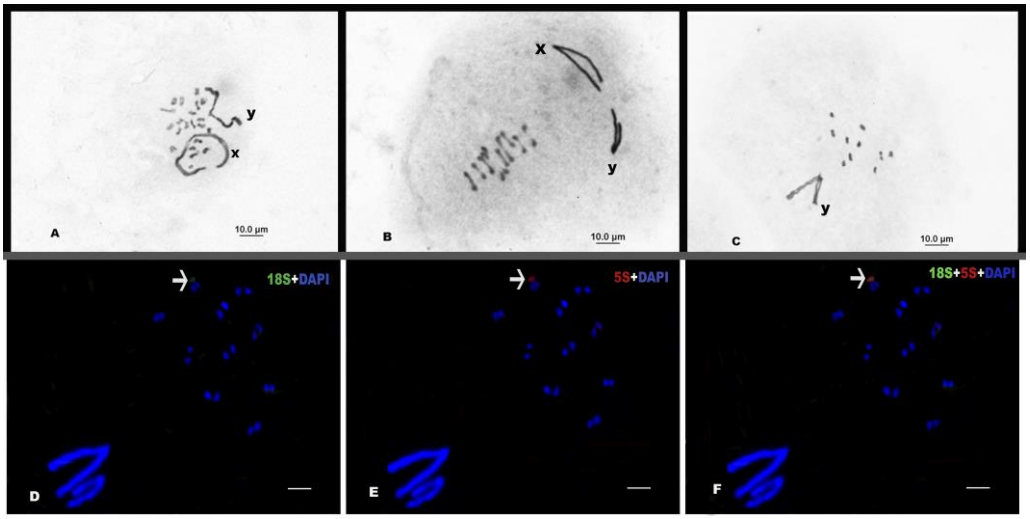


Figura 1 – Células meióticas de *Alagoasa coccineloide* com coração Giemsa (**A-C**). **A.** metáfase espermatogonial com 2n=22= 20+X+y. **B.** metáfase I com 2n=10II+X+y. **C.** metáfase II, com n=10+y. **D., E., F.** Metádase I submetida a FISH com sondas de rDNA 18S (verde) e 5S (vermelho), setas=sítio de hibridação. Barra=10 µm.

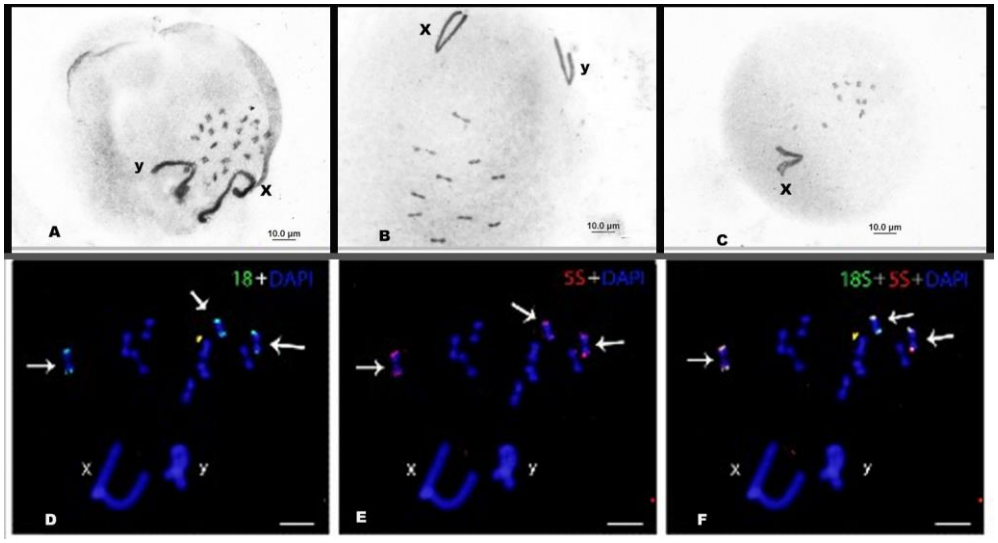


Figura 2 – Células meióticas de *Alagoasa florigera* com coloração Giemsa (**A-C**). **A.** metáfase espermatogonial com 2n=22=20+X+y. **B.** metáfase I com 2n=10II+X+y. **C.** metáfase II, com n=10+y. Metáfasse I submetida FISH com sondas de rDNA 18S (verde) e 5S (vermelho), setas=sítio de hibridação. Barra=10 µm.

Conclusão

Os dados citogenéticos obtidos para *Alagoasa coccineloide* e para *Alagoasa florigera* mostram o número diploide 2n=22=20+X+y e a fórmula meiótica 2n=10II+X+y; o sistema de determinação sexual é X e y, sendo o X metacêntrico e o y submetacêntrico, e estes são assinápticos durante toda a fase da meiose.

A FISH mostrou marcações em um par de cromossomos autossômicos em *A. coccineloide* e em três pares de *A. florigera*.

Agradecimentos

Agradeço a Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), ao Programa de pós-graduação em Biologia Evolutiva e ao Laboratório de Genética e Evolução por fornecerem o espaço utilizado para a realização do presente estudo, assim como agradeço a bolsa de incentivo a pesquisa fornecida pela Universidade Estadual de

Ponta Grossa que foi meu apoio financeiro durante a realização da Iniciação Cientifica.

Referências

ALMEIDA, et al. 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.

BORROR, D.J.; DeLONG, D.M. **Introdução ao estudo dos insetos.** São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda, 1988. 653p.

CABRAL-DE-MELLO, D.C.; MOURA, R.C.; MARTINS A Cytogenetic Mapping of rRNAs and Histone H3 Genes in 14 Species of Dichotomius (Coleoptera, Scarabaeidae, Scarabaeinae) Beetles. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 134, n. 2, p. 127–135, 2011a.

CABRAL-DE-MELLO, D.C.; MOURA, R.C.; MARTINS, C. Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the beetle Dichotomius geminatus provides the first evidence for an association of 5S rRNA and histone H3 genes in insects, and repetitive DNA similarity between the B chromosome and A complement. **Heredity**, v. 104, n. 4, p. 393–400, apr. 2010.

COSTA, C.; VANIN, S.A.; CASARI-CHEN, S.A. **Larvas de Coleoptera de Brasil.** São Paulo: Museu de zoologia (USP), 1988. 447p.

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

GILLOTT, C. **Entomology.** 2º Ed. New York: Plenum Press, 1995. 798p.

LINGAFELTER, S.W. The Chrysomelidae Species Database. Systematic Entomology Laboratory, ARS, USDA. National Museum of Nature History. Disponível em: <http://www2.sil.barc.usda.gov/coleoptera/chrysom/chrysom.htm> Acesso em 12 de agosto de 2001.

PETITPIERRE, E.; SEGARRA, C.; YADAV, J.S.; VIRKKI, N. Cromossome nunbers and meioformulare of Chrysomelidae. *In:* JOLIVET, E.; PETITPIERRE, E.; HSIAO, T.H. **Biology of Chrysomelidae.** Kluwer Academic Publishres, 1988.181-86p.

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

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

SMITH, S.G.; VIRKKI, N. **Aniamal cytogenetics.** v. 3. Berlin: Gebruder Borntraeger, 1978. 366p.

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

VIRKKI, N. On the cytology of some neotropical chrysomelidae (Coleoptera)**.** **Annales Academiae Scientiarum Fennicae.** v. 75. Serie A IV, 1964. 1-24p.

VIRKKI, N. The sex cromosomes of Disonychina (Coleoptera, Alticinae): Xy+nX systems. **Cytobios.** v. 53, 43-55p, 1988.