

GUILHERME MESSIAS DA SILVA

Análise Cariotípica em Representantes do Gênero
Dichotomius (Coleoptera, Scarabaeidae).

RECIFE, 2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO – UFPE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – CCB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO

Análise Cariotípica em Representantes do Gênero
Dichotomius (Coleoptera, Scarabaeidae).

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Mestrando: Guilherme Messias da Silva

Orientador(a): Prof^a Dr^a Maria José de Souza Lopes

Co-orientador(a): Prof^a Dr^a Rita de Cássia de Moura

RECIFE, 2006

Silva, Guilherme Messias da
Análise cariotípica em representantes do Gênero
***Dichotomius* (Coleoptera, Scarabaeidae) / Guilherme Messias da**
Silva. – Recife: O Autor, 2006.

iv, 76 folhas : il., fig., tabs.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de
Pernambuco. CCB. Ciências Biológicas, 2006.

Inclui bibliografia, anexo e apêndice.

1. Citogenética animal 2. Coleoptera – Estudo cromossômico
3. Cariótipo 4. Heterocromatina I. Título.

575
572.8

CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)

UFPE
CCB – 2006-062

Análise Cariotípica em Representantes do Gênero
Dichotomius (Coleoptera, Scarabaeidae).

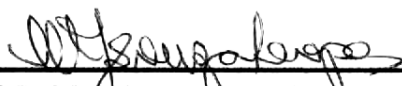
Mestrando: Guilherme Messias da Silva

Orientador(a): Prof^a Dr^a Maria José de Souza Lopes

Co-orientador(a): Prof^a Dr^a Rita de Cássia de Moura

Comissão Examinadora

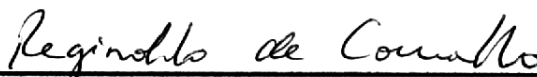
- **Membros Titulares**



Profª Drª Maria José de Souza Lopes
Departamento de Genética/CCB/UFPE



Profª Drª Vilma Loreto da Silva
UAG/UFRPE



Prof Dr Reginaldo de Carvalho
Departamento de Biologia/UFRPE

- **Membros Suplentes**

Profª Drª Neide Santos

Departamento de Genética/CCB/UFPE

Profª Drª Ana Maria Benko Iseppon

Departamento de Genética/CCB/UFPE

Mais uma vitória,
Mais uma batalha vencida,
Será que acabou?
Certamente que não, está só começando!!
Eu consegui,
Mas não estava sozinho,
Graças a Deus sempre tive pessoas maravilhosas me dando suporte.
Dedico esta a todos,
Especialmente a Profª Maria José e a Rita Moura.
E principalmente a minha família,
Meus Pais, meu Irmão e minha sobrinha Geovana.
E a uma pessoa indispensável para que tudo isso acontecesse,
Meu amor Mércia.
Amo todos.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	i
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
I. INTRODUÇÃO	10
I.1. Objetivos	13
II. REVISÃO DA LITERATURA	14
II.1. Considerações Sobre a Superfamília Scarabaeoidea	14
II.2. Mecanismos de Determinação Sexual em Coleoptera	18
II.3. Caracterização Citogenética em Scarabaeoidea	24
II.3.1. Família Scarabaeidae	26
II.4. Padrão de Distribuição e Qualificação da Heterocromatina Constitutiva	35
II.5. Regiões Organizadoras de Nucléolos e sua Distribuição	42
II.5.1. Uso Associado da FISH com AgNO ₃ na Análise Cromossômica	44
III. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
IV. CAPÍTULO 1: Análise cariotípica, bandeamento C e distribuição de RONS em três espécies do gênero <i>Dichotomius</i> (Coleoptera, Scarabaeidae, Scarabaeinae)	54
Resumo	55
Introdução	56
Material e Métodos	58
Resultados	59
Discussão	60
Referências Bibliográficas	64
V. CONCLUSÕES	69
VI. APÊNDICE	70
VI.1. Fotos das Espécies Estudadas	70
VII. ANEXO	71
VII.1. Normas da Revista Genética	71

AGRADECIMENTOS

Muitos contribuíram para que eu pudesse, hoje, estar concretizando mais essa etapa da minha vida acadêmica. A Prof^a Maria José de Souza Lopes orientou-me com respeito, senso crítico, dedicação, profissionalismo e acima de tudo com muita amizade. Esteve sempre presente e disposta a contribuir com suas valiosas sugestões. A ela expresso todo o meu sincero agradecimento.

À Prof^a Rita de Cássia de Moura, não só pela co-orientação, mas também por tudo que representa para mim, pelo exemplo de profissional e principalmente pela pessoa maravilhosa que ela é. Agradeço também pela atenção, colaboração e incentivo disposto na produção deste trabalho, e na minha vida pessoal.

À Prof^a Neide Santos e à Prof^a Vilma Loreto que sempre estavam interessadas em saber como eu estava e como as coisas caminhavam. E pelas colaborações nas valiosas informações e esclarecimento de dúvidas sobre o complexo, mas prazeroso, mundo da Genética.

Uma amizade bem semeada e cultivada sempre renderá bons frutos. Aos amigos Diogo, João Henrique, Marcela, Merilane, Sarah, Cibeles, Pollyanna, Juliana, Myrella, Luzia, Danielle, Carol, Iane e Fernando pela participação nas coletas e pelos bons momentos compartilhados no dia a dia das atividades de Laboratório. Agradeço também às técnicas Francisca Tavares Lira e Cirlene Maria da Silva pela dedicação nas atividades do Laboratório e pelo carinho, respeito e atenção com que sempre me trataram.

Agradeço especialmente ao Dr. Edgar Guimarães Bione, pela atenção, pelo apoio e pela colaboração na realização deste trabalho.

Ao Dr. Sergio Ide do *Instituto Biológico* de São Paulo pela identificação taxonômica das espécies estudadas neste trabalho, sou imensamente grato.

Quero agradecer aos meus amigos e à minha família, meus pais e meu irmão pelo amor, carinho, respeito e incentivo, a minha avó, meus tios e tias, primos e primas pelo apoio e torcida. Quero também agradecer em especial a minha namorada, Mércia, por tudo que ela representa para mim, pelo seu amor,

carinho, respeito, apoio, compreensão, por está sempre presente nos bons e nos maus momentos da minha vida, incentivando-me para vencer os meus obstáculos.

Finalmente, mas não menos importante, quero agradecer a Deus, por está sempre junto a mim, proporcionando sabedoria e guiando os meus passos nessa caminhada.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1.

- Figura 1.** Cromossomos mitóticos e meióticos de *Dichotomius sericeus* **(a-d)**, *D. nesus* **(e)** e *D. semisquamosus* **(f)** corados com orceína lacto-acética. **(a)** cariótipo espermatogonial. **(b)** metáfase I destacando o mecanismo sexual Xy_r . **(c,d)** metáfases II, **(c)** com o X e **(d)** com o y_r , respectivamente. **(e,f)** metáfases I com o mecanismo Xy_p . Barra 10 μ m. 66
- Figura 2.** Padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva em *Dichotomius sericeus* **(a)**, *D. semisquamosus* **(b)** e *D. nesus* **(c,d)**. Em **(a,d)** cariótipos espermatogoniais. **(b)** metáfase espermatogonial. **(c)** paquíteno. Barra 10 μ m. 67
- Figura 3.** Cromossomos corados com nitrato de prata ($AgNO_3$) **(a,b,c,e)** e pelo método de FISH com sonda de DNAr 28S **(d,f)**. *Dichotomius sericeus* **(a,b)**, *D. nesus* **(c,d)** e *D. semisquamosus* **(e,f)**. **(a)** zigóteno com o bivalente sexual totalmente marcado (seta). **(b)** metáfase I com as regiões heterocromáticas e o bivalente sexual Xy_r marcados pela prata. **(c,e)** paquítenos com bivalente sexual e bivalente autossômico totalmente marcados (setas) em *D. nesus* e *D. semisquamosus*, respectivamente. **(d,f)** paquíteno e metáfase I, respectivamente. As setas apontam os sítios de DNAr. Barra 10 μ m. 68

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Números diplóides e sistemas de determinação sexual em espécies distribuídas nas 12 tribos da subfamília Scarabaeinae. 31
- Tabela 2.** Padrão de qualificação da heterocromatina constitutiva em espécies de Scarabaeidae estudadas com o uso de fluorocromos base-específicos. 41

RESUMO

Dichotomius é um gênero pertencente estritamente ao Novo Mundo e que apresenta aproximadamente 153 espécies descritas. Para o Brasil há registro de ocorrência de mais de 83 espécies. Cromossomos meióticos e mitóticos de *Dichotomius sericeus*, *Dichotomius nisus* e *Dichotomius semisquamosus*, foram estudados através da coloração convencional, bandeamento C e coloração com nitrato de prata (AgNO_3). Em *D. nisus* e *D. semisquamosus* foi usada hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sonda de DNAr 28S. As três espécies analisadas apresentaram cariótipo assimétrico com $2n=18$, cromossomos meta-submetacêntricos e redução gradual de tamanho, exceto o par 1 que apresentou tamanho grande em relação aos outros cromossomos do complemento. *D. nisus* e *D. semisquamosus* apresentaram mecanismo sexual do tipo Xy_p , enquanto que em *D. sericeus* o mecanismo sexual identificado foi Xy_r . A análise da heterocromatina constitutiva (HC) pelo bandeamento C revelou a presença de blocos de HC nas regiões pericentroméricas de todos os cromossomos nas três espécies. Com relação ao tamanho dos blocos, *D. semisquamosus*, apresentou blocos menores quando comparados com os blocos visualizados em *D. sericeus* e *D. nisus*. A coloração com nitrato de prata (AgNO_3) revelou marcações correspondentes as RONS nos bivalentes sexuais em *D. sericeus* e *D. nisus* e em um par autossômico em *D. semisquamosus*. Adicionalmente, a coloração AgNO_3 também marcou as regiões de HC nas três espécies. O método de FISH confirmou a localização dos sítios ribossomais, no bivalente sexual de *D. nisus* e no bivalente autossômico de *D. semisquamosus*, coincidindo com as marcações obtidas pela coloração AgNO_3 .

ABSTRACT

Dichotomius is a pertaining sort strict to the New World and that it presents 153 described species approximately. For Brazil it more than has register of occurrence of 83 species. The meiotic and mitotic chromosomes of *Dichotomius sericeus*, *Dichotomius nisus* and *Dichotomius semisquamosus*, had been studied through the conventional staining, C-banding and staining with silver nitrate (AgNO_3). In *D. nisus* and *D. semisquamosus* was used fluorescent hibridization *in situ* (FISH) with probe of DNAr 28S. The three analyzed species had presented asymmetric karyotype with $2n=18$, chromosomes meta-submetacentric and gradual reduction of size, except pair 1 that it presented great size in relation to the other chromosomes of the complement. *D. nisus* and *D. semisquamosus* had presented sex mechanism of the Xy_p type, whereas in *D. sericeus* the identified sex mechanism was Xy_r . The analysis of the constitutive heterochromatin (HC) for C-banding revealed to the presence of blocks of HC in the pericentromeric regions of all the chromosomes in the three species. With regard to the size of the blocks, *D. semisquamosus*, presented comparative lesser blocks when with the blocks visualized in *D. sericeus* and *D. nisus*. The staining with silver nitrate (AgNO_3) revealed to corresponding marks the RONS in the sex bivalent in *D. sericeus* and *D. nisus* and in a autosome pair in *D. semisquamosus*. Additionally, the AgNO_3 staining also marked the regions of HC in the three species. The FISH method confirmed the localization of the ribosomal sites, in the sex bivalent of *D. nisus* and in the autosome bivalent of *D. semisquamosus*, coinciding with the markings gotten for the AgNO_3 staining.

I. INTRODUÇÃO

A ordem Coleoptera é considerada a mais rica e variada da classe Insecta com cerca de 25.000 gêneros e 357.899 espécies, compreendendo 40% do total de insetos e 30% dos animais. A ordem está dividida em quatro subordens: Archostemata, Adephaga, Myxophaga e Polyphaga (Crowson, 1967). Um grande número de seus representantes ocorre nas regiões tropicais, em especial na região Neotropical que é conhecida como o maior repositório de coleópteros do planeta. Entretanto, conhece-se apenas 6.703 gêneros e 72.476 espécies para esta região distribuída em 127 famílias. Aproximadamente 5.000 gêneros e 30.000 espécies ocorrem no Brasil (Costa, 2000). Na subordem Polyphaga, Scarabaeidae se destaca por ser uma das famílias mais numerosas apresentando aproximadamente 2.300 gêneros e 27.800 espécies (Ratcliffe *et al.*, 2002). O gênero *Dichotomius* pertence à tribo Dichotomiini (Scarabaeinae), possui mais de 153 espécies descritas e está distribuído no novo mundo. Para o Brasil há registro de mais de 83 espécies do gênero (Vaz-de-Mello, 2000).

Apesar da ampla diversidade da fauna de Coleoptera, estudos cromossômicos ainda são escassos e na sua maioria estão restritos à análise convencional. Somente cerca de 1% das espécies descritas tem sido estudadas do ponto de vista citogenético. Dois aspectos representam fatores que dificultam os estudos citogenéticos em coleópteros: 1) dificuldade na obtenção de cromossomos meióticos, decorrente da variação na duração da espermatogênese em diferentes espécies e 2) o reduzido tamanho dos cromossomos, o que dificulta a análise citológica. Para a maioria das espécies a identificação cromossômica individual dentro do complemento é dificultada pela similaridade morfológica entre os cromossomos (Smith e Virkki, 1978; Petitpierre, 1996).

Os estudos cromossômicos em Scarabaeidae datam inicialmente da década de 50, com predominância de trabalhos com coloração convencional. A maior parte das espécies analisadas até o momento, foram listadas por Smith e Virkki (1978). Nesse trabalho, foram relacionadas 252 espécies, subespécies ou raças cromossômicas, destas cerca de 61% pertencem às subfamílias Coprinae

(=Scarabaeinae), Rutelinae e Melolonthinae. Atualmente, são conhecidas citogeneticamente um pouco mais de 355 espécies pertencentes a 12 subfamílias de Scarabaeidae. Essa família mostra-se bastante conservada com relação ao número diplóide $2n=20$, mecanismo sexual do tipo Xy_p além de cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e acrocêntricos (Smith e Virkki, 1978; Bione et al., 2005a,b; Martins, 1994; Moura et al., 2003).

A análise da heterocromatina constitutiva (HC) e das regiões organizadoras de nucléolos (RONS) nesse grupo de organismos tem contribuído para uma melhor caracterização da estrutura e dinâmica do material genético e das relações filogenéticas existentes entre as espécies. O principal método utilizado para o estudo da heterocromatina constitutiva (HC) em Coleoptera é o bandeamento C. A heterocromatina tem se caracterizado como um material cromossômico com variabilidade de padrões e heterogeneidade intra e interespecífica. Em algumas famílias, como por exemplo, Scarabaeidae, a HC apresenta localização preferencial na região pericentromérica dos autossomos e dos cromossomos sexuais. Adicionalmente, algumas espécies possuem o cromossomo X totalmente heterocromático (Bione et al., 2005a,b; Moura et al., 2003). Além do bandeamento C, o advento de outras técnicas de identificação cromossômica, como a coloração pelo nitrato de prata ($AgNO_3$), utilização de fluorocromos base específicos e a hibridização *in situ* fluorescente (FISH), têm permitido analisar regiões específicas dos cromossomos que não são identificadas por técnicas convencionais (Angus, 1983; Rosek e Rudek, 1992; Plohl et al., 1993; Moura et al., 2003).

Atualmente, ainda são poucas as informações sobre a localização das RONS em Coleoptera. A utilização da coloração com nitrato de prata ($AgNO_3$) e a hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sondas de DNAr, por sua vez, tem permitido a visualização e uma melhor caracterização da estrutura de cromossomos meióticos, através da análise das RONS. No caso da $AgNO_3$ é possível também identificar as regiões cinetocóricas (Moura et al., 2003; Bione et al., 2005a,b). Portanto, uma análise comparativa em representantes da família Scarabaeidae contribuirá para a compreensão da evolução cromossômica das

espécies, além de detectar marcadores citogenéticos eficientes para estudos filogenéticos.

I.1 OBJETIVOS

I.1.1 Objetivo Geral

Caracterizar citogeneticamente as espécies *Dichotomius sericeus*, *Dichotomius nisus* e *Dichotomius semisquamosus* (Scarabaeidae; Scarabaeinae).

I.1.2 Objetivos Específicos

1. Determinar características cromossômicas numéricas e morfológicas, através da análise convencional em cromossomos mitóticos e meióticos;
2. Analisar comparativamente os padrões de distribuição da heterocromatina constitutiva e sua variabilidade através do bandeamento C;
3. Identificar as regiões organizadoras de nucléolos através da coloração com nitrato de prata (AgNO_3) e hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sonda de DNAr 28S;
4. Usar os marcadores citogenéticos para analisar comparativamente as espécies estudadas.

II. REVISÃO DA LITERATURA

II.1. Considerações Sobre a Superfamília Scarabaeoidea

Scarabaeoidea é uma superfamília muito ampla, diversa e seus representantes apresentam uma distribuição mundial de aproximadamente 2.200 gêneros e mais de 31.000 espécies. Besouros dessa superfamília são adaptados a muitos habitats, e apresentam diferentes hábitos alimentares como fungívoros, herbívoros, necrófagos, coprófagos, saprófagos e alguns são carnívoros. Alguns exibem cuidado parental e podem conviver socialmente com outros insetos. Assim alguns são mirmecófilos, termófilos, ou ectoparasitas. Morfologicamente muitos apresentam cornos, outros são hábeis em rolar e compactar bolas de esterco (Ratcliffe *et al.*, 2002).

Os escarabeídeos desempenham um importante papel na dinâmica de nutrientes e na manutenção de ecossistemas, atuando na decomposição da matéria orgânica, no aumento da fertilização do solo e na sua aeração e são um alto indicador da biodiversidade de florestas tropicais (Halffter e Favila, 1993). Além disso, algumas espécies como as do gênero *Dichotomius* são eficientes controladores biológicos de artrópodes, como por exemplo, do díptero *Haematobia irritans irritans* L. (mosca dos chifres) que ataca búfalos, ovelhas, cavalos, cães e principalmente bovinos (Fazolin *et al.*, 1997).

O processo de adaptação a vários ambientes provocou uma enorme radiação adaptativa desses besouros, de modo que é possível encontrar larvas vivendo e alimentando-se em troncos semi-apodrecidos (Passalidae e Lucanidae), de restos de animais (Trogidae), de fungos arbóreos ou associados a insetos sociais (Ceratocanthidae), de raízes de plantas (Plecomidae e grupos relacionados a Scarabaeidae), húmus e estrume de herbívoros (Scarabaeidae – Scarabaeinae e Aphodiinae), de predação (Hybosoridae e alguns Scarabaeidae – Cetoniinae) (Costa *et al.*, 1988).

O desenvolvimento pós-embrionário dos besouros é por holometabolía, ou seja, envolve metamorfose completa. Isto significa que esses insetos

desenvolvem-se a partir de um ovo e passam pelos estágios de larva e pupa antes de tornarem-se adultos (Gullan e Cranston, 2000). As larvas desenvolveram inúmeras características para a vida no solo, das quais podemos destacar: corpo alongado e cilíndrico, de leve a fortemente curvado dorsoventralmente em forma de C, e fracamente esclerotizado (Costa *et al.*, 1988; Scholtz, 1990).

Por sua vez, os adultos possuem algumas modificações significativas que contribuem para a sua caracterização. Dentre elas podemos destacar: o comprimento do corpo (2 a 160 mm), forma do corpo (oval, obovada, quadrada e cilíndrica), coloração (metálica ou não, com ou sem ornamentação), protórax altamente adaptado para cavar com coxas largas e tíbias denteadas com apenas um esporão; um par de asas anteriores ou élitros (endurecidos, convexos ou achatados, com ou sem estrias ou pêlos) e um par de asas posteriores com nervação reduzida e um complexo mecanismo de dobramento; antenas em forma de clava lamelada (formada pelos três últimos segmentos antenais) e quatro túbulos de Malpighi (Cooper, 1983; Scholtz, 1990).

Das plantas podem alimentar-se desde a raiz (rizófagos) até o néctar (nectarívora). Alguns besouros da família Scarabaeidae são caracterizados pelo uso de fezes ou outros detritos orgânicos como recurso alimentar, tanto no estágio de larva como de adulto, formando bolotas de excrementos que são enterradas juntamente com os ovos. Esses besouros são conhecidos vulgarmente como “rola-bosta” (coprófagos), sendo especializados em extrair de grandes herbívoros. Insetos coprófagos são importantes em vários processos ecológicos, incluindo reciclagem de nutrientes, aeração do solo, transporte de outros organismos, como ácaros predadores e enterramento de sementes dispersadas e defecadas por vertebrados (Gullan e Cranston, 2000).

Em 1981, Crowson propôs que os ancestrais de Scarabaeoidea eram besouros pequenos e adaptados à vida sob o solo, os quais provavelmente se alimentavam de fungos subterrâneos e seriam semelhantes a representantes de coleópteros das famílias Glaresidae, Ochodaeidae e Bolboceratidae.

O mais antigo registro fóssil de Scarabaeoidea, *Aphodiites*, foi encontrado nas camadas do Jurássico Inferior na Suíça. Esse fóssil é pequeno

(aproximadamente 5 mm de comprimento) e possui características morfológicas semelhantes aos atuais Aphodiinae. Os maiores fósseis semelhantes a Scarabaeoidea foram encontrados no Jurássico Superior e mediam de 15 (*Opiselleipon*) a 35 mm (*Geotrupoides*) tendo o último sido encontrado no Jurássico Superior (Scholtz, 1990). Outros fósseis também foram encontrados, com características similares a Aphodiinae, no Líbano em âmbar do Cretáceo Inferior e na China, como o *Protoscarabaeus*, datando também do Cretáceo Inferior e semelhante aos modernos Geotrupidae e Hybosoridae (Crowson, 1981). Um Lucanidae primitivo foi descrito no Kasaquistão como sendo o primeiro fóssil para Scarabaeoidea do Cretáceo superior (Nikalojev, 1993).

Através do registro fóssil fica evidente que as principais divisões dos modernos Scarabaeoidea se distinguiram no começo do Terciário. Cerca de 80 espécies, algumas das quais representam extensos gêneros, estão presentes hoje na América do Norte e Europa. Bolas de estrume fósseis iguais àsquelas feitas pelos modernos Scarabaeinae foram encontradas nas camadas do Oligoceno Inferior no Chile, e formas similares aos modernos Aphodiinae foram encontradas em argila do Eoceno em Londres. O fóssil mais antigo de Scarabaeoidea, *Eophyllocerus* (subfamília Melolonthinae, Scarabaeidae), foi encontrado nos depósitos de carvão do Eoceno na Alemanha (Scholtz, 1990; Browne e Scholtz, 1999).

Browne e Scholtz (1999) propuseram a partir da análise filogenética de 134 características de adultos e de larvas uma nova classificação para as diferentes famílias de Scarabaeoidea baseada em três linhagens principais: glaresoide, passaloide e escarabeoide. A linhagem glaresoide possui apenas a família Glaresidae. A passaloide possui duas sublinhagens: glafiroide (que é representada pelas famílias Glaphyridae, Passalidae, Lucanidae, Diphylostomatidae, Trogidae, Bolboceridae e Pleocomidae) e geotrupoide (contendo Geotrupidae, Ochodaeidae, Ceratocanthidae e Hybosoridae). Destas apenas Pleocomidae, Diphylostomatidae, Geotrupidae e Belohinidae não ocorrem no Brasil. Na linhagem escarabeoide existem todos os taxa que estão incluídos na família Scarabaeidae sendo agora representados por 12 subfamílias (Aphodiinae,

Scarabaeinae, Orphninae, Melolonthinae, Chasmatopterinae, Hopliinae, Oncerinae, Rutelinae, Dynastinae, Trichiinae, Cetoniinae e Valginae).

De todas as famílias de Scarabaeoidea, Scarabaeidae merece ser destacada como sendo a mais representativa estando constituída por aproximadamente 91% de todos os escarabeóides e por apresentar uma grande radiação adaptativa, compreendendo cerca de 2.300 gêneros e 27.800 espécies, distribuídas em 12 subfamílias e várias tribos. Os Scarabaeidae são notadamente os principais constituintes da coleopterofauna da região Neártica (125 gêneros e 1.700 espécies) representada pelos Estados Unidos da América, Canadá e México neártico e da região Neotropical (362 gêneros e 4.706 espécies) do Sul do México até a Argentina (Costa *et al.*, 1988, Ratcliffe *et al.*, 2002). Para o Brasil, especificamente, há registro de aproximadamente 204 gêneros e 1.777 espécies (Costa, 2000).

II.2. Mecanismos de Determinação Sexual em Coleoptera

O mecanismo detalhado responsável pela diferenciação dos cromossomos sexuais, presentes em diferentes grupos de animais, permanece como um fato complexo que merece mais estudos. Ohno (1967) apresentou propostas fundamentais para o entendimento da evolução de cromossomos sexuais. Dois eventos principais foram destacados: acúmulo de fatores responsáveis pelo desenvolvimento do sexo heterogamético em um dos homólogos do par homomórfico e na seqüência, inversão pericêntrica como etapa para diferenciação morfológica do par de cromossomos denominados X e Y. Nesse processo parece ter ocorrido deterioração genética gradual do cromossomo Y, ressaltado como um passo necessário para a eliminação de parte do seu material. Frota e Aratangy (1968) sugeriram que o acúmulo de genes letais recessivos, protegidos por alelos normais dominantes no X, levaria a uma gradual degeneração do Y. Também foi destacada a importância de heterocromatinização como processo para a diferenciação dos cromossomos sexuais (Singh *et al.*, 1976). Em vertebrados tem sido observado que a diferenciação de cromossomos sexuais de cobras (Jones, 1989) e de peixes (Sola *et al.*, 1990) resulta de heterocromatinização do cromossomo Y em machos heterogaméticos (XY) e do cromossomo W em fêmeas heterogaméticas (ZW).

Alguns insetos como os lepidópteros, bem como em aves e peixes tem sido observada uma inversão do mecanismo XY, com os machos homogaméticos ZZ e as fêmeas heterogaméticas ZW. De acordo com a teoria generalista, mais aceita, a evolução cromossômica sexual começa com um par de cromossomos idênticos que adquiriram a função de determinação do sexo. A supressão do crossing-over entre o X e o Y ou entre o Z e o W acarreta diferenciação dos dois cromossomos durante a evolução e deteriorização do Y ou do W (Walther e Frantisek, 1997).

A existência de um número grande de diferentes mecanismos para determinação do sexo nos organismos levou a uma classificação desses sistemas em duas categorias: uma é a determinação sexual ambiental (DSA), onde o sinal primário para diferenciação é fornecido pelo ambiente, e a outra é a determinação

sexual genética (DSG), que inclui vários mecanismos. Assim como ocorre na classe dos insetos, o sexo pode ser determinado por vários mecanismos: por fatores relacionados aos cromossomos sexuais Y(W) e aos autossomos, pelo número de cromossomos X, por haploidia versus diploidia, ou por infecção envolvendo microrganismos (Fumi *et al.*, 2002).

Devido à grande variedade de mecanismos de determinação sexual em coleópteros, Smith e Virkki (1978), dividiram esses mecanismos em dois grupos de sistemas, os ortodoxos e os não ortodoxos. Os ortodoxos incluem sistemas aquiasmáticos (Xy_p , X_nY_p , Xy_{np} , Xy_c , XO) e quiasmáticos, estes podem ser sistemas simples (neoXY, Xy_r , XY) ou múltiplos (X_1X_2Y , XY_1Y_2 , X_nY_n , $X_n\text{neo}X\text{neo}Y_p$). Os não ortodoxos são aqueles sistemas em que os cromossomos sexuais perdem a sua capacidade de parear convencionalmente via quiasma ou nucléolo, mantendo-se, portanto, como univalentes.

Segundo White (1973) na ordem Coleoptera existem aproximadamente seis tipos de mecanismos sexuais: 1) o mecanismo XO, que é originado após perda do y, o cromossomo X migra para um dos pólos em anáfase I e se divide equacionalmente em anáfase II. Tem sido comumente encontrado em algumas famílias como Carabidae, Lycidae, Cantharidae, Lampyridae, Passalidae e Curculionidae; 2) o Xy_r (r de “rod-shaped”) é um sistema raro na ordem, com o cromossomo y muito pequeno em relação ao X. Destaca-se a pequena quantidade de heterocromatina nos cromossomos X e y estando estes fracamente associados formando uma figura semelhante a um bastão ou vara; 3) o Xy_p é amplamente distribuído na subordem Polyphaga, o cromossomo y é diminuto em relação ao X, sendo representado com letra minúscula, e portanto, descrito como “Xy” para designar o mecanismo cromossômico heterogamético de determinação sexual e o “p” representando o tipo de associação meiótica do bivalente sexual. Esse mecanismo foi comparado por Smith (1950) a um pára-quedas, onde o X representa o dossel e o y ligado ao X por duas linhas tênues, representa o pára-quedista. No geral esses dois cromossomos são metacêntricos com o X similar em tamanho aos autossomos e o y muito pequeno; 4) neoXY, os cromossomos sexuais têm o mesmo tamanho e provavelmente tiveram origem a partir dos

mecanismos Xy_p e XO , através de translocação do cromossomo X para um dos autossomos; 5) XY, forma-se quando os cromossomos sexuais, que são indistinguíveis quanto à forma e o tamanho, estão associados na meiose da mesma maneira que os autossomos, sem formar nenhuma configuração diferencial. Esse mecanismo é encontrado em vários crisomelídeos da subfamília Alticinae; 6) mecanismo sexual múltiplo, é caracterizado pelo aumento no número de cromossomos sexuais e pode ser originado por meio de sucessivas translocações a partir dos mecanismos simples. Esse sistema é predominante entre os representantes do gênero *Blaps* (Tenebrionidae) (Vitturi *et al.*, 1996). Das 2.160 espécies listadas por Smith e Virkki (1978), 54% apresentaram mecanismo sexual do tipo Xy_p , 14% tipo XO , 2% tipo XY, 7% neoXY, 2,4% Xy_r e 4,2% não apresentaram os cromossomos sexuais pareados durante a prófase I.

O modo como ocorre o pareamento do bivalente, Xy_p , oscila entre a associação nucleolar (descartada), a associação quiasmática (descartada) e a associação por heterocromatina. A associação quiasmática foi descartada, pois segundo White (1973) não há evidência clara de quiasma no Xy_p , provavelmente, porque o bivalente sexual em coleópteros geralmente é muito pequeno e compacto durante a metáfase I. A existência de associações não homólogas envolvendo vários ou todos os cromossomos em uma célula diplóide parece ser um processo bastante comum em células meióticas de insetos, particularmente em Coleoptera. Geralmente essas associações são produzidas por segmentos heterocromáticos situados nas regiões centroméricas ou teloméricas (Drets *et al.*, 1983).

Analisando cromossomos de besouros, mais especificamente, os segmentos heterocromáticos comumente sofrem diferentes graus de pareamento ectópico, gerando a formação de cromocentros (Smith e Virkki, 1978). Em *Epilachna paenulata*, por exemplo, o bivalente Xy_p mostra uma associação telômero-telômero entre os braços longos dos cromossomos sexuais. Esse comportamento dos segmentos heterocromáticos que formam o pára-quedas está de acordo com o comportamento de atração e adesão entre segmentos heterocromáticos que ocorre nos autossomos dessa espécie. Por isso e também

por não ter sido encontrado material nucleolar associado ao Xy_p , não se pode excluir a associação da heterocromatina para explicar a origem da dupla composição dos pólos heterocromáticos do “pára-quedas”. Dessa forma, em *E. paenulata* o dossel do “pára-quedas” resulta de uma associação aquiasmática entre os segmentos heterocromáticos dos cromossomos X_p e y_p , e o “pára-quedista” seria apenas a associação terminal entre os braços longos dos cromossomos sexuais. Diferindo da concepção usual de que o dossel é o cromossomo X_p e o pára-quedista é o y_p (Drets *et al.*, 1983). Assim, os segmentos de heterocromatina constitutiva representam um importante papel, não somente em associações cromossômicas, mas também na formação do Xy_p (Drets e Stoll, 1974).

Alguns autores têm proposto que o bivalente sexual com a forma de pára-quedas é uma característica primitiva e ancestral e que uma vez perdida, durante a evolução, não pode ser readquirida (Crowson, 1981; Virkki *et al.*, 1991). Entretanto, estudos cromossômicos em *Dendroctonus* (Curculionoidea-Scolytidae) mostram que a condição Xy_p parece ter sido readquirida, sugerindo que partes fundamentais do X_p e do y_p parecem ter sido mantidas, assegurando o reaparecimento do Xy_p perdido devido a rearranjos estruturais (Lanier, 1981).

Os cromossomos sexuais que fazem parte do grupo não ortodoxo estão relacionados com aqueles sistemas em que tais cromossomos apresentam-se como univalentes. Esses sexuais possuem dois tipos de comportamento durante a meiose, o primeiro com os univalentes separando-se tardiamente na anáfase I (pós-reducional), é comumente encontrado nas famílias Lampyridae, Chrysomelidae, Curculionidae, Coccinelidae e Scarabaeidae (Manna e Lahiri, 1972) (Yadav, 1971). O segundo com os univalentes X ou y passando por uma pré-redução, ou seja, separando suas cromátides irmãs na primeira divisão meiótica (pré-reducional). Entre os mecanismos de determinação sexual não ortodoxos, o sistema $X0$ é o mais freqüente e pode ser originado das duas formas, pós-reducional e pré-reducional (Smith e Virkki, 1978).

Ocasionalmente espécies com sistema $X0$ têm sido observadas em Tenebrionidae que representa uma família relativamente bem estudada. Em

Passalidae, a tribo Passalini apresenta mecanismo X0, enquanto a tribo Proculini possui sistemas neoXY e Xy (Mesa *et al.*, 1977; Smith e Virkki, 1978).

Na superfamília Scarabaeoidea, indivíduos machos com sistema de determinação sexual do tipo X0, tem sido encontrados em um pequeno número de espécies distribuídas em três subfamílias de Scarabaeidae: Scarabaeinae com uma espécie (*Copris fricator*), Melolonthinae com quatro espécies (*Aserica* sp.; *Apogonia* sp, nr. *Nigricans*; *Apogonia ferruginea*; *Apogonia* sp.) e Dynastinae com duas espécies (*Pentodon punctatus*; *Pentodon* sp.) (Yadav *et al.*, 1979).

Os sistemas cromossômicos múltiplos de determinação sexual ocorrem em poucas espécies. Segundo White (1973), novos cromossomos sexuais derivados de translocações Robertsonianas entre um autossomo (A) e um X ou Y originais são designados como neo-Y (AY) ou neo-X (AX).

Na família Tenebrionidae, o gênero *Blaps* (Blaptini) tem se caracterizado por apresentar espécies com números elevados de cromossomos, fato este que pode está relacionado com a presença de complexos sistemas de determinação do sexo (Smith e Virkki, 1978; Vitturi *et al.*, 1996). Das 12 espécies estudadas, apenas *Blaps judeorum* $2n=19$ (8II+2X1Y) apresentou número diplóide inferior a 30 cromossomos. Por sua vez, *Blaps gibba* mostrou o maior número cromossômico com $2n=38$ (15II+7X1Y). Após a análise comparativa dessas duas espécies com outras 10 do gênero, Vitturi *et al.* (1996) chegaram à conclusão de que os rearranjos responsáveis pelo mecanismo cromossômico múltiplo de determinação sexual podem ser devido a eventos de translocações. Foi sugerido que o envolvimento de vários cromossomos X na determinação sexual de *B. gigas* e *B. gibba* pode ser devido a trocas de seqüências terminais de DNAr entre o Y e vários dos autossomos originais. Essa hipótese é suportada pelo fato da existência de uma conexão terminal-terminal entre os cromossomos sexuais durante a prófase meiótica dessas duas espécies, e que essas regiões terminais dos cromossomos sexuais possuam proteínas de afinidade com o nitrato de prata (argirofílicas) (Vitturi *et al.*, 1996).

Na família Chrysomelidae a subfamília Alticinae merece destaque devido à ocorrência de sistemas sexuais múltiplos e de cromossomos sexuais gigantes.

Segundo Virkki (1970; 1985), os cromossomos sexuais gigantes, que muitas vezes correspondem a 50% do tamanho total do genoma das espécies da subtribo Oedionychina (Alticinae), poderiam ser derivados a partir de translocações dos cromossomos X e Y para um par de autossomos, como aqueles observados em *Phyllotrupes* (Alticinae, Systemini), ou a partir de fusões entre cromossomos Y provenientes de sistemas de determinação sexual múltiplo do tipo X_nY_n , dependendo da relação evolutiva das subtribos.

II.3. Caracterização Citogenética em Scarabaeoidea

Os estudos citogenéticos realizados em Coleoptera representam cerca de 1% das espécies descritas taxonomicamente, apesar da grande quantidade de seus representantes e de ser considerada a mais ampla ordem dentro da classe Insecta. De forma geral, os coleópteros apresentam cromossomos metacêntricos de tamanho pequeno ou médio que quando comparados a cromossomos de representantes de outras ordens, como por exemplo, Orthoptera, são consideravelmente menores e menos acessíveis para análise cariotípica (Smith e Virkki, 1978; Mesa *et al.*, 1982).

Segundo Smith e Virkki (1978), o tamanho dos cromossomos varia entre as diferentes famílias estudadas e também com relação à fase na qual foi mensurado. Na família Chrysomelidae (Cerambycoidea) o tamanho varia de 1,8 a 3,9 μm , em representantes de Cucujidae (Cucujoidea) varia de 1,2 a 3,9 μm e em Scarabaeidae (Scarabaeoidea) tem sido descrita uma variação que vai de 0,3 a 3,0 μm . O tamanho 0,3 μm , encontrado nessa última família, é considerado o menor comprimento cromossômico dentro da ordem. Além desses aspectos, nesse grupo de organismos também é comum ocorrer variação de tamanho dos cromossomos dentro do cariótipo, como pode ser observado nas espécies *Walterianella venusta* (Chrysomelidae) na qual o cromossomo X mede 39,0 e o y 20,0 μm e em *Passalus punctinger* (Passalidae) com o autossomo A1 medindo 4,8 e o A2 3,6 μm . Também têm sido observados cariótipos assimétricos, que podem originar cariótipos simétricos através de sucessivas fusões cêntricas (Smith e Virkki, 1978).

Na maioria das espécies que representam a superfamília Scarabaeoidea o número cromossômico e o sistema de determinação sexual mais freqüente é $2n=20, Xy_p$, com meiofórmula $9II+Xy_p$. Cariótipo esse considerado primitivo, e a partir do qual os rearranjos cromossômicos tem originado cariótipos derivados (Smith e Virkki, 1978). Possíveis variações são provenientes de uma evolução cariotípica envolvendo, principalmente, cinco tipos de rearranjos diferentes que ocorreram nesta superfamília: 1) fusão X-autossomo; 2) fusão autossomo-

autossomo; 3) perda do cromossomo y; 4) fissão cêntrica em autossomos e 5) mudanças na morfologia cromossômica devido à ocorrência de inversões (Yadav e Pillai, 1979).

Variações do número cromossômico foram verificadas em várias famílias, como por exemplo, em Scarabaeidae ($2n=8$ a $2n=30$), Lucanidae ($2n=10$ a $2n=26$) e Passalidae ($2n=16$ a $2n=36$) (Smith e Virkki, 1978; Cabral-de-Mello *et al.*, 2006). Scholtz, (1990) analisando espécies da família Lucanidae observou as seguintes variações no número diplóide e no mecanismo sexual: $2n=10$, neoXY (Lucaninae: tribo Dorcini), $2n=18$, Xy_p (Syndesinae: Sinodendrini), $2n=20$, Xy_p (Aesalinae) e $2n=26$, Xy_r (Lucaninae). Em Passalidae, as duas subfamílias estudadas citogeneticamente (Passalinae e Aulacocyclinae) apresentam variação do número diplóide e do mecanismo sexual em representantes de suas tribos. O número diplóide em Proculini (Passalinae) varia de $2n=16$ a $2n=36$ com mecanismo neoXY ou de $2n=22$ a $2n=36$ com mecanismo Xy. Por outro lado, a tribo Passalini (Passalinae) apresenta, para a maioria das espécies, o cariótipo $2n=25$, X0, tendo apenas uma espécie do gênero *Passalus* apresentando variação para $2n=31$, X0 (Smith e Virkki, 1978; Mesa e Martins, 1986; Cabral-de-Mello *et al.*, 2006). Na subfamília Aulacocyclinae, o cariótipo encontrado foi $2n=30$, XY (*Aulacocyclus edentulus*) com cromossomos meta-submetacêntricos (Mesa *et al.*, 1978).

Na família Glaresidae, o gênero *Glaseris*, com relação a seus caracteres morfológicos e cariótipo $2n=20$, Xy_p , tem sido considerado como o mais primitivo para a superfamília Scarabaeoidea. No entanto, Pleocomidae, Geotrupidae, Glaphyridae e Hybosoridae, menos primitivas, também apresentam, predominantemente, cariótipo com $2n=20$, Xy_p (Smith e Virkki, 1978; Scholtz, 1990).

Na família Geotrupidae, apesar da maioria de seus representantes apresentarem $2n=20$, Xy_p , as espécies *Anoplotrupes stercorosus* e *Thorectes intermedius* assim como outras oito espécies da subfamília Geotrupinae apresentaram variação para $2n=22$, XY (Yadav *et al.*, 1979; Vitturi *et al.*, 1999; Colomba *et al.*, 2004).

A família Trogidae está constituída por três gêneros: *Trox*, *Omorgus* e *Polymoncus* (Scholtz, 1986). Para esses gêneros, o cariótipo até agora descrito também corresponde a $2n=20, Xy_p$, contudo, quanto à posição do centrômero ocorre diferenças. Em *Trox* todos os cromossomos são metacêntricos, enquanto no gênero *Omorgus* os cromossomos são todos acrocêntricos. No gênero *Polymoncus* a espécie *P. auricensis* apresenta um cariótipo com a maioria dos cromossomos metacêntricos e apenas um ou dois pares de acrocêntricos. Em 1990, Scholtz sugeriu que este cariótipo observado em *P. auricensis* constituído também por cromossomos acrocêntricos tenha sua origem a partir de cariótipos metacêntricos que sofreram alterações cromossômicas do tipo inversões pericêntricas. Provavelmente, esta espécie seja o representante da ocorrência de um cariótipo intermediário dentro da família Trogidae.

II.3.1. Família Scarabaeidae

A família Scarabaeidae possui destaque dentro de Scarabaeoidea, por ser a mais representativa, sendo constituída por aproximadamente 91% de todos os escarabeóides. Os representantes dessa família estão, atualmente, agrupados em 12 subfamílias e distribuídos em mais de 2.300 gêneros e 27.800 espécies no mundo. Essa distribuição mundial pode ser representada geograficamente por 362 gêneros e 4.706 espécies localizadas na região Neotropical (Costa, 2000), e aproximadamente 125 gêneros e 1.700 espécies com ocorrência para região Neártica (Ratcliffe *et al.*, 2002). Para o Brasil, especificamente, há registro de aproximadamente 204 gêneros e 1.777 espécies (Costa *et al.*, 1988).

Do ponto de vista citogenético, Scarabaeidae, apresenta um pouco mais que 355 espécies estudadas (Smith e Virkki, 1978; Yadav e Pillai, 1979; Vidal e Nocera, 1984; Colomba *et al.*, 1996 e 2000a; Moura *et al.*, 2003; Bione *et al.*, 2005 a, b). Essa família é considerada bastante conservada quanto ao número e morfologia cromossômica, possuindo, predominantemente, em mais de 50% das espécies analisadas, número cromossômico de $2n=20$, mecanismo sexual do tipo

Xy_p (meiofórmula 9II+Xy_p) e cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e acrocêntricos (Smith e Virkki, 1978; Vidal, 1984; Martins, 1994).

As variações do número diplóide descritas para Scarabaeidae são da ordem de 2n=8,XY (*Eurysternus caribaeus*) a 2n=30, Xy (*Autoserica assamensis*) (Yadav *et al.*, 1979; Cabral-de-Mello *et al.*, 2006). Quanto aos sistemas de determinação sexual, esta família possui sete tipos: Xy_p, XY_p, Xy_r, XY, Xy, neoXY e X0. Destes sete mecanismos sexuais, o XY_p foi descrito recentemente por Moura *et al.* (2003) para a espécie *Phyllophaga* (*Phyllophaga*) *aff capillata* (Melolonthinae).

Em Scarabaeidae, dentre suas subfamílias, destacam-se, Melolonthinae, Rutelinae, Dynastinae e Scarabaeinae como sendo as mais estudadas e com uma maior diversidade cariotípica. Pouca variação no número diplóide e morfologia cromossômica tem sido observada em subfamílias de Scarabaeidae, sendo encontrado com maior frequência o cariótipo 2n=20,Xy_p (9II+Xy_p) (Smith e Virkki, 1978; Yadav *et al.*, 1979). Entretanto, em Scarabaeinae tem sido encontrados alguns exemplos de variação cariotípica, como 2n=8,XY (*Eurysternus caribaeus* – Eurysternini); 2n=12,neoXY (*Phanaeus* – Coprini); 2n=14,Xy_p (*Copris lugubris* – Coprini); 2n=18,Xy_p (*Canthon*, *Cantochilum* – Scarabaeini); 2n=21,X0 (*Copris fricator* – Coprini); 2n=20,Xy_r (*Onthophagus catta* – Scarabaeini) e 2n=24,Xy_p (*Oniticellus spinipes* - Scarabaeini) (Smith e Virkki, 1978; Yadav *et al.*, 1979).

Dynastinae apresenta uma variação do número diplóide de 2n=12 em *Oryctes nasicornis* (Prowazek, 1902, apud Smith e Virkki, 1978) a 2n=20 *Phyllognathus dionysius* (Yadav e Pillai, 1977) e cinco diferentes tipos de sistemas de determinação sexual: Xy_p, X0, XY, Xy e neoXY ou até mesmo podendo ocorrer a ausência do bivalente sexual, como observado em *Eophileurus chinensis* (Phileurini) (Kudoh *et al.*, 1973). Duas espécies de Dynastinae (*Phileurus* sp. e *Strategus validus*), duas de Rutelinae (*Macraspis morio* e *Pelidnota sumptuosa*) e uma de Scarabaeinae (*Phanaeus ensifer*), foram analisadas por Martins (1994). Dessas, a única que apresentou o cariótipo típico para a família foi *S. validus*. *Phileurus* sp. (2n=14,Xy_p) e *P. sumptuosa* (2n=18,neoXY) apresentaram redução

do número diplóide, enquanto *M. morio* e *P. ensifer* mantiveram o número diplóide $2n=20$, embora o mecanismo sexual tenha sido alterado para neoXY.

Em Rutelinae tem sido encontrada uma variação de quatro números diplóides ($2n=16, 18, 20$ e 22) e três mecanismos de determinação sexual (Xy_p , Xy_r e neoXY). Nessa subfamília destaca-se o gênero *Adoretus*, como o mais conservado, apresentando dez espécies analisadas e todas com o mesmo cariótipo $2n=22, Xy_p$ (Smith e Virkki, 1978; Yadav e Pillai, 1979).

Estudos cromossômicos em espécies neotropicais de Rutelinae (*Geniates borelli*, *Macraspis festiva* e *Pelidnota pallidipennis*) e de Dynastinae (*Ligyrrus ebenus*, *Cyclocephala paraguayensis marginella*, *Cyclocephala cearae* e *Strategus surinamensis hirtus*) mostraram a ocorrência de cariótipo $2n=20, Xy_p$ com cromossomos meta-submetacêntricos na maioria das espécies. O número cromossômico foi reduzido para $2n=18$, sem alteração do mecanismo sexual em *C. cearae* e *M. festiva* (Moura *et al.*, 2003; Bione *et al.*, 2005b).

Vidal (1984) analisou 90 espécies de coleópteros provenientes da Argentina. Destas, 29 espécies pertenciam à família Scarabaeidae, estando distribuídas da seguinte forma: subfamília Scarabaeinae ou Coprinae (16 espécies, incluindo *Dichotomius anaglypticus* e *Dichotomius bosqui*), Dynastinae (11 espécies), Rutelinae (uma espécie, *Macraspis dichroa ssp. cribata*) e Cetoninae (uma espécie, *Euphoria lurida*). Esta análise cariotípica revelou a presença do cariótipo primitivo, $2n=20, Xy_p$ com meiofórmula $9II+Xy_p$, em 15 espécies. Seis espécies mostraram redução do número diplóide para $2n=18$ ($8II+Xy_p$) incluindo *Dichotomius anaglypticus*. *Phanaeus* (*Phanaeus*) *menelas* e *Phanaeus* (*P.*) *imperator* apresentaram alteração no mecanismo sexual para $2n=20, neoXY$ ($9II+neoXY$). Outras constituições cariotípicas foram observadas, $2n=20, Xy$ (*Bolbites onitoides*), $2n=14, neoXY$ (*Deltochilum valgum*) e $2n=16, neoXY$ (*Arcophileurus vervex vervex*). Três espécies apresentaram $2n=20$ sem mecanismo sexual observável, incluindo *Dichotomius bosqui*. Em *Anomiopsoides heteroclyta* com $2n=18$, também não foi possível observar o mecanismo sexual.

Melolonthinae, por sua vez, apresenta variação cromossômica com os seguintes números diplóides: $2n=18, 19, 20, 21$ e 30 com mecanismos sexuais do

tipo Xy, Xy_p, XY_p, Xy_r, X0 e neoXY. Nessa subfamília foram estudadas 47 espécies, destas cerca de 57,5% (27 espécies) apresentaram número diplóide 2n=20 e mecanismo Xy_p (Smith e Virkki, 1978; Yadav e Pillai, 1979; Moura *et al.*, 2003). O número diplóide 2n=30 (*Autoserica assamensis*) encontrado nessa subfamília é considerado o maior para a família Scarabaeidae (Yadav *et al.*, 1979).

Segundo Moura *et al.* (2003), *Lyogenys fuscus*, *Phyllophaga (Phitalus) vestita* e *Phyllophaga (Phyllophaga) aff capillata* (Melolonthinae) possuem número diplóide 2n=20 e cromossomos meta-submetacêntricos. Nessas espécies, o mecanismo sexual encontrado foi Xy_p, com exceção de *Phyllophaga (P.) aff capillata* que apresentou o sistema XY_p. Embora as espécies de *Phyllophaga* apresentem o mesmo número diplóide, são facilmente separadas pela diferença no tamanho dos cromossomos, particularmente dos sexuais.

Segundo Yadav e Dange (1991), apenas, 12 espécies de Sericinae são conhecidas do ponto de vista cromossômico e todas apresentam 2n=20, com exceção de *Ophalmoserica karafutoensis*, (2n=18) e *Aserica* sp., (2n=19) que sofreram redução do número cromossômico.

A subfamília Scarabaeinae com aproximadamente 96 espécies estudadas citogeneticamente e distribuídas em 12 tribos é considerada menos conservada em Scarabaeidae. Dentre as espécies estudadas cerca de 66,3%, ou seja, 63 espécies apresentam 2n=20 (37 com mecanismo Xy_p; 2 com XY; 6 com Xy; 4 com Xy_r; 2 com neoXY; e 12 com mecanismos não identificados). *Oniticellus spinipes* possui 2n=24, Xy_p. *Copris fricator* apresenta 2n=21, X0. *Copris hispanus cavolinii* mostrou número diplóide 2n=19 (sem mecanismo sexual descrito). Vinte espécies apresentaram 2n=18 (17 com mecanismo Xy_p; *Gymnopleurus sinuatus* com XY; e duas com sistemas não identificados), 5 com 2n=14 (4 com mecanismo Xy_p e uma com neoXY) e 4 espécies com 2n=12 (três com mecanismo neoXY; e uma com XY) e uma com 2n=8,Xy (*Eurysternus caribaeus*) (Smith e Virkki, 1978; Yadav e Pillai, 1979; Vidal, 1984; Martins, 1994; Colomba *et al.*, 1996; Bione, 2004; Cabral-de-Mello *et al.*, 2006).

Em Scarabaeinae, o gênero *Onthophagus* está bem representado com aproximadamente 27 espécies analisadas, das quais 25 possuem número diplóide

de $2n=20$ e duas $2n=18$ (*Onthophagus* sp.3 e *Onthophagus* sp.4). *Cantharsius* é um gênero que apresenta oito espécies estudadas, sendo sete com número diplóide $2n=20$ e *Cantharsius* sp. com $2n=18$. Nas espécies *Isocopris inhiata* e *Diabroctis mimas*, descritas por Bione *et al.* (2005a), o cariótipo encontrado foi $2n=18$, Xy_p com cromossomos meta-submetacêntricos em *I. inhiata* e $2n=20$, Xy_p também com cromossomos meta-submetacêntricos (pares 1, 2, 3, 4 e 7), além da presença de cromossomos acrocêntricos (pares 5, 6, 8 e 9) em *D. mimas*. Dentro do gênero *Dichotomius* cinco espécies foram estudadas cariotipicamente. *D. carolinus* e *D. bosqui* apresentaram $2n=20$ e *D. anaglypticus* (= *D. bos*), *D. bicuspis* e *D. semiaeneus* apresentaram $2n=18$. Com exceção de *D. bosqui*, que não teve seu mecanismo sexual determinado, todas as outras apresentaram mecanismo do tipo Xy_p (Smith e Virkki, 1978; Vidal, 1984; Bione, 2004). Os gêneros *Phanaeus* e *Copris* apresentaram redução do número diplóide para $2n=12$ e $2n=14$, respectivamente (Smith e Virkki, 1978; Yadav e Pillai, 1979). A Tabela 1 apresenta dados cromossômicos de representantes da subfamília Scarabaeinae.

Tabela 1. Números diplóides e sistemas de determinação sexual em espécies distribuídas nas 12 tribos da subfamília Scarabaeinae.

Tribo / Espécie	Número diplóide	Meiofórmula	Referência
Ateuchini			
<i>Canthidium breve</i>	18	8II+Xy _p	Vidal, 1984
Canthonini			
<i>Canthochilum andyi</i>	18	8II+Xy _p	Yadav e Pillai, 1979
<i>Canthochilum hispidum</i>	18	8II+Xy _p	Yadav e Pillai, 1979
<i>Canthochilum histeroides</i>	18	8II+Xy _p	Yadav e Pillai, 1979
<i>Canthochilum oakleyi</i>	18	8II+Xy _p	Yadav e Pillai, 1979
<i>Canthon indigaceus</i>	18	8II+Xy _p	Yadav e Pillai, 1979
<i>Canthon muticus</i>	20	9II+Xy _p	Vidal, 1984
<i>Canthon septemmaculatus</i>	20	9II+Xy _p	Vidal, 1984
<i>Canthon staigi</i>	20	9II+Xy _p	Bione, 2004
<i>Deltochilum valgum</i>	14	6II+neoXY	Vidal, 1984
Coprini / Dichotomiini			
<i>Cantharsius molossus</i>	20	9II+Xy _p	Yadav e Pillai, 1979
<i>Cantharsius pithecius</i>	20	9II+Xy _p	Yadav e Pillai, 1979
<i>Cantharsius prox. sagax</i>	20	9II+Xy _p	Yadav e Pillai, 1979
<i>Cantharsius sagax</i>	20	9II+Xy _p	Yadav e Pillai, 1979
<i>Cantharsius sp1</i>	20	9II+Xy _r	Yadav e Pillai, 1979
<i>Cantharsius sp2</i>	18	8II+Xy _p	Yadav e Pillai, 1979
<i>Cantharsius sp3</i>	20	9II+Xy _p	Yadav e Pillai, 1979
<i>Chironitis furcifer</i>	20	9II+Xy	Yadav e Pillai, 1979
<i>Copris fricator</i>	21	10II+X0	Yadav e Pillai, 1979
<i>Copris tullius</i> = <i>Copris fricator</i>	20	?	Yadav e Pillai, 1979
<i>Copris hispanus cavolinii</i>	19	?	Yadav e Pillai, 1979
<i>Copris incertus</i>	14	6II+Xy _p	Yadav e Pillai, 1979
<i>Copris lugubris</i>	14	6II+Xy _p	Yadav e Pillai, 1979
<i>Copris lunaris</i>	20	?	Yadav e Pillai, 1979
<i>Copris sp</i>	14	6II+Xy _p	Yadav e Pillai, 1979
<i>Dichotomius anaglypticus</i> = <i>D. bos</i>	18	8II+Xy _p	Vidal, 1984
<i>Dichotomius bicuspis</i>	18	8II+Xy _p	Bione, 2004
<i>Dichotomius bosqui</i>	20	?	Vidal, 1984
<i>Pinotus carolinus</i> = <i>D. carolinus</i>	20	9II+Xy _p	Smith e Virkki, 1978
<i>Dichotomius semiaeneus</i>	18	8II+Xy _p	Bione, 2004

<i>Helicopriss bucephalus</i>	20	9II+Xy	Yadav e Pillai, 1979
<i>Isocopriss inhiata</i>	18	8II+Xy _p	Bione, 2004
Eucranini			
<i>Anomiopsides heteroclyta</i>	18	?	Vidal, 1984
<i>Eucranium arachnoides</i>	18	8II+Xy _p	Vidal, 1984
<i>Glyphoderus sterquilinus</i>	18	8II+Xy _p	Vidal, 1984
Eurysternini			
<i>Eurysternus caribaeus</i>	8	4II+XY	Cabral-de-Mello et al., 2006
Gymnopleurini			
<i>Gymnopleurus cyaneus</i>	20	9II+Xy _p	Yadav e Pillai, 1979
<i>Gymnopleurus koengii</i>	20	9II+Xy _p	Yadav e Pillai, 1979
<i>G. sinuatus</i> = <i>Paragymnopleurus sinuatus</i>	18	8II+Xy _p	Yadav e Pillai, 1979
Oniticellini			
<i>Oniticellus fulvus</i> = <i>Euonticellus fulvus</i>	20	?	Smith e Virkki, 1978
<i>O. pallipes</i> = <i>Euonticellus pallipes</i>	20	9II+Xy _p	Yadav e Pillai, 1979
<i>O. spinipes</i> = <i>Tioniocellus spinipes</i>	24	11II+Xy _p	Yadav et al., 1979
Onitini			
<i>Bubas bison</i>	20	9II+Xy	Colomba et al., 1996
<i>Onitis philemon</i>	20	9II+Xy _p	Yadav e Pillai, 1979
<i>Ontherus sulcator</i>	20	9II+Xy _p	Vidal, 1984
Ontophagini			
<i>Caccobius schreberi</i>	20	9II+Xy _p	Yadav e Pillai, 1979
<i>Onthophagus bonasus</i> = <i>Digitonthophagus bonasus</i>	20	9II+Xy _r	Yadav e Pillai, 1979
<i>Onthophagus catta</i> = <i>Digitonthophagus gazella</i>	20	9II+Xy _r	Yadav e Pillai, 1979
<i>Onthophagus andalusicus italicus</i>	20	?	Yadav e Pillai, 1979
<i>Onthophagus crassus</i>	20	9II+Xy _p	Yadav e Pillai, 1979
<i>Onthophagus dama</i>	20	9II+Xy _r	Yadav e Pillai, 1979
<i>Onthophagus fracticornis</i>	20	?	Yadav e Pillai, 1979
<i>Onthophagus furcatus</i>	20	9II+Xy	Yadav e Pillai, 1979
<i>Onthophagus hecate</i>	20	9II+Xy _p	Yadav e Pillai, 1979
<i>Onthophagus hirculus</i>	20	9II+Xy _p	Vidal, 1984
<i>Onthophagus illyricus</i>	20	9II+Xy	Yadav e Pillai, 1979

<i>Onthophagus lemur</i>	20	?	Yadav e Pillai, 1979
<i>Onthophagus marginicollis</i>	20	9II+Xy _p	Smith e Virkki, 1978
<i>Onthophagus mopsus</i>	20	9II+Xy _p	Yadav e Pillai, 1979
<i>Onthophagus m. gracilicornis</i>	20	9II+Xy _p	Smith e Virkki, 1978
<i>Onthophagus nuchicornis</i>	20	?	Smith e Virkki, 1978
<i>Onthophagus ovatus</i>	20	?	Yadav e Pillai, 1979
<i>Onthophagus pennsylvanicus</i>	20	9II+Xy _p	Yadav e Pillai, 1979
<i>Onthophagus punctatus</i>	20	?	Yadav e Pillai, 1979
<i>Onthophagus quaestus</i>	20	9II+Xy _p	Yadav e Pillai, 1979
<i>Onthophagus ramosellus</i>	20	9II+Xy _p	Yadav e Pillai, 1979
<i>Onthophagus rufescens</i>	20	9II+Xy _p	Smith e Virkki, 1978
<i>Onthophagus ruficapillus</i>	20	9II+Xy	Yadav e Pillai, 1979
<i>Onthophagus sp1</i>	20	9II+Xy _p	Yadav e Pillai, 1979
<i>Onthophagus sp2</i>	20	9II+Xy _p	Yadav e Pillai, 1979
<i>Onthophagus sp3</i>	18	8II+Xy _p	Yadav e Pillai, 1979
<i>Onthophagus sp4</i>	18	8II+Xy _p	Yadav e Pillai, 1979
<i>Onthophagus taurus</i>	20	9II+Xy _p	Yadav e Pillai, 1979
<i>Onthophagus vacca</i>	20	?	Yadav e Pillai, 1979
<i>Onthophagus verticicornis</i>	20	?	Yadav e Pillai, 1979
Phanaeini			
<i>Bolbites ornitoides</i>	20	9II+Xy _p	Vidal, 1984
<i>Phanaeus ensifer</i> = <i>Coprophanaeus ensifer</i>	20	9II+XY	Martins, 1994
<i>Dendropaemon viripenne</i>	20	9II+Xy _p	Bione, 2004
<i>Diabroctis mimas</i>	20	9II+Xy _p	Bione, 2004
<i>Gromphas lacordairei</i>	20	9II+Xy _p	Vidal, 1984
<i>Oruscatus davus</i>	20	?	Vidal, 1984
<i>Phanaeus carnifex</i> = <i>Sulcophanaeus carnifex</i> ou <i>Phanaeus vindex</i>	12	5II+neoXY	Yadav e Pillai, 1979
<i>Phanaeus daphnis</i>	12	5II+neoXY	Smith e Virkki, 1978
<i>Phanaeus igneus</i>	12	5II+XY	Yadav e Pillai, 1979
<i>Phanaeus mexicanus</i>	12	5II+neoXY	Smith e Virkki, 1978
<i>Phanaeus aff. yucatanus</i>	14	6II+Xy _p	Smith e Virkki, 1978
<i>Sulcophanaeus imperator</i>	20	9II+neoXY	Vidal, 1984
<i>Sulcophanaeus menelas</i>	20	9II+neoXY	Vidal, 1984
<i>Tetramereia convexa</i>	20	9II+Xy _p	Bione, 2004

Scarabaeini			
<i>Scarabaeus laticollis</i>	20	9II+Xy	Yadav e Pillai, 1979
<i>Scarabaeus sacer</i>	20	9II+Xy _p	Yadav e Pillai, 1979
<i>Scarabaeus semipunctatus</i>	20	9II+Xy _p	Yadav e Pillai, 1979
Sisyphini			
<i>Sisyphus schaefferi</i>	20	9II+Xy	Yadav e Pillai, 1979

II.4. Padrão de Distribuição e Qualificação da Heterocromatina Constitutiva

A organização genômica de eucariotas envolve dois requisitos que se opõem. O primeiro, e talvez o principal, mostra que o genoma desses organismos precisa ser fortemente compactado a fim de poder ser confinado no núcleo; o genoma teria virtualmente um metro (m) de comprimento e estaria compactado dentro do núcleo a um diâmetro que seria mensurado em micrometros (μm). O segundo é a maquinaria celular que facilita esta compactação e precisa ser flexível o suficiente para permitir o pronto acesso a este DNA por uma enorme variedade de fatores essenciais para transcrição, reparo, correta replicação e segregação. Classicamente, a cromatina foi subdividida em dois domínios: heterocromatina e eucromatina (Horn e Peterson, 2006).

A heterocromatina foi descrita originalmente, através de estudos citológicos, como uma fração do genoma que permanece condensada durante todo o ciclo celular de plantas e animais e difere da eucromatina que passa por processos de condensação e descondensação em fases específicas do ciclo. Este componente genômico pode ser diferenciado em dois tipos: 1) heterocromatina constitutiva (HC) que se caracteriza por apresentar pouca densidade de genes, grande quantidade de DNA repetitivo, replicação tardia, baixa frequência de recombinação e localização preferencial em regiões cromossômicas pericentroméricas, embora também possa ocupar áreas intersticiais ou terminais de cromossomos de eucariotas superiores (Renauld e Gasser, 1997; Wallrath, 1998; Henikoff, 2000; Redi *et al.*, 2001; Grewal e Elgin, 2002) e 2) heterocromatina facultativa que é idêntica estruturalmente à eucromatina. Ela se distingue da HC por envolver cromossomos inteiros, como na inativação de um dos cromossomos X de fêmeas de mamíferos ou grupos de cromossomos dentro de um cariótipo, como na inativação de todo o complemento cromossômico de origem paterna de alguns homópteros (John, 1988).

A HC pode ser descrita em duas formas com características próprias: a α -heterocromatina e a β -heterocromatina. A α -heterocromatina é o tipo mais comum e consiste de repetições *in tandem* de uma sequência simples, correspondendo à

heterocromatina detectada pelo bandejamento C nos cromossomos dos eucariotas superiores. Os blocos de α -heterocromatina podem ser polimórficos, variando consideravelmente de tamanho dentro de uma espécie ou entre espécies diferentes. A β -heterocromatina é um tipo mais raro de HC rica em retrotransposons e tem sido observada nos cromossomos de *Drosophila* e do hamster *Mesocricetus auratus* onde forma fibras de cromatina mais ou menos desorganizadas que replicam tardiamente e se posicionam entre a α -heterocromatina e a eucromatina dessas espécies (Holmquist *et al.*, 1998).

A heterocromatina é um dos componentes cromossômicos mais dinâmicos, estando sujeita a variações quantitativas e qualitativas, bem como a mudanças em sua localização (Morescalchi, 1977; King e John, 1980). Essas variações são mais facilmente demonstráveis do que alterações na eucromatina. Isso ocorre, principalmente, devido à introdução de técnicas como o bandejamento C, que oferece uma maneira simples de evidenciar regiões heterocromáticas. O bandejamento C representa a técnica mais largamente utilizada em plantas e animais, desde a sua descrição, na década de 70.

O uso de colorações com fluorocromos base-específicos também são de grande utilidade para diferenciar a heterocromatina corada pelo bandejamento C quanto à sua composição de bases. Essa técnica tem revelado diferenças dentro da heterocromatina, pois permite uma qualificação desse material quanto à composição de bases AT e GC (Schweizer, 1976; 1981). O uso desses corantes fluorescentes têm contribuído de forma significativa para um estudo mais preciso das regiões heterocromáticas coradas pelo bandejamento C.

Os fluorocromos, em conjunto com outras substâncias não fluorescentes, as quais funcionam como contracorantes, como, por exemplo, a Distamicina (DA), permitem qualificar esse material heterocromático quanto à composição de pares de base e podem ser divididos em dois grupos principais. O primeiro é formado por aqueles fluorocromos específicos para interagir com as regiões do DNA ricas em Adenina e Timina (AT) como a Quinacrina, Hoechst 33258 e o 4'6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) e o segundo grupo, pelos que mostram afinidade para a Guanina

e Citosina (GC) como a Cromomicina A₃ (CMA₃) e a Mitramicina (MM) (Schweizer, 1981).

Coleoptera representa um grupo de insetos com resultados significativos quanto ao padrão e a distribuição de heterocromatina constitutiva no cariótipo. Dados de bandeamento C têm revelado que a HC autossômica em coleópteros tem localização preferencial na área pericentromérica. Entretanto, podem ocorrer blocos, com menor frequência em áreas intersticiais e teloméricas (Angus, 1982, 1983).

Dentre as diferentes famílias de Coleoptera, além de Scarabaeidae, Cincidelidae, Coccinellidae, Curculionidae, Tenebrionidae e Carabidae também tem sido estudadas quanto ao padrão e distribuição da heterocromatina constitutiva. Em Cincidelidae foram analisados dois representantes do gênero *Odontocheila*. O bandeamento C em *O. confusa* e *O. noticordis* revelou blocos de HC localizados pericentromericamente em todos os cromossomos. Em *O. noticordis* os pares 5 e 6 apresentaram, adicionalmente, bandas terminais (Proença *et al.*, 2002).

Em Coccinellidae as espécies *Epilachna paenulata* e *Eriopis connexa* tiveram seus cariótipos bandeados e revelaram a presença de bandas pericentroméricas em todos os cromossomos. Na espécie *E. paenulata*, a HC representa cerca de 15% do complemento total do conjunto haplóide (Drets *et al.*, 1983; Maffei *et al.*, 2000). Em Curculionidae, a espécie *Otiorhynchus corvus* apresentou um padrão de HC com blocos localizados na região paracentromérica de todos os cromossomos, incluindo o X. No Y foi observado um segmento de heterocromatina relativamente grande quando relacionado ao seu pequeno tamanho e a sua forma de ponto (Holecová *et al.*, 1997).

Em Scarabaeidae ocorre predominância de um conservado padrão de HC localizado na região pericentromérica. A análise de três espécies da subfamília Coprinae (=Scarabaeinae) através do bandeamento C (*Glyphoredus sterquilinus*, *Eucranium arachnoides* e *Anomiopsoides heteroclyta*) revelou nas duas primeiras uma grande diferença quanto a localização dos blocos de HC, com *G. sterquilinus* mostrando blocos pericentroméricos restritos aos pares 1, 3, 4, 5, 6, 7 e 8,

enquanto que em *E. arachnoides* os pares 2, 3, 5 e 7 apresentaram blocos pericentroméricos e os pares 4, 6, 8 e o cromossomo X exibiram blocos pericentroméricos e teloméricos. O par 1 e o y não apresentaram blocos heterocromáticos. Em *A. heteroclyta* toda a HC está restrita na região pericentromérica (Vidal e Nocera, 1984).

Em *Gymnopleurus sturmi* o padrão de distribuição da HC, em machos e fêmeas, é bastante complexo. Foram observados blocos de HC localizados nas regiões centroméricas e pericentroméricas dos pares 1, 2 e 4 em ambos os sexos. O par 3, nos machos, apresentou blocos nas regiões pericentroméricas. Enquanto que nas fêmeas, este par apresentou blocos nas regiões pericentroméricas e centroméricas. Os pares 6, 7, 8, 9 e o cromossomo X mostraram blocos nas regiões subtelocêntricas nos dois sexos. O par 5 apresentou blocos centroméricos e o cromossomo Y não apresentou blocos de HC (Colomba *et al.*, 2000a).

Em *Bolbites ornitoides*, representante da tribo Phanaeini (Scarabaeinae), o bandejamento C revelou apenas um par autossômico com bloco pericentromérico, os outros oito pares restantes apresentaram um dos braços totalmente heterocromático (Vidal, 1980 *apud* Virkki, 1983). Na espécie *Bubas bison* da tribo Onitini (Scarabaeinae), o padrão da HC revelou a presença de blocos localizados nas regiões pericentroméricas e distais ou teloméricas de oito pares de cromossomos e os dois pares restantes do cariótipo apresentaram blocos apenas nas regiões pericentroméricas (Colomba *et al.*, 2006).

As espécies *Isocopris inhiata* e *Diabroctis mimas* (Scarabaeinae) apresentaram um padrão de bandejamento C com grandes blocos paracentroméricos observados em todo o braço curto dos pares 3, 4, 5 e 7 de *I. inhiata* e nos pares 2, 4 e 7 de *D. mimas*. Esse padrão caracteriza cromossomos difásicos, isto é, cromossomos com um braço totalmente heterocromático e o outro eucromático, em ambas as espécies. Adicionalmente, *I. inhiata* mostrou blocos teloméricos no par 6 e *D. mimas* nos pares 1 e 3. Os cromossomos X destas espécies foram quase que totalmente heterocromáticos (Bione *et al.*, 2005a).

Na subfamília Dynastinae (Scarabaeidae), o bandeamento C em *Enema pan*, *Lygerus ebenus* e *Strategus surinamensis hirtus* revelou grandes blocos de HC pericentroméricos em todos os cromossomos. O padrão de HC pericentromérico foi a única marcação para *E. pan* diferente do observado para as outras espécies. A espécie *L. ebenus* também mostrou um cromossomo pequeno com um bloco terminal. Em *L. ebenus* e em *S. s. hirtus* os cromossomos X apresentaram-se quase inteiramente heterocromáticos. A espécie *S. s. hirtus* também apresentou ausência de HC em um bivalente autossômico (Vidal e Giacomozzi, 1978; Bione *et al.*, 2005b). Em *Geniates borelli*, *Macraspis festiva* e *Pelidnota pallidipennis* (Rutelinae) foi observado um padrão semelhante aos descritos para Dynastinae, com a presença de grandes blocos de HC pericentroméricos e os cromossomos X quase que totalmente heterocromáticos (Bione *et al.*, 2005b). Nos melolontíneos *Phyllophaga* (*Phytalus*) *vestita*, *Phyllophaga* (*Phyllophaga*) *aff. capillata* e *Lyogenys fuscus* também foram observados blocos pericentroméricos de HC (Moura *et al.*, 2003).

O padrão de banda C em sete espécies de Tenebrionidae (*Hegeter grancanariensis*, *Pacchyla sublunata*, *Tentyria grossa*, *Misolampus goudoti*, *Tenebrio molitor*, *Gonocephalum patrulele* e *Gonocephalum rusticum*) mostrou blocos de HC proeminentes na região pericentromérica de todos os cromossomos. *Misolampus goudoti* apresentou, adicionalmente, pequenas bandas teloméricas, enquanto em *Gonocephalum patrulele*, o cromossomo X foi totalmente heterocromático. Quanto à quantidade de heterocromatina detectada pelo bandeamento C, ocorreram variações, como nas espécies *P. sublunata* e *G. rusticum* que apresentaram 25% e na espécie *M. goudoti* foi detectado 58% de heterocromatina no cariótipo (Juan e Petitpierre, 1989).

Variabilidade no padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva tem sido encontrada em representantes da família Carabidae. As espécies *Acupalpus elegans* e *Bembidion minimum* foram analisadas por Rozek e Rudek (1992). *A. elegans* (2n=42,XY) possui blocos de HC pericentroméricos em quase todos os cromossomos. Os autossomos 1, 4, 11, 12, 16 e 17 foram heteromórficos quanto à localização de blocos C positivos e os pares 10, 13 e 19, assim como o braço

longo dos pares 14 e 15 foram completamente heterocromáticos. O cromossomo X mostrou um bloco de HC envolvendo o centrômero e se estendendo pelo braço curto e metade do braço longo. O cromossomo Y foi totalmente heterocromático. Em *B. minimum* ($2n=24,XY$), os blocos de HC apresentaram-se localizados em regiões terminal e subterminal ocorrendo em ambos os braços da maioria dos cromossomos. Padrão diferencial de distribuição de HC também foi descrito para três outras espécies desta família. *Amara aenea* ($2n=35,XO$), *Calathus erratus* ($2n=37,XO$) e *Harplus picipennis* ($2n=37,XO$) apresentaram grandes blocos pericentroméricos de HC, com ampla variação quanto ao tamanho, quando os cariótipos foram comparados. Adicionalmente, em *A. aenea* o par 1 apresentou pequeno bloco intersticial de HC e um grande bloco distal (Rosek, 1995).

Estudos mais refinados, com o uso de fluorocromos, na qualificação da HC ainda são escassos na ordem Coleoptera, e estão mais concentrados nas famílias Tenebrionidae e Scarabaeidae. Em Tenebrionidae, a espécie *Tribolium confusum* possui blocos de HC pericentroméricos em todos os cromossomos do complemento, correspondendo entre 40 e 45% do comprimento dos cromossomos mitóticos. Esses blocos coraram fortemente com o DA/DAPI, demonstrando que essas regiões são ricas em pares de bases AT (Plohl *et al.*, 1993). *Misolampus goudoti*, por sua vez, apresentou cerca de 58% do seu material cromossômico positivo para o bandeamento C. A coloração com CMA₃ mostrou uma fraca marcação nas regiões centroméricas, quando comparadas com as regiões distais dos cromossomos. Enquanto que a coloração com o DA/DAPI mostrou uma fraca diferenciação longitudinal nos cromossomos (Pons *et al.*, 1993). Em *Tenebrio molitor*, apesar da grande quantidade de bases AT em seu DNA satélite, tanto o CMA₃ quanto o DAPI revelaram pequenas marcações correspondentes aos blocos de heterocromatina observados pelo bandeamento C (Juan *et al.*, 1990).

Na família Scarabaeidae, poucas espécies foram estudadas com a tríplice coloração CMA₃/DA/DAPI. Em *Thorectes intermedius*, as bandas C foram positivas para o CMA₃ e negativas para o DAPI. A espécie *Macraspis festiva* mostrou uma HC predominantemente neutra, enquanto *Geniates borelli* e *Pelidnota pallidipennis* apresentaram uma HC rica em pares de base GC (CMA₃

+) e AT (DAPI +) na região pericentromérica de todos os cromossomos, respectivamente. Em todas as espécies ocorreu marcação com CMA₃ nas regiões organizadoras de nucléolos ativos (Vitturi *et al.*, 1999; Bione *et al.*, 2005b).

Moura *et al.* (2003) analisaram três espécies de Melolonthinae (Scarabaeidae) *Phyllophaga* (*Phytalus*) *vestita*, *Phyllophaga* (*Phyllophaga*) *aff capillata* e *Lyogenys fuscus* e observaram algumas diferenças quanto à composição da HC. Em *Phyllophaga* (*Phytalus*) *vestita* tanto o DAPI quanto o CMA₃ coraram todos os blocos da HC. Em *Phyllophaga* (*Phyllophaga*) *aff capillata* a HC mostrou-se negativa para o DAPI e apresentou bandas positivas com o CMA₃ em um dos autossomos e no bivalente sexual. Por outro lado, *Lyogenys fuscus* apresentou toda HC fortemente marcada pelo DAPI e nenhuma marcação com o CMA₃ foi observada. A tabela 2 apresenta os dados do padrão qualitativo da HC em Scarabaeidae.

Tabela 2. Padrão de qualificação da heterocromatina constitutiva em espécies de Scarabaeidae estudadas com o uso de fluorocromos base-específicos.

Gênero / Espécie	CMA ₃	DAPI	CMA ₃ / DAPI	NEUTRA	Referência
<i>Thorectes</i>					
<i>Thorectes intermedius</i>	x	0	0	0	Vitturi <i>et al.</i> , 1999
<i>Macraspis</i>					
<i>Macraspis festiva</i>	0	0	0	x	Bione <i>et al.</i> , 2005b
<i>Geniates</i>					
<i>Geniates borelli</i>	x	0	0	0	Bione <i>et al.</i> , 2005b
<i>Pelidinota</i>					
<i>Pelidinota pallidipennis</i>	0	x	0	0	Bione <i>et al.</i> , 2005b
<i>Phyllophaga</i>					
<i>Phyllophaga</i> (<i>Phytalus</i>) <i>vestita</i>	0	0	x	0	Vidal, 1984 Moura <i>et al.</i> , 2003
<i>Phyllophaga</i> (<i>Phyllophaga</i>) <i>aff capillata</i>	x	0	0	0	Moura <i>et al.</i> , 2003
<i>Lyogenys</i>					
<i>Lyogenys fuscus</i>	0	x	0	0	Moura <i>et al.</i> , 2003

II.5. Regiões Organizadoras de Nucléolos e sua Distribuição

As Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONs) ou constrições secundárias são sítios cromossômicos onde estão localizados genes responsáveis por produzir determinados tipos de RNA ribossomais (RNAr), os quais serão sintetizados e processados em pré-ribossomos existentes no nucléolo e mais tarde se tornarão parte de ribossomos maduros localizados no citoplasma. Durante a interfase, ocorre no núcleo a síntese do RNAr e o nucléolo é formado. Nos eucariotas são conhecidos quatro tipos diferentes de RNAr designados pelos seus respectivos coeficientes de sedimentação: 5S, 5,8S, 18S e 28S. Com exceção do 5S, todos os outros são transcritos pelos genes localizados nas RONs. Esses genes estão organizados *in tandem* formando unidades que originam o RNAr 45S precursor das formas 5,8S, 18S e 28S (Sumner, 1990).

A técnica de coloração pelo nitrato de prata (AgNO_3), desenvolvida por Goodpasture e Bloom (1975), tem permitido a visualização em diferentes organismos tanto dos nucléolos quanto das RONs, através do uso da microscopia óptica. A coloração AgNO_3 é a mais freqüentemente utilizada, devido à sua alta especificidade para marcar as proteínas associadas às RONs. É importante destacar que o material marcado por esse método de coloração corresponde a RONs funcionalmente ativas na intérfase anterior (Miller *et al.*, 1976).

As RONs podem variar quanto ao número e a distribuição, entre espécies diferentes ou dentro da mesma espécie. Estes padrões determinam quais cromossomos fazem parte da organização nucleolar auxiliando na caracterização cromossômica de diferentes espécies ou táxons. Nos casos onde mais de uma RON está presente, no mesmo complemento, nem sempre todas estão ativas em uma mesma célula. O processo de ativação pode ser ao acaso ou pode existir uma ativação diferencial que produz tipos distintos de RONs (Santos *et al.*, 1990).

Em Coleoptera e especificamente em Scarabaeidae, o número e a localização das RONs podem variar entre as espécies. Quanto ao padrão de distribuição dentro do complemento, tem sido observado quatro localizações de RONs: 1) RONs localizadas em um par autossômico; 2) RONs presentes em mais

de um par autossômico; 3) RONS presentes tanto em autossomos como no X e 4) RONS restritas ao bivalente sexual localizadas no cromossomo X (Vitturi *et al.*, 1999; Colomba *et al.*, 2000a,b; Moura *et al.*, 2003; Vitturi *et al.*, 2003; Colomba *et al.*, 2004; Bione *et al.*, 2005a,b).

Estudos sobre a localização das RONS em Coleoptera ainda são escassos. Entretanto, os dados obtidos têm indicado que um par de autossomos como organizador de nucléolos pode estar amplamente distribuído nessa Ordem (Drets *et al.*, 1983; Virkki, 1983; Postiglioni e Brum-Zorrilla, 1988). Algumas famílias como: Carabidae, Chrysomelidae, Meloidae e principalmente Scarabaeidae merecem destaque, quanto ao estudo das RONS, dentro da Ordem. De La Rúa *et al.* (1996) analisaram três gêneros de Carabidae (*Carabus*, *Calosoma* e *Ceroglossus*) e observaram que todas as espécies mostraram o mesmo padrão de AgNO₃, revelando dois remanescentes nucleolares por núcleo. Quatro outros representantes dessa família pertencentes ao gênero *Trechus* (*T. latus*, *T. pilisensis*, *T. pulchellus* e *T. quadristriatus*) e dois ao gênero *Bembidium* (*B. lamprus* e *B. properans*) apresentaram, em células mitóticas, RONS localizadas em um par autossômico (Rozek, 1998a, 1998b). Em *Diabrotica speciosa* (Chrysomelidae, Galerucinae) o padrão observado pela coloração com AgNO₃ em representantes de três populações analisadas foi o mesmo, isto é, presença de RONS na região telomérica do braço curto do par 9 em todos os indivíduos estudados (Schneider *et al.*, 2002).

Células paquitênicas de *Epicauta atomaria* (Meloidae) mostraram que o nucléolo está associado ao sétimo par de autossomos. No tenebrionídeo *Palembus dermestoides*, foi observado a existência de duas RONS localizadas no terceiro e quarto pares de autossomos. Nessas duas espécies o bivalente sexual Xy_p também mostrou-se corado pelo nitrato de prata (Almeida *et al.*, 2000).

Em Scarabaeidae nas espécies *Geniates borelli*, *Macraspis festiva* e *Pelidnota pallidipennis* (Rutelinae) foram visualizadas, a marcação dos remanescentes nucleolares localizados nos bivalentes Xy_p. Essas marcações foram observadas até o final do paquíteno ou início do diplóteno. Além disso, o bivalente sexual mostrou afinidade pela prata durante diferentes fases da meiose

e também ocorreu forte marcação dos cinetócoros no início da prófase I até a anáfase II (Bione *et al.*, 2005b).

As espécies *Isocopris inhiata* e *Diabroctis mimas* (Scarabaeinae) apresentaram marcações AgNO_3 que correspondem a proteínas argirofílicas presentes nos bivalentes sexuais do tipo Xy_p . Essas marcações foram observadas desde o início da prófase até o final do paquíteno ou início do diplóteno. A prata também detectou blocos similares áqueles visualizados pelo bandejamento C em diferentes fases da meiose (Bione *et al.*, 2005a).

Em Melolonthinae, a análise de *Phyllophaga (Phytalus) vestita*, *Phyllophaga (Phyllophaga) aff capillata* e *Lyogenys fuscus*, a partir da coloração com nitrato de prata, mostrou a presença de remanescentes nucleolares em somente um par de cromossomos nessas espécies. Em *Phyllophaga (Phyllophaga) aff capillata* a RON ativa foi observada em um autossomo. Por outro lado, em *Phyllophaga (Phytalus) vestita* e *Lyogenys fuscus* as RONS foram observadas nos bivalentes sexuais (Moura *et al.*, 2003).

Em Coleoptera, a coloração com nitrato de prata mostra afinidade pela heterocromatina constitutiva. Isso ocorre devido à presença de proteínas argirofílicas distribuídas nesse material, geralmente localizadas nas regiões cinetocóricas. Essa relação de afinidade foi destacada por Vitturi *et al.* (1999), ao analisar a espécie *Thorectes intermedius* e observar que toda heterocromatina corada pelo bandejamento C e com o fluorocromo CMA_3 possuía grande afinidade pela prata.

II.5.1. Uso Associado da FISH com AgNO_3 na Análise Cromossômica

O uso da técnica de Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH), em plantas e animais, tem permitido a localização e o mapeamento de seqüências específicas de DNA como, por exemplo, os genes que produzem RNAr. Em Coleoptera esta técnica tem sido usada em conjunto com a coloração por nitrato de prata (AgNO_3), na análise das RONS em algumas espécies. Os resultados obtidos com sondas de

DNAr podem diferir dos da coloração por nitrato de prata por revelar o número de cromossomos que carregam as RONS independente do estado de ativação dessas, isto é, enquanto que a AgNO_3 marca apenas as regiões de DNAr ativas, a FISH marca todas as regiões, ativas ou inativas. A aplicação desses dois métodos é de fundamental importância em besouros da subordem Polyphaga na tentativa de elucidar o tipo de associação existente no sistema sexual Xy_p (Juan *et al.*, 1993; Gálán *et al.*, 1995; Petitpierre, 1996).

Em Tenebrionidae, *Misolampus goudoti* e *Tenebrio molitor* foram analisadas através da FISH com sonda de DNAr de *Drosophila melanogaster*. *M. goudoti* apresentou, em células de metáfases mitóticas, sítios ribossomais localizados em um par de autossomos. Na espécie *T. molitor* foram observados sítios localizados em diferentes autossomos e no bivalente sexual Xy_p . Contudo, com a coloração pelo nitrato de prata apenas o bivalente sexual foi marcado revelando, que apenas as RONS localizadas nestes cromossomos estavam ativas na interfase anterior (Juan *et al.*, 1993). No coccinelídeo *Olla v-nigrum* a FISH combinada com a prata mostrou uma RON localizada no bivalente sexual Xy_p (Maffei *et al.*, 2001).

Em representantes da família Cincidelidae, a FISH tem revelado diferentes padrões de marcações. Em *Cincidela melancolica* (9II+XXXY) os resultados revelaram que os genes de DNAr estão localizados em um dos cromossomos X e no Y. Em contraste, *Cincidela paludosa* (7II+X0) apresentou uma RON localizada em um par de autossomos, enquanto que *Megacephala euphratica* (15II+X0) possui RONS localizadas em três pares de autossomos. Nessas espécies, os resultados obtidos com FISH estão de acordo com os obtidos pela coloração com nitrato de prata (Gálán *et al.*, 1995). Em *Megacephala whelani*, hibridização durante mitose e meiose, mostrou que os genes de DNAr estão localizados em três pares de autossomos (Gálán e Hudson, 1999). Por sua vez, nas espécies *Odontocheila confusa* e *Odontocheila noticordes* a FISH revelou a presença de sítios ribossomais em apenas um par de autossomos. Resultados estes também similares aos obtidos pela coloração com nitrato de prata indicando que nestas espécies todas as RONS estão ativas (Proença *et al.*, 2002).

Em Carabidae, dezenove espécies do gênero *Zabrus* ($2n=47-63$) foram estudadas com sondas de DNAr 18S. Foram observadas variações tanto no número como na intensidade dos sinais das RONS. *Zabrus (Iberozaerus) curtus neglectus*, *Z. (Iberozaerus) angustatus* e *Z. (Iberozaerus) theveneti* apresentaram duas marcações. Em *Zabrus (Iberozaerus) vasconicus*, *Z. (Iberozaerus) ambiguus* e *Z. (Iberozaerus) castroi* doze marcações pela FISH foram detectadas. A intensidade dos sinais também revelaram variações, que se apresentaram desde pequenos pontos até braços cromossômicos inteiros (Sanches-Gea *et al.*, 2000).

Em Scarabaeidae, algumas espécies tem sido analisadas através da FISH. Em representantes da subfamília Scarabaeinae, como *Gymnopleurus sturmi* foram observados sítios ribossomais nas regiões heterocromáticas dos bivalentes 18 e 22 com sinais de hibridização apresentando-se polimórficos quanto ao tamanho (Colomba *et al.*, 2000a). Em *Isocoprins inhiata* e *Diabroctis mimas*, os dados obtidos pela FISH revelaram que sítios de DNAr 28S estão presentes em um bivalente autossômico em *I. inhiata*, e em 2 bivalentes autossômicos e no cromossomo X em *D. mimas*. Nos autossomos de ambas as espécies, estes sítios foram localizados em cromossomos médios (Bione *et al.*, 2005a).

Na subfamília Melolonthinae, *Phyllophaga (Phytalus) vestita*, *Phyllophaga (Phyllophaga) aff capillata* e *Lyogenys fuscus* tiveram seus dados obtidos, com a coloração por AgNO_3 , confirmados pela FISH. Nos bivalentes meióticos, a FISH com sondas ribossômicas 18S e 25S (RNAr) mostrou apenas um sinal de hibridização em cada uma das espécies. *Phyllophaga (Phyllophaga) aff capillata* apresentou uma RON em um bivalente autossômico pequeno, enquanto que nas outras duas espécies o X é o organizador nucleolar (Moura *et al.*, 2003).

Em *Geniates borelli*, *Macraspis festiva* e *Pelidnota pallidipennis* (Rutelinae-Scarabaeidae) os dados da coloração com AgNO_3 coincidiram com os obtidos pela FISH e permitiram a identificação dos sítios de DNAr no cromossomo X das três espécies analisadas (Bione *et al.*, 2005b).

Colomba *et al.* (2006) analisaram uma espécie pertencente à subfamília Scarabaeinae e representante da tribo Onitini (*Bubas bison*) e observaram através da FISH com a utilização da sonda 18S (DNAr) sinais de hibridização nas regiões

heterocromáticas teloméricas dos cromossomos. A análise mostrou que estes sítios estão localizados em oito cromossomos do complemento. Esses resultados também foram confirmados por marcações em núcleos interfásicos. Este padrão representa o número máximo de sítios de DNAr encontrado dentro da subfamília Scarabaeinae.

III. Referências Bibliográficas

- Almeida, M.C.; Zacaro, A.A. and Cella, D.M. 2000. Cytogenetic analysis of *Epicauta atomaria* (Meloidae) and *Palembus dermestoides* (Tenebrionidae) with Xy_p sex determination system using standard staining, C-bands, NOR and synaptonemal complex microspreading techniques. *Hereditas*. 133:147-157.
- Angus, R.B. 1982. Separation of two species standing as *Helophorus aquaticos* (L.) (Coleoptera, Hydrophilidae) by banded chromosome analysis. *Syst. Entomol.* 7:265-281.
- Angus, R.B. 1983. Separation of *Helophorus grandis*, *maritimus* and *occidentalis* sp. n. (Coleoptera, Hydrophilidae) by banded chromosome analysis. *Syst. Entomol.* 8:1-13.
- Bione, E.G. 2004. Citogenética em representantes da subfamília Scarabaeinae (Coleoptera-Scarabaeidae). 142pp. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Depto. de Genética.
- Bione, E.G.; Camparoto, M.L. and Simões, Z.L.P. 2005a. A study of the constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions of *Isocoprins inhiata* and *Diabroctis mimas* (Coleoptera: Scarabaeidae, Scarabaeinae) using C-banding, AgNO₃ staining and FISH techniques. *Genet. Mol. Biol.* 28 (1): 111-116.
- Bione, E. G., Moura, R. C., Carvalho, R. and Souza, M. J. 2005b. Karyotype, C- and fluorescence banding pattern, NOR location and FISH study of five Scarabaeidae (Coleoptera) species. *Genet. Mol. Biol.* 28: 376-381.
- Browne, J. and Scholtz, C.H. 1999. A phylogeny of the families of Scarabaeoidea (Coleoptera). *Systematic Entomology* 24: 51-84.
- Cabral-De-Mello, D.C.; Silva, F.A.B. and Moura, R.C. 2006. Karyotype characterization of *Eurysternus caribaeus*: The smallest diploid number among Scarabaeidae (Coleoptera: Scarabaeoidea). *Micron* (In press).
- Colomba, M. S.; Montereisino, E.; Vitturi, R. and Zunino, Z. 1996. Characterization of mitotic chromosomes of the scarab beetles *Glyphoderus sterquilinus* (Westwood) and *Bubas bison* (L.) (Coleoptera: Scarabaeidae) using conventional and banding techniques. *Biol. Zent. Bl.* 115: 58-70.
- Colomba, M. S.; Vitturi, R. and Zunino, M. 2000a. Karyotype analyzes, banding, and fluorescent *in situ* hybridization in the Scarab beetle *Gymnopleurus sturmi* McLeady (Coleoptera, Scarabaeoidea, Scarabaeidae). *The Journal of Heredity* 91:260-264.
- Colomba, M. S.; Vitturi, R. and Zunino, M. 2000b. Chromosome analysis and rDNA FISH in the stag beetle *Dorcus parallelipipedus* L. (Coleoptera: Scarabaeoidea: Lucanidae).
- Colomba, M.S.; Vitturi, R.; Volpe, N.; Lannino, A. and Zunino, M. 2004. Karyotype, banding and rDNA FISH in scarab beetle *Anoplotrupes stercorosus* (Coleoptera: Scarabaeoidea: Geotrupidae). *Description and comparative analysis. Micron.* 35:717-720.
- Colomba M. S.; Vitturi, R.; Libertini, A.; Gregorini, A. and Zunino, M. 2006. Heterochromatin of the scarab beetle, *Bubas bison* (Coleoptera:

- Scarabaeidae) II. Evidence for AT-rich compartmentalization and a high amount of rDNA copies. *Mícron*. 37:47-51.
- Cooper, J.B. 1983. A review of the Nearctic genera of family Scarabaeidae (exclusive of the subfamilies Scarabaeinae and Geotrupinae) (Coleoptera), with an evaluation of computer generated keys. 1121f. Doctoral Thesis, Department of Biology, Carleton University. Ottawa, Ontario, Canadá.
- Costa, C.; Vanin, S.A. and Casari-Chen, S.A. 1988. Larvas de coleópteros do Brasil. Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, p.282, 165pls.
- Costa, C. 2000. Estado de conocimiento de los coleoptera Neotropicales. In: Hacia un Proyecto CYTED para el inventario y estimación de la diversidad Entomologica en Iberoamérica: PRIBES-2000. Martín-Piera, F, J. Morrone & A. Melic (Eds) m3m: Monografías Tercer Milenio vol.1 SEA, Zaragoza, p.99-114.
- Crowson, R.A. 1967. The natural classification of the families of Coleoptera. Middlesex: E. W. Classey. 213pp.
- Crowson, R.A. 1981. The biology of the Coleoptera. London (Academic Press).802pp.
- De La Rúa, P.; Serrano, J.; Hewitt, M. and Gálian, J. 1996. Physical mapping of rDNA genes in the ground beetle *Carabus* and related genera (Carabidae: Coleoptera). *J. Zoo. Syst. Evol. Research* 34:95-101.
- Drets, M. E. and Stoll, M. 1974. C-banding and non-homologous association in *Gryllus argentinus*. *Chromosoma*. 48:367-390.
- Drets, M. E.; Corbella, E.; Panzera, F. and Folle, G. A. 1983. A-banding and non-homologous association II. The "parachute" Xy_p sex bivalent and the behaviour of heterochromatic segments in *Epilachna paenulata*. *Chromosoma*. 88: 249-255.
- Fazolin, M.; Argolo, V.M. and Estrela, J.L.V. 1997. Criação massal do besouro africano para manejo integrado da mosca dos chifres. Comunicado Técnico, n.78, Embrapa, ISSN 0100-8668, p.1-6.
- Frota-Pessoa, O. and Aratangy, L.R. 1968. The degeneration of the Y chromosome. *Rev. Bras. Pesq. Med. Biol.* 1:241-244.
- Fumi, O.; Masataka, G. S. and Toru, S. 2002. Sex determination in *Bombyx mori*. *Current Science*. 83(4):466-471.
- Gálian, J.; Serrano, J.; De La Rúa, P.; Petitpierre, E. and Juan, C. 1995. Localization and activity of rDNA genes in tiger beetles (Coleoptera: Cincidelinae). *Heredity*. 74:524-530.
- Gálian, J. and Hudson, P. 1999. Cytogenetic analysis of Australian tiger beetles (Coleoptera: Cincidelidae): chromosome number, sexs-determining system and localization of rDNA genes. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 37:1-6.
- Goodpasture, C. and Bloom, S.E. 1975. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma*. 53:37-50.
- Grewal, S.I.S. and Elgin, S.C.R. 2002. Heterochromatin: new possibilities for the inheritance of structure. *Current Opinion in Genet. & Devel.* 12:178-187.
- Gullan, P.J. and Cranston, P.S. 2000. The Insects: An outline of Entomology. 2 ed. Oxford: Blackwell Science. 476pp.

- Halffter, G. and Favila, M.E. 1993. The Scarabaeinae (Insecta: Coleoptera): an animal group for analyzing, inventoring and monitoring biodiversity in tropical rainforest and modified landscapes. *Biology International*. 27:15-21.
- Henikoff, S. 2000. Heterochromatin function in complex genomes. *Biochim Et Biofhy's Acta*. 1470:01-08.
- Holecová, M.; Rozek, M. and Lachowska, D. 1997. C-banded karyotype of *Otiorhynchus corvus* Boheman 1843 (Coleoptera, Curculionidae). *Cytologia*. 62:209-212.
- Holmquist, G.P.; Kapitonov, V.V. and Jurka, J. 1998. Mobile genetic elements, chiasmata, and the unique organization of beta-heterochromatin. *Cytogenet. Cell. Genet.* 80:113-116.
- Horn, P.J. and Peterson, C.L. 2006. Heterochromatin assembly: a new twist on an old model. *Chromosome Research*. 14:83-94.
- Jones, K.W. 1989. Inactivation phenomena in the evolution and functions of sex chromosomes. In: *Evolutionary mechanisms in sex determination* (Wachtel, S.S. Ed.) Fla: Crc Press, Boca Raton, Pp 69-90.
- John, B. 1988. The biology of heterochromatin. In: *Heterochromatin molecular and structural aspects* (Verma, R.S.) Cambridge University Press, Cambridge, Mass. Pp:1-147.
- Juan, C. and Petitpierre, E. 1989. C-Banding and DNA content in seven species of Tenebrionidae (Coleoptera). *Genome*. 32:834-839.
- Juan, C.; Gonsálvez, J. and Petitpierre, E. 1990. Improving beetle karyotype analysis: restriction endonuclease banding of *Tenebrio Molitor* chromosomes. *Heredity*. 65:157-162.
- Juan, C.; Pons, J. and Petitpierre, E. 1993. Localization of tandemly repeated DNA sequences in beetle chromosomes by fluorescent *in situ* hybridization. *Chromosome Res.* 1(3):167-174.
- King, M. and John, B. 1980. Regularities and restrictions governing C-band variation in Acridoid grasshopper. *Chromosoma (Berl.)*. 76:123-150.
- Kudoh, K.; Abe, A. and Saitoh, K. 1973. Chromosome studies of beetles. VI. A chromosomo survey of eleven species of the family Scarabaeidae. *Sci. Rep. Hirosaki Univ.* 20 P.88-95.
- Lanier, G.N. 1981. Cytotaxonomy of *Dendroctonus*. In: *Application of genetics and cytology in insect systematics and evolution* (Stock M.W. Ed.) Proc. Symp. Entomol. Soc. Am. Pp 33-65.
- Maffei, E.M.D.; Gasparino, E. and Pompolo, S.G. 2000. Karyotypic characterization by mitosis, meiosis and C-banding of *Eriopis connexa* Mulsant (Coccinellidae: Coleoptera: Polyphaga), A predator of insect pests. *Hereditas*. 132:79-85.
- Maffei, E.M.D.; Pompolo, S.G.; Campos, L.A.O. and Petitpierre, E. 2001. Sequential FISH analysis with rDNA genes and Ag-NOR banding in the lady beetle *Olla v-nigrum* (Coleoptera: Coccinellidae). *Hereditas*. 135:13-18.
- Manna, G.K. and Lahiri, M. 1972. Chromosome complement and meiosis in forty-six species of Coleoptera. *Chrom. Inf. Serv.* 13: 9-11.
- Martins, V. G. 1994. The chromosome of five species of Scarabaeidae (Polyphaga, Coleoptera). *Naturalia, São Paulo*, 19: 89-96.

- Mesa, A.; Ferreira, A. and Martins, V. 1977. Cytological diversity among Brazilian species of the genus *Passalus* (Coleoptera, Scarabaeoidea, Passalidae). 29^a Reunião Annual Soc. Brasil. Progr. Ciência, Fortaleza, Ce, 6-13.
- Mesa, A.; Ferreira, A. and Martins, V. 1978. The chromosomes of an Australian Passalid, *Aulacocyclus Edentulus* Macl. (Coleoptera, Passalidae, Aulacocyclinae). J. Aust. Ent. Soc. 17: 385-388.
- Mesa, A.; Ferreira, A. and Carbonell, C.S. 1982. Cariologia de los acridoideos neotropicales: estado actual de su conocimiento y nuevas contribuciones. Annis Soc. Ent. Fr (N.S). V.18 (4), P.507-526.
- Mesa, A. and Martins, V.G. 1986. Karyological diversity among Brazilian species of the genus *Passalus* (Coleoptera, Scarabaeoidea, Passalidae). Rev. Brasil. Genet. 9(4): 735-740.
- Miller, D.A.; Dev, V.G. Tantravahi, R. and Miller, O.J. 1976. Suppression of human nucleolus organizer activity in mouse-human somatic hybrid cells. Exp. Cell Res. 101:235-243.
- Morescalchi, A. 1977. Phylogenetic aspects of karyological evidence. In: Major patterns of vertebrate evolution (Hecht, M.K.; Goody, P.C. And Hecht, B.M. Eds) New York: Plenum Press Corporation. Pp:149-167.
- Moura, R. C.; Souza, M. J.; Melo, N. F. and Lira-Neto, A. C. 2003. Karyotypic characterization of representatives from Melolonthinae (Coleoptera: Scarabaeidae): Karyotypic analysis, banding and fluorescent in situ hybridization (FISH). Hereditas 138: 200-206.
- Nikolajev, G.V. 1993. The discovery of a penticorn beetle (Coleoptera: Lucanidae) from the Upper Cretaceous of Kasakstan. Selvinia, 1: 89-92.
- Ohno, S. 1967. Sex chromosomes and sex-linked genes. Monographs on Endocrinology, 1. Springer, Berlin-Heidelberg-New York.
- Petitpierre, E. 1996. Molecular cytogenetics and taxonomy of insects, with particular reference to the Coleoptera. Int. J. Insect Morphol & Embryol. 25:115-133.
- Plohl, M.; Lucijanac-Justic, V. and Ugarkovic, D. 1993. Satellite DNA and heterochromatin of four beetle *Tribolium confusum*. Genome. Vol. 36:467-475.
- Pons, J.; Petitpierre, E. and Juan, C. 1993. Characterization of the heterochromatin of the darkling beetle *Misolampus goudoti*: cloning of two satellite DNA families and digestion of chromosomes with restriction enzymes. Hereditas. 119:179-185.
- Postiglioni, A. and Brum-Zorrilla, N. 1988. Non-relationship between nucleolus and sex chromosomes system Xy_p in *Chelymorpha variabilis* Boheman (Coleoptera: Chrysomelidae). Genetica. 77:134-141.
- Proença, S.J.R.; Serrano, A.R.M. and Collares-Pereira, M.J. 2002. Cytogenetic variability in genus *Odontocheila* (Coleoptera, Cincidelidae): karyotypes, C-banding, NORs and localization of ribosomal genes de *O. confusa* and *O. nodicornis*. Genetica. 114:237-245.
- Prowazek, S. 1902. Spermatologische studien. II. Arb. Zool. Inst. Univ. Wien 13: 223-236.
- Ratcliffe, B.C.; Jameson, M.L. and Smith, A.B.T. 2002. Scarabaeidae. In: Arnett, Jr.R.H.; Thomas, M.C.; Skelley, P.E.; Frank J.H. American beetles,

- Polyphaga: Scarabaeoidea through Curculionoidea. Ed. Crc Press Llc, V.2, P.39-81.
- Redi, C.A.; Garagna, S.; Zacharias, H.; Zuccotti, M. and Capanna, E. 2001. The other chromatin. *Chromosoma*. 110:136-147.
- Renauld, H. and Gasser, S.M. 1997. Heterochromatin: A meiotic matchmaker? *Trends Cell. Biol.* 7(5):201-205.
- Rozek, M. 1998a. C-bands and NORs on chromosome in four species of the genus *Trechus* Clairv. (Coleoptera, Carabidae). *Caryologia*. 51:189-194.
- Rozek, M. 1998b. C-bands and NORs on chromosome of *Bembidion lampos* (Herbst) and *Bembidion properans* (Steph.) (Coleoptera, Carabidae). *Cytologia*. 63:317-321.
- Rozek, M. and Rudek, Z. 1992. Karyotype analysis and C-banding pattern in two species of Carabidae (Coleoptera, Carabidae). *Fol. Biol. (Kraków)*. 40 (1-2): 47-52.
- Rozek, M. 1995. C-banding patterns in chromosomes of three species of Carabid beetle (Coleoptera, Carabidae). *Fol. Biol. (Kraków)*. 43:35-40.
- Sanches-Gea, J.F.; Serrano, J. and Gálian, J. 2000. Varyability in rDNA loci in Iberian species of the genus *Zabrus* (Coleoptera: Carabidae) detected by fluorescence in situ hybridization. *Genome*. 43:22-28.
- Santos, J.; Sentis, C.; García-Rodríguez, J. and Fernández-Piqueras, J. 1990. latent NORs in the species *Picnogaster Cucullata* (Orthoptera). *Heredity*. 65:7-10.
- Schneider, M.C.; Artoni, R.F. and Almeida, M.C. 2002. Cytogenetic analysis of 3 populations of *Diabrotica Speciosa* (Chrysomelidae, Galerucinae): constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions. *Cytologia*. 67:281-287.
- Scholtz, C.H. 1986. Phylogeny and systematics of the trogidae (Coleoptera: Scarabaeoidea). *Systematic Entomology* 11: 355-363.
- Scholtz, C.H. 1990. Phylogenetic trends in the Scarabaeoidea. *Journal of Natural History* 24: 1027-1066.
- Schweizer, D. 1976. Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. *Chromosoma (Berl.)* 58: 307-324.
- Schweizer, D. 1981. Counterstain-enhanced chromosome banding. *Human Genet.* 57:1-14.
- Singh, L.; Purdon, I.F. and Jones, K.W. 1976. Satellite DNA and evolution of sex chromosomes. *Chromosoma*. 59:43-62.
- Smith, S.G. 1950. The cytotaxonomy of Coleoptera. *Can. Entomol.* 82: 58-68.
- Smith, S.G. and Virkki, N. 1978. Coleoptera. In: John, B. *Animal cytogenetics*. Borntraeger, Berlin, Stuttgart, P.366.
- Sola, L.; Monaco, P.J. and Rasch, E.M. 1990. Cytogenetics of bisexual/unisexual species of *Poecilia*. 1. C-bands, Ag-NOR polymorphism, and sex chromosomes in three populations of *Poecilia latipinna*. *Cytogenet. Cell. Genet.* 53:73-80.
- Sumner, A.T. 1990. Chromosome banding. Unwin Hyman Ed. (London) 39-68 Pps.
- Vaz-de-Mello, F.Z. 2000. Estado atual de conhecimento dos Scarabaeidae s. str. (Coleoptera: Scarabaeoidea) do Brasil. In *PRIBES 2000*, Martín-Piera, Morrone and Melic (Eds.) pp 183-195.

- Vidal, O. R. and Giacomozzi, R.O. 1978. Los cromosomas de la subfamilia Dynastinae (Coleoptera, Scarabaeidae). II. Las bandas C en *Enema pan* (Fabr.). Physis (Buenos Aires) 38 (94):113-119.
- Vidal, O. R. 1984. Coleoptera from Argentina. Genetica 65: 235-239.
- Vidal, O. R. and Nocera, C. P. 1984. Citogenética de la tribu Eucranini (Coleoptera, Scarabaeidae). Estudios convencionales y con bandeado C. Physis 42:83-90.
- Virkki, N. 1967. Chromosome relationships in some North American scarabaeoid beetles with special reference to *Plecoma* and *Trox*. Cn. J. Genet. Cytol. 9: 107-125.
- Virkki, N. 1970. Sex chromosomes and karyotypes of the Alticinae (Coleoptera). Hereditas. 64:267-282.
- Virkki, N. 1983. Banding of *Oedionychna* (Coleoptera: Alticinae) chromosomes: C- and Ag-bands. J. Agric. Univ. Puerto Rico. 67:221-225.
- Virkki, N. 1985. The cytogenetic system of *Oedionychna* (Alticinae). First International Symposium on the Chrysomelidae. 3:489-497.
- Virkki, N.; Mazella, C. and Denton, A. 1991. Silver staining of the coleopteran Xy_p sex bivalent. Cytobios 67:45-63.
- Vitturi, R.; Catalano, E.; Sparacio, I. Colomba, M.S. and Morello, A. 1996. Multiple-chromosome sex systems in the darkling beetles *Blaps gigas* and *Blaps gibba* (Coleoptera, Tenebrionidae). Genetica 97:225-233.
- Vitturi, R.; Colomba, M.S.; Barbieri, R. and Zunino, M. 1999. Ribosomal DNA location in the scarab beetle *Thorectes Intermedius* (Costa) (Coleoptera: Geotrupidae) using banding and fluorescent *in-situ* hybridization. Chromosome Res. 7:255-260.
- Vitturi, R.; Colomba, M.S.; Volpe, N.; Lannino, A. and Zunino, M. 2003. Evidence for male XO sex-chromosome system in *Pentodon bidens punctatum* (Coleoptera: Scarabaeoidea: Scarabaeidae) with X-linked 18S-28S rDNA clusters. Genes Genet. Syst. 78:427-432.
- Wallrath, L.L. 1998. Unfolding the mysteries of heterochromatin. Curr. Opin. Genet. Dev. 8:147-153.
- Walther, T. and Frantisek, M. 1997. Sex chromosome differentiation in some species of Lepidoptera (Insecta). Chromosome Res. 5:283-291.
- White, M.J.D. 1973. Animal cytology and evolution. Third edition. Cambridge University. London, 961pp.
- Yadav, J.S. 1971. Karyological studies on the three species of Bruchidae (Coleoptera). Caryologia. 24:157-166.
- Yadav, J. S. and Pillai, R. K. 1977. Chromosome studies on four species of Dynastinae and Cetoniinae (Scarabaeidae: Coleoptera). Zoo. Anz. Jena. 198:47-52.
- Yadav, J. S. and Pillai, R. K. 1979. Evolution of karyotypes and phylogenetic relationships in Scarabaeidae (Coleoptera). Zool Anz Jena 202: 105-118.
- Yadav, J. S.; Pillai, R. K. and Karamjeet. 1979. Chromosome numbers of scarabaeidae (Polyphaga: Coleoptera). The Coleopterists Bulletin 33 (3): 309-318.
- Yadav, J.S. and Dange, M.P. 1991. Karyotypic studies on four species of Sericinae (Scarabaeidae: Coleoptera). The Nucleus 34 (3): 177-179.

IV. CAPÍTULO 1

**Análise cariotípica comparativa, bandeamento C e distribuição de RONS
entre três espécies do gênero *Dichotomius* (Coleoptera, Scarabaeidae,
Scarabaeinae)**

O manuscrito a seguir será
submetido à Revista Genetica
publicada na Holanda.

Análise cariotípica, bandeamento C e distribuição de RONS em três espécies do gênero *Dichotomius* (Coleoptera, Scarabaeidae, Scarabaeinae)

G.M. Silva^{1*}, D.C. Cabral-de-Mello^{1,2}, E.G. Bione³, R.C. Moura² & M.J. Souza¹.

¹Universidade Federal de Pernambuco/UFPE, Centro de Ciências Biológicas/CCB, Departamento de Genética, Recife, Pernambuco, Brasil.

²Universidade de Pernambuco/UPE, Instituto de Ciências Biológicas/ICB, Departamento de Biologia, Recife, Pernambuco, Brasil.

³Universidade de São Paulo/USP, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

*(Email: guilhermemessias@yahoo.com.br)

Palavras-chave: Besouro, Cariótipo, Heterocromatina, RONS.

Resumo

Cromossomos meióticos e mitóticos de *Dichotomius sericeus*, *D. nesus* e *D. semisquamosus* foram analisados através da técnica convencional, bandeamento C e coloração com nitrato de prata. Em *D. nesus* e *D. semisquamosus* foi usada hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sonda de DNAr 28S. As espécies analisadas apresentaram cariótipo assimétrico com $2n=18$, cromossomos meta-submetacêntricos e redução gradual de tamanho. O mecanismo sexual foi do tipo Xy_p , exceto em *D. sericeus* que apresentou o tipo Xy_r . A análise da heterocromatina constitutiva (HC) revelou blocos pericentroméricos em todos os cromossomos das três espécies. As regiões organizadoras de nucléolos (RONS) marcadas com nitrato de prata ($AgNO_3$) foram localizadas no bivalente sexual de *D. sericeus* e *D. nesus* e em autossomo de *D. semisquamosus*. Nessas duas últimas espécies, o uso da FISH com sonda de DNAr 28S confirmou os resultados obtidos com a coloração $AgNO_3$.

Introdução

Scarabaeidae pertence à subordem Polyphaga e apresenta aproximadamente 2.300 gêneros e 27.800 espécies (Costa, Vanin & Casari-Chen, 1988). Esta família representa os principais constituintes da coleopterofauna da região Neártica e Neotropical (Ratcliffe, Jameson & Smith, 2002), estando representados por 362 gêneros e 4.706 espécies localizadas na região Neotropical (Costa, 2000) e aproximadamente 125 gêneros e 1.700 espécies com ocorrência na região Neártica (Ratcliffe, Jameson & Smith, 2002). Para o Brasil, há registro de aproximadamente 204 gêneros e 1.777 espécies (Costa, 2000).

Dichotomius pertence à tribo Dichotomiini (Halffter & Matthews, 1966), que é bastante diversa e apresenta cerca de 30 gêneros e mais de 750 espécies distribuídas mundialmente. Essa distribuição é notadamente maior no novo mundo com mais de 600 espécies. *Dichotomius* é um gênero exclusivamente do novo mundo e possui aproximadamente 153 espécies descritas (Ratcliffe, Jameson & Smith, 2002). Para o Brasil estão registradas mais de 83 espécies (Vaz-de-Mello, 2000).

Apesar do elevado número de espécies descritas para Scarabaeidae, as análises citogenéticas ainda são escassas e em sua maioria estão restritas ao uso da análise convencional. Dados citogenéticos de escarabeídeos correspondem a aproximadamente 355 espécies, ou seja, um pouco mais de 1,27% das espécies descritas (Smith & Virkki 1978; Yadav, Pillai & Karamjeet, 1979; Vidal, 1984; Moura et al., 2003). Em Scarabaeidae predomina o número diplóide $2n=20$, mecanismo sexual do tipo pára-quedas (Xy_p) e cromossomos meta-submetacêntricos (Smith & Virkki, 1978; Vidal, 1984; Martins, 1994; Colomba et al., 1996; Colomba, Vitturi & Zunino, 2000a).

O uso de técnicas citogenéticas mais refinadas na superfamília Scarabaeoidea está restrito a poucas espécies pertencentes às famílias Scarabaeidae, Lucanidae e Geotrupidae. Em Lucanidae, além da caracterização convencional, a espécie *Dorcus parallelipipedus* foi estudada pelo método de FISH com sonda de DNAr, pelo uso de fluorocromos base-específicos e pela coloração

com nitrato de prata (AgNO_3). Em Geotrupidae, por sua vez, as espécies *Anoplotrupes stercorosus* e *Thorectes intermedius* foram analisadas pelo bandeamento C, pelo uso de fluorocromos base-específicos, pelo método de FISH e pela coloração AgNO_3 (Vitturi et al., 1999; Colomba, Vitturi & Zunino, 2000b; Moura et al., 2003; Colomba et al., 2004; Bione, Camparoto & Simões, 2005a).

Em geral, Scarabaeidae apresenta heterocromatina constitutiva (HC) localizada em regiões cromossômicas pericentroméricas. Adicionalmente, algumas espécies mostram HC em regiões intersticiais e/ou teloméricas (Moura et al., 2003; Bione, Camparoto & Simões, 2005a; Bione et al., 2005b). Quanto ao padrão de distribuição das regiões organizadoras de nucléolos (RONS), tem sido observado principalmente quatro tipos de localizações: 1) RONS localizadas em um par autossômico (*Isocoprins inhiata* e *Phyllophaga (Phyllophaga) aff capillata*); 2) RONS presentes em mais de um par autossômico (*Gymnospleurus sturmi* e *Bubas bison*); 3) RONS presentes tanto em autossomos como no X (*Diabroctis mimas*) e 4) RONS restritas ao bivalente sexual com localização no cromossomo X (*Phyllophaga (Phytalus) vestita*, *Lyogenys fuscus*, *Geniates borelli*, *Macraspis festiva*, *Pelidnota pallidipennis* e *Pentodon bidens punctatum*) (Colomba, Vitturi & Zunino, 2000a,b; Moura et al., 2003; Vitturi et al., 2003; Bione, Camparoto & Simões, 2005a; Bione et al., 2005b)

O presente trabalho teve como objetivo a caracterização cariotípica das espécies *Dichotomius sericeus*, *D. nisus* e *D. semisquamosus* (Scarabaeinae, Dichotomiini), através da análise convencional, bandeamento C, coloração com nitrato de prata e hibridização *in situ* fluorescente (FISH). As diferentes técnicas usadas permitiram uma distinção cromossômica entre as três espécies analisadas.

Material e Métodos

Neste trabalho foram estudados os cromossomos meióticos e mitóticos de machos do gênero *Dichotomius* (Hope, 1838), sendo 50 exemplares de *D. sericeus*, 15 de *D. nisus* e 18 de *D. semisquamosus*. *Dichotomius nisus* e *D. semisquamosus* foram coletados em Aldeia, no município de Paudalho (7° 53' 48" S, 35° 10' 47" W) e em Brejo Novo, município de Caruaru (08° 425' S, 035° 151' W) no Estado de Pernambuco e na cidade de Ribeirão Preto (21° 10' 39" S, 47° 48' 37" W), São Paulo. *Dichotomius sericeus* foi coletado, exclusivamente, nas localidades do Estado de Pernambuco, Brasil. As coletas foram realizadas nos anos de 2003 a 2006 com a utilização de armadilhas de solo do tipo "Pitfall".

Os indivíduos foram sacrificados e os testículos fixados em Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético) e armazenados em freezer. As preparações citológicas foram obtidas a partir da técnica clássica de esmagamento de folículos testiculares (Souza, 1991) e para a coloração convencional foi usada orceína lacto-acética a 2%. O bandeamento C foi realizado segundo a técnica de Sumner (1972). A coloração com nitrato de prata foi realizada segundo Rufas *et al.* (1987). A hibridização *in situ* fluorescente seguiu a metodologia descrita por Natarajan *et al.* (1998) e Sakamoto-Hojo *et al.* (1999). O fragmento de DNAr usado como sonda para detecção da RON foi obtido a partir do clone 28S com 473 pares de base, desenvolvida para *Apis mellifera* (GenBank número de acesso AJ302936). Este fragmento foi primeiramente amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR) e em seguida usado como molde para amplificar produtos biotinilados através de outra PCR. Para a detecção da sonda biotinilada foi utilizado o complexo fluoresceína-avidina.

Microscópio Leica e sistema de captura Cytovision acoplado ao microscópio Olympus BX51 foram usados para obtenção das fotomicrografias. Foram usados os filmes Kodak Imagelink, Asa 25 para as lâminas coradas convencionalmente, com AgNO₃ e C-bandeadas e o Kodak Kodacolor, Asa 400 para a FISH. As cópias fotográficas foram feitas em papel Kodabrome II RC Print F3 da Kodak. As

pranchas foram montadas e organizadas no programa CorelDRAW Graphics Suite 12.

As espécies foram identificadas pelo Dr. Sérgio Ide, Instituto Biológico, SP. O material identificado está mantido na coleção entomológica do Departamento de Biologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Pernambuco e no Departamento de Genética do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco.

Resultados

Coloração convencional

Dichotomius sericeus, *D. nisus* e *D. semisquamosus* apresentaram número diplóide de $2n=18$. A constituição cariotípica das três espécies foi bastante similar, com a ocorrência de cromossomos meta-submetacêntricos que decrescem em ordem gradativa de tamanho, com exceção do par 1 que foi notadamente maior quando comparado com outros cromossomos do complemento. Esta diferença de tamanho caracteriza assimetria cariotípica nas espécies (Fig. 1). Quanto ao sistema de determinação sexual, *D. sericeus* apresentou mecanismo do tipo Xy_r (meiofórmula $8II+Xy_r$) (Fig. 1b), enquanto que *D. nisus* e *D. semisquamosus*, apresentaram mecanismo do tipo Xy_p (meiofórmula $8II+Xy_p$), com o cromossomo X sendo de tamanho médio e o y diminuto, caracterizando um típico pára-quedas (Fig. 1e,f).

Bandeamento C, Coloração $AgNO_3$ e FISH

O padrão de distribuição de heterocromatina constitutiva (HC) observado nas três espécies revelou a presença de blocos pericentroméricos em todos os cromossomos do complemento (Fig. 2). Em *D. Semisquamosus*, os blocos de HC foram menores quando comparados com *D. sericeus* e *D. nisus* (Fig. 2b). O

padrão pericentromérico do bandejamento C permitiu observar cromossomos com dois braços no cariótipo destas espécies. O uso da coloração com nitrato de prata (AgNO_3) nas três espécies revelou massas amorfas correspondentes aos remanescentes nucleolares, associadas ao bivalente sexual em *D. sericeus* e *D. nisus* (Fig. 3a,c). Em *D. semisquamosus*, a marcação foi em um autossomo de tamanho médio e esse padrão foi confirmado pela FISH (Fig. 3e,f). As regiões cromossômicas correspondentes a HC também se apresentaram marcadas pela AgNO_3 em diferentes fases meióticas das espécies analisadas (Fig. 3b). O método de FISH usando sonda de DNAr confirmou o padrão de marcação das RONS em *D. nisus* e *D. semisquamosus* (Fig. 3d,f).

Discussão

Na subfamília Scarabaeinae, cerca de 15% das espécies analisadas cromossomicamente apresentam uma variação cariotípica com relação ao número diplóide e o mecanismo de determinação sexual ($2n=20, Xy_p$), considerado primitivo para a família Scarabaeidae (Yadav & Pillai, 1979; Martins, 1994; Colomba et al. 1996; Vitturi et al. 2003; Bione, Camparoto & Simões, 2005a; Bione et al., 2005b).

As três espécies de *Dichotomius* aqui analisadas, assim como *D. anaglypticus* (Vidal, 1984), *D. bicuspis* e *D. semiaeneus* (dados não publicados) apresentam cariótipo com $2n=18$ e cromossomos meta-submetacêntricos. O par 1 se destaca por seu grande tamanho em relação aos demais cromossomos do complemento, caracterizando uma assimetria cariotípica nessas espécies. A morfologia do par 1 sugere a ocorrência de mecanismo de inversão seguido de fusão cêntrica entre autossomos, ocasionando assim uma diminuição do número cromossômico $2n=20$ (considerado ancestral em Scarabaeidae) para $2n=18$. Alterações semelhantes tem sido descritas na literatura e estão incluídas dentro dos tipos de evolução cromossômica propostos para Coleoptera por Yadav & Pillai (1979). Por outro lado, *Pinotus carolinus* (= *Dichotomius carolinus*) e *D. bosqui* não

apresentaram redução do número diplóide para $2n=18$, permanecendo com $2n=20$ (Smith & Virkki, 1978; Vidal, 1984).

Dichotomius nisus e *D. semisquamosus* mostraram mecanismo sexual Xy_p aquiasmático, considerado primitivo e muito freqüente em Scarabaeidae, e também verificado em outras espécies de *Dichotomius* analisadas (Smith & Virkki, 1978; Yadav, Pillai & Karamjeet, 1979; Vidal, 1984). Em contraste, *D. sericeus* apresentou mecanismo sexual do tipo quiasmático Xy_r , pouco freqüente para Scarabaeidae e com cinco ocorrências na subfamília Scarabaeinae (*Catharsius* sp., *C. molosus*, *Onthophagus bonasus*, *O. catta* e *O. dama*), uma em Melolonthinae (*Autoserica* sp.) e quatro em Rutelinae (*Adorrhinyptia* sp., *Anomala lucens*, *Strigoderma protea* e *Ectinohoplia rufipes*) (Smith e Virkki, 1978; Yadav, Pillai & Karamjeet, 1979).

Dichotomius sericeus, *Dichotomius nisus* e *Dichotomius semisquamosus*, semelhante ao observado em outros Scarabaeidae, apresentaram padrão pericentromérico de localização da heterocromatina constitutiva (HC). Este padrão tem sido observado na maioria das espécies de coleópteros, e particularmente em Scarabaeidae (Rozek & Maryanska-Nadachowska, 1991; Rozek, 1992; Colomba, Vitturi & Zunino, 2000a,b; Moura et al., 2003; Bione, Camparoto & Simões, 2005a; Bione et al., 2005b). Entretanto, também tem sido observado nesta família localização de HC em outras regiões, como nos pares 4, 6, 8 e no cromossomo X de *Eucranium arachnoides* que exibiram blocos pericentroméricos e teloméricos. O par 1 e o cromossomo Y não apresentaram blocos de HC (Vidal & Nocera, 1984). Em *Gymnopleurus sturmi*, o padrão de distribuição da HC, em machos e fêmeas, é bastante complexo, com blocos heterocromáticos distribuídos em diferentes cromossomos e localizações quando os dois sexos foram comparados (Colomba, Vitturi & Zunino, 2000a). Um outro exemplo foi descrito em *Bubas bison* que apesar de mostrar um padrão pericentromérico de HC apresentou, adicionalmente, blocos distais e teloméricos em diferentes cromossomos (Colomba et al., 2006).

As espécies mostraram um grau de conservação com relação ao padrão pericentromérico de distribuição da HC. Contudo, em *D. semisquamosus* os

blocos de HC foram menores quando comparados com *D. sericeus* e *D. nesus*. Trabalho recente com outras espécies de Scarabaeinae mostrou que *Isocoprins inhiata* e *Diabroctis mimas* possuem grandes blocos paracentroméricos de HC envolvendo todo o braço curto dos pares 3, 4, 5 e 7 na primeira espécie e nos pares 2, 4 e 7 da segunda, caracterizando a presença de cromossomos difásicos. Os cromossomos X destas espécies foram quase totalmente heterocromáticos (Bione, Camparoto & Simões, 2005a).

Dados da literatura têm mostrado que em Coleoptera, mais especificamente em Scarabaeidae, as RONS estão freqüentemente distribuídas em um único par autossômico ou no bivalente sexual (Virkki, 1983; Colomba, Vitturi & Zunino, 2000a; Moura et al., 2003; Vitturi et al., 2003; Bione et al., 2005b; Colomba et al., 2006). Uma variabilidade em relação à localização das RONS foi observada nas espécies estudadas neste trabalho. *Dichotomius semisquamosus* apresentou a RON restrita a um autossomo de tamanho médio. Esse tipo de marcação também foi encontrado por Moura et al. (2003) em *Phyllophaga* (*Phyllophaga*) *aff capillata* e em *Gymnopleurus sturmi* através da análise da coloração com nitrato de prata (AgNO_3) e confirmado pelo método de FISH (Colomba, Vitturi & Zunino, 2000a). Em *D. sericeus* e *D. nesus*, de forma similar ao padrão descrito para *Phyllophaga* (*Phitalus*) *vestita* e *Lyogenys fuscus* a RON está localizada no bivalente sexual (Moura et al., 2003) conforme demonstrado pela prata e pelo FISH. Esse padrão de marcação sugere que ao longo da evolução deste grupo de organismos, ocorreram rearranjos cromossômicos envolvendo os cromossomos portadores dos sítios de DNAr. Em contraste, no Scarabaeidae *Bubas bison* ($2n=20$) a distribuição de sítios de DNAr, observados pelo método de FISH, envolve oito cromossomos do complemento. Esse padrão representa o maior número de sítios de DNAr observado nesta família (Colomba et al., 2006).

Os resultados deste trabalho representam os primeiros dados usando marcadores cromossômicos para o gênero *Dichotomius*. As espécies estudadas mostraram similaridade quanto ao número diplóide $2n=18$, o que indica a ocorrência de rearranjos do tipo inversão e fusão na evolução cromossômica desse grupo. Apesar de similaridades quanto ao número diplóide as espécies

apresentaram diferenciação quanto ao mecanismo sexual, tamanho dos blocos de HC e localização dos sítios de DNAr. Portanto, esses dados cromossômicos associados a outras informações da literatura destacam a ocorrência de variabilidade cariotípica no gênero *Dichotomius*.

Agradecimentos

Os autores são gratos ao Dr. Sérgio Ide, Instituto Biológico, São Paulo pela identificação taxonômica das espécies analisadas. A Francisca Tavares de Lira e a Cirlene Maria da Silva pela assistência técnica. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro.

Referências Bibliográficas

- Bione, E.G.; Camparoto, M.L. & Simões, Z.L.P. 2005a. A study of the constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions of *Isocopris inhiata* and *Diabroctis mimas* (Coleoptera: Scarabaeidae, Scarabaeinae) using C-banding, AgNO₃ staining and FISH techniques. Genet. Mol. Biol. 28 (1): 111-116.
- Bione E. G., Moura R. C., Carvalho R. & Souza M. J., 2005b. - Karyotype, C-and fluorescence banding pattern, NOR location and FISH study of five Scarabaeidae (Coleoptera) species. Genet. Mol. Biol. 28: 376-381.
- Colomba, M. S.; Montereisino, E.; Vitturi, R. & Zunino, Z. 1996. Characterization of mitotic chromosomes of the scarab beetles *Glyphoderus sterquilinus* (Westwood) and *Bubas bison* (L.) (Coleoptera: Scarabaeidae) using conventional and banding techniques. Biol. Zent. Bl. 115: 58-70.
- Colomba, M. S.; Vitturi, R. & Zunino, M. 2000a. Karyotype analyzes, banding, and fluorescent *in situ* hybridization in the Scarab beetle *Gymnopleurus sturmi* McLeady (Coleoptera, Scarabaeoidea, Scarabaeidae). The J. of Heredity 91: 260-264.
- Colomba, M. S.; Vitturi, R. & Zunino, M. 2000b. Chromosome analysis and rDNA FISH in the stag beetle *Dorcus parallelipipedus* L. (Coleoptera: Scarabaeoidea: Lucanidae). Hereditas 133: 249-253.
- Colomba M.; Vitturi, R.; Volpe N.; Lannino, A. & Zunino, M. 2004. Karyotype, banding and rDNA FISH in the scarab beetle *Anoplotrupes stercorosus* (Coleoptera Scarabaeoidea: Geotrupidae). Description and comparative analysis. Micron 35: 717-720.
- Colomba M. S.; Vitturi, R.; Libertini, A.; Gregorini, A. & Zunino, M. 2006. Heterochromatin of the scarab beetle, *Bubas bison* (Coleoptera: Scarabaeidae) II. Evidence for AT-rich compartmentalization and a high amount of rDNA copies. Micron 37: 47-51.
- Costa, C.; Vanin, S.A. & Casari-Chen, S.A. 1988. Larvas de coleópteros do Brasil. Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, p.282, 165pls.
- Costa, C. 2000. Estado de conocimiento de los coleoptera Neotropicales. In: Hacia un Proyecto CYTED para el inventario y estimación de la diversidad Entomologica en Iberoamérica: PRIBES-2000. Martín-Piera, F, J. Morrone & A. Melic (Eds) m3m: Monografías Tercer Milenio vol.1 SEA, Zaragoza, p.99-114.
- Halffter, G. & Mathews, E.G. 1966. The natural history of dung beetles of the subfamily Scarabaeinae (Coleoptera, Scarabaeidae). Fol. Ent. Mex. 12/14: 1-312.
- Martins, V. G. 1994. The chromosome of five species of Scarabaeidae (Polyphaga, Coleoptera). Naturalia, São Paulo, 19: 89-96.
- Moura, R. C.; Souza, M. J.; Melo, N. F. & Lira-Neto, A. C. 2003. Karyotypic characterization of representatives from Melolonthinae (Coleoptera: Scarabaeidae): Karyotypic analysis, banding and fluorescent *in situ* hybridization (FISH). Hereditas 138: 200-206.
- Natarajan, A.T.; Santos, S.J.; Darroudi, F.; Hadjidikova, V.; Vermeulen, S.; Chatterjee, S.; Berg, M.; Grigorova, M.; Sakamoto-Hojo, E.T.; Granath, F.;

- Ramalho, A.T. & Curado, M.P. 1998. ¹³⁷Cesium-induced chromosome aberrations analysed by fluorescence in situ hybridization: eight years follow up of the Goiania radiation accident victims. *Mutat. Res.* 400(1-2): 299-312.
- Ratcliffe, B.C.; Jameson, M.L. & Smith, A.B.T. 2002. Scarabaeidae. In: Arnett, Jr.R.H.; Thomas, M.C.; Skelley, P.E.; Frank J.H. *American Beetles, Polyphaga: Scarabaeoidea through Curculionoidea*. Ed. CRC Press LLC, v.2, p. 39-81.
- Rozeq, M. & Maryanska-Nadachowska, A. 1991. Studies on C-banding karyotype and meiosis of *Harpalus affinis* (Shrank, 1781) (Coleoptera, Carabidae). *Caryologia* 44: 317-323.
- Rozeq, M. 1992. Karyological analysis of *Acupalpus* (*Stenolophurus*) *teutonius* (Schrank) and *Pogonus persicus* (Chaud.) (Coleoptera, Carabidae). *Folia Biol. (Kraków)* 40: 113-118.
- Rufas, J.S, Giménez-Abian, J., Suja, J.A. & Garcia de La Vega, C. 1987. Chromosome organization in meiosis revealed by light microscope analysis of silver-stained cores. *Genome* 29: 706-712.
- Sakamoto-Hojo, E.T, Natarajan, A.T. and Curado, M.P. 1999. Chromosome translocations in lymphocytes from individuals exposed to Cs-137 7.5 years after the accident in Goiania (Brazil). *Radiat. Prot. Dosim.* 86:25-32.
- Smith, S.G. & Virkki, N. 1978. Coleoptera. In: John, B. *Animal Cytogenetics*. Borntraeger, Berlin, Stuttgart, p. 366.
- Souza, M. J. 1991. Two simple methods for the preparation of mitotic and meiotic Orthoptera chromosomes. *Rev. Bras. Gen. Brasil*, 14 (4): 1079-1084.
- Sumner, A.T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res.* 75: 304-306.
- Vaz-de-Mello, F.Z. 2000. Estado atual de conhecimento dos Scarabaeidae s. str. (Coleoptera: Scarabaeoidea) do Brasil. In *PRIBES 2000*, Martín-Piera, Morrone and Melic (Eds.) pp 183-195.
- Vidal, O. R. 1984. Coleoptera from Argentina. *Genetica* 65: 235-239.
- Vidal, O. R. & Nocera, C. P. 1984. Citogenética de la tribu Eucranini (Coleoptera, Scarabaeidae). *Estudios convencionales y con bandeado C*. *Physis* 42: 83-90.
- Virkki, N. 1983. Banding of *Oedionychna* (Coleoptera: Alticinae) chromosomes: C- and Ag-bands. *J. Agric. Univ. Puerto Rico* 67: 221-225.
- Vitturi, R.; Colomba, M.S.; Barbieri, R. & Zunino, M. 1999. Ribosomal DNA location in the scarab beetle *Thorectes intermedius* (Costa) (Coleoptera: Geotrupidae) using banding and fluorescent *in-situ* hybridization. *Chromosome Res.* 7: 255-260.
- Vitturi, R.; Colomba, M.; Volpe, N.; Lannino, A. & Zunino, M. 2003. Evidence for male XO sex-chromosome system in *Pentodon bidens punctatum* (Coleoptera: Scarabaeoidea: Scarabaeidae) with X-linked 18S-28S rDNA clusters. *Genes Genet. Syst.* 78: 427-432.
- Yadav, J. S. & Pillai, R. K. 1979. Evolution of karyotypes and phylogenetic relationships in Scarabaeidae (Coleoptera). *Zool. Anz. Jena.* 202: 105-118.
- Yadav, J. S.; Pillai, R. K. & Karamjeet. 1979. Chromosome numbers of Scarabaeidae (Polyphaga: Coleoptera). *The Coleopterists Bulletin* 33 (3): 309-318.

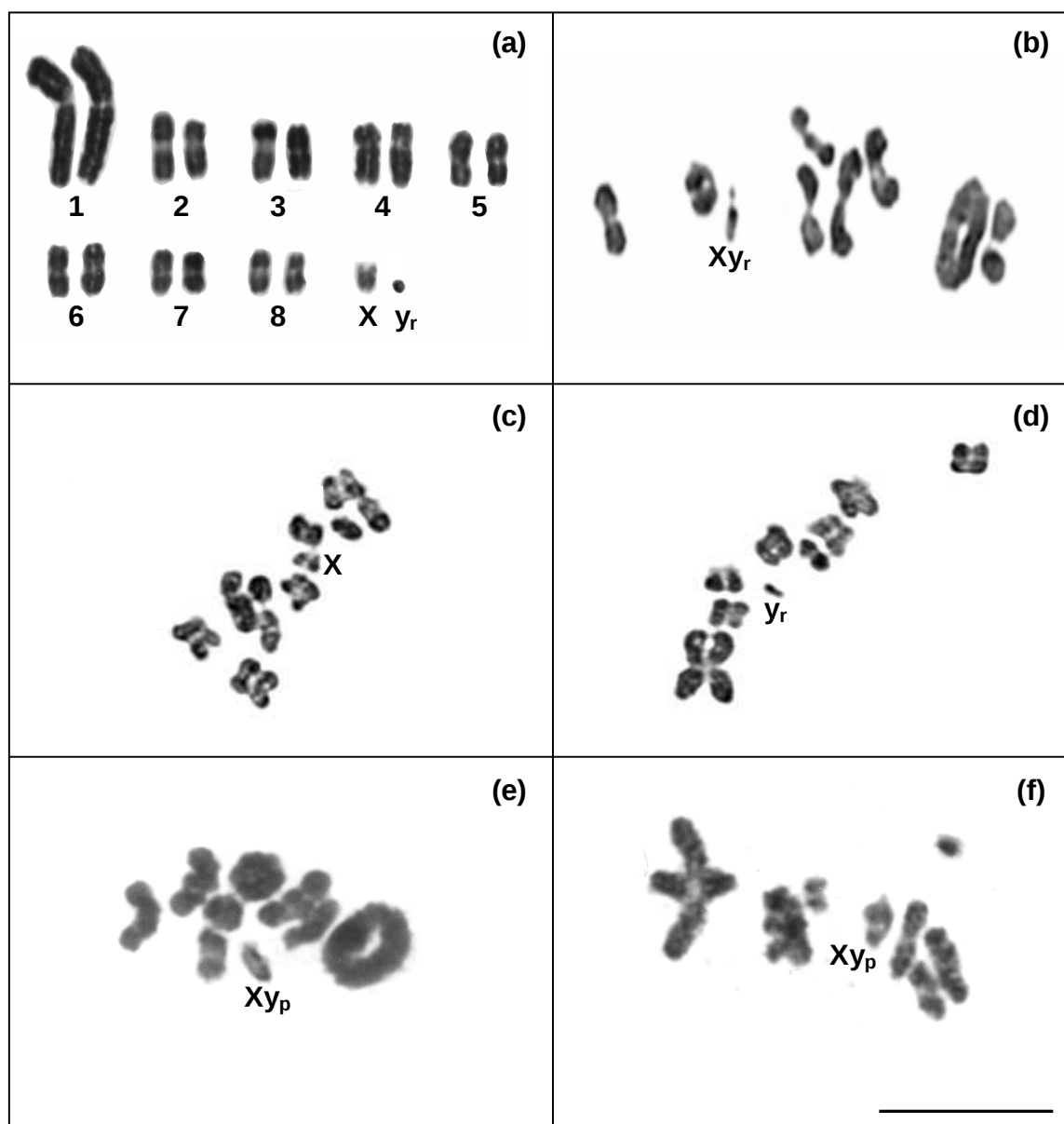


Figura 1. Cromossomos mitóticos e meióticos de *Dichotomius sericeus* (a-d), *D. nesus* (e) e *D. semisquamosus* (f) corados com orceína lacto-acética. (a) cariótipo espermatogonial. (b) metáfase I destacando o mecanismo sexual Xy_r. (c,d) metáfases II, (c) com o X e (d) com o y_r, respectivamente. (e,f) metáfases I com o mecanismo Xy_p. Barra 10μm.

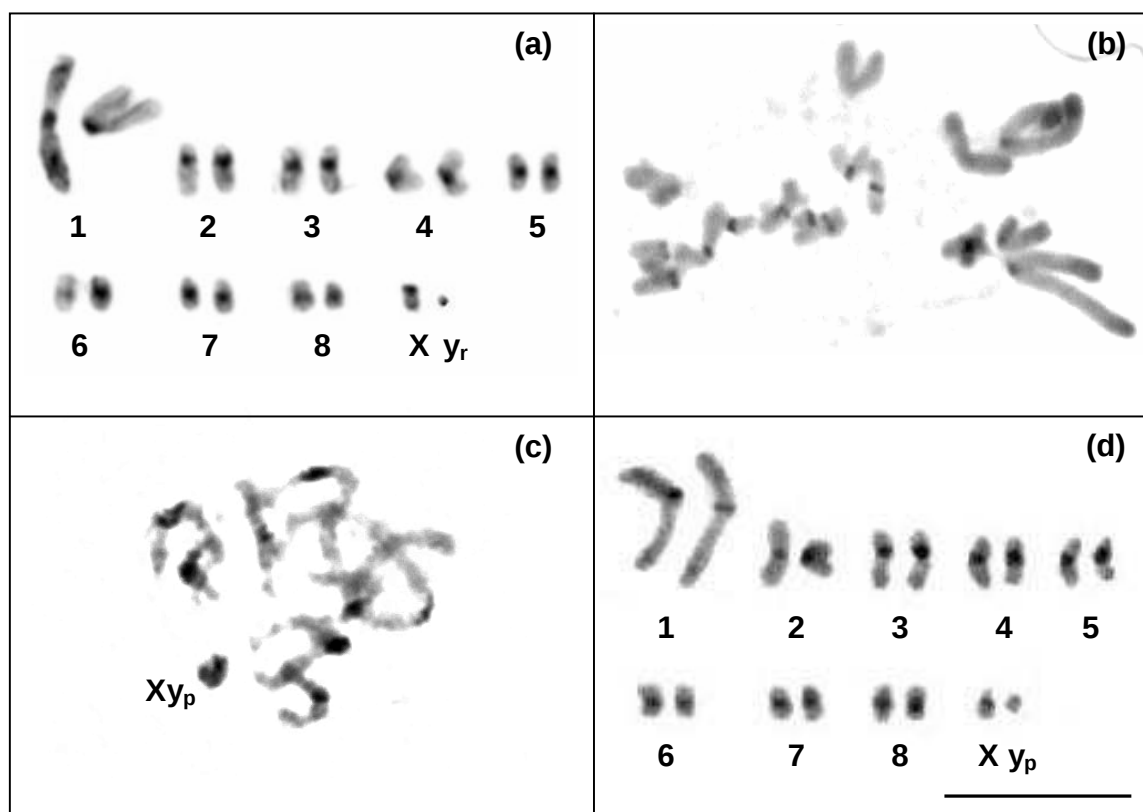


Figura 2. Padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva em *Dichotomius sericeus* (a), *D. semisquamosus* (b) e *D. nisus* (c,d). Em (a,d) cariótipos espermatogoniais. (b) metáfase espermatogonial. (c) paquíteno. Barra 10µm.

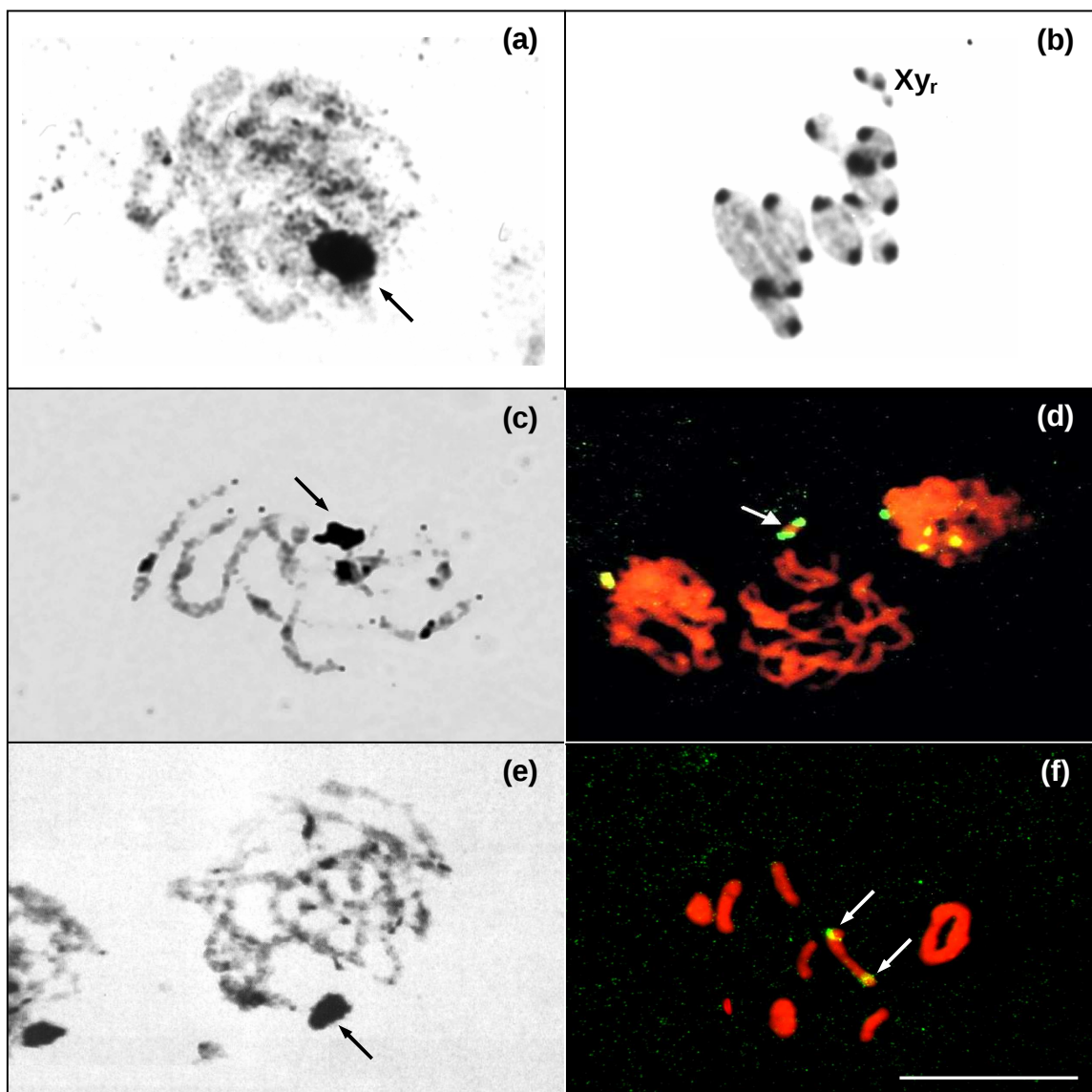


Figura 3. Cromossomos corados com nitrato de prata (AgNO_3) (a,b,c,e) e pelo método de FISH com sonda de DNAr 28S (d,f). *Dichotomius sericeus* (a,b), *D. nisus* (c,d) e *D. semisquamosus* (e,f). (a) zigóteno com o bivalente sexual totalmente marcado (seta). (b) metáfase I com as regiões heterocromáticas e o bivalente sexual Xy_r marcados pela prata. (c,e) paquítenos com bivalente sexual e bivalente autossômico totalmente marcados (setas) em *D. nisus* e *D. semisquamosus*, respectivamente. (d,f) paquíteno e metáfase I, respectivamente. As setas apontam os sítios de DNAr. Barra 10 μm .

V. CONCLUSÕES

O presente trabalho mostra o resultado da análise citogenética realizada nos escarabeídeos *Dichotomius sericeus*, *Dichotomius nisus* e *Dichotomius semisquamosus*. Os resultados obtidos permitiram chegar às seguintes conclusões:

1. As três espécies apresentaram redução do número diplóide para $2n=18$, cromossomos do tipo meta-submetacêntricos e o par 1 representando o maior cromossomo do complemento, caracterizando uma assimetria cariotípica, provavelmente devido à ocorrência de rearranjos cromossômicos envolvendo inversão seguida de fusão cêntrica entre autossomos.
2. Com exceção de *Dichotomius sericeus*, que apresentou mecanismo de determinação sexual do tipo Xy_r , *D. nisus* e *D. semisquamosus* mostraram mecanismo do tipo Xy_p , considerado mais freqüente para a família Scarabaeidae, e também para Coleoptera.
3. Padrões similares de bandeamento C, com localização dos blocos de heterocromatina constitutiva (HC) nas regiões pericentroméricas de todos os cromossomos foram detectados nas três espécies. Contudo, em *D. semisquamosus* o tamanho dos blocos foram menores quando comparados com *D. sericeus* e *D. nisus*.
4. As RONS localizadas em bivalentes sexuais de *D. sericeus* e *D. nisus* reforçam a hipótese da condição ancestral desse padrão dentro de Scarabaeidae. Por sua vez, a localização autossômica da RON em *D. semisquamosus* sugere a ocorrência de rearranjos entre diferentes cromossomos durante a sua evolução cariotípica.
5. O uso da hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sonda de DNAr 28S em *D. nisus* e *D. semisquamosus* confirmou a localização e o número de Ag-RONS ativas nessas espécies.

VI. APÊNDICE

VI.1. Fotos das Espécies Estudadas



Dichotomius sericeus



Dichotomius nisus



Dichotomius semisquamosus

VII. ANEXO

VII.1. Normas da Revista Genética



<http://www.springer.com/journal/10709>

Genetica

An International Journal of Genetics and Evolution

Editor: R.C. Woodruff

ISSN: 0016-6707 (print version)

ISSN: 1573-6857 (electronic version)

Journal no. 10709

Springer Netherlands

Online Manuscript Submission

Springer now offers authors, editors and reviewers of *Genetica* the option of using our fully web-enabled online manuscript submission and review system. To keep the review time as short as possible (no postal delays!), we encourage authors to submit manuscripts online to the journal's editorial office. Our online manuscript submission and review system offers authors the option to track the progress of the review process of manuscripts in real time. Manuscripts should be submitted to: <http://gene.edmgr.com>

The online manuscript submission and review system for *Genetica* offers easy and straightforward log-in and submission procedures. This system supports a wide range of submission file formats: for manuscripts - Word, WordPerfect, RTF, TXT and LaTeX; for figures - TIFF, GIF, JPEG, EPS, PPT, and Postscript.

NOTE: By using the online manuscript submission and review system, it is NOT necessary to submit the manuscript also in printout + disk. In case you encounter any difficulties while submitting your manuscript on line, please get in touch with the responsible Editorial Assistant by clicking on "CONTACT US" from the tool bar.

Electronic figures

You should supply the electronic versions of your figures. We prefer figures in TIFF, EPS, PS, PDF and Microsoft® Office format. Be aware that we may not be able to use other file formats and that the hard copy may be scanned instead. For vector graphics, EPS is the preferred format. For bitmapped graphics, TIFF is the preferred format. The following resolutions are optimal: line figures - 600 - 1200 dpi; photographs - 300 dpi; screen dumps - leave as is. Colour figures can be submitted in the RGB colour system. Font-related problems can be avoided by using standard fonts such as Times Roman, Courier and Helvetica. Figures should be saved in separate files. The figure legends should be included in the text file.

Language

We appreciate any efforts that you make to ensure that the language is corrected before submission. This will greatly improve the legibility of your paper if English is not your first language.

Manuscript Presentation

The journal's language is English. British English or American English spelling and terminology may be used, but either one should be followed consistently throughout the article. British English (American English) spelling and terminology should be used consistently throughout the article. Manuscripts should be printed or typewritten on A4 or US Letter bond paper, one side only, leaving adequate margins on all sides to allow reviewers' remarks. Please double-space all material, including notes and references. Quotations of more than 40 words should be set off clearly, either by indenting the left-hand margin or by using a smaller typeface. Use double quotation marks for direct quotations and single quotation marks for quotations within quotations and for words or phrases used in a special sense. Number the pages consecutively with the first page containing:

Title page

The title page should list in order: the title of the manuscript; the authors names and their institutional affiliations with concise addresses; the name, address, telephone and fax numbers, and E-mail address.

Abstract

The abstract should consist of a single paragraph of approximately 200 words which summarizes the subject. References should not be cited in the abstract.

Key words

Please provide 5 to 10 key words or short phrases in alphabetical order.

Abbreviations

Abbreviations and their explanations should be collected in a list.

Text

Four levels of headings should be used in the text. The first level should be bold-faced, freestanding and positioned flush to the left margin. This heading level should be reserved for blocks or text that constitute a major fraction of the article (e.g. **Materials and methods**). The second level of headings should be italics, freestanding, flush left. This heading level is used to group two or more closely related third-level heads in long-papers. The third level headings is the most frequently used subhead. It is italics, flush left with no white line underneath and is used to initiate the first paragraph of a sub-topic. The fourth level heading is paragraph-initiating italic followed by a colon. Desired location of tables and figures should be indicated in the margins. Text citations with three or fewer authors should include all names while those with four or more authors should cite the first author and et al. Only articles that are published or in press should be cited. Citations of personal communications or unpublished results should list all names and initials. Numbers of ten or less should be written in full unless part of a date, a fraction or decimal, a percent or a unit of measurement.

Taxonomic names

Taxonomic names of genera and lower taxa should be italicized. Authors are requested to mention the authorities of any taxa named in the articles.

Appendices

This section should be reserved for large bodies of data of mathematical derivations that would disrupt the main text.

Cross-Referencing

In the text, a reference identified by means of an author's name should be followed by the date of the reference in parentheses and page number(s) where appropriate. When there are more than two authors, only the first author's name should be mentioned, followed by 'et al.'. In the event that an author cited has had two or more works published during the same year, the reference, both in the text and in the reference list, should be identified by a lower case letter like 'a' and 'b' after the date to distinguish the works.

Examples:

Winograd (1986, p. 204)

(Winograd, 1986a, b)

(Winograd, 1986; Flores et al., 1988)

(Bullen, Beauchamp & Bennett, 1990)

Acknowledgements

Acknowledgements of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the References.

References

1. Journal article:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 342:325–329

2. Inclusion of issue number (optional):

Saunders DS (1976) The biological clock of insects. *Sci Am* 234(2):114–121

3. Journal issue with issue editor:

Smith J (ed) (1998) Rodent genes. *Mod Genomics J* 14(6):126–233

4. Journal issue with no issue editor:

Mod Genomics J (1998) Rodent genes. *Mod Genomics J* 14(6):126–233

5. Book chapter:

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York

6. Book, authored:

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

7. Book, edited:

Smith J, Brown B (eds) (2001) *The demise of modern genomics*. Blackwell, London

8. Chapter in a book in a series without volume titles:

Schmidt H (1989) Testing results. In: Hutzinger O (ed) *Handbook of environmental chemistry*, vol 2E. Springer, Berlin Heidelberg New York, p 111

9. Chapter in a book in a series with volume title:

Smith SE (1976) Neuromuscular blocking drugs in man. In: Zaimis E (ed) *Neuromuscular junction. Handbook of experimental pharmacology*, vol 42. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp593–660

10. Proceedings as a book (in a series and subseries):

Zowghi D et al (1996) A framework for reasoning about requirements in evolution. In: Foo N, Goebel R (eds) *PRICAI'96: topics in artificial intelligence*. 4th Pacific Rim

conference on artificial intelligence, Cairns, August 1996. Lecture notes in computer science (Lecture notes in artificial intelligence), vol 1114. Springer, Berlin Heidelberg New York, p 157

11. Proceedings with an editor (without a publisher):

Aaron M (1999) The future of genomics. In: Williams H (ed) Proceedings of the genomic researchers, Boston, 1999

12. Proceedings without an editor (without a publisher):

Chung S-T, Morris RL (1978) Isolation and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid from *Streptomyces fradiae*. In: Abstracts of the 3rd international symposium on the genetics of industrial microorganisms, University of Wisconsin, Madison, 4–9 June 1978

13. Paper presented at a conference:

Chung S-T, Morris RL (1978) Isolation and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid from *Streptomyces fradiae*. Paper presented at the 3rd international symposium on the genetics of industrial microorganisms, University of Wisconsin, Madison, 4–9 June 1978

14. Patent:

Name and date of patent are optional

Norman LO (1998) Lightning rods. US Patent 4,379,752, 9 Sept 1998

15. Dissertation:

Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California

16. Institutional author (book):

International Anatomical Nomenclature Committee (1966) Nomina anatomica. Excerpta Medica, Amsterdam

17. Non-English publication cited in an English publication:

Wolf GH, Lehman P-F (1976) Atlas der Anatomie, vol 4/3, 4th edn. Fischer, Berlin. [NB: Use the language of the primary document, not that of the reference for "vol" etc.!]

18. Non-Latin alphabet publication:

The English translation is optional.

Marikhin VY, Myasnikova LP (1977) Nadmolekulyarnaya struktura polimerov (The supramolecular structure of polymers). Khimiya, Leningrad

19. Published and In press articles with or without DOI:

19.1 In press

Wilson M et al (2006) References. In: Wilson M (ed) Style manual. Springer, Berlin Heidelberg New York (in press)

19.2. Article by DOI (with page numbers)

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. J Mol Med 78:74–80. DOI 10.1007/s001090000086

19.3. Article by DOI (before issue publication with page numbers)

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. J Mol Med (in press). DOI 10.1007/s001090000086

19.4. Article in electronic journal by DOI (no paginated version)

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. Dig J Mol Med. DOI 10.1007/s801090000086

20. Internet publication/Online document

Doe J (1999) Title of subordinate document. In: The dictionary of substances and their effects. Royal Society of Chemistry. Available via DIALOG. [http://www.rsc.org/dose/title of subordinate document](http://www.rsc.org/dose/title%20of%20subordinate%20document). Cited 15 Jan 1999

20.1. Online database

Healthwise Knowledgebase (1998) US Pharmacopeia, Rockville. <http://www.healthwise.org>. Cited 21 Sept 1998

Supplementary material/private homepage Doe J (2000) Title of supplementary material. <http://www.privatehomepage.com>. Cited 22 Feb 2000

University site Doe J (1999) Title of preprint. <http://www.uni-heidelberg.de/mydata.html>. Cited 25 Dec 1999

FTP site Doe J (1999) Trivial HTTP, RFC2169. <ftp://ftp.isi.edu/in-notes/rfc2169.txt>. Cited 12 Nov 1999

Organization site ISSN International Centre (1999) Global ISSN database. <http://www.issn.org>. Cited 20 Feb 2000

Figures

All photographs, graphs and diagrams should be referred to as a 'Figure' and they should be numbered consecutively (1, 2, etc.). Multi-part figures ought to be labeled with lower case letters (a, b, etc.). Please insert keys and scale bars directly in the figures. Relatively small text and great variation in text sizes within figures should be avoided as figures are often reduced in size. Figures may be sized to fit approximately within the column(s) of the journal. Provide a detailed legend (without abbreviations) to each figure, refer to the figure in the text and note its approximate location in the margin. Please place the legends in the manuscript after the references.

Tables

Each table should be numbered consecutively (1, 2, etc.). In tables, footnotes are preferable to long explanatory material in either the heading or body of the table. Such explanatory footnotes, identified by superscript letters, should be placed immediately below the table. Please provide a caption (without abbreviations) to each table, refer to the table in the text and note its approximate location in the margin. Finally, please place the tables after the figure legends in the manuscript.

Proofs

Proofs will be sent to the corresponding author by e-mail (if no e-mail address is available or appears to be out of order, proofs will be sent by regular mail). Your response, with or without corrections, should be sent within 72 hours. Please do not make any changes to the PDF file. Minor corrections (10) should be sent as an e-mail attachment to: proofscorrection@springer.com. Always quote the four-letter journal code and article number and the DO No. from your proof in the subject field of your e-mail. Extensive corrections must be clearly marked on a printout of the PDF file and should be sent by first-class mail (airmail overseas).

Offprints

50 offprints of each article will be provided free of charge. Additional offprints (both hard copies and PDF files) can be ordered by means of an offprint order form supplied with the proofs.

Page Charges and Colour Figures

No page charges are levied on authors or their institutions except for colour pages. Up to two (2) colour pages (irrespective of the number of individual figures on them) will be published free of charge if the Editor and Referees consider this essential. Additional colour pages will be charged accordingly.

Copyright

Authors will be asked, upon acceptance of an article, to transfer copyright of the article to the Publisher. This will ensure the widest possible dissemination of information under copyright laws.

Permissions

It is the responsibility of the author to obtain written permission for a quotation from unpublished material, or for all quotations in excess of 250 words in one extract or 500 words in total from any work still in copyright, and for the reprinting of figures, tables or poems from unpublished or copyrighted material.

Springer Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer now provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink. To publish via Springer Open Choice, upon acceptance please visit www.springer.com/openchoice to complete the relevant order form and provide the required payment information. Payment must be received in full before publication or articles will publish as regular subscription-model articles. We regret that Springer Open Choice cannot be ordered for published articles.

Additional Information

Additional information can be obtained from:

Genetica

Springer

Van Godewijckstraat 30

P.O. Box 17

3300 AA Dordrecht

The Netherlands

Fax: 00 31 78 6576377

<http://www.springer.com>