MAPEAMENTO MOLECULAR DE REGIÕES TELOMÉRICAS EM ESPÉCIES DO GÊNERO *OMOPHOITA* (COLEOPTERA, ALTICINAE)

Bibiana Hax Lemos (PIBIC/UEPG), Lucas R. de A. Mello, Mara Cristina de Almeida Matiello (Orientadora), e-mail: almeidamara@uol.com.br

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética

2.00.00.00-6 Ciências Biológicas
2.02.00.00-5 Genética
2.02.04.00-0 Genética Animal

Palavras-chave: evolução, cromossomos gigantes, Chrysomelidae.

Resumo

Os Alticiniae possuem os cromossomos sexuais com tamanho e comportamento diferente da maioria das espécies. Segundo a literatura, existem duas hipóteses para explicar a origem deste sistema X+y, considerando sua origem polifilética, uma através da incorporação de genes dos cromossomos sexuais em um dos bivalentes autossômicos e outra pela fusão de cromossomos sexuais múltiplos. Porém, mesmo com todas essas mudanças ocorridas nos cromossomos, um número grande de sequências telomérica poderia ter sido mantido. Como, por exemplo, a sequência telomérica TTAGG conservada nos invertebrados. O objetivo central deste trabalho foi caracterizar os cromossomos de espécies do gênero *Omophoita* e mapear regiões telomérica identificando os clusters e propor processos evolutivos que ocorreram no grupo. Os resultados mostram sequencias telomérica conservadas em *Omophoita octoguttata* e *Omophoita sexnotata*. Além disso, uma sequencia intersticial no cromossomo X de *O. octoguttata* foi observada. As espécies *Omophoita personata* e *Omophoita magniguttis* não mostraram marcações evidentes.

Introdução

Os representantes Alticinae apresentam o complemento cromossômico e o comportamento dos cromossomos sexuais diferentes da maioria dos Coleoptera. Os cromossomos sexuais possuem um comportamento 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, 1963, 1964, 1967). 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.

Na opinião de VIRKKI (1983), os diferentes tipos de sistema X+y possuem uma origem polifilética e foram estabelecidos pela aquisição de novos mecanismos de orientação e segregação dos cromossomos sexuais. A origem do sistema de determinação sexual do tipo X+Y, caracterizado por serem de tamanho e morfologia semelhantes, na subtribo Oedionychina, parece ter ocorrido através da incorporação dos genes dos cromossomos sexuais em um dos bivalentes autossômicos ou ser o resultado de fusões de cromossomos sexuais múltiplos (VIRKKI, 1963, 1964, 1967,

1970, 1984; SMITH & VIRKKI, 1978). O sistema X+y é semelhante ao X+Y, porém no primeiro tipo de sistema, os cromossomos sexuais têm tamanhos diferentes. A origem desses sistemas poderia ter sido a partir do sistema neoXY, com posterior perda de homologia entre os cromossomos sexuais, devido a ocorrência de rearranjos cromossômicos diferentes ou, ainda, por aquisição de material de diferentes autossomos (VIRKKI, 1963).
As sequências teloméricas são altamente conservadas em grandes grupos taxonômicos, como o hexâmero (TTAGGG)n nos vertebrados (ZAKIAN, 1995; SAHARA et al., 1999) e a sequência (TTAGG)n amplamente distribuída nos insetos. No entanto, representam um grupo heterogêneo quanto à organização telomérica, (OKAZAKI, et al. 1993; SAHARA et al., 1999; VITKOVÁ et al., 2005). Entre os insetos, já foram identificadas algumas espécies com mecanismos de manutenção do telômero independentes da telomerase, tais como aqueles observados em *Drosophila melanogaster* elementos transponíveis HeT-A e TART estão presentes na porção terminal do cromossomo (BIESSMANN et al., 1990). Em Coleoptera, poucas espécies foram analisadas com a técnica de FISH e responderam positivamente a presença do cluster (TTAGG)n. A família Tenebrionidae mostrou a ocorrência de uma sequência alternativa (TCAGG)n (OKAZAKI et al., 1993; SAHARA et al., 1999; FRYDRYCHOVA & MAREC, 2002; MRAVINAC et al., 2011).

Material e Métodos

Para a confecção das lâminas foram utilizados testículos de insetos estocados no Laboratório de Citogenética e Evolução da UEPG ou de exemplares coletados nos municípios de Itaiacoca (S 25°07’20” e W 49°56’04”), entre os meses de outubro e dezembro de 2016.

As preparações citológicas para o estudo dos cromossomos foram obtidas a partir de testículos de indivíduos adultos de quatro espécies do gênero *Omophoita*: *O. octoguttata*, *O. personata*, *O. magniguttis* e *O. sexonotata*. O animal foi dissecado e o testículo foi posteriormente fixado em Carnoy I.

A hibridação *in situ* fluorescente foi realizada segundo PINKEL et al. (1986). A sonda telomérica foi obtida através de amplificação por PCR (Polymerase Chain Reaction), utilizando os primers Tel F 5’-TAGGTTAGGTTAGGTTAGG e Tel R 5’-AACCTAACCTAACCTAACC para a sequência (TTAGG)n, posteriormente a sonda foi marcada e o sinal de hibridização foi detectado por antidigoxigenina. Os cromossomos foram contracorados com DAPI (0.2mg/ml) em uma solução anti-fade. Posteriormente foram fotografados em um microscópio de epifluorescência utilizando filtros específicos e o software de DP controller.

Resultados e Discussão

A análise citogenética nas quatro espécies do gênero *Omophoita* mostraram o número diploide 2n=22 cromossomos, o sistema XY, com sexuais gigantes. Estes dados são concordantes com aqueles descritos por Almeida et al. (2009). A hibridação fluorescente *in situ* com a sequência telomérica (TTAGG)n mostrou marcações positivas para a sequência telomérica em duas espécies analisadas. As espécies *O. personata* e *O. magniguttis* não mostraram marcações evidentes.

As células meióticas de *O. octoguttata* e *O. sexnotata* mostraram clusters de sequência telomérica na região terminal de todos os bivalentes autossômicos e dos cromossomos sexuais (Fig. 1). Além disso, o cromossomo X de *O. octoguttata* mostrou uma marcação intersticial proximal em um dos braços (Fig. 1A e 1C). Os

dados obtidos sugerem um cluster intersticial que possivelmente é resultado de uma fusão cromossômica. Essa possibilidade indicaria a origem do sistema gigante por meio de fusão (VIRKKI, 1963, 1964, 1967, 1970, 1984; SMITH & VIRKKI, 1978).

A falta de marcações nos cromossomos de *O. magnigittis* e *O. personata* poderia ser explicada por dois eventos: 1- as espécies podem ter as regiões telomérica alteradas, não sendo iguais as demais, ou 2- poderia ter ocorrido algum problemas durante o processo de hibridação. Sendo assim outras analises deveriam ser utilizadas para comprovar uma das possibilidades.

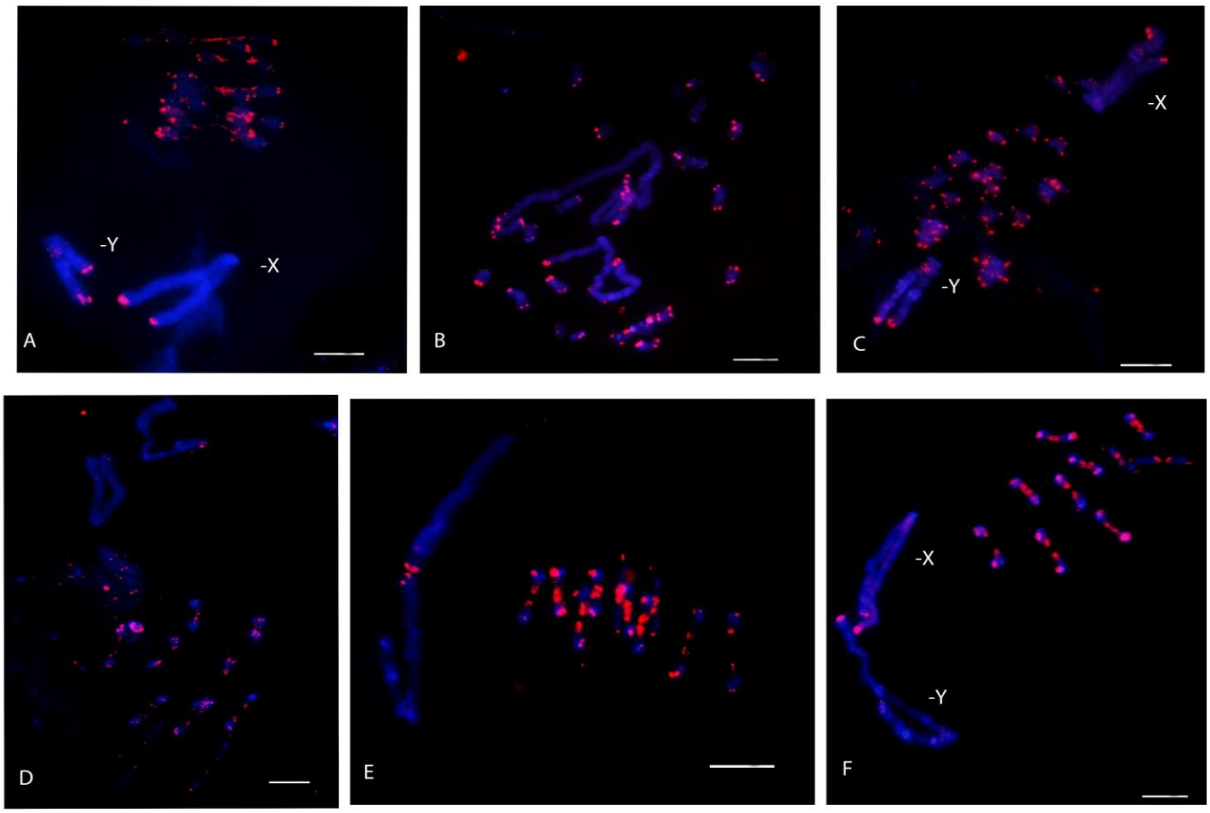


Figura 1. Células meióticas de *O. octoguttata* (A, B e C) e *O. sexnotata* (D, E e F) submetidas à FISH com sonda telomérica (TTAGG)n. X e Y = Cromossomos sexuais, Barra = 10 µm.

Conclusões

Os resultados obtidos mostram a presença da sequência telomérica (TTAGG)n preservada na maioria das espécies analisadas. A sequência intersticial obtida para *Omophoita octoguttata* evidencia uma possível explicação para a origem do sistema de determinação sexual em Alticinae. Este sistema com cromossomos gigantes, possivelmente tem origem por fusão. Análises mais refinadas poderão confirmar essa hipótese.

Agradecimentos

Agradecemos ao CNPq e a Fundação Araucária pelo financiamento do projeto e a UEPG pela concessão da bolsa de Iniciação Cientifica.

Referências

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

OKAZAKI, S.; TSUCHIDA, K.; MAEKAWA, H.; ISHIKAWA, H.; FUJIWARA, H. Identification of a pentanucleotide telomeric sequence, (TTAGG)n, in the silkworm *Bombyx mori* and other insects. *Molecular and Cellular Biology*, v. 13, p. 1424 – 1432, 1993.

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

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

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

VIRKKI, N. Chromosome in evolution of Coleoptera. In: SHARMA, A.K.; SHARMA, A. **Chromosomes in evolution of eukaryotic groups**. Florida: CRC Press, 1984. 259p.

VIRKKI, N. Chromosome number and giant postreductional sex chromosomes in the beetle *Walterianella venusta* Schaufuss (Chrysomelidae, Alticinae). **Journal of Agricultural of University of Puerto Rico**, v.47, p.154-63, 1963.

VIRKKI, N. Futher Chrysomelids with an X+Y sex chromosome system: Megalopodinae. **Hereditas**, v.98, p.209-13, 1983.

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

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

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

VIRKKI, N. Sex chromosomes and karyotypes of the Alticidae (Coleoptera). **Hereditas**, v.64, p.267-82, 1970.

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