ANÁLISE CITOGENÉTICA DE ESPÉCIES DE DORYPHORINA (COLEOPTERA, CHRYSOMELIDAE, CHRYSOMELINAE)

Lucas Vinicius dos Santos (PIBIC/Fundação Araucária/), Jhon Alex Dziechciarz Vidal, Mara Cristina de Almeida Matiello, Mateus Henrique Santos (Orientador), e-mail: marangonsantos@gmail.com

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

Ciências Biológicas, Genética Animal

Palavras-chave: rDNA, cromossomos sexuais, meiose

Resumo

As espécies de Chrysomelini estudadas citogeneticamente mostraram números diploides e sistemas de determinação do sexo variados. O objetivo deste trabalho foi caracterizar citogeneticamente espécies de Doryphorina. As preparações foram a partir de testículo de adultos e analisadas com coloração convencional e hibridação *in situ* fluorescente (FISH). Análise de células meióticas de *Cosmograma fulvocincta* mostrou 2n= 25, cromossomos metacêntricos e sistema X0. A análise meiótica da Sp 1 mostrou 2n=22, e sistema XY, com a maioria dos cromossomos metacêntricos. O estudo de *C. pollispila* evidenciou n= 11, possivelmente sendo 2n=22. O estudo de células mitóticas de *Platyphora fasciatomaculata* mostrou 2n=28 e 2 cromossomos sexuais, com cromossomos metacêntricos e submetacêntricos. A FISH mostrou um par portador do cístron 45S e apenas um sítio com o cluster de 5S em um dos bivalentes autossômico. Estes dados estão de acordo com aqueles descritos na literatura.

Introdução

Os coleópteros pertencem a um grupo muito diverso, o qual agrupa a subordem Polyphaga, da qual faz parte a família Chrysomelidae (GULLAN; CRANSTON, 2008). Algumas espécies da subtribo Doryphorina apresentam um comportamento de cuidado parental onde as fêmeas cuidam dos ovos e larvas, esse fenômeno já foi observado e descrito em pelo menos nove espécies (WINDSOR et. al., 2013). Algumas espécies podem apresentar um chifre esternal que pode ser usado em disputas por alimento (EBERHARD, 1981).

Apesar do grande número de espécies descritas na ordem Coleoptera há uma escassez de estudos citogenéticos destes, sendo que pouco mais de 3.000 espécies foram estudadas, o que representa cerca de 1% de todas as espécies (PETTIPIERRE, 1996). Estudos citogenéticos em Chrysomelinae mostram uma grande variação do número diploide, variando de 2n= 12 até 2n=50, e no sistema de determinação sexual, podendo ser encontrados os sistemas Xy_p ou XY_p, (PETITPIERRE, 2011). Em Doryphorina, também ocorre essa variação do número diploide e do sistema de determinação sexual, sendo encontrado os sistemas Xy_p, X0 ou neoXY, porém, o mais frequente é o sistema X0 (PETITPIERRE, 2011). Segundo White (1978) a análise da variação do número cromossômico permite compreender possíveis processos de especiação e definir marcos evolutivo.

Estudos citogenéticos dos indivíduos pertencentes a essa subtribo se mostram importantes para contribuir com a taxonomia do grupo, com a descrição da variabilidade presente. Desta forma, levando a um maior conhecimento do grupo, da

sua relação evolutiva e das diferenciações que ocorreram no processo evolutivo das espécies. Nesse sentido, o objetivo foi caracterizar citogeneticamente algumas espécies da subtribo Doryphorina e investigar os mecanismos de determinação sexual presente neste grupo.

Material e Métodos

Os indivíduos de Doryphorina foram coletados em Ponta Grossa, Estado do Paraná (S 25°07´10" W 49°56´24") por meio de puçá. As preparações citogenéticas foram obtidas seguindo a metodologia proposta por ALMEIDA, ZACARO e CELLA (2000). Para preparação mitótica o órgão foi precessado conforme a metodologia de WEBB (1978). As preparações foram coradas com solução de Giemsa (3%), durante 12 minutos. Para o mapeamento dos cístrons 45S e 5S foi utilizada a hibridação *in situ* fluorescente (FISH), descrita por PINKEL et al. (1986). As sondas foram marcadas por 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.

As melhores células mitóticas e meióticas foram fotografadas em um microscópio de epifluorescência Olympus BX41, com objetiva 100 de imersão, utilizado filtros específicos e o software de DP controller.

Resultados e Discussão

Os animais da subtribo Doryphorina coletados para esse estudo foram capturados usando puçá, no distrito de Itaiacoca no município de Ponta Grossa. No período foram coletados 70 indivíduos, entre machos e fêmeas, sendo estes agrupados em 6 espécies (*Cosmogramma fulvocincta*, *Caligrapha pollispila, Isostilodes bisbilineata, Platyphora vinula, Platyphora fasciatomaculata e espécie 1*). No entanto, as espécies *Cosmogramma fulvocincta, Caligrapha pollispila, Platyphora fasciatomaculata e sp1*., responderam às análises citogenéticas.

Análise de células mitóticas e meióticas de *C. fulvocincta* mostrou a ocorrência do número diploide igual a 25, com cromossomos metacêntricos. O sistema de determinação sexual é do tipo X0, e em metáfases II, foi possível observar células com n= 12 e células com n=13, comprovando o sistema X0 e a segregação correta dos cromossomos (Figuras 1A, 1B e 1C). A análise de células mitóticas e meióticas da Espécie 1 (sp 1) mostrou 2n=22, sendo 20 cromossomos autossômicos e dois cromossomos sexuais XY, com a maioria dos cromossomos metacêntricos. Além disso, em metáfases II observou-se n=11, mostrando segregação correta (Figuras 1D e 1E). O estudo de *C. pollispila* evidenciou em metáfases II n= 11 cromossomos, possivelmente sendo 2n=22 (Figura 1F). Estes dados, de número cromossômico e sistema de determinação sexual, estão de acordo com aqueles descritos na literatura para espécies do mesmo gênero ou relacionadas.

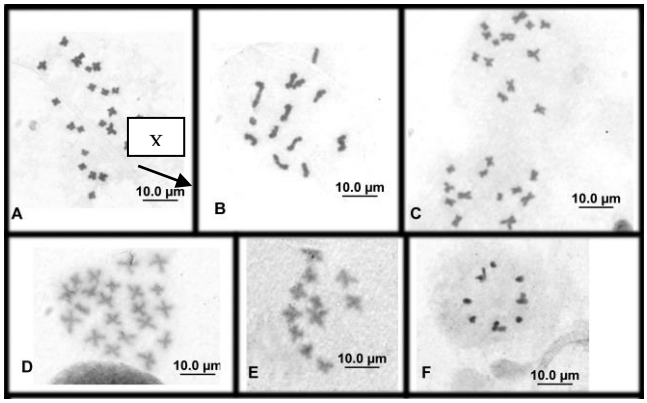


Figura 1. Células gaméticas de espécies de Doryphorini. **A.** Metáfase mitótica de *Cosmogramma fulvocincta* com 2n=25=24+X0. **B.** Metáfase I de *C. fulvocincta* com 2n=12II+X0. **C.** Metáfases II de *C. fulvocincta* com n= 12 e n=13. **D.** Metáfase mitótica da sp1 com 2n=22. **E.** Metáfase II da sp1 com 2n=11. **F.** Metáfase II de *Calligrapha pollispila* com n=11.

O estudo de metáfases espermatogoniais de *P. fasciatomaculata* mostrou o número diploide igual a 28 cromossomos, sendo 26 autossomos e 2 cromossomos sexuais, a morfologia cromossômica é metacêntrica e submetacêntrica (Figura 2).

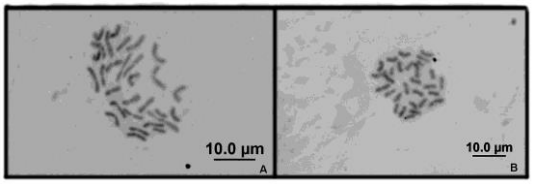


Figura 2 – Células mitóticas espermatogoniais de indivíduos machos de *Platyphora fasciatomaculata* coradas convencionalmente com Giemsa, mostrando 2n= 26+Xy.

A FISH com sondas de rDNA 18S e 5S mostrou um par de cromossomos portadores do cístron 45S (Figura 3A) e apenas um sítio de um cluster de 5S em um dos cromossomos do bivalente autossômico (Figura 3B).

Os dados obtidos para as espécies analisadas em relação ao número diploide e sistema de determinação sexual estão de acordo com aqueles descritos na literatura para espécies do mesmo gênero ou relacionadas. O padrão de um par portador dos cístrons de rDNA 45S e 5S é considerado ancestral para Coleoptera (Schneider *et al*., 2007; Cabral-de-Melo; Moura; Martins, 2010, 2011). A evolução cromossômica nas espécies de Chrysomelidae, em geral, tem ocorrido, principalmente, por fissões e fusões cêntricas e inversões pericêntricas (VIRKKI, 1984; PETITPIERRE, 1988). O número diplóide maior que 24, em muitas subfamílias éconsiderada uma característica derivada (PETITPIERRE, 1988).

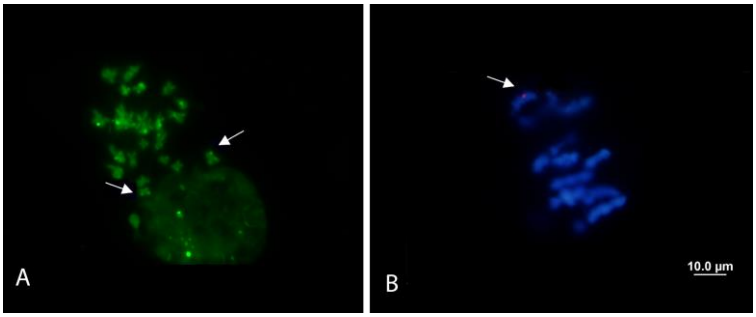


Figura 3 – Células meióticas de *Platyphora fasciatomaculata* submetidas a FISH com sondas de rDNA 18S (**A.**) e 5S (**B.**), mostrando sinais de hibridação (setas).

Conclusão

Os números diploides, o sistema de determinação sexual e um par portador dos genes de rDNA estão de acordo com o que já foi descrito na literatura.

Agradecimentos

Agradeço a Fundação Araucária pela bolsa concedida.

Referências

ALMEIDA, M. C.; ZACARO, A. A.;CELLA, D. M. Cytogenetic analysis of *Epicauta atomaria* (Meloidae) and *Palembus dermestiodes* (Tenebrioidae) with Xyp sex determination system using standart, C-bands, NOR and synaptonemal complex microspreading technique. **Hereditas**, v. 133, p. 147–157, 2000.

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 na association of 5S rRNA and histone genes in insects, and repetitive DNA similarity between the B chromosome and A complemente. **Heredity**, v. 104, p. 393-400, 2010.

CABRAL-DE-MELO, D. C.; MOURA, R. C.; MARTINS, C. Cytogenetic mapping of rRNAs and histone H3 genes in 14 species of *Dichotomius* (Coleoptera, Scarabaeidea, Scarabaeinae) beeltes. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 134, p. 127-135, 2011.

EBERHARD, W. G. The Natural History of *Doryphora* sp. (Coleoptera, Chrysomelidae) and the Function of its Sternal Horn.pdf. **Annals Of The Entonmological Society Of America**, v. 74, n. 5, p. 445–448, 1981.

GULLAN, P. J., CRANSTON, P. S. **Os Insetos um resumo de entomologia**. 3ªed ed. São Paulo, SP3ª: Roca, 2008.

PETITPIERRE, E. Cytogenetics, cytotaxonomy and genetics of Chrysomelidae. In: JOLIVET, E.; PETITPIERRE, E.; HSIAO, T.H. **Biology of Chrysomelidae**. Kluwer Academic Publishres, 1988. 131-59.

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.

PETITPIERRE, E. Cytogenetics, cytotaxonomy and chromosomal evolution of Chrysomelinae revisited (Coleoptera, Chrysomelidae). **ZooKeys**, v. 157, p. 67–79, 2011.

PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 9, p. 2934–8, 1986.

SCHNEIDER, M. C.; ROSA, S. P.; ALMEIDA, M. C.; COSTA, C.; CELLA, D. M. Chromosomal similarities and diferences among four Neotropical Elateridae (Conoderini and Pyrophorini) and other related species, with comments on the NOR patterns in Coleoptera. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 45, p. 308-316, 2007.

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

WEBB, G.C.; WHITE, M.J.D.; CONTRERAS, N.; CHENEY, J. Cytogenetics of the parthenogenetic grasshopper *Warramaba* (formely *Moraba*) *virgo* and its bisexual relatives. IV. Chromosomes banding studies. **Chromosoma**, v.67, p.309-39, 1978.

WINDSOR, D. M.; DURY, G. J.; FRIEIRO-COSTA, F. A.; LANCKOWSKY, S.; PASTEELS, J. M. Subsocial Neotropical Doryphorini (Chrysomelidae, Chrysomelinae): New observations on behavior, host plants and systematics. **ZooKeys**, v. 332, p. 71–93, 2013.