# ANÁLISE CITOGENÉTICA MOLECULAR (FISH) EM ALGUMAS ESPÉCIES DE MEGALOPODIDAE (COLEOPTERA)

Jhon Alex Dziechciarz Vidal (PIBIC/CNPq); Matheus Azambuja dos Santos, Lucas Rosolen de Almeida Mello; Mara Cristina de Almeida Matiello (Orientadora), almeidamara@uol.com.br

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

**Ciências Biológicas, Genética.**

**Palavras-chave:** Heterocromatina, rDNA, *Agathomerus.*

## Resumo

Os Megalopodidae são considerados um táxon primitivo dentro da superfamília Chrysomeloidea, por apresentarem algumas características que os assemelham aos Cerambycidae. Esta família possui 28 gêneros e 512 espécies. Citogeneticamente os Megalopodidae são poucos estudados, apenas algumas espécies de *Agathomerus* foram analisadas. Este trabalho buscou caracterizar citogeneticamente três espécies de Megalopodidae, como número cromossômico, determinação sexual, regiões heterocromáticas e localização de genes ribossomais (rDNA) 5s e 18s. Para análise citológica as gônadas foram maceras e coradas com Giemsa 3%, os cromossomos foram submetidos a técnica de obtenção de regiões hetecromáticas (bandas C), a localização dos genes de rDNA foi por meio da hibridação *in situ* fluorescente (FISH). As espécies estudadas possuem número cromossômico 2n= 20+X+y, as marcações de banda C foram prevalentes na região pericentroméricas, e em alguns cromossomos em direção ao braço curto, os genes rDNA 5s e 18s foram sintênicos e colocalizados.

## Introdução

Megalopodidae compreende 28 gêneros e 512 espécies (RODRÍGUEZ-MIRÓN; ZARAGOZA-CABALLERO, 2017) agrupando 3 subfamilias, Palophaginae, Zeugophorinae e Megalopodinae (CHABOO; FLOWERS, 2015). Estas espécies apresentam algumas características que os assemelham ao grupo dos Cerambycidae sendo considerados um táxon primitivo dentro da superfamília Chrysomeloidea, uma das características mais marcante é o órgão estridulatório mesotonal (SEKERKA; VIVES, 2013).

As espécies de Megalopodidae se alimentam de diversas plantas, podendo causar sérios danos, por se alimentarem da seiva, inclusive de espécies cultivadas (AN, 2015; CHABOO; FLOWERS, 2015; PETITPIERRE, 1988; WEBSTER; LESAGE; DEMERCHANT, 2012).

A família do presente estudo é Megalopodinae, eles vivem normalmente em arbustos, voam durante o horário mais quente do dia e se alimentam de diversas plantas, principalmente Solanaceae (JOLIVET; PETITPIERRE; HSIAO, 1988).

De 1.500.000 animais descritos mundialmente, 80% são insetos e apenas 1% foram descritos citogeneticamente (OKUTANER et al., 2011). Da mesma maneira poucas espécies da ordem Coleoptera foram analisadas citogeneticamente, aproximadamente 3.000 espécies (PETITPIERRE, 1996).

Os estudos realizados em Megalopodidae correspondem apenas a descrição do número cromossômico, sendo que a maioria apresenta 2n=20+X+y, sendo *A. sellatus, A. subfasciatus* e *A. testaceus* (JOLIVET; PETITPIERRE, 1988; VIRKKI, 1983).
O objetivo deste trabalho foi analisar citogeneticamente espécies de Megalopodidae por meio da análise convencional e molecular. Desta forma, contribuir para a resolução taxonômica e relação evolutiva do grupo.

**Material e Métodos**

No presente projeto foram realizadas coletas na região de Ponta Grossa – PR (25”03’20”S 50°14’24”W, 907m) manualmente com o auxílio de rede entomológica. Espécimes foram enviados ao Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo – MZUSP para identificação taxonômica.
A preparação das lâminas foi realizada segundo ALMEIDA, ZÁCARO e CELLA (2000). A técnica para obtenção da banda C, foi realizada segundo SUMMER (1972), com algumas modificações.
Os genes de rDNA 5S e 18S foram mapeados por hibridação *in situ* fluorescente (FISH), segundo PINKEL et al. (1986), utilizando sondas descritas para *Omophoita octoguttata* (Coleoptera). As sondas foram marcadas por PCR empregando-se digoxigenina 11-dUTP (Roche) e detecção por antidigoxigenina rhodamina (Roche) para o gene 5S e a adenina biotinilada (16 dUTP–biotin-Roche), com posterior detecção pela streptavidina Alexa-fluor (Molecular Probes) para o gene 18S. Os cromossomos foram contracorados com DAPI montado em uma solução anti-fade. As melhores células foram fotografas em um microscópio de epifluorescência Olympus BX41. As imagens foram capturadas com uma câmera Olympus DP-71 12 megapixels no programa DP controller.

**Resultados e Discussão**

Durante as coletas foram encontrados um total de 52 espécimes de coleópteros pertencentes a família Megalopodidae e subfamília Megalopodinae, com a ocorrência de 5 espécies, *Agathomerus subfasciatus* (Germar, 1823), *Mastosthethus multinotatus* (Pic, 1917), *Agathomerus flavomaculatus* (Klug, 2004), *Agathomerus marginatus* (Klug 1824) e *Agathomerus sellatus* (Germar, 1823).
As três espécies analisadas *A. sellatus, A. subfasciatus* e *A. marginatus,* possuem 2n=22 cromossomos e número haploide igual a 11. O mecanismo cromossômico de determinação sexual é do tipo Xy, sendo assinápticos na meiose I (Figura 1, **A., B.** e **C.**). Estes dados estão de acordo com àqueles descritos por VIRKKI (1983).
A técnica de obtenção de bandas mostrou a presença de heterocromatina pericentromérica para a maioria dos cromossomos em *A. sellatus* e *A. marginatus* (Figura 1, **D.** e **F.**). Alguns cromossomos de *A. sellatus* mostram a presença de heterocromatina em regiões pericentroméricas e que se estendem em direção ao braço curto (Figura 1, **F**). A visualização das bandas C é difícil devido ao pequeno tamanho dos cromossomos e além disso, estas espécies não apresentam grandes quantidades de heterocromatina.
A heterocromatina em Coleoptera normalmente é encontrada em regiões pericentroméricas, porém em algumas espécies são encontradas na região intersticial e/ou telomérica (ALMEIDA; ZÁCARO; CELLA, 2000), sendo menos frequentes nestas regiões (BIONE et al., 2005).

A análise de células meióticas de *A. marginatus* e *A. sellatus* submetidas a FISH com sondas de rDNA 5S e 18S mostrou marcações em apenas um par cromossômico, sendo estas sintênicas e colocalizadas. Não foi possível identificar qual par cromossômico devido ao pequeno tamanho dos cromossomos e por não apresentarem uma morfologia distinta entre eles (Figura 1, **G., H.** e **I**). O padrão de um par portador dos cístrons de rDNA 5S e 45S é considerado ancestral para Coleoptera (Schneider *et al*., 2007; Cabral-de-Melo; Moura; Martins, 2010, 2011).
A FISH tem se mostrado uma ótima ferramenta para mapeamento de genes ribossomais em diversas espécies (ALMEIDA et al., 2010) gerando grande informação para estudos de evolução cariotípica e da estrutura molecular dos cromossomos (PETITPIERRE, 1996).

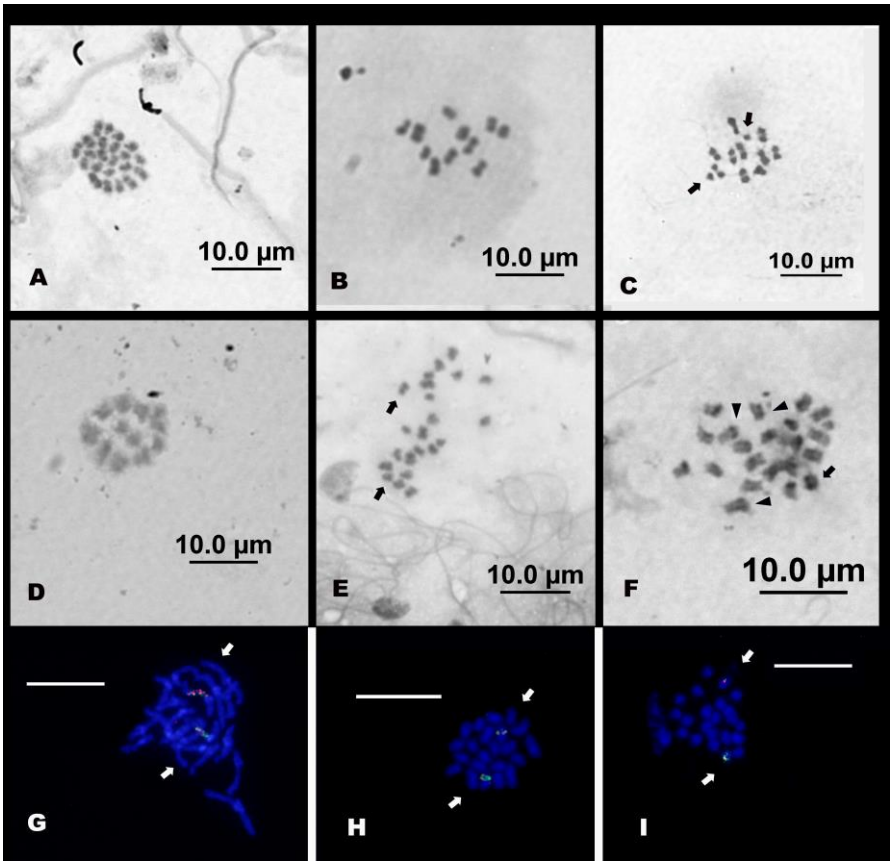



**Figura 1:** Células meióticas de *A. marginatus* com coloração Giemsa **(A.** e **B.),** *A. sellatus* (**C**) e *A. subfasciatus* (**D**). Células submetidas a técnica para obtenção de banda C, *A. marginatus* (**E),** *A. sellatus* **(F**), e a hibridização *in situ* fluorescente com sondas de DNAr 5S (vermelho) e 18S (verde) (**G., H.** e **I.),** setas (**C**) = cromossomos sexuais assinápticos, setas (**E.** e **F.)** = regiões de heterocromatina pericentromérica, cabeça de seta (**F**) = heterocromatina no braço curto, setas (**G., H.** e **I.**) mostram sitio de hibridização.

## Conclusões

Os dados citogenéticos obtidos mostram número cromossômico 2n=20+X+y, sistema cromossômico X+y, sendo assinápticos na meiose I. O padrão de heterocromatina obtido para as espécies é pericentromérico, além disso, as espécies não possuem grande quantidade de heterocromatina. A hibridação *in situ* fluorescente (FISH) mostrou marcações em apenas um par cromossômico para ambas as espécies, portanto, apresentam características evolutivas basais.

## Agradecimentos

Agradecemos ao CNPq pela concessão da bolsa e financiamento do projeto. Agradecemos ao especialista Carlos Campaner do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo – MZUSP por realizar a identificação dos coleópteros que usei como material de estudo para a realização do estudo. Agradeço a Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) e ao Programa de pós-graduação em Biologia Evolutiva e ao Laboratório de Genética Evolutiva por me fornece toda a estrutura necessária para a realização desta pesquisa.

## Referências

ALMEIDA, M. C. et al. Physical mapping of 18S rDNA cistron in species of the *Omophoita* genus (Coleoptera, Alticinae) using fluorescent *in situ* hybridization. **Micron**, v. 41, n. 7, p. 729–734, 2010.

AN, S. L. Classification of leaf beetles from Korea. Part V. Subfamily Megalopodinae (Coleoptera: Chrysomelidae). **Journal of Asia-Pacific Biodiversity**, v. 8, n. 4, p. 314–317, 2015.

BIONE, E. et al. Karyotype, C-and fluorescence banding pattern, NOR location and FISH study of five Scarabaeidae (Coleoptera) species. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, n. 3, p. 376–381, set. 2005.

CHABOO, C. S.; FLOWERS, R. W. Beetles (Coleoptera) of Peru: A Survey of the Families. Megalopodidae Latreille, 1802. **Journal of the Kansas Entomological Society**, v. 88, n. 3, p. 354–355, jul. 2015.

JOLIVET, P.; PETITPIERRE, E.; HSIAO, T. H. (EDS.). **Biology of Chrysomelidae**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1988.

OKUTANER, A Y. et al. Some Cytogenetic Observations of Two Dorcadion Dalman, 1817 Species (Coleoptera: Cerambycidae: Lamiinae: Dorcadiini). **Mun. Ent. Zool.**, v. 6, n. 2, p. 866–876, 2011.

PETITPIERRE, E. A new contribution to the cytogenetics and cytotaxonomy of the Chrysomelinae (Coleoptera: Chrysomelidae). **Cytobios**, v. 54, n. January 1988, p. 153–159, 1988.

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

RODRÍGUEZ-MIRÓN, G. M.; ZARAGOZA-CABALLERO, S. Revisión taxonómica del género *Mastostethus* (Coleoptera: Megalopodidae) en México y descripción de dos especies nuevas. **Revista Mexicana de Biodiversidad**, v. 88, n. 2, p. 312–334, 2017.

SEKERKA, L.; VIVES, E. Review of Zeugophorinae of New Guinea, with description of *Zeugophorella* gen. nov and new synonyms of Zeugophora (Coleoptera: Megalopodidae). **Acta Entomologica Musei Nationalis Pragae**, v. 53, n. 2, p. 747–762, 2013.

SUMNER, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**, v.75, p: 304-6, 1972.

WEBSTER, R. P.; LESAGE, L.; DEMERCHANT, I. New Coleoptera records from New Brunswick, Canada: Megalopodidae and Chrysomelidae. **ZooKeys**, v. 179, n. SPL.ISS., p. 321–348, 2012.