

Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Ciências Biológicas  
Departamento de Genética  
Curso de Pós-Graduação em Genética

**Variabilidade Cromossômica nos Tenebrionídeos  
*Zophobas* aff. *confusus* e *Nyctobates gigas* (Coleoptera,  
Tenebrioninae)**

AMARO DE CASTRO LIRA NETO

**RECIFE-PE  
2004**

Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Ciências Biológicas  
Departamento de Genética

**Variabilidade Cromossômica nos Tenebrionídeos  
*Zophobas* aff. *confusus* e *Nyctobates gigas* (Coleoptera,  
Tenebrioninae)**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Genética.

Aluno: Amaro de Castro Lira Neto  
Orientador: Profa. Dra. Maria José de Souza Lopes

**RECIFE-PE  
2004**

Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Ciências Biológicas  
Departamento de Genética  
Curso de Pós-Graduação em Genética

Parecer da Comissão Examinadora de Defesa de Dissertação de  
Mestrado do Aluno **Amaro de Castro Lira Neto**

**“Variabilidade Cromossômica nos Tenebrionídeos  
*Zophobas aff. confusus* e *Nyctobates gigas* (Coleoptera,  
Tenebrioninae)”**

Área de Concentração: Genética

A comissão examinadora, composta pelos professores abaixo, considera o candidato **Amaro de Castro Lira Neto** aprovado com distinção.

Recife, 19 de fevereiro de 2004

---

Profa. Dra. Rita de Cássia de Moura  
Departamento de Biologia/ICB/UPE

---

Profa. Dra. Neide Santos  
Departamento de Genética/CCB/UFPE

---

Profa. Dra. Ana Maria Benko Iseppon  
Departamento de Genética/CCB/UFPE

## Variabilidade Cromossômica nos Tenebrionídeos *Zophobas* aff. *confusus* e *Nyctobates gigas* (Coleoptera, Tenebrioninae)

Aluno: Amaro de Castro Lira Neto

Orientador: Profa. Dra. Maria José de Souza Lopes

Data da Defesa: 19 de Fevereiro de 2004

### **Comissão Examinadora**

- **Membros Titulares**

**Profa. Dra. Rita de Cássia de Moura**  
Departamento de Biologia/ICB/UPE

**Profa. Dra. Neide Santos**  
Departamento de Genética/CCB/UFPE

**Profa. Dra. Ana Maria Benko Iseppon**  
Departamento de Genética/CCB/UFPE

- **Membros Suplentes**

**Dra. Constância Flávia Junqueira Ayres**  
Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães/FIOCRUZ-PE

**Prof. Dr. Reginaldo de Carvalho**  
Departamento de Genética/CCB/UFPE

*Dedico este trabalho à  
Minha mãe, Maria Inez  
Nascimento Lira, e aos  
meus familiares*

## *Agradecimentos*

*Muitas foram as pessoas que estiveram ao meu lado e contribuíram de forma efetiva para que eu pudesse chegar até aqui. Entretanto, nesta singela lista de agradecimentos, não terei espaço suficiente para lembrar de todas. Por isso começo pedindo desculpas pelas eventuais ausências.*

*Gostaria de agradecer, de forma especial, à professora **Maria José de Souza Lopes** a quem considero como uma mãe, minha “mãe científica”. À você, Mazé, agradeço pela oportunidade concedida, confiança depositada, profissionalismo exemplar, seriedade na condução do trabalho e disponibilidade ofertada, qualidades estas que fazem com que todos a tenham como uma excelente profissional em todos os níveis exercidos. Entre outros, estes são os motivos que me fazem tê-la como espelho em minha vida profissional que está começando.*

*À **Universidade Federal de Pernambuco**, em especial ao **Departamento de Genética**, por ter permitido o uso de suas instalações e equipamentos para o desenvolvimento do trabalho.*

*A todos os integrantes do **Laboratório de Citogenética Animal**. Em especial à, **Cirlene Maria da Silva**, **Danielle Brandão**, **Ebenézer Bernardes (Bené do Violino)**, **Francisca Tavares de Andrade (Fran)**, **Guilherme Messias**, **Marília de França Rocha**, **Mércia Rodrigues**, **Neide Santos**, **Sandra Vasconcelos**, **Tania Rieger** e **Vilma Loreto (Vilminha)** pelos momentos de alegria e descontração, amizade, paciência, cumplicidade, compreensão, harmonia, além da participação ativa nas atividades de campo e de Laboratório. Em especial à **Rita de Cássia de Moura** pelos ensinamentos dentro e fora do Laboratório e pela valiosa participação nesse trabalho.*

*Aos professores e funcionários do Departamento de Genética/CCB/UFPE por todos estes anos de aprendizado e convivência. Entre esses, gostaria de destacar as professoras e coordenadoras do Mestrado em Genética Ana Maria Benko Iseppon e Aline Alexandrino pelas conversas, conselhos e ensinamentos, além da amizade construída durante o meu período de mestrado.*

*Aos colegas do mestrado Alessandra, Antônio Humberto, Brígida, Cristhian Reis, David, Ivan, Leonardo, Márcio, Nilmara, Raquel, Sérgio e todos os outros. Vivemos bons momentos de estudo, conversas, brincadeiras, problemas, reivindicações, cervejas e trabalho, muito trabalho.*

*Ao Dr. Carlos Campaner, curador do museu de Zoologia da USP/SP, pela identificação das espécies estudadas neste trabalho.*

*Às agências de fomento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelos auxílios concedidos durante a realização deste trabalho.*

*À Maria Inez Nascimento Lira, minha mãe, a quem devo simplesmente tudo.*

*À minha família e em especial à Cassandra de Barros Correia de Moura, Cláudia Lira de Barros Correia, José Farias Gomes Filho e Marinete Lira de Barros Correia pelo amor, carinho, respeito, compreensão, dedicação, incentivo e apoio em todos os momentos da minha vida.*

*À Tathiane Galdino dos Santos, a quem tenho partilhado minha vida e meu coração já há alguns anos, agradeço pelo amor, carinho e compreensão pelas ausências.*

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>09</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>10</b>
<b>RESUMO</b>	<b>11</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>12</b>
<b>1.0 INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
1.1 Objetivo Geral	14
1.2 Objetivos Específicos	14
<b>2.0 REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>15</b>
2.1 Considerações Gerais Sobre a Família Tenebrionidae	15
2.2 Caracterização Cromossômica	17
2.2.1 Ordem Coleoptera	17
2.2.2 Família Tenebrionidae	20
2.3 Heterocromatina Constitutiva e Sua Distribuição em Coleoptera	25
2.4 Regiões Organizadoras de Nucléolos	32
<b>3.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>40</b>
<b>4.0 MANUSCRITO</b>	
“Variabilidade Cromossômica nos Tenebrionídeos <i>Zophobas</i> aff. <i>confusus</i> e <i>Nyctobates gigas</i> (Coleoptera, Tenebrioninae)”	<b>50</b>
<b>5.0 CONCLUSÕES</b>	<b>54</b>
<b>6.0 ANEXOS</b>	<b>70</b>
6.1 Instruções para o periódico <i>Genetics and Molecular Biology</i>	71
6.2 Instruções para o periódico <i>Caryologia</i>	73

**LISTA DE FIGURAS**

- Figura 1:** Metáfases espermatogoniais coradas convencionalmente: **a)** *Zophobas* aff. *confusus* (2n=20, Xy<sub>p</sub>) e **b)** *Nyctobates gigas* (2n=18, neo XY). **60**
- Figura 2:** Células meióticas de *Zophobas* aff. *confusus* (**a, b, e, f**) e *Nyctobates gigas* (**c, d**) coradas convencionalmente. **a)** diacinese; **b)** metáfase I; **c)** metáfase I; **d)** metáfase II; **e)** metáfase II com o y e **f)** metáfase II com o X. As setas em **a** e **b** indicam o bivalente sexual Xy<sub>p</sub> enquanto que em **c**, o bivalente sexual neoXY **61**
- Figura 3:** Células meióticas de *Zophobas* aff. *confusus* após bandeamento C (**a, b**), coloração com nitrato de prata (**c, d**), CMA<sub>3</sub> (**e**) e DAPI (**f**). Células em paquíteno (**a, c, e, f**) e metáfase I (**b, d**). As setas indicam o Xy<sub>p</sub>. A cabeça de seta em C indica a RON. **62**
- Figura 4:** Células meióticas e mitóticas de *Nyctobates gigas* após bandeamento C (**a, b**), coloração com nitrato de prata (**c, d**), CMA<sub>3</sub> (**e, f**) e DAPI (**g**). Células em paquíteno (**a, c, d, e, f, g**) e metáfase espermatogonial (**b**). As setas em **a** e **c** indicam o bivalente neoXY. As cabeças de seta em **c** e **d** apontam a RON. **63**

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Números cromossômicos e sistemas de determinação sexual em representantes da subfamília Tenebrioninae (Tenebrionidae). Dados de Juan e Petitpierre, 1991a (1); Juan e Petitpierre, 1991b (2); Yadav *et al.*, 1994 (3); Vitturi *et al.*, 1996 (4); Palmer e Petitpierre, 1997(5) **22**

## RESUMO

Cromossomos meióticos e mitóticos de *Zophobas* aff. *confusus* e *Nyctobates gigas* (Tenebrionidae) foram estudados através de coloração convencional, bandeamento C, coloração com nitrato de prata e os fluorocromos CMA<sub>3</sub> e DAPI. *Zophobas* aff. *confusus* apresentou 2n=20 (9+Xy<sub>p</sub>) e cromossomos meta-submetacêntricos. *Nyctobates gigas* exibiu 2n=18 (8+neoXY) e cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e acrocêntricos. O bandeamento C revelou grandes blocos de heterocromatina constitutiva (HC) pericentroméricos em todos os cromossomos de ambas as espécies. Contudo, os resultados obtidos com o CMA<sub>3</sub> e com o DAPI revelaram variação interespecífica quanto à composição da HC. Os dois fluorocromos marcaram a HC de *Z. aff. confusus*, entretanto o DAPI apresentou uma coloração mais brilhante. Os blocos CMA<sub>3</sub> pericentroméricos de *N. gigas* foram de tamanhos similares àqueles detectados pelo bandeamento C. Blocos DAPI não foram detectados nessa espécie. A coloração com nitrato de prata revelou uma RON localizada no bivalente Xy<sub>p</sub> de *Z. aff. confusus* e uma RON autossômica em *N. gigas*. Na primeira espécie o bivalente sexual mostrou marcação durante a prófase I da meiose até a metáfase I. A prata também marcou as regiões de HC em *N. gigas*.

## ABSTRACT

The meiotic and mitotic chromosomes of *Zophobas* aff. *confusus* and *Nyctobates gigas* (Tenebrionidae) were studied by conventional staining, C-banding, AgNO<sub>3</sub> impregnation and CMA<sub>3</sub> and DAPI fluorochromes. *Zophobas* aff. *confusus* presented 2n=20 (9+Xy<sub>p</sub>) with metacentric and submetacentric chromosomes. *Nyctobates gigas* showed 2n=18 (8+neoXY) with metacentric, submetacentric and acrocentric chromosomes. The analysis of constitutive heterochromatin (CH) showed similar C-banding patterns in the two species with pericentromeric blocks in all chromosomes. However, the results of CMA<sub>3</sub> and DAPI revealed an interspecific variation. These fluorochromes marked the HC in *Z. aff. confusus*, however the DAPI was stronger than CMA<sub>3</sub>. The CMA<sub>3</sub> blocks in pericentromeric regions of the *N. gigas* were similar in size to those detected by the C-banding. DAPI blocks were not detected in this species. The silver staining revealed a NOR located in the sexual bivalent Xy<sub>p</sub> of *Z. aff. confusus* and an autosomic NOR in *N. gigas*. In the first species the sexual bivalent was stained with silver during the prophase I of the meiosis up to metaphase I.

## 1.0 INTRODUÇÃO

A ordem Coleoptera compreende cerca de 25.368 gêneros e 357.899 espécies distribuídas mundialmente, constituindo-se na maior ordem do reino animal (Costa, 2000). Apesar do elevado número de espécies descritas, apenas cerca de 1% foram estudadas citogeneticamente até o momento. Em geral, este grupo, particularmente a subordem Polyphaga, tem apresentado um alto grau de conservação cariotípica com uma nítida predominância do número diplóide  $2n=20$  (meiofórmula  $9II+Xy_p$ ) e cromossomos meta-submetacêntricos. Smith (1950) sugeriu este cariótipo como primitivo para Coleoptera.

De forma geral, nos coleópteros, a identificação cromossômica individual dentro do complemento é dificultada pela similaridade morfológica entre os cromossomos. Por sua vez, a análise da heterocromatina constitutiva e das regiões organizadoras de nucléolos têm contribuído para uma melhor caracterização da estrutura e dinâmica do material genético e das relações filogenéticas existentes nesse grupo. Nesses organismos, o principal método utilizado para o estudo da heterocromatina constitutiva é o bandeamento C. Por outro lado, o advento de técnicas como coloração por nitrato de prata, fluorocromos base específicos e bandeamento com enzimas de restrição têm permitido analisar regiões específicas dos cromossomos que não são identificadas por técnicas convencionais. A utilização dessas técnicas em Coleoptera ainda é escassa com os estudos existentes restritos às famílias Scarabaeidae, Tenebrionidae, Chrysomelidae, Carabidae e Hydrophilidae (Angus, 1983; Rosek e Rudek, 1992; Plohl *et al.*, 1993; Almeida, 2001; Moura *et al.*, 2003).

Apesar da grande diversidade de coleópteros existente na Região Neotropical, os estudos citogenéticos ainda são limitados (Ferreira *et al.*, 1984; Mesa e Fontanetti, 1984; Martins, 1994; Bione, 1999; Almeida *et al.*, 2000; Maffei *et al.*, 2000; Almeida, 2001; Moura *et al.*, 2003).

## 1.1 Objetivo Geral

Caracterizar citogeneticamente as espécies *Nyctobates gigas* e *Zophobas* aff. *confusus* (Coleoptera, Tenebrionidae, Tenebrioninae).

## 1.2 Objetivos Específicos

1. Analisar cariotipicamente as duas espécies levando em consideração o número cromossômico, o mecanismo de determinação do sexo e a morfologia cromossômica;
2. Identificar o número e a localização das regiões organizadoras de nucléolos (RONs) através da coloração com nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ );
3. Analisar o padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva (HC) através da técnica de bandeamento C e a sua composição com o uso dos fluorocromos  $\text{CMA}_3$  (Cromomicina  $\text{A}_3$ ) e DAPI (4'6-diamidino-2-fenilindol);
4. Analisar comparativamente os resultados obtidos entre as duas espécies frente aos dados da literatura.

## 2.0 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Considerações Gerais Sobre a Família Tenebrionidae

Dentro da subordem Polyphaga, Tenebrionoidea apresenta-se como uma superfamília bastante representativa, sendo composta por 27 famílias distribuídas nas regiões Paleártica, Neotropical, Afrotropical, Oriental e Australiana (Lawrence *et al.*, 1999).

Tenebrionidae é uma família com aproximadamente 20.000 espécies distribuídas mundialmente. Devido à sua grande diversidade, alguns de seus representantes podem ser confundidos com grupos considerados distantes como Carabidae ou Curculionidae. Muitas espécies pertencentes à subfamília Pimeliinae vivem em regiões desérticas como o Sudoeste da América do Norte, Norte e Sudoeste da África além da Ásia Menor e Central. Algumas Tribos de Tenebrioninae (Opatrini, Blaptini, Heleini) também ocorrem preferencialmente em regiões de clima semi-árido. Por sua vez, Lagriinae apresenta-se um pouco mais cosmopolita, apesar de exibir maior concentração nos trópicos, enquanto que as espécies de Diaperinae e Coelometopinae estão bem representadas nas florestas tropicais (Lawrence *et al.*, 1999).

Os tenebrionídeos são primariamente saprófitas alimentando-se de uma grande variedade de animais e plantas em decomposição. Os adultos são quase sempre de cor escura com hábitos noturnos; alguns são ápteros e vivem no solo enquanto outros vivem em cascas de árvores mortas. As espécies diurnas apresentam quase sempre coloração brilhante sendo encontradas freqüentemente em flores ou folhagens ou estão associadas com madeiras mortas ou fungos. Larvas de alguns grupos como Pycnocerini, Tenebrionini, Cyphaleini, Helopini, Ulomini e Coelometopinae são especializadas em tecido vegetal vivo e madeira podre, enquanto que Pimeliinae, Heleini, Opatrini, Blaptini, Eleodini, Apocryphini, Crypticini, Ectychini, Diaperini e alguns Amarygmmini vivem no solo e se alimentam de matéria vegetal em decomposição ou atacam raízes de plantas. As espécies fungíveras ocorrem em várias tribos incluindo Bolitophagini, Dysantini, Scaphidemini e Diaperini. Por

sua vez, larvas e adultos de alguns tenebrionídeos também podem ser encontrados em areia do mar e margens de rios e lagos (Lawrence *et al.*, 1999).

Doyen e Tschinkel (1982) realizaram um estudo fenético e cladístico em 335 representantes de Tenebrionidae levando em consideração 80 caracteres taxonômicos. Os resultados revelaram a presença de três ramos principais dentro da família: Lagrioides, Tenebrioides e Tentyrioides. O ramo Lagrioide (Lagriinae) parece ser o mais primitivo podendo ser elevado ao nível de família. Por sua vez, o grupo Tenebrioide inclui todas as espécies que possuem glândulas defensivas pareadas e não musculares com abertura entre o sétimo e oitavo segmento abdominal. As subfamílias Tenebrioninae, Diaperinae e Coelometopinae apresentam-se como suas principais linhagens. Os Tentyrioides são espécies sem glândula defensiva e ainda não está claro se esta linhagem é derivada da linhagem Tenebrioide ou Lagrioide.

Na Região Neotropical existem cerca de 478 gêneros e 4.624 espécies, com 147 gêneros e 1.234 espécies ocorrendo no Brasil (Costa, 2000). Desses, alguns gêneros como *Tenebrio*, *Tribolium*, *Alphitobius*, *Palorus* e *Gnathocerus* são mais bem estudados biologicamente por apresentar espécies capazes de causar danos consideráveis a produtos agrícolas armazenados (Costa *et al.*, 1988). Por outro lado, *Nyctobates* e *Zophobas* (Tenebrioninae) representam dois gêneros ainda pouco estudados. O primeiro está predominantemente distribuído nas regiões Oriental e Neotropical enquanto que *Zophobas* é quase que exclusivamente Neotropical (Baptiste, 2003).

Dentro de *Zophobas*, as espécies *Z. atratus* e *Z. rugipes* têm sido estudadas quanto à biologia, ciclo de vida, crescimento e tempo de pupação das larvas em populações naturais e de laboratório (Tschinkel, 1978; 1981; 1993). Estas espécies estão amplamente distribuídas através da América Central, Oeste da Índia, México e parte da América do Sul. Por apresentar grande semelhança quanto à forma e tamanho e compartilharem os mesmos nichos, como fezes de morcego e madeira em decomposição, Tschinkel (1984) sugeriu que estas podem ser variedades de uma mesma espécie.

## 2.2 Caracterização Cromossômica

### 2.2.1 Ordem Coleoptera

Estudos citogenéticos dentro da ordem Coleoptera representam menos de 1% do total das espécies descritas. De forma geral, esses organismos apresentam cromossomos metacêntricos de tamanho pequeno ou médio sendo menos acessíveis para análise do que os cromossomos de ortópteros e podem apresentar um grau de dificuldade similar aos representantes das ordens Odonata, Lepdoptera e Heteroptera. O tamanho dos cromossomos está relacionado com a família estudada e a fase na qual foi mensurado, variando de 0,5 a 6,5 $\mu$ m de comprimento em metáfase espermatogonial (Smith e Virkki, 1978; Petitpierre, 1996). Entretanto, devido às dificuldades na obtenção de metáfases mitóticas, a maioria das análises nesse grupo têm sido realizadas em meiose de indivíduos machos (Petitpierre, 1996).

Smith e Virkki (1978) reuniram dados citogenéticos de 2.160 coleópteros onde 2.000 pertencem à subordem Polyphaga, 159 à Adephaga e 1 (*Micromalthus debilis*) à Archostemata. Posteriormente, Mesa e Fontanetti (1985) descreveram pela primeira vez o cariótipo de um representante da subordem Myxophaga (*Ytu zeus*) o qual apresentou  $2n=20$ . Apesar deste grupo apresentar uma ampla conservação quanto ao cariótipo constituído por  $2n=20$ , números extremos são encontrados. Estes números correspondem a  $2n=4$  no elaterídeo *Chalcolepidius zonatus* (Ferreira *et al.*, 1984) e  $2n=69$  no carabídeo *Ditomus capito* (Serrano, 1981).

Segundo White (1973) seis tipos de mecanismos sexuais ocorrem em Coleoptera: 1) no mecanismo  $X_0$ , 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 encontrado em algumas famílias como Carabidae, Lycidae, Cantharidae, Lampyridae, Passalidae e Curculionidae; 2) o  $Xy_r$  (r de “rod-bivalent”) é um sistema raro nesta ordem com o cromossomo y muito pequeno em relação ao X; 3) o  $Xy_p$  é amplamente distribuído na subordem Polyphaga e está reportado por Smith e Virkki (1978) em alguns representantes de Adephaga. Neste sistema, cuja forma é comparada a de um pára-quedas, o cromossomo X

representa o dossel, enquanto que o y, conectado com o X por duas linhas tênues, representa o pára-quedista. Geralmente os dois cromossomos são metacêntricos com o y muito pequeno e o X com tamanho similar ao dos autossomos; 4) neoXY, os cromossomos sexuais têm o mesmo tamanho e provavelmente tiveram origem a partir dos mecanismos  $Xy_p$  e  $X0$ , através de uma translocação do cromossomo X para um dos autossomos. Esse mecanismo é encontrado em famílias onde o  $X0$  também é freqüente como, Carabidae e Passalidae; 5) XY, os cromossomos sexuais são indistinguíveis quanto à forma e o tamanho. 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% possuíam mecanismo sexual do tipo  $Xy_p$ , 14%  $X0$ , 2% XY, 7% neoXY, 2,4%  $Xy_r$  e 4,2% apresentaram os cromossomos sexuais não pareados durante a prófase I.

Dentro da subordem Adephaga, Carabidae apresenta-se como uma das famílias mais bem estudadas citogeneticamente com cerca de 600 espécies analisadas (Serrano e Yadav, 1984; Rozek, 1985; Maddison, 1985; Serrano, 1986; Serrano *et al.*, 1986; Rezek, 1988; 1989; Rozek e Rudek, 1992). Esse grupo tem revelado uma grande diversidade quanto ao número cromossômico, que varia entre  $2n=8$  (Graphiterini) e  $2n=69$  (Harpalini), além de diferentes tipos de sistemas sexuais. Entretanto, tem sido observada a ocorrência de três grupos cariotípicos dentro desta família: um formado pelas tribos Bembidiini e Trechinni com  $2n=23$  ( $X0$ ) e  $2n=24$  (XY), outro representado por Carabini com  $2n=28$  e o terceiro composto por oito tribos incluindo Harpalini com  $2n=37$  cromossomos (Serrano, 1986).

Polyphaga é a subordem mais representativa dentro da ordem Coleoptera sendo, por isso, a mais bem estudada do ponto de vista citogenético. O cariótipo mais encontrado e aceito como primitivo para esta subordem é  $2n=20$ ,  $Xy_p$  com meiofórmula  $9II+Xy_p$ . Apesar da grande quantidade de famílias existente neste grupo, algumas como Curculionidae, Chrysomelidae, Scarabaeidae, Cerambycidae, Coccinellidae e Tenebrionidae se destacam

quanto ao número de espécies analisadas (Smith e Virkki, 1978; Petitpierre, 1988; Yadav *et al.*, 1979; Ferreira *et al.* 1993; Bisoi e Patnaik, 1988; Juan e Petitpierre, 1991a).

Ferreira *et al.* (1993) determinaram a meiofórmula de dezesseis espécies de Cerambycidae, sete delas pertencentes à subfamília Cerambycinae, oito à Lamiinae e uma à Prioninae. Apenas duas espécies de Cerambycinae (*Arcyphoderes hirtipes* e *Megacyllene acuta*) e uma de Lamiinae (*Hypsioma gibera*) apresentaram o cariótipo considerado primitivo para Polyphaga,  $9\text{II}+\text{Xy}_p$ . O número cromossômico das demais espécies variou de  $5\text{II}+\text{Xy}_p$  (*Pachypeza teres*) a  $17\text{II}+\text{Xy}_p$  (*Pirodes nitidus*) com uma certa predominância de  $10\text{II}+\text{Xy}_p$  (*Coleoxestia* sp., *Minochroma equestres*, *Macrophora accentifer*, *Steirastoma marmoratum*, *Acanthoderes nigricans*, *Dryocteres scropulosus* e *Acrocinus longimanus*).

Atualmente são conhecidas, citogeneticamente, cerca de 326 espécies pertencentes a 21 subfamílias de Scarabaeidae. Apesar de apresentar variação numérica de  $2n=12$  a  $2n=22$ , essa família mostra-se bastante conservada com relação ao número diplóide ( $2n=20$ ) e mecanismo sexual do tipo  $\text{Xy}_p$  além de apresentar cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e acrocêntricos (Smith e Virkki, 1978; Yadav *et al.*, 1979; Vidal e Nocera, 1984; Martins, 1994; Bione, 1999; Moura *et al.*, 2003). A subfamília Coprine é considerada a menos conservada quanto ao número modal. Existem evidências de que os cariótipos derivados nesta subfamília surgiram através de eventos como perda de cromossomos, aumento no tamanho do cromossomo y, decréscimo no número cromossômico por fusão autossomo-autossomo ou X-autossomo (Yadav e Pillai, 1977).

Petitpierre (1988) reuniu dados de 725 espécies de Chrysomelidae onde foi verificada uma ampla variedade no número cromossômico ( $2n=8$  a  $2n=64$ ), sendo  $2n=24$  um pouco mais freqüente que os outros. Entretanto, no que diz respeito às subfamílias, observou-se uma certa conservação com Donaciinae-Cryptocephalinae  $2n=30$ , Chrysomelinae  $2n=24$ , Megalopoinae  $2n=20$ , Hispinae-Cassinae  $2n=18$  e Criocerinae-Eumolpinae  $2n=16$ . O número modal  $2n=20$  tem sido observado no arcaico gênero *Timarcha* dentro de Chrysomelinae (Petitpierre *et al.*, 1991). Em *Chrysolina* (Chrysomelinae) o número diplóide varia entre  $2n=22$  e  $2n=47$  com predominância de  $2n=24$  ( $11\text{II}+\text{Xy}_p$ ), encontrado em mais de 50% das espécies analisadas. Entretanto, tem sido observado uma forte correspondência entre o

número cromossômico e as plantas hospedeiras de algumas espécies. Dessa forma, as espécies de *Chrysolina* que se alimentam de Lamiaceae exibem  $2n=24$ , de Asteraceae  $2n=40$ , de Hypericaceae  $2n=32/38$ , de Plantaginaceae  $2n=36/40$  e de Apiaceae  $2n=40/46/47$  (Petitpierre *et al.*, 1991; 2001; Petitpierre, 1999).

Por outro lado, os crisomelídeos pertencentes à subfamília Alticinae apresentam complemento cromossômico e comportamento dos cromossomos sexuais diferentes da maioria dos coleópteros. Os autossomos, na maioria das espécies, formam 10 bivalentes durante a meiose e o sistema sexual mais frequente é X+y. Os cromossomos sexuais apresentam inúmeras irregularidades no emparelhamento, orientação e segregação (pré ou pós-reducional) e podem ter tamanhos e morfologia diferentes em espécies relacionadas, sugerindo uma formação recente e não estabelecida (Virkki, 1963; 1964; 1967). Quanto ao tamanho dos sexuais, a tribo Oedionychini se destaca por apresentar cromossomos extremamente grandes, muitas vezes correspondendo a 50% do complemento cromossômico total (Smith e Virkki, 1978; Virkki, 1985).

### 2.1.2 Família Tenebrionidae

Dentro da família Tenebrionidae, aproximadamente 200 espécies foram estudadas citogeneticamente representando apenas 1% da sua diversidade. O número diplóide varia de  $2n=14$  (*Diaperis boleti* e *Scotobius miliaris*) a  $2n=38$  (*Blaps gibba*) com uma nítida predominância do cariótipo constituído por 20 cromossomos ( $2n=20$ ) encontrado em quase 65% das espécies analisadas. O sistema de determinação sexual  $Xy_p$  é o mais frequente, estando presente em 67% das espécies. Outros sistemas simples ( $XY$ ,  $X0$ ,  $Xy_r$ ) e múltiplos ( $2XY$ ,  $3XY$ ,  $4XY$  e  $4X2Y$ ) também são encontrados (Juan e Petitpierre, 1991a). Nessa família o conjunto cromossômico é formado, na maioria dos casos, por cromossomos metacêntricos e submetacêntricos de tamanhos similares e muitas vezes de difícil distinção individual (Petitpierre, 1996; Vitturi *et al.*, 1996).

Os tenebrionídeos *Pachycera coromandelensis* e *Alphitobius laevigatus* apresentaram número cromossômico igual a  $2n=20$  e cromossomos metacêntricos e submetacêntricos em sua maioria. Em ambas as espécies o sistema sexual encontrado foi o

$Xy_p$  constituindo, portanto, a meiofórmula  $9II+Xy_p$ . Por sua vez, *Holobrachium dentipes* exibiu  $2n=22$  com sistema sexual  $Xy_r$  (Bisoi e Patnaik, 1988). Três representantes da subfamília Tentyriinae (*Hegeter grancanariensis*, *Pachychila sublunata* e *Tentyria grossa*) e quatro da Tenebrioninae (*Misolampus goudoti*, *Tenebrio molitor*, *Gonocephalum patrulele* e *G. rusticum*) foram estudadas por Juan e Petitpierre (1989a). Todas as espécies apresentaram número diplóide  $2n=20$  e sistema sexual  $Xy_p$ . *G. patrulele* e *G. rusticum* revelaram apenas cromossomos metacêntricos que decrescem gradualmente de tamanho. As outras espécies, além de cromossomos metacêntricos, revelaram de um a quatro pares de acrocêntricos. Outras seis espécies foram estudadas por Yadav *et al.* (1994). *Rhytinota impolita*, *Gonocephalum yagum*, *G. bilineatum*, *Scleron reitteri*, *Opatroides vicinus* e *Pseuloblastus melly* apresentaram  $2n=20$  e sistema de determinação sexual do tipo  $Xy_p$ , com predominância de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos.

Palmer e Petitpierre (1997) analisaram cromossomicamente duas espécies da tribo Milosampini (*Misolampus subglader* e *Coelometopus chypeatus*), duas espécies do gênero *Glabrasida* (*G. goudoti* e *G. zapareti*) e quatro do gênero *Asida* (*A. glacialis glacialis*, *A. glacialis rustica*, *A. moraguesi*, *A. cardonae*). Todas apresentaram cariótipo composto por  $2n=20$  e sistema sexual  $Xy_p$ , meiofórmula  $9II+Xy_p$ .

Espécimes de *Palembus dermestoides*, coletados no Estado de São Paulo, apresentaram meiofórmula  $9II+Xy_p$  com cariótipo composto por 20 cromossomos submetacêntricos e subtlocêntricos. O cromossomo X é um metacêntrico médio enquanto o y, também metacêntrico, é o menor do complemento (Almeida *et al.*, 2000).

Apesar do cariótipo  $2n=20$  ( $9II+Xy_p$ ) ser bem conservado nessa família, três tribos constituem uma exceção. Dentro da subfamília Pimeliinae, as tribos Akidini e Pimeliini apresentam uma redução no número cromossômico. Das 6 espécies de Akidini analisadas, pertencentes aos gêneros *Akis* e *Morica*, todas exibiram  $2n=16$  com meiofórmula  $7II+neoXY$ . Pimeliini apresenta um número maior de espécies estudadas, 22, onde apenas duas não apresentam  $2n=18$ . Os sistemas sexuais  $Xy_p$  e  $Xy_r$  aparecem quase na mesma proporção (Juan e Petitpierre, 1988; 1989b; 1990; 1991a; Holecova *et al.*, 2002). O Gênero *Blaps* (tribo Blaptini) tem se caracterizado por apresentar espécies com números elevados de

cromossomos além de sistemas complexos de determinação do sexo (Lewis e John, 1957; Virkki, 1974; Smith e Virkki, 1978; Vitturi *et al.*, 1996). Das 12 espécies estudadas, apenas *B. judeorum*  $2n=19$  (8II+2X1Y) apresentou número diplóide menor que 30 cromossomos. Por sua vez, *B. gibba* exibiu o maior número cromossômico com  $2n=38$  (15II+7X1Y) (Vitturi *et al.*, 1996). Segundo Virkki (1974) o aumento no número diplóide nessas espécies se deve a sucessivas fissões cêntricas envolvendo os autossomos. No que diz respeito aos cromossomos sexuais, foi sugerido que a origem dos sistemas múltiplos, encontrados neste grupo, se deve a translocações autossomo-cromossomo y. Tendo como base o  $Xy_p$ , esses rearranjos mantêm um número reduzido de ys (geralmente um), enquanto incorporam novos X ao multivalente sexual.

Tenebrioninae é a subfamília mais bem estudada contendo cerca de metade das espécies analisadas nesta família. Apesar de bem conservada quanto ao cariótipo  $9II+Xy_p$ , pode-se observar uma boa quantidade de variações numéricas e mecanismos de determinação sexual em algumas tribos. Na tabela 1 estão listados dados citogenéticos dessa subfamília.

**Tabela 1:** Números cromossômicos e sistemas de determinação sexual em representantes da subfamília Tenebrioninae (Tenebrionidae). Dados de Juan e Petitpierre, 1991a (1); Juan e Petitpierre, 1991b (2); Yadav *et al.*, 1994 (3); Vitturi *et al.*, 1996 (4); Palmer e Petitpierre, 1997(5).

Tribo/Espécie	Nº Diplóide	Meiofórmula	Autor
Amarygmini			
<i>Holoplobrachium dentipes</i> (FABRICIUS)	22	$10+Xy_p$	1
Blaptini			
<i>Blaps cribrosa</i> SOLIER	36	$9+X_{1-12}Y_{1-6}$	1
<i>gigas</i> LINNAEUS	35	$15+4XY$	1,2,4
<i>judaeorum</i> MILLER (S Race)	19	$8+2XY$	1
<i>judaeorum</i> MILLER (N Race)	21	$9+2XY$	1
<i>lethifera</i> MARSHAN	37	$17+2XY$	1,2
<i>lusitanica</i> HERBST	35	$15+4XY$	1
	19	$8+2XY$	1
<i>mortisaga</i> LINNAEUS	36	$16+3XY$	1
<i>mucronata</i> LATREILLE	36	$16+3XY$	1
<i>sulcata</i> CASTELNAU	34	$15+3XY$	1
<i>tenuicollis</i> SOLIER	36	$15+4X2Y$	1
<i>waltli</i> SEIDLITZ	34	$15+3XY$	1
<i>wiedemanni</i> SOLIER	25	$15+4XY$	1
<i>bedeli torres-salai</i> ESPAÑOL	34	$15+XXX Y$	5
<i>gibba</i> CASTELNAU	38	$15+7XY$	4
<i>Caenoblaps nitida</i> SCHUSTER	35	$16+XXY$	1
Coniointini			

<i>Diastolinus fortipes</i> FAIRMAIRE	-	12+Xy <sub>p</sub>	1
Crypticini			
<i>Crypticus gibbulus</i> QUENCEL	20	9+Xy <sub>p</sub>	1
<i>Navicularis latihumeralis</i> HAR.LINDBERG	20	9+Xy <sub>p</sub>	1
Dendarini			
<i>Isocerus balearicus</i> SCHAUFUSS	-	9+Xy <sub>p</sub>	1
<i>Phylan abbreviatus</i> OLIVER	20	9+Xy <sub>p</sub>	1
<i>gibbulus</i> MULSANT & REY	-	9+Xy <sub>p</sub>	1
<i>mediterraneus</i> (PIOCHARD)	-	9+Xy <sub>p</sub>	1
<i>nitidicollis</i> PÉREZ ARCAS	26	12+Xy <sub>p</sub>	1
<i>obesus</i> WALT	-	9+Xy <sub>p</sub>	1
<i>semicostatus</i> MULSANT & REY	26	12+Xy <sub>p</sub>	1
Eleodini			
<i>Eleodes armata</i> LECONTE	20	9+neoXY	1
<i>cordata</i> ESCHSCHOLTZ	20	9+neoXY	1
<i>dentipes</i> ESCHSCHOLTZ	20	9+neoXY	1
Helopini			
<i>Nesotes viridicollis</i> SCHAUFUSS	20	9+Xy <sub>p</sub>	1
<i>conformis grancanariensis</i> ESPAÑOL	-	9+Xy <sub>p</sub>	1
<i>gomerensis</i> (WOLLASTON)	20	9+Xy <sub>p</sub>	1
<i>piscescens</i> (WOLLASTON)	-	9+Xy <sub>p</sub>	1
<i>porrectus</i> (WOLLASTON)	-	9+Xy <sub>p</sub>	1,2
<i>picipens</i> WOLLASTON	20		2
Misolampini			
<i>Coelometopus clypeatus</i> GERMAR	20	9+Xy <sub>p</sub>	5
<i>Misolampus goudoti erichsoni</i> VAULOGER	20	9+Xy <sub>p</sub>	1,2
<i>subglaber</i> ROSENHAUER	20	9+Xy <sub>p</sub>	5
Opratini			
<i>Pseudolamus seriatoporus</i> FABRICIUS	-	9+Xy <sub>p</sub>	1
<i>Gonocephalum</i> sp.	20	9+Xy <sub>p</sub>	1
<i>Gonocephalum</i> sp.	20	9+Xy <sub>p</sub>	1
<i>Gonocephalum</i> sp.	20	9+Xy <sub>p</sub>	1
<i>Gonocephalum</i>			
<i>bilineatum</i> (WALKER)	20	9+Xy <sub>p</sub>	1,3
<i>dorsogranosum</i> FAIRMAIRE	-	9+Xy <sub>p</sub>	1
<i>depressum</i> FABRICIUS	20	9+Xy <sub>p</sub>	1
<i>elongatum</i> FAIRMAIRE	20	9+Xy <sub>r</sub>	1
<i>hoffmannseggi</i> STEVEN	20	9+Xy <sub>p</sub>	1
<i>oblongum</i> FABRICIUS	20	9+Xy <sub>p</sub>	1
<i>parallelum</i> KASZAB	20	9+Xy <sub>p</sub> /Xy <sub>r</sub>	1
<i>patruela</i> (ERICHSON)	20	9+Xy <sub>p</sub>	1,2
<i>rusticum</i> OLIVIER	20	9+Xy <sub>p</sub>	1,2
<i>oblitum</i> WOLLASTON	20	-	2
<i>vagum</i> STEVEN	20	9+Xy <sub>p</sub>	1,3
<i>Opatroides vicinus</i> (FAIRMAIRE)	20	9+Xy	1
	21	9+X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	1
	20	9+Xy <sub>p</sub>	1,3
<i>Ammobius rufus</i> LUCAS	20	9+Xy <sub>p</sub>	1,2
<i>Scleron</i> sp.	22	10+Xy <sub>r</sub>	1
<i>Scleron</i> sp.	20	9+Xy	1
<i>Scleron asperulum</i> WOLLASTON	20	9+neoXY	1,2
<i>granutipenne</i> FAIRMAIRE	22	10+Xy <sub>p</sub>	1
<i>reitteri</i> GEBIEN	22	10+Xy <sub>p</sub>	1,3
<i>Mesomorphus villiger</i> BLANCHARD	19	9+X <sub>0</sub>	1

<i>Clitobius ovatus opacus</i> HAR.LINDBERG	-	9+Xy <sub>p</sub>	1
Pedinini			
<i>Opatrinus aciculatus</i> LECONTE	20	9+Xy <sub>p</sub>	1
<i>validus</i> BURMEISTER	20	9+Xy <sub>p</sub>	1
<i>Blapstinus</i> sp.	-	9+Xy <sub>p</sub>	1
Phaleriini			
<i>Phaleria acuminata</i> KÜSTER	20	9+Xy <sub>p</sub>	1
<i>Phaleria variabilis</i> QUED	-	9+Xy <sub>p</sub>	1
Platynotini			
<i>Pseudoblaps meteeyi</i> MULSANT & REY	20	9+Xy <sub>p</sub>	1
<i>Pseudoblaps mellyi</i> MULSANT & REY	20	9+Xy <sub>p</sub>	3
<i>Platynotus excavatus</i> (FABRICIUS)	20	9+Xy <sub>p</sub>	1
	-	9+Xy <sub>p</sub>	1
<i>punctatipennis</i> MULSANT & REY	20	9+Xy <sub>p</sub>	1
Platydemini			
<i>Platydemia impressifrons</i> FAIRMAIRE	20	9+Xy <sub>p</sub>	1
Scaurini			
<i>Eulabris</i> sp.	20	9+Xy <sub>p</sub>	1
<i>Scaurus punctatus</i> FABRICIUS	-	9+neoXY	1
<i>striatus</i> FABRICIUS	24	11+neoXY	1,2
<i>vicinus</i> SOLIER	-	11+neoXY	1
Scotobiini			
<i>Scotobius miliaris</i> (BILLBERG)	14	6+Xy <sub>p</sub>	1
<i>muricatos</i> GUERIN	18	8+Xy <sub>p</sub>	1
<i>tritidis</i> GUERIN	18	8+neoXY	1
Tenebrionini			
<i>Tenebrio molitor</i> LINNAEUS	20	9+Xy	1,2
	20	9+Xy <sub>r</sub>	1
	20	9+Xy <sub>p</sub>	1
<i>obscurus</i> FABRICIUS	20	9+Xy <sub>r</sub>	1
<i>picipes</i> HERBST	20	9+Xy <sub>p</sub>	1
<i>Upis ceramboides</i> LINNAEUS	20	9+Xy <sub>p</sub>	1
<i>Alobates pennsylvanica</i> DEGGER	20	9+Xy <sub>p</sub>	1
<i>Scobates calcaratus</i> FABRICIUS	-	8+neoXY	1
<i>Derosphaerus cribrum</i> FAIRMAIRE	20	9+Xy <sub>p</sub>	1
<i>Balopus elongatus</i> HERBST	20	-	1
Trachyscelini			
<i>Trachyscelis aphadioides</i> LATREILLE	22	10+Xy <sub>p</sub>	1
Ulomini			
<i>Alphitobius</i> sp.	20	9+Xy <sub>p</sub>	1
<i>Alphitobius</i> sp.	20	9+Xy <sub>p</sub>	1
<i>diaperinus</i> (PANZER)	19	9+X0	1
<i>pliceus</i> OLIVIER	20	9+Xy <sub>p</sub>	1
<i>Tribolium anaphe</i> HINTON	18	8+X0	1
<i>audax</i> HALSTEAD	-	9+Xy <sub>p</sub> +ss	1
<i>brevicornis</i> LEC.	18	9+X0	1
<i>castaneum</i> HERBST	20	9+Xy <sub>p</sub>	1,2
<i>confusum</i> DU VAL	18	8+neoXY	1
<i>destructor</i> UYTENBOOGAART	18	8+neoXY	1
<i>ferrugineum</i> FABRICIUS	20	9+Xy <sub>p</sub>	1
<i>freemani</i> HINTON	20	9+Xy <sub>p</sub>	1
<i>madens</i> CHARPENTIER	-	9+Xy+ss	1
<i>Latheticus oryzae</i> WATERHOUSE	-	9+Xy <sub>p</sub>	1
<i>Sitophagus hololeptoides</i> CASTELNAU	20	9+Xy <sub>p</sub>	1

<i>Gnathocerus cornutus</i> FABRICIUS	20	9+Xy <sub>p</sub>	1
<i>maxillosus</i> FABRICIUS	20	9+Xy <sub>p</sub>	1
<i>Cynaesus angustus</i> LECONTE	20	9+Xy <sub>p</sub>	1
<i>Palorus subdepressus</i> WOLLASTON	20	9+Xy <sub>p</sub>	1

### 2.3 Heterocromatina Constitutiva (HC) e Sua Distribuição em Coleoptera

A heterocromatina foi originalmente descrita, através de estudos citológicos, como uma fração do genoma que permanece visivelmente condensada durante todo o ciclo celular de plantas e animais (Heitz, 1933). Este componente genômico pode ser diferenciado em dois tipos. A heterocromatina constitutiva (HC) se caracteriza por apresentar pouca densidade de genes, grande quantidade de DNA repetitivo, replicação tardia, baixa frequência de recombinação, localização preferencial na região pericentromérica dos cromossomos de eucariotas superiores, além de estar associada a proteínas específicas como a HP1 e as SU(VAR)s (Renauld e Gasser, 1997; Wallrath, 1998; Henikoff, 2000; Redi *et al.*, 2001; Grewal e Elgin, 2002). Por sua vez, a heterocromatina facultativa é estruturalmente idêntica à eucromatina. Ela se distingue da HC por aparecer em cromossomos inteiros ou grupos de cromossomos dentro de um cariótipo. Alguns exemplos conhecidos são a inativação de um dos cromossomos X de fêmeas de mamíferos e de todo o complemento cromossômico de origem paterna de alguns homópteros (John, 1988). Mais recentemente, o termo heterocromatina também tem sido usado para descrever diferentes formas de cromatina que são estrutural e bioquimicamente distintas (Murzina *et al.*, 1999).

Dois tipos de heterocromatina constitutiva, com características próprias, foram descritos: a  $\alpha$ -heterocromatina e a  $\beta$ -heterocromatina. O primeiro é o tipo mais comum da HC e consiste de repetições *em tandem* de uma seqüência simples, correspondendo à heterocromatina detectada pelo bandeamento C nos cromossomos dos eucariotas superiores. Os blocos de  $\alpha$ -heterocromatina podem ser polimórficos, variando consideravelmente de tamanho de um indivíduo para o outro. A  $\beta$ -heterocromatina é um tipo raro de heterocromatina constitutiva rico em retrotransposons e tem sido observada nos cromossomos de *Drosophila* e do hamster *Mesocricetus auratus* onde forma fibras de

cromatina relativamente desorganizadas que replicam tardiamente e se posicionam como uma fronteira entre a  $\alpha$ -heterocromatina e a eucromatina dessas espécies (Holmquist *et al.*, 1998).

Apesar da heterocromatina constituir uma significativa fração na maioria dos genomas de eucariotas, sua função ainda não é muito clara. Num passado recente, acreditava-se que a heterocromatina era um componente sem função sendo tratado como “lixo evolucionário” e, portanto, dispensável ao genoma. Atualmente, devido principalmente ao grande número de estudos moleculares, esta visão parece ter mudado. Controle gênico, defesa do genoma contra elementos parasíticos, manutenção e auxílio dos papéis desempenhados por telômeros e centrômeros, dosagem compensatória, eliminação de DNA e endoreplicação diferencial são algumas das funções relatadas na literatura atual (Redi *et al.*, 2001; Wallrath, 1998; Henikoff 2000; Zuckerkandl e Henning, 1995; Renauld e Gasser, 1997; Grewal e Elgin, 2002).

Uma das propriedades mais estudadas da heterocromatina é o silenciamento gênico. Este fenômeno é observado quando genes são colocados em justaposição a domínios de heterocromatina através de rearranjos cromossômicos ou transposição. Conhecida como PEV (Variação por Efeito de Posição), esta propriedade foi descoberta em *Drosophila* quando o gene *White*<sup>+</sup>, responsável pela pigmentação vermelha dos olhos e localizado no cromossomo X, foi transportado para próximo da heterocromatina centromérica devido a uma inversão. Este processo originou diferentes graus de pigmentação nos olhos da prole de acordo com a posição do gene em relação à heterocromatina; quanto mais próximo o gene, menor o grau de pigmentação. Este fenômeno também tem sido observado em outros grupos de organismos como leveduras e mamíferos (Wallrath, 1998; Grewal e Elgin, 2002).

Estudos citológicos, genéticos e moleculares sobre o silenciamento gênico provocado pelo PEV em *Drosophila*, indicam dois mecanismos plausíveis: primeiro, alterações na estrutura da cromatina que resultam na inacessibilidade do gene aos fatores de transcrição e segundo, compartimentalização nuclear. A teoria da compartimentalização nuclear assume que os genes residem em lugares específicos do núcleo e que os fatores de regulação e transcrição não estão distribuídos uniformemente através do nucleoplasma (Wallrath, 1998).

O conceito de equilocidade proposto por Heitz (1933) defende que em um mesmo cariótipo a distribuição da HC entre os cromossomos não homólogos tende a ser equilocal, isto é, os blocos de HC em diferentes cromossomos apresentam, de uma forma geral, a mesma distância de seus respectivos centrômeros. Segundo Loidl (1983) para cada banda intercalar existente no cariótipo, existe um outro cromossomo onde um de seus braços coincide em tamanho com a distância do referido bloco até o centrômero do seu cromossomo. Sendo assim, os telômeros dos menores braços cromossômicos definem a posição das bandas intercalares nos maiores braços de outros cromossomos e braços muito pequenos podem corresponder a bandas pericentroméricas ou a nenhuma banda.

Baseados nestes conceitos, Schweizer e Loidl (1987) propuseram um modelo pelo qual o padrão de distribuição da HC em muitas espécies seria o reflexo da disposição espacial dos cromossomos no núcleo interfásico mitótico. A heterocromatina seria formada nos telômeros e depois transportada para as regiões intersticiais. Como consequência da migração na anáfase, os cromossomos ficariam alinhados por seus centrômeros, deixando em proximidade os telômeros dos cromossomos pequenos com regiões intersticiais dos cromossomos maiores. Isto possibilitaria a transferência de HC dos telômeros para regiões intersticiais entre cromossomos não homólogos. Na meiose, atuam os processos de homogeneização destas regiões, tanto entre cromossomos homólogos quanto entre não homólogos, sendo favorecido pela orientação em *bouquet*. Excessões a este modelo podem ser explicados por eventos posteriores como rearranjos cromossômicos, amplificação e transposição da heterocromatina, recombinação meiótica, evolução cromossômica independente, entre outros.

Dentre as técnicas usadas para o estudo da HC, o bandeamento C é a que tem sido mais largamente utilizada em plantas e animais. Dados de diferentes espécies de eucariotas têm mostrado uma localização preferencial da HC nas regiões pericentroméricas. Entretanto, blocos intersticiais ou terminais, quando presentes, podem auxiliar na identificação de homólogos ou de cromossomos individuais na análise do cariótipo de uma dada espécie (Sumner, 1990).

Em Coleoptera, dados sobre a análise da heterocromatina constitutiva ainda são escassos. Entretanto, os poucos estudos realizados têm demonstrado uma preferência dos blocos de HC pela região pericentromérica podendo ocorrer, em menor frequência, nas regiões intersticiais e teloméricas dos autossomos. Os cromossomos sexuais, por sua vez, apresentam um padrão variável podendo exibir bandas apenas na região pericentromérica ou ao longo de todo o cromossomo (Angus 1982, 1983; Drets *et al.*, 1983; Virkki, 1983; Juan *et al.*, 1990; Rozek e Rudek, 1992; Juan *et al.*, 1993; Bione 1999; Almeida *et al.*, 2000; Maffei *et al.*, 2000; Moura *et al.*, 2003).

As espécies de Scarabaeidae estudadas com o bandeamento C tem revelado um conservado padrão de HC pericentromérica, entretanto bandas adicionais têm sido encontradas (Vidal e Nocera, 1984; Bione 1999; Moura *et al.*, 2003). Vidal e Nocera (1984) estudaram três representantes da subfamília Coprinae: *Glyphoderus sterquilinus*, *Eucranium arachnoides* e *Anomiopsoides heteroclyta*. Os dois primeiros revelaram grande diferença quanto ao posicionamento dos blocos de HC, com *G. sterquilinus* apresentando bandas pericentroméricas no par 1 e nos pares 3-8 e nenhuma banda no par 2 e sexuais, enquanto que em *E. arachnoides* todos os cromossomos apresentaram bandas pericentroméricas com os pares 4, 6, e 8 e o X exibindo bandas teloméricas adicionais. Por outro lado, em *A. heteroclyta* toda a HC está distribuída pericentromericamente. O bandeamento C em *Enema pan* e *Ligyris ebenus* (Dynastinae) revelou blocos de HC pericentroméricos em todos os cromossomos. Em *L. ebenus* o X apresentou-se quase totalmente heterocromático (Vidal e Giacomozzi, 1978; Bione, 1999). Por sua vez, *Geniates borelli*, *Macraspis festiva* e *Pelidnota pallidipennis* (Rutelinae) exibiram padrão similar com grandes blocos pericentroméricos e os Xs quase totalmente heterocromáticos (Bione, 1999). Heterocromatina pericentromérica também pôde ser observada nos melolontíneos *Phyllophaga (Phytalus) vestita*, *Phyllophaga (Phyllophaga) aff. capillata* e *Lyogenys fuscus* (Moura *et al.*, 2003).

Em Carabidae os blocos de HC também estão predominantemente distribuídos na região pericentromérica, no entanto, esta família apresenta uma certa variabilidade quanto à presença de bandas adicionais teloméricas ou intersticiais. *Harpalus affinis* apresentou um

interessante padrão com proeminentes blocos pericentroméricos e bandas intersticiais em alguns dos cromossomos. O par 18 e o cromossomo X mostraram-se inteiramente corados (Rozek e Maryanska-Nadachowska, 1991). Outros dois carabídeos (*Acupalpus elegans* e *Bembidion minimum*) tiveram seu cariótipo estudado com o bandeamento C. Foi observado que *A. elegans* possui um padrão de bandas C composto por blocos pericentroméricos em quase todos os cromossomos. Os pares 1, 4, 11, 12, 16, e 17 foram heteromórficos quanto a localização dos segmentos C positivos. Os pares 10, 13 e 19, assim como o braço longo dos pares 14 e 15 foram completamente C positivos. O cromossomo X revelou um grande bloco de HC ao redor do centrômero que se estendia ocupando o braço curto e metade do braço longo enquanto que o Y foi totalmente heterocromático. Em *B. minimum* o bandeamento C revelou blocos localizados nas regiões terminal e subterminal ocorrendo, na maioria dos cromossomos, em ambos os braços (Rozek e Rudek, 1992). Quatro espécies do gênero *Trechus* (*T. latus*, *T. pilinensis*, *T. pulchellus* e *T. quadristriatus*) exibiram, na maioria dos cromossomos, bandas pericentroméricas. Entretanto, o par 1 em *T. pilinensis* também apresentou uma banda terminal e nenhuma marcação em *T. quadristriatus*. Por sua vez, em *T. latus* o cromossomo X apresentou-se totalmente eucromático (Rozek, 1998a).

Proença *et al.* (2002) estudaram dois representantes do gênero *Odontocheila* (Cicindelidae). A análise com 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.

Os coccinelídeos *Epilachna paenulata* e *Eriopsis connexa* revelaram, através do bandeamento C, bandas pericentroméricas em todos os cromossomos. Em *E. paenulata* a HC representa cerca de 15% do complemento total do conjunto haplóide (Drets *et al.*, 1983; Maffei *et al.*, 2000). Na família Hydrophilidae, *Helophorus grandis* e *H. aquaticus* apresentaram bandas pericentroméricas com exceção do cromossomo B observado em *H. grandis* que revelou um grande bloco de HC em posição intersticial (Angus, 1982; 1983). No meloídeo *Epicauta atomaria* e nos crisomelídeos *Paranaita opima*, *Omophoita magniguttis* e *O. sexnotata* foram verificados blocos C positivos na região pericentromérica de todos os

cromossomos do complemento. Os crisomelídeos, por sua vez, exibiram blocos adicionais de HC nos cromossomos sexuais (Almeida *et al.*, 2000; Almeida, 2001).

A família Tenebrionidae, entretanto, tem sido um pouco mais estudada quanto à distribuição e a composição da HC. A grande quantidade de HC e DNA satélite, encontrados em diferentes espécies desta família, caracteriza esses organismos como modelo para estudo da estrutura, função e evolução desses componentes genômicos (Petitpierre, 1996). Em várias espécies o DNA satélite analisado, até o momento, corresponde a mais de 50% do genoma e apresenta-se formado por seqüências monoméricas que variam de 100-360 pares de bases (Mestrovic *et al.*, 2000). Estas seqüências têm se revelado altamente ricas em pares de base AT: 63% em *Misolampus goudoi* (Pons *et al.*, 1993), 68% em *Tenebrio obscurus* (Ugarkovic *et al.*, 1994), 70,5% em *Tribolium freemani* (Juan *et al.*, 1993) e 73% em *Tribolium confusum* (Plohl *et al.*, 1993).

Juan e Petitpierre (1989a) analisaram o padrão de bandas C de sete espécies de Tenebrionidae (*Hegeter grancanariensis*, *Pacchyla sublunata*, *Tentyria grossa*, *Misolampus goudoti*, *Tenebrio molitor*, *Gonocephalum patrule* e *Gonocephalum rusticum*). Todas apresentaram proeminentes blocos de HC na região pericentromérica de todos os cromossomos. *Misolampus goudoti* apresentou adicionalmente pequenas bandas teloméricas, enquanto que em *G. patrule* o cromossomo X mostrou-se quase totalmente heterocromático. Nestas espécies também foi observada uma acentuada diferença na quantidade da heterocromatina corada pelo bandejamento C, com percentuais que variaram de aproximadamente 25% em *Pacchyla sublunata* e *Gonocephalum rusticum* até 58% em *Misolampus goudoti*.

Em *Tribolium confusum* e *Tenebrio obscurus* foram descritos grandes blocos de HC na região pericentromérica de todos os cromossomos do complemento. Adicionalmente, *T. obscurus* apresentou bandas teloméricas fracamente coradas. Em *T. confusum* os blocos de HC chegam a representar entre 40 e 45% do comprimento total dos cromossomos (Plohl *et al.*, 1993; Urgakovic *et al.*, 1994).

Cromossomos mitóticos de *Palembus dermestoides* apresentaram blocos de HC na região pericentromérica de todos os autossomos e do X, enquanto que o  $y_p$  não

apresentou nenhum bloco. Em alguns cromossomos, também foram detectadas bandas na região telomérica (Almeida *et al.*, 2000).

Vitturi *et al.* (1996) estudaram através do bandeamento C duas espécies do gênero *Blaps*. Em *B. gigas* foram detectadas bandas na região pericentromérica de todos os autossomos e cromossomos sexuais. *Blaps gibba* apresentou blocos de HC na região pericentromérica de todos os autossomos. O par 1 também apresentou bandas intersticiais enquanto que os pares 9 e 12, bandas distais. O uso desta técnica também permitiu a distinção de alguns dos cromossomos sexuais dentro dos sistemas múltiplos destas espécies.

Em *Tenebrio molitor* blocos de HC foram detectados na região pericentromérica de todos os cromossomos. Além disso, cinco pares exibiram bandas distais enquanto que o X e quatro pares de autossomos, bandas proximais. O cromossomo Y apresentou-se totalmente heterocromático. O uso da endonuclease de restrição *Alu* I revelou um padrão muito semelhante ao do bandeamento C, com proeminentes blocos de heterocromatina na região pericentromérica de todos os cromossomos. Por sua vez, o tratamento com *Eco* RI apresentou um padrão reverso ao do bandeamento C com as regiões intersticiais e terminais dos cromossomos levemente coradas. A boa resolução obtida através do uso desta endonuclease, permitiu a descoberta de um heteromorfismo referente ao par 9 causado, provavelmente, por uma inversão pericentromérica (Juan *et al.*, 1990).

As técnicas que utilizam corantes fluorescentes têm contribuído de forma significativa para um estudo mais preciso das regiões heterocromáticas coradas pelo bandeamento C. Esses fluorocromos permitem qualificar esse material quanto à composição de pares de bases e estão divididos em dois grupos principais. O primeiro é formado por aqueles específicos para regiões ricas em AT como Quinacrina, Hoechst 33258 e o 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) e o segundo grupo, pelos que mostram afinidade para GC como Cromomicina A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>) e Mitramicina (MM) (Schweizer, 1976).

Em Scarabaeidae poucas espécies foram estudadas com a tríplice coloração CMA<sub>3</sub>/DA/DAPI. As bandas C de *Thorectes intermedius* foram positivas para CMA<sub>3</sub> e homogêneas para DAPI. *Macraspis festiva* mostrou uma HC predominantemente neutra, enquanto *Geniates borelli* e *Pelidinota pallidipennis*, apresentaram uma HC rica nos pares de

bases GC e AT, respectivamente. Em todas as espécies houve marcação das regiões organizadoras de nucléolos ativas com CMA<sub>3</sub> (Vitturi *et al.*, 1999; Bione, 1999). Por sua vez, *Phyllophaga (Phytalus) vestita*, *Phyllophaga (Phyllophaga) aff. capillata* e *Lyogenys fuscus* também apresentaram diferenças quanto à composição da HC. Em *Phyllophaga (Phytalus) vestita* tanto o DAPI quanto o CMA<sub>3</sub> coraram a HC. Em *Phyllophaga (Phyllophaga) aff. capillata* a HC mostrou-se homogênea para o DAPI e apresentou bandas CMA<sub>3</sub> positivas em um dos autossomos e no bivalente sexual. Por outro lado, *L. fuscus* apresentou sua HC fortemente marcada pelo DAPI e nenhuma marcação com o CMA<sub>3</sub> (Moura *et al.*, 2003).

O uso da dupla coloração DAPI/DA em cromossomos mitóticos de *Tribolium confusum* induziu uma forte marcação fluorescente nas regiões pericentroméricas de todos os cromossomos, correspondendo assim ao padrão de HC identificado nesta espécie (Plohl *et al.*, 1993). Em *Tenebrio molitor*, apesar da grande quantidade de bases A-T em seu DNA satélite, tanto o CMA<sub>3</sub> quanto o DAPI revelaram pequenas marcações correspondentes aos blocos de heterocromatina observados pelo bandeamento C (Juan *et al.*, 1990).

#### 2.4 Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONs)

As regiões organizadoras de nucléolos (RONs) são sítios cromossômicos onde estão localizados os genes para transcrição do RNA ribossomal (RNAr), o qual é sintetizado e processado em pré-ribossomos existentes no nucléolo e mais tarde se tornarão parte de ribossomos maduros localizados no citoplasma. Nos eucariotos 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 arranjados *em tandem* formando unidades transcricionais que originam um RNAr 45S precursor das formas 5,8S, 18S e 28S (Sumner, 1990).

Toda a estrutura do nucléolo interfásico está organizada ao redor das RONs. A transcrição dos genes que compõe a RON gera duas estruturas que são encontradas em todos os nucléolos: o componente fibrilar denso e o componente granular. O primeiro contém RNA pré-ribossomal recém sintetizado e uma coleção de proteínas, enquanto que o segundo é

composto por partículas pré-ribossomais quase completas destinadas ao citoplasma. Um terceiro componente, o centro fibrilar, é normalmente observado no nucléolo da maioria dos metazoários mas geralmente não está presente nos eucariotas inferiores. Quando presente, o centro fibrilar é circundado pelo componente fibrilar denso e é exatamente na região limitante entre estas duas estruturas onde se encontra a zona de transcrição dos genes de DNAr (Olson *et al.*, 2000).

A morfologia do nucléolo pode variar bastante de acordo com o tipo celular e o estado fisiológico da célula. Isto depende, de fato, do balanço entre a síntese de RNAr, a produção e acumulação de proteínas nucléolares e o transporte das subunidades ribossomais (Goessens *et al.*, 1986). De acordo com o arranjo e a quantidade de seus componentes, três tipos principais de nucléolo podem ser visualizados: 1- o nucléolo em forma de anel tem um centro fibrilar localizado centralmente que é circundado por uma pequena zona de componente fibrilar denso e outra de componente granular; 2- o nucléolo com nucléolonema é formado por uma rede tri-dimensional de fibras do componente fibrilar denso com centros fibrilares que podem ou não estar presentes. O componente granular está presente quase sempre em pequenas quantidades ao redor do conjunto; 3- o nucléolo compacto consiste de vários centros fibrilares circundados por uma camada de componente fibrilar denso e embebidos em grandes áreas de componente granular (Schwarzacher e Wachtler, 1983).

O número e a distribuição das RONS podem variar 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 estão todas 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. No gafanhoto *Pycnogaster cucullata* foram observados dois tipos distintos de RONS: as denominadas RONS primárias se apresentam ativas em todas as células das gônadas de todos os indivíduos, enquanto que RONS secundárias parecem ser dispensáveis estando ativas apenas em algumas células de alguns indivíduos (Santos *et al.*, 1990).

A presença de RONS inativas ou estritamente latentes, que nunca mostram atividade transcricional, tem sido descrita em algumas espécies (Juan *et al.*, 1993; Santos *et al.*, 1990). Um exemplo extremo foi observado no gafanhoto *Stauroderus scalaris*. Nessa espécie a análise dos cístrons ribossomais com sondas de DNAr mostrou a presença de grande quantidade de DNAr na região pericentromérica de todos os cromossomos. Entretanto, uma única RON ativa foi detectada no complemento estando localizada no par G<sub>3</sub> (López-León *et al.*, 1999). Mecanismos complexos podem estar envolvidos na expressão dos genes de DNAr. A regulação pode ser afetada por fatores como a presença de cromossomos extras (Bs) e segmentos supernumerários, interação entre tipos de RONS, tipo celular e estado de desenvolvimento, entre outros (Cabrero *et al.*, 1986; López-León *et al.*, 1999; Zatssepina *et al.*, 1996).

Durante a mitose, a síntese de RNA (incluindo a síntese de RNAr) cessa e o nucléolo normalmente desaparece. Na prófase, o componente fibrilar denso desaparece e o componente granular é disperso no fluido nuclear, na metáfase, contudo, algum material granular pode permanecer associado aos cromossomos. Em alguns casos esse material pode formar uma bainha em volta dos cromossomos (Pawelez e Risueño, 1982). O material dos centros fibrilares pode ser reconhecido em alguns tipos celulares, através da mitose, sempre ligado aos cromossomos. Na telófase, novos nucléolos são formados em loci específicos sobre os cromossomos. Primeiro, o componente fibrilar denso surge adjacente ao centro fibrilar enquanto que componente granular aparece um pouco mais tarde (Sumner, 1990). Por sua vez, a meiose apresenta algumas vantagens no estudo do nucléolo e sua relação com as RONS. Neste tipo de divisão celular os genes ribossomais permanecem ativos, na maioria das vezes, até o final do paquíteno ou início do diplóteno, além dos cromossomos apresentarem-se menos condensados que em metáfase mitótica (Wachtler e Stahl, 1993).

A técnica de coloração com nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>) desenvolvida por Goodpasture e Bloom (1975) tem sido largamente usada para identificar RONS ativas durante as divisões mitóticas e meióticas em diferentes organismos. Estudos sobre a localização das RONS em Coleoptera ainda são escassos. Contudo, os dados obtidos têm indicado que um par

de autossomos organizador de nucléolos pode estar amplamente distribuído nessa ordem (Drets *et al.*, 1983; Virkki, 1983; Postiglioni e Brum-Zorrilla, 1988).

Células paquitênicas de *Epicauta atomaria* (Meloidae) mostraram que o nucléolo está associado ao sétimo par de autossomos. No tenebrionídeo *Palembus dermestoides*, observou-se a existência de duas RONS localizadas no terceiro e quarto pares de autossomos. Em ambas as espécies o bivalente sexual  $Xy_p$  também mostrou-se corado pelo nitrato de prata (Almeida *et al.*, 2000). Quatro carabídeos pertencentes ao gênero *Trechus* (*T. Latus*, *T. pilisensis*, *T. pulchellus* e *T. quadristriatus*) e dois ao gênero *Bembidion* (*B. lamprus* e *B. properans*) apresentaram, em células mitóticas, uma RON autossômica ativa (Rožek, 1998a, 1998b).

Em *Blaps gigas* ( $15II+X_1X_2X_3X_4Y$ ) a coloração por  $AgNO_3$  revelou um grande nucléolo associado ao sistema sexual múltiplo durante o início da diacinese. Na metáfase I foram observados sinais de prata nos braços longos dos cromossomos  $X_3$  e  $X_4$  e nas extremidades de  $X_1$  e  $X_2$ . O cromossomo Y apresentou marcações nas suas extremidades de ligação com  $X_3$  e  $X_4$  durante a formação do multivalente sexual. Por sua vez, *Blaps gibba* ( $15II+X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7Y$ ) apresentou 7-8 pequenas marcações dispersas em seu multivalente sexual indicando a existência de proteínas argilofílicas em todos os seus componentes. Foi sugerido que o envolvimento de vários cromossomos X no multivalente sexual destas espécies se deve, provavelmente, a trocas de seqüências terminais de DNAr entre o Y e alguns autossomos (Vitturi *et al.*, 1996).

Existe controvérsia quanto à típica configuração em pára-quedas do  $Xy_p$  de besouros da subordem Polyphaga ser ou não devido à presença de nucléolo. John e Lewis (1960) estudaram o comportamento do bivalente sexual  $Xy_p$  durante a meiose em *Tenebrio molitor* (Tenebrionidae) e duas espécies de coccinélídeos, *Adalia bipunctata* e *Coccinella septempunctata*. Estes autores sugeriram que a associação inicial dos cromossomos  $X_p$  e  $y_p$ , nessas espécies, deve-se à presença de segmentos compostos por heterocromatina constitutiva. Contudo, a manutenção e a segregação regular deste bivalente são assegurados pela presença de um persistente nucléolo que serve como co-orientador neste processo.

Por sua vez, Drets *et al.* (1983) estudaram detalhadamente a formação do  $Xy_p$  em *Epilachna paenulata* (Coccinellidae). Nos estágios iniciais da meiose I o “dossel” do “pára-queda”, formado pelo bivalente sexual, corresponde aos segmentos heterocromáticos pareados dos cromossomos X e y, enquanto que o “pára-queda” representa os segmentos eucromáticos de ambos os cromossomos. Apenas no final da metáfase I, bem próximo à anáfase I, o “dossel” e o “pára-queda” passam a corresponder ao  $X_p$  e  $y_p$ , respectivamente. Nessa espécie a RON está localizada num par de autossomos e a coloração com nitrato de prata não detectou nenhum material nucleolar associado ao bivalente sexual, indicando que  $Xy_p$  é mantido devido a associações terminais de natureza heterocromática. Esta hipótese foi reforçada pelos resultados obtidos por Postiglioni e Brum-Zorrilla (1988) com *Chelymorpha variabilis* (Chrysomelidae). Neste caso, apesar do bivalente sexual  $Xy_p$  corar-se com prata durante a metáfase I, a RON nesta espécie não está associada aos cromossomos sexuais mais sim a um par de autossomos, como evidenciado pela reação positiva ao fluorocromo acridina orange e ao nitrato de prata.

Os contatos terminais entre cromossomos pode variar de muito fracos até extremamente resistentes (Virkki, 1989). Portanto, esta variação pode afetar o pareamento cromossômico durante a meiose. Se o  $Xy_p$  contém apenas pontos fracos de ligação cromossômica, sujeitos ao estresse durante a descondensação-recondensação do cromossomo X e durante a prometáfase, mesmo uma pequena força adesiva pode ser decisiva. Estudos do desenvolvimento do  $Xy_p$  em espécies que apresentam RON autossômica, pertencentes à família Curculionidae, revelaram a presença de substâncias que possuem afinidade pela prata no lúmen do  $Xy_p$ . A persistência destas substâncias no final da prófase até a anáfase I, sugere que estas podem ter função aderente sendo responsáveis por uma disjunção normal desses cromossomos (Virkki *et al.*, 1990; 1991).

O uso da técnica de Hibridização *in Situ* Fluorescente (FISH) em espécies de plantas e animais tem permitido a localização e o mapeamento de seqüências específicas de DNA como, por exemplo, os genes que transcrevem RNAr. Esta técnica tem sido usada em conjunto com a coloração por nitrato de prata na análise das RONs em algumas espécies de Coleoptera. 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  $\text{AgNO}_3$  marca apenas regiões de DNAr ativas, a FISH marca tanto regiões ativas quanto inativas. A aplicação de ambos os métodos é de particular interesse em besouros da subordem Polyphaga na tentativa de esclarecer o tipo de associação existente no sistema sexual  $\text{Xy}_p$  (Juan *et al.*, 1993; Galían *et al.*, 1995; Petitpierre, 1996).

Duas espécies de Tenebrionidae, *Misolampus goudoti* e *Tenebrio molitor*, ambas com  $2n=20$  e sistema de determinação sexual  $\text{Xy}_p$ , foram analisadas através de FISH com sonda de DNAr de *Drosophila melanogaster*. *Misolampus goudoti* apresentou, em metáfases mitóticas, dois sítios ribossomais localizados em um par de autossomos e um em núcleos paquitênicos. Em *T. molitor* foram observadas seis sítios localizados em diferentes autossomos e nos cromossomos X e  $y_p$ . Entretanto, em *T. molitor* a coloração pelo nitrato de prata marcou apenas o bivalente sexual revelando que apenas as RONS localizadas nestes cromossomos estavam ativas na intérfase anterior (Juan *et al.*, 1993).

Em *Gymnopleurus sturmi* (Scarabaeidae) foram observados cístrons ribossomais nas regiões heterocromáticas dos pares 18 e 22 com os sinais de hibridização apresentando-se polimórficos quanto ao tamanho (Colomba *et al.*, 2000a). Outros três escarabeídeos: *Phyllophaga (Phytalus) vestita*, *Phyllophaga (Phyllophaga) aff. capillata* e *Lyogenys fuscus* tiveram os dados obtidos com a coloração por nitrato de prata confirmados pela FISH. A primeira espécie apresenta uma RON autossômica enquanto que nas outras duas o cromossomo X é o organizador nucleolar (Moura *et al.*, 2003). *Geniates borelli*, *Macraspis festiva*, *Palidnota pallidpennis* e *Strategus surinamensis hirtus* também tiveram os dados de  $\text{AgNO}_3$  confirmados pela FISH revelando RONS ativas no cromossomo X. Entretanto em *Lygirus ebenus* foram observados dois sítios de RNAr localizados no X e em um par de autossomos. Nessa espécie a coloração com nitrato de prata marcou somente o par autossômico indicando a atividade apenas desta RON (Moura, 2002). No coccinelídeo *Olla v-nigrum* FISH combinada com  $\text{AgNO}_3$  revelou uma RON localizada no bivalente sexual  $\text{Xy}_p$  (Maffei *et al.*, 2001).

A coloração com nitrato de prata em células mitóticas do geotrupídeo *Thorectes intermedius* ( $2n=20+XY$ ) revelou marcações em todos os cromossomos do complemento inclusive nos sexuais (Vitturi *et al.*, 1995). Na tentativa de explicar este padrão, os autores apresentaram duas hipóteses não exclusivas: 1- o cariótipo de *T. intermedius* apresenta uma grande quantidade de RONS; 2- a  $AgNO_3$  cora, nesta espécie, outras regiões cromossômicas diferentes das RONS. Vitturi *et al.* (1999) constataram que estas regiões reagem positivamente ao bandeamento C e ao fluorocromo base-específico  $CMA_3$ , além disso, seis exemplares machos foram estudados com FISH. Destes, quatro exibiram um forte sinal de mesmo tamanho e intensidade no braço curto dos pares 1 e 3. O quinto espécime apresentou quatro marcações com uma considerável variação no tamanho do sinal, enquanto o exemplar restante exibiu células com um ou quatro sinais. Esses resultados indicam que nessa espécie a  $AgNO_3$  marca, além das RONS, as regiões de heterocromatina constitutiva. Por sua vez, a FISH revelou a ocorrência de inter- e intraindividual polimorfismo no número e dimensão das RONS. Uma condição similar foi observada em *Dorcus parallelipedus* (Lucanidae). Nessa espécie a  $AgNO_3$  marcou as regiões de heterocromatina constitutiva e as regiões terminais de alguns autossomos, enquanto que a FISH apresentou marcações nas regiões teloméricas do par dois. Esta parece ser uma condição comum para representantes de superfamília Scarabaeioidea sendo observada em 11 espécies (Colomba *et al.*, 2000b).

O uso da FISH em representantes da família Carabidae tem revelado diferentes padrões de marcações. Em *Cincidela melancolica* ( $9II+XXXXY$ ) os resultados revelaram que os genes de DNAr estão localizados em um cromossomo X e no cromossomo 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 aqueles obtidos pela coloração com nitrato de prata (Galían *et al.*, 1995). O uso de sondas 18S-28S nas espécies *Cincidela cardinalba*, *C. sp* e *C. gillesensis* exibiu marcações em dois dos quatro cromossomos sexuais. Em *Megacephala whelani*, hibridização durante mitose e meiose, mostrou que os genes de RNAr estão localizados em três pares de autossomos (Galían e Hudson, 1999). Dezenove espécies pertencentes ao gênero *Zabrus*

( $2n=47-63$ ) foram estudadas com sondas 18S. Nessas espécies observou-se variação tanto no número de cromossomos que exibem RONS (2-12) quanto na intensidade dos sinais que podem marcar de pequenos pontos a até braços cromossômicos inteiros (Sanches-Gea *et al.*, 2000). Por sua vez, em *Odontocheila confusa* e *Odontocheila noticordes* (Cincidelidae) a FISH revelou a presença de sítios ribossomais em apenas um par de autossomos. Estes resultados estão de acordo com os obtidos pela coloração com nitrato de prata indicando que nestas espécies todas as RONS estão ativas (Proença *et al.*, 2002).

### 3.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida MC (2001) Estudos citogenéticos em 14 espécies de Alticinae (Coleoptera, Polyphaga, Chrysomelidae): heterocromatina constitutiva e regiões organizadoras de nucléolo. Tese de doutorado apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, Brasil. 181.
- Almeida MC, Zacaro AA and Cella DM (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 RB (1982) Separation of two species standing as *Helophorus aquaticos* (L.) (Coleoptera, Hydrophilidae) by banded chromosome analysis. *Syst Entomol* 7: 265-281.
- Angus RB (1983) Separation of *Helophorus grandis*, *maritimus* and *occidentalis* sp.n. (Coleoptera, Hydrophilidae) by chromosome banded analysis. *Syst Entomol* 8: 1-13.
- Baptiste VREM (2003) Tenebrionidae and allied families (Página da Web). [http://134.60.85.50:591/Tenebrionidae/TenebrionN\\_su.html](http://134.60.85.50:591/Tenebrionidae/TenebrionN_su.html).
- Bione EG, 1999. Citogenética de Coleópteros das subfamílias Dyinastinae e Rutelinae (Polyphaga-Scarabaeoidea-Scarabaeidae). Tese de Mestrado, Departamento de Genética CCB/UFPE.
- Bisoi MR and Patnaik SC (1988) A chromosome study of seven species of indian Coleoptera (Meloidae, Tenebrionidae and Coccinelidae). *Caryologia* 41: 309-321.
- Cabrero J, Navas-Castillo J and Camacho JPM (1986) Effects of supernumerary chromosome segments on the activity of nucleolar organiser regions in the grasshopper *Chorthippus binotatus*. *Chromosoma* 93: 375-380.
- Colomba MS, Vitturi R and Zunino M (2000a) Karyotype analysis, banding and fluorescent *in situ* hybridization in the scarab beetle *Gymnopleurus sturmi* McLeay (Coleoptera: Scarabaeoidea: Scarabaeidae). *J Hered* 91 (3): 260-264.

- Colomba MS, Vitturi R and Zunino M (2000b) Chromosome analysis and rDNA FISH in the stag beetle *Dorcus parallelipipedus* L. (Coleoptera: Scarabaeoidea: Lucanidae). *Hereditas* 133: 249-253.
- Costa C (2000) Estado de conocimiento de los Coleoptera neotropicales. PriBES-2000, m3m: Monografias Tercer Milenio 1: 99-114.
- Costa C, Vanin SA and Casari-Chen SA (1988) Larvas de coleópteros do Brasil. Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, 282pp.
- Doyen JT and Tschinkel WR (1982) Phenetic and cladistic relationships among tenebrionid beetle (Coleoptera). *Syst Entom* 7: 127-183.
- Drets ME, Corbella E, Panzera F and Folle GA (1983) C-banding and non-homologous association II. The “parachute” Xy<sub>p</sub> sex bivalent and the behavior of heterocromatin segments in *Epilachna paenulata*. *Chromosoma (Berl.)* 88: 249-255.
- Ferreira A, Cella D, Tarvido D and Virkki N (1984) Two pairs of Chromosomes: a new low record for Coleoptera. *Rev Bras Gen* 7: 231-239.
- Ferreira A, Conduto VL and Martins VG (1993) Cytogenetic survey of some Brazilian Cerambycidae (Coleoptera, Polyphaga, Chrysomelidae). *Rev Bras Genet* 16 (1): 51-57.
- Galián J and Hudson P (1999) Cytogenetic analysis of Australian tiger beetles (Coleoptera: Cicindelidae): chromosome number, sex-determining system and localisation of rDNA genes. *J Zool Syst Evol Res* 37: 1-6.
- Galián J, Serrano J, De la Rúa P, Petitpierre E and Juan C (1995) Localization and activity of rDNA genes in tiger beetles (Coleoptera: Cicindelinae). *Heredity* 74: 524-530.
- Goessens G, Thiry M and Lepoint A (1986) Relations between nucleoli and nucleolus-organizing regions during the cell cycle. *Chrom Today* 9:261-271.
- Goodpasture C and Bloom SE (1975) Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma* 53: 37-50.
- Grewal SIS and Elgin SCR (2002) Heterochromatin: new possibilities for the inheritance of structure. *Current Opin in Genet & Develop* 12: 178-187.
- Heitz E (1933) Die somatische heteropycnose bei *Drosophila melanogaster* und ihre genetische Bedeutung. *Z. Zellforsch* 20: 237-287.

- Henikoff S (2000) Heterochromatin function in complex genomes. *Biochim et Biofys Acta* 1470: 01-08.
- Holecova M, Lachowska D and Karagyan G (2002) Karyological notes on six beetle species from Armenia (Coleoptera: Tenebrionidae, Cerambycidae, Curculionidae). *Folia Biol (Krakow)* 50(1-2): 9-12.
- Holmquist GP, Kapitonov VV and Jurka J (1998) Mobile genetic elements, chiasmata, and the unique organization of beta-heterochromatin. *Cytogenet Cell Genet* 80:113-116.
- John B (1988) The biology of heterochromatin. In: *Heterochromatin. Molecular and Structural aspects* (Verma, R.S.) Cambridge University press, Cambridge, Mass. pp 1-147.
- John B and Lewis KR (1960) Nucleolar controlled segregation of the sex chromosomes in beetles. *Heredity* 15: 431-439.
- Juan C and Petitpierre E (1988) A chromosome survey of North African and Eastern Mediterranean tenebrionids (Coleoptera). *Cytobios* 54: 85-94.
- Juan C and Petitpierre E (1989a) C-banding and DNA content in seven species of Tenebrionidae (Coleoptera). *Genome* 32: 834-839.
- Juan C and Petitpierre E (1989b) New chromosomal findings on the Spanish Tenebrionidae (Coleoptera). *Caryologia* 42: 259-266.
- Juan C and Petitpierre E (1990) Karyological differences among Tenebrionidae (Coleoptera). *Genetica* 80: 101-108.
- Juan C and Petitpierre E (1991a) Chromosome number and sex-determining systems in tenebrionidae (Coleoptera). *Barcelona, Adv in Coleopterol*: 167-176.
- Juan C and Petitpierre E (1991b) Evolution of genome size in darkling beetles (Tenebrionidae, Coleoptera). *Genome* 34:168-173.
- Juan C, Gosálvez 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.

- Lawrence JF, Hastings AM, Dallwitz MJ, Paine TA and Zucher EJ (1999) Beetles of the world: a key and information system for families and subfamilies. Melbourne, CSIRO Publishing, version 1.0 for MS-Windows.
- Lewis KR e John B (1957) The organization and evolution of the sex multiple in *Blaps mucromata*. *Chromosoma* 9: 69-80.
- Loidl J (1983) Some features of heterochromatin in wild *Allium* species. *Plant Syst Evol* 143: 117-131.
- López-León MD, Cabrero J and Camacho JPM (1999) Unusually high amount of inactive ribosomal DNA in the grasshopper *Stauroderus scalaris*. *Chrom. Res.* 7:83-88.
- Maddison DR (1985) Chromosomal diversity and evolution in the ground beetle genus *Bembidion* and related taxa (Coleoptera: Carabidae: Trechitae). *Genetica* 66: 93-114.
- Maffei EMD, Gasparino E and Pompolo SG (2000) Karyotypic characterization by mitosis, meiosis and C-banding of *Eriops connexa* Mulsant (Coccinellidae: Coleoptera: Polyphaga), a predator of insect pests. *Hereditas* 132: 79-85.
- Maffei EMD, Pompolo SG, Campos LAO 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.
- Martins VG (1994) The chromosomes of five species of Scarabaeidae (Polyphaga, Coleoptera). *Naturalia* 19: 89-96.
- Mesa A and Fontanetti CS (1984) Multiple sex chromosomes, autossomal polymorphism and a high number of S chromosomes in *Euchroma gigantes* L. 1735 (Coleoptera, Buprestidae). *Rev Bras Genet* VII (4): 629-637.
- Mesa A and Fontanetti CS (1985) The chromosomes of a primitive species of beetle: *Ytu zeus* (Coleoptera, Myxophaga, Torrindicolidae). *Proc Acad Nat Sci Philadelphia* 137: 102-105.
- Mestrovic N, Mravinac B, Juan C, Urgarkovic D and Plohl M (2000) Comparative study of satellite sequences and phylogeny of species from the genus *Palorus* (Insecta, Coleoptera). *Genome* 43: 776-785.

- Moura RC, Souza MJ, Melo NF and Lira-Neto AC (2003) Karyotypic characterization of representatives from Melolonthinae (Coleoptera: Scarabaeidae): karyotypic analysis, banding and fluorescent *in situ* hybridization (FISH). *Hereditas* 138: 200-206.
- Moura RC (2002) Análise citogenética comparativa em coleópteros da família Scarabaeidae e caracterização de poliformismo autossômico em *Euchroma gigantea* - Brupestidae (Polyphaga). Tese de Doutorado. Centro de Ciências Biológicas/UFPE
- Murzina N, Verreault A, Laue E and Stillman B (1999) Heterochromatin dynamics in mouse cells: interaction between chromatin assembly factor 1 and hp1 proteins. *Molecular Cell* 4: 529-540.
- Olson MOJ, Dundr M and Szebeni A (2000) The nucleolus: an old factory with unexpected capabilities. *Trends in Cell Biol.* 10:189-196.
- Palmer M and Petitpierre E (1997) New chromosomal findings on Tenebrionidae (Coleoptera) from the Western Mediterranean. *Caryologia* 50(2): 117-123.
- Paweletz N and Risueño MC (1982) Transmission electron microscopic studies on the mitotic cycle of nucleolar proteins impregnated with silver. *Chromosoma* 85:261-273.
- Petitpierre E (1988) Cytogenetics, cytotaxonomy and genetics of Chrysomelidae. In: Jolivet P, Petitpierre E and Hsiao (eds) *Biology of Chrysomelidae*, Kluwer, Dordrecht, pp: 131-159.
- Petitpierre E (1996) Molecular cytogenetics and taxonomy of insects, with particular reference to the coleoptera. *Int J Insect Morphol & Embryol* 25: 115-133.
- Petitpierre E (1999) The cytogenetics and cytotaxonomy of Chrysolina Mots. and Oreina Chev. (Coleoptera, Chrysomelidae, Chrysomelinae). *Hereditas* 131: 55-62.
- Petitpierre E, Juan C and Alvarez-Fuster A (1991) Evolution of chromosomes and genome size in Chrysomelidae and Tenebrionidae. *Adv in Coleopterology*: 129-144.
- Petitpierre E, Aoki M, Hattori K and Katakura H (2001) A chromosomal analysis of the *Chrysolina angusticollis* species complex (Coleoptera, Chrysomelidae). *Chromosome Science* 4: 117-120.
- Plohl M, Lucijanac-Justic V, Hugarkovic D, Petitpierre E and Juan C (1993) Satellite DNA and heterochromatin of the flour beetle *Tribolium confusum*. *Genome* 36: 467-675.

- Pons J, Petitpierre E and Juan C (1993) Characterization of the heterochromatin of the darkling beetle *Misolampus goudoi*: 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  $X_{yp}$  in *Chelymorpha variabilis* Boheman (Coleoptera: Chrysomelidae). *Genetica* 77: 134-141.
- Proença SJR, Serrano ARM and Collares-Pereira MJ (2002) Cytogenetic variability in genus *Odontocheila* (Coleoptera, Cicindelidae): karyotypes, C-banding, NORs and localisation of ribosomal genes of *O. confusa* and *O. nodicornis*. *Genetica* 114: 237-245.
- Redi CA, Garagna S, Zacharias H, Zuccotti M and Capanna E (2001) The other chromatin. *Chromosoma* 110: 136-147.
- Renauld H and Gasser SM (1997) Heterochromatin: A meiotic matchmaker? *Trends Cell Biol* 7 (5): 201-205.
- Rozek M (1985) Karyological studies on Trechinae (Coleoptera, Carabidae). III Karyotype of *Trechus latus* Putz. and *Trechus quadristriatus* (Schr.). *Caryologia* 38: 371-375.
- Rozek M (1988) Karyotypes in four species of Amara (Coleoptera, Carabidae). *Caryologia* 41: 1-8.
- Rozek M (1989) Karyotypes of *Bembidion quadrimaculatum* (L.) and *Clivina fossor* (L.) (Coleoptera: Carabidae). *Folia Biol* 37: 151-154.
- Rozek M (1998a) C-bands and NORs on chromosomes in four species of the genus *Trechus* Clairv. (Coleoptera, Carabidae). *Caryologia* 51: 189-194.
- Rozek M (1998b) C-bands and NORs on chromosomes of *Bembidion lampros* (Herbst) and *Bembidion properans* (Steph.) (Coleoptera, Carabidae). *Cytologia* 63: 317-321.
- Rozek M and Maryanska-Nadachowska A (1991) Studies on C-banding karyotype and meiosis of *Harpalus affinis* (Shrank, 1781) (Coleoptera, Carabidae). *Caryologia* 44: 317-323.
- 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.

- Sanches-Gea JF, Serrano J and Galián 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 *Pycnogaster cucullata* (Orthoptera). *Heredity* 65:7-10.
- Schweizer D (1976) Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. *Chromosoma (Berl.)* 58: 307-324
- Schwarzacher HG and Wachtler F (1983) Nucleolus organizer regions and nucleoli. *Hum. Genet.* 63: 89-99.
- Schweizer D and Loidl J (1987) A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C-band patterns. *Chrom Today* 9: 61-74.
- Serrano J (1981) Chromosome number and karyotype evolution of Caraboidea. *Genetica* 55: 51-60.
- Serrano J (1986) Karyotypical approach to carabid evolution (Coleoptera). In: Boer D *et al.*(eds) *Carabid Beetles*. Stuttgart, New York, pp 221-225.
- Serrano J and Yadav JS (1984) Chromosome numbers and sex determining mechanisms in adaphagan Coleoptera. *Coleopt Bull* 38: 335-357.
- Serrano J, Galián J and Ortiz A (1986) A chromosome study of thirteen species of Spanish Carabidae (Coleoptera, Adephaga). *Folia Biol* 34: 319-328.
- Smith SG (1950) The Cyto-taxonomy of Coleoptera. *Can Entomol* 82: 58-68.
- Smith SG and Virkki N (1978) Coleoptera In: *Animal Cytogenetics* (John, B. ed.). Borntraeger, Berlin, Stuttgart. 366pp.
- Sumner AT (1990) Chromosome banding. Unwin Hyman ed. (London) 39-68 pps.
- Tschinkel WR (1978) Dispersal Behavior of the larval Tenebrionid Beetle *Zophobas rugipes*. *Physiol Zool* 51: 300-313.
- Tschinkel WR (1981) Larval dispersal and cannibalism in a natural population of *Zophobas atratus* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Anim Behav* 29: 990-996.
- Tschinkel WR (1984) *Zophobas atratus* (Fab.) and *Z. rugipes* Kirsch (Coleoptera: Tenebrionidae) are the same species. *The Coleopter Bull* 38 (4): 325-333.

- Tschinkel WR (1993) Crowing, maternal age, age at Pupation, and life history of *Zophobas atratus* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Ecology Pop Biol* 86(3): 278-297.
- Urgarkovic D, Plohl M, Petitpierre E, Lucijanic-Justic V and Juan C (1994) *Tenebrio obscurus* satellite DNA is resistant to cleavage by restriction endonucleases *in situ*. *Chromosome Res* 2: 217-223.
- Vidal OR and Giacomozzi RO (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 OR and Nocera CP (1984) Citogenética de la tribu Eucranini (Coleoptera, Scarabaeidae). Estudios convencionales y con bandeado C. *Physis* (Buenos Aires) 42: 83-90.
- Virkki N (1963) Chromosome number and giant postreductional sex chromosomes in the beetle *Walterianella venusta* Schaufuss (Chrysomelidae, Alticinae). *J Agric Univ Puerto Rico* 47: 154-163.
- Virkki N (1964) On the cytology of some neotropical chrysomelids (Coleoptera). *Ann Acad Scient Fennicae, serie A IV* 75: 1-4.
- Virkki N (1967) Rapid allocyclic changes in the centric and a segment of the X chromosome in meiosis of male *Omophoita superba* Weise (Coleoptera, Alticinae). *Hereditas* 58: 262-264.
- Virkki N (1974) Evolution of extremely complicated sex chromosome systems in *Blaps* (Coleoptera). *J Agric Univ Puerto Rico* 48: 140-149.
- 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 *Oedionychina* (Alticinae). *First Intern Symp on the Chrys* 3: 489-497.
- Virkki N (1989) Proximal vs distal collochors in Coleopteran chromosomes. *Hereditas* 110: 101-107.

- Virkki N, Mazzela C and Denton A (1990) Staining of substances adjacent to the Xy<sub>p</sub> sex bivalent in certain weevils (Coleoptera: Curculionidae). J Agric Univ Puerto Rico 74: 405-418.
- Virkki N, Mazzela C and Denton A (1991) Silver staining of the coleopteran Xy<sub>p</sub> sex bivalent. Cytobios 67: 45-63.
- Vitturi R, Colomba MS and Zunino M (1995) L'analisi cariológica nei Coleotteri Scarabaeoidea: risultati e prospettive. Atti 56° Congr Unione Zoologica Italiana, Reggio Calabria, Italia.
- Vitturi R, Catalano E, Sparacio I, Colomba MS 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 MS, 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.
- Wachtler F and Stahl A (1993) The nucleolus: a structural and functional interpretation. Micron 24 (5): 473-505.
- Wallrath LL (1998) Unfolding the mysteries of heterochromatin. Current Opinion in Gen & Devel 8: 147-153.
- White MJD (1973) Animal cytology and evolution. 3rd edition. Cambridge University, London, 961pp.
- Yadav JS and Pillai RK (1977) Karyological investigations on seven species of coprinae (Scarabaeidae; Coleoptera). Caryologia 30(3): 255-263.
- Yadav JS, Pillai RK and Karamjeet L (1979) Chromosome numbers of Scarabaeidae (Polyphaga: Coleoptera). The Coleopterists Bulletin 33(3): 309-318.
- Yadav JS, Pillai RK and Yadav AS (1994) Karyological analysis of six species of Tenebrionidae (Coleoptera, Polyphaga). Folia biol. (Kraków) 42: 23-26.
- Zatsepina OV, Schofer C, Weipoltshammer K, Mosgoeller W, Almeder M, Stefanova VN, Jordan EG and Wachtler F (1996) The RNA polymerase I transcription factor UBF and

rDNA are located at the same major sites in both interphase and mitotic pig embryonic kidney (PK) cells. *Cytog Cell Genet* 73 (4): 274-278.

Zuckerkindl E and Hennig W (1995) Tracking heterochromatin. *Chromosoma* 104: 75-83.

Variabilidade Cromossômica nos Tenebrionídeos *Zophobas* aff.  
*confusus* e *Nyctobates gigas* (Coleoptera, Tenebrioninae)

O manuscrito a seguir será submetido à  
Revista *Caryologia* (ISSN: 0008-7114),  
publicada na Itália.

## Variabilidade Cromossômica nos Tenebrionídeos *Zophobas* aff. *confusus* e *Nyctobates gigas* (Coleóptera, Tenebrioninae)

Amaro de Castro Lira-Neto<sup>1</sup>, Guilherme Messias da Silva<sup>2</sup>, Rita de Cássia de Moura<sup>2</sup>  
e Maria José de Souza<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Genética, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brasil;

<sup>2</sup> Departamento de Biologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco (UPE), Recife, Pernambuco, Brasil.

Correspondência: Amaro de Castro Lira Neto, Departamento de Genética, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Av. Prof Moraes Rego S/N, Cidade Universitária, CEP: 50732-970, Recife Pernambuco, Brasil. E-mail: amarocastro@ig.com.br. Tel: (55)(81) 3271-8520; FAX: (55)(81) 3271-8522.

**Resumo:** Exemplares machos dos tenebrionídeos (Tenebrioninae) *Zophobas* aff. *confusus* e *Nyctobates gigas* coletados no Estado de Pernambuco, Brasil, foram estudados através de coloração convencional, bandeamento C, coloração com nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>) e os fluorocromos base específicos CMA<sub>3</sub> e DAPI. *Zophobas* aff. *confusus* apresentou 2n=20 (9+Xy<sub>p</sub>) enquanto que *Nyctobates gigas* exibiu 2n=18 (8+neoXY). O bandeamento C revelou grandes blocos pericentroméricos de heterocromatina constitutiva (HC) em todos os autossomos das duas espécies, exceto no par 8 de *N. gigas* no qual nenhum bloco C positivo foi observado. Os cromossomos sexuais de ambas as espécies mostraram-se quase totalmente heterocromáticos. As duplas colorações CMA<sub>3</sub>/DA e DAPI/DA marcaram a HC em *Z. aff. confusus*. Entretanto, a marcação com DAPI mostrou-se mais intensa. Por sua vez, *N. gigas* possui blocos de HC CMA<sub>3</sub> positivos e DAPI homogêneos. A coloração com AgNO<sub>3</sub> também revelou resultados distintos para as duas espécies com *Z. aff. confusus* apresentando uma RON localizada no bivalente sexual Xy<sub>p</sub> e *N. gigas*, uma RON autossômica.

**Palavras Chave:** Coleoptera, Tenebrionidae, Heterocromatina, RONs, Fluorocromos.

## INTRODUÇÃO

A ordem Coleoptera compreende cerca de 25.368 gêneros e 357.899 espécies, constituindo-se na maior ordem do reino animal. Dentro da subordem Polyphaga, a família Tenebrionidae destaca-se por apresentar cerca de 20.000 espécies distribuídas mundialmente. Por sua vez, registros dessa família na Região Neotropical apontam a existência de aproximadamente 478 gêneros e 4.624 espécies, desses 147 gêneros e 1.234 espécies ocorrem no Brasil (Costa, 2000).

Em comparação ao grande número de coleópteros descritos taxonomicamente, poucas são as espécies analisadas do ponto de vista cromossômico. Nesta ordem tem sido observado um alto grau de conservação cariotípica com uma nítida predominância do número diplóide  $2n=20$  (meiofórmula  $9+Xy_p$ ) e cromossomos meta-submetacêntricos. Smith e Virkki (1978) sugeriram este cariótipo como primitivo para Coleoptera. Entretanto, variações numéricas foram observadas com  $2n=4$  no elaterídeo *Chalcolepidius zonatus* (Ferreira *et al.*, 1984) e  $2n=69$  no carabídeo *Ditomus capito* (Serrano, 1981) representando, respectivamente, o menor e o maior número cromossômico encontrados até o momento.

As análises da heterocromatina constitutiva e das regiões organizadoras de nucléolos têm contribuído para uma melhor caracterização da estrutura e dinâmica do material genético e das relações filogenéticas em Coleoptera (Petitpierre, 1996; Rozek, 1998; Almeida *et al.*, 2000). Nesses organismos o principal método utilizado para o estudo da heterocromatina constitutiva é o bandeamento C. Contudo, o uso de técnicas mais refinadas que utilizam fluorocromos base específicos e bandeamento com enzimas de restrição têm permitido uma análise mais detalhada desse tipo de cromatina (Plohl *et al.*, 1993; Colomba *et al.*, 2000; Mestrovic *et al.*, 2000; Lorite *et al.*, 2001). Com relação às regiões organizadoras de nucléolo (RONs), a coloração com nitrato de prata tem contribuído de forma significativa na detecção e localização de RONs ativas em diferentes espécies (Galían, 1995; Maffei *et al.*, 2001a; Maffei, *et al.*, 2001b).

Recentemente, a técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sonda de DNAr tem sido usada para o mapeamento cromossômico de sítios ribossômicos de

diferentes espécies de Coleoptera. Essa técnica permite localizar RONS, independente do seu estado de ativação. Adicionalmente, o uso de AgNO<sub>3</sub> e FISH combinados possibilitam uma análise mais completa dessas regiões cromossômicas (Proença *et al.*, 2002; Moura *et al.*, 2003). Entretanto, a maior parte das análises citogenéticas nessa ordem foram realizadas através da coloração convencional. A utilização de técnicas mais modernas está praticamente restrita a algumas espécies pertencentes às famílias Scarabaeidae, Tenebrionidae, Chrysomelidae, Carabidae, Hydrophilidae e Cincidelidae (Angus, 1983; Plohl *et al.*, 1993; Rosek, 1998; Lorite, 2001; Proença *et al.*, 2002; Moura *et al.*, 2003).

Apesar da grande diversidade de coleópteros existente na Região Neotropical, poucas espécies foram estudadas citogeneticamente (Drets *et al.*, 1983; Postiglioni e Brum-Zorrila, 1988; Mesa e Fontanetti, 1984; Maffei *et al.*, 2000; Moura *et al.*, 2003). Neste trabalho representantes brasileiros de *Nyctobates gigas* e *Zophobas* aff. *confusus* foram analisados através da coloração convencional, bandeamento C, fluorocromos base específicos e coloração com nitrato de prata. Os resultados obtidos representam uma primeira caracterização cariotípica nos gêneros *Zophobas* e *Nyctobates*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Cromossomos meióticos e mitóticos de cinco exemplares machos de *Nyctobates gigas* e quinze de *Zophobas* aff. *confusus* (Tenebrioninae) foram analisados neste trabalho. Os exemplares foram coletados, respectivamente, na Reserva Biológica de Tapacurá (São Lourenço da Mata) e na localidade de Vila Velha (Município de Itamaracá) no Estado de Pernambuco, Brasil. *Zophobas* aff. *confusus* foi encontrado associado a fezes de morcego, enquanto que *N. gigas* habita cascas de árvores mortas.

Os indivíduos foram anestesiados com éter para a retirada dos testículos sendo alguns exemplares tratados com colchicina 0,2% por um período de 6-9 horas. Os testículos foram fixados com etanol e ácido acético (3:1). As preparações citológicas foram obtidas através da técnica clássica de esmagamento de folículos testiculares. Para a coloração convencional foi utilizada aorceína lacto-acética 2%. O bandeamento C foi feito segundo

Sumner (1972). O material foi tratado com HCL 0,2 N por 30 minutos, hidróxido de bário a 5% por 30 segundos e 2 x SSC por 45 minutos. Nas duas últimas soluções a temperatura foi de 60°C. Duplas colorações com CMA<sub>3</sub>/DA e DAPI/DA foram feitas segundo Schweizer *et al.* (1983). Para a CMA<sub>3</sub>/DA as lâminas foram coradas com Cromomicina A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>) por uma hora e Distamicina A (DA) por quarenta minutos, enquanto que a coloração com DAPI/DA foi feita com vinte minutos de 4'6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) e quarenta minutos de Distamicina A (DA). A coloração com nitrato de prata seguiu a metodologia descrita por Rufas *et al.* (1987), sendo as lâminas submetidas a um pré-tratamento com 2 x SSC a 60°C por 10 minutos e coradas com nitrato de prata (1g/ml) a 70-80°C.

As lâminas foram fotografadas com microscópio Leica DMLB equipado com epifluorencência. Para as lâminas coradas convencionalmente, foi utilizado o filme Kodak Imagelink ASA 25 e para as fotomicrografias com fluorescência usou-se o filme T-MAX ASA 400 da Kodak. As cópias fotográficas foram feitas em papel Kodak Kodabrome Print F3.

## RESULTADOS

As duas espécies estudadas neste trabalho apresentaram diferenças quanto ao número diplóide e ao sistema de determinação do sexo. Metáfases espermatogoniais permitiram visualizar o número cromossômico e a morfologia dos cromossomos de ambas as espécies. *Zophobas* aff. *confusus* apresentou 2n=20 (Fig 1a) com meiofórmula 9+Xy<sub>p</sub> (Fig 2a-b), enquanto que *N. gigas* exibiu 2n=18 (Fig 1b), com meiofórmula 8+neoXY (Fig 2c). O cariótipo de *Z. aff. confusus* é constituído por cromossomos metacêntricos e submetacêntricos com pouca diferença de tamanho. O cromossomo X é metacêntrico, enquanto que o y é puntiforme (Fig 1a, 2e-f). Por sua vez, *N. gigas* apresentou um cariótipo composto por cromossomos muito pequenos que decrescem gradativamente de tamanho sendo formado por três pares metacêntricos, três submetacêntricos, dois acrocêntricos. O neoX é submetacêntrico enquanto que o neoY é acrocêntrico (Fig 1b, 2d). Em metáfases I de *Z. aff. confusus* pôde-se observar o pseudobivalente Xy<sub>p</sub> em formato característico com o cromossomo X formando o “dossel” e o y o “para-quedaista” (Fig 2a-b). Em *N. gigas* a

identificação do bivalente sexual neoXY nem sempre foi possível devido a sua similaridade em forma e tamanho aos bivalentes autossômicos. No entanto, algumas células em metáfase I permitiram a identificação deste bivalente devido ao heteromorfismo existente entre os cromossomos neoX e neoY (Fig 2c). Em células paquítenicas, o neoXY apresentou, muitas vezes, um segmento desapareado (Fig 4a, c). Esta região sem homologia deve corresponder ao cromossomo X que foi fusionado a um par de autossomos durante a formação do neoXY.

O padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva (HC), revelado pelo bandejamento C, mostrou grandes blocos localizados na região pericentromérica de todos os cromossomos de *Z. aff. confusus* (Fig 3a-b) e *N. gigas* (Fig 4a-b), exceto o par 8 de *N. gigas* no qual nenhum bloco de HC foi observado. Os cromossomos sexuais das duas espécies apresentaram-se quase que totalmente heterocromáticos, exceto o  $y_p$  de *Z. aff. confusus*.

O uso das duplas colorações CMA<sub>3</sub>/DA e DAPI/DA em *Z. aff. confusus* e *N. gigas*, revelou padrões distintos quanto à composição de pares de bases da HC. Na primeira espécie tanto o CMA<sub>3</sub> quanto o DAPI marcaram as regiões de heterocromatina constitutiva coradas pelo bandejamento C. Entretanto, a marcação com o fluorocromo DAPI (DAPI<sup>++</sup>) foi mais brilhante do que a obtida com o CMA<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>), indicando uma predominância de pares de bases AT (Fig 3e-f). Por sua vez, *N. gigas* exibiu fortes marcações CMA<sub>3</sub> positivas (CMA<sub>3</sub><sup>++</sup>) em todos os cromossomos do complemento, exceto o par oito, indicando uma HC rica em GC (Fig 4e-f). Nessa espécie, a coloração com DAPI foi homogênea em todos os cromossomos (DAPI<sup>N</sup>) (Fig 4g).

A coloração com nitrato de prata também revelou resultados diferentes para as duas espécies estudadas. Em *Zophobas aff. confusus* foi possível visualizar uma massa amorfa, correspondente ao nucléolo, no bivalente  $Xy_p$  até o paquíteno (Fig 3c). No entanto, esse bivalente apresentou seu lúmen marcado com AgNO<sub>3</sub> até metáfase I (Fig 3d). Em *N. gigas* pôde-se observar uma forte marcação em um bivalente autossômico o que sugere a presença de uma RON ativa neste par (Fig 4c). Nessa espécie a AgNO<sub>3</sub> também marcou as regiões correspondentes à heterocromatina constitutiva (Fig 4d).

## DISCUSSÃO

Em geral, a ordem Coleoptera apresenta um alto grau de conservação com relação ao número diplóide  $2n=20$ , sistema de determinação sexual  $Xy_p$  e cromossomos metacêntricos e submetacêntricos. Entretanto, variações numéricas dentro de famílias e subfamílias têm sido relatadas na literatura. Diferentes rearranjos estruturais tais como fusões Robertsonianas e em tandem, fissões e cromossomos B podem ser responsáveis por essas variações (Smith e Virkki, 1978; Vidal e Nocera, 1984; Petitpierre *et al.*, 1991).

As duas espécies estudadas nesse trabalho diferiram quanto ao número diplóide, à morfologia cromossômica e ao sistema sexual encontrados. O cariótipo encontrado em *Zophobas* aff. *confusus*, composto por 20 cromossomos meta-submetacêntricos de tamanho similar e sistema sexual  $Xy_p$  com o  $y_p$  diminuto, corresponde ao considerado como modal para essa ordem (Smith e Virkki, 1978) sendo também encontrado em 63% das espécies de Tenebrionidae estudadas (Juan e Petitpierre, 1991). Por sua vez, *Nyctobates gigas* exibiu uma redução de um par de cromossomos no número diplóide ( $2n=18$ ) e sistema sexual neoXY, além de 2 pares de cromossomos acrocêntricos. Essa redução ocorreu, provavelmente, devido a uma fusão X-autossomo que originou o sistema neoXY como observado nos tenebrionídeos pertencentes à Tribo Akidini (Pimeliinae). Essa Tribo constitui uma exceção dentro de Tenebrionidae por apresentar  $7+neoXY$  em todas as espécies estudadas (Juan e Petitpierre, 1991).

A clássica formação do sistema neoXY é derivada de uma fusão de um X acrocêntrico com um autossomo também acrocêntrico. Contudo, esse sistema também tem sido encontrado em grupos onde o cromossomo X é predominantemente metacêntrico como em Heteroptera (Bressa *et al.*, 1999; Nokkala e Nokkala, 1999). Nos coleópteros, ambos os sistemas  $Xy_p$  e XO podem servir como estágios iniciais para a formação do neoXY. Entretanto, esse sistema é mais encontrado em famílias onde o XO aparece com maior frequência como Carabidae e Passalidae (Smith e Virkki, 1978).

Em Coleoptera a técnica mais utilizada para o estudo da heterocromatina constitutiva (HC) é o bandeamento C. Apesar dos dados sobre a análise da HC nesse grupo ainda serem escassos, os poucos estudos realizados têm demonstrado uma predominância de

blocos nas regiões pericentroméricas dos cromossomos podendo ocorrer, com menor frequência, em regiões intersticiais e teloméricas (Angus 1983; Drets *et al.*, 1983; Virkki, 1983; Juan *et al.*, 1990; 1993; Rozek e Rudek, 1992; Almeida *et al.*, 2000; Maffei *et al.*, 2000; Moura *et al.* 2003).

*Zophobas* aff. *confusus* e *Nyctobates gigas* apresentaram padrão similar quanto à distribuição da HC com grandes blocos localizados na região pericentromérica dos autossomos. Com relação aos cromossomos sexuais, os neoX e neoY de *N. gigas* e o X<sub>p</sub> de *Z. aff. confusus* mostraram-se quase totalmente heterocromáticos. A ocorrência do cromossomo X quase totalmente heterocromático tem sido relatada em outras espécies estudadas como *Gonocephalum patruelle* (Tenebrionidae), *Phyllophaga (Phytalus) vestita* (Scarabeidae), *Harpalus affinis* (Carabidae) e mais cinco espécies pertencentes à família Scarabaeidae (Juan e Petitpierre, 1989; Rozek e Maryanska-Nadachowska, 1991; Moura, 2002; Moura *et al.*, 2003). Por outro lado, em *Trechus latus* (Carabidae) o cromossomo X apresenta-se completamente eucromático (Rozek, 1998a). A não marcação do y<sub>p</sub> de *Z. aff. confusus* pelo bandeamento C também foi observada em outras espécies de coleópteros como *Gymnopleurus sturmi* (Scarabaeidae), *Palembus dermestoides* (Tenebrionidae) e *Epicauta atomaria* (Meloidae) (Almeida *et al.*, 2000; Colomba *et al.*, 2000). Nesses casos, a falta de marcação pode ser devido ao minúsculo tamanho dos blocos de HC no y<sub>p</sub> dessas espécies. Por outro lado, o uso da FISH tem auxiliado o estudo da HC deste cromossomo como demonstrado por Juan *et al.* (1993) que confirmaram a presença de DNA repetitivo no y<sub>p</sub> de algumas espécies de Coleoptera.

A grande quantidade de HC encontrada nas espécies aqui estudadas representa uma característica marcante dentro da família Tenebrionidae. Na maioria das espécies onde este tipo de cromatina foi quantificado, os valores chegam a quase 50% do genoma com o maior valor (58%) sendo observado em *Misolampus goudoti* (Juan e Petitpierre, 1989; Plohl *et al.*, 1993; Pons *et al.*, 1997). Esse padrão de HC tem permitido o uso desses organismos como modelo para estudo da estrutura, função e evolução da heterocromatina constitutiva e seus componentes (Petitpierre, 1996).

O uso dos fluorocromos base específicos CMA<sub>3</sub> e DAPI nas duas espécies aqui analisadas revelou variação interespecífica quanto à composição de pares de bases da HC. Apesar destes blocos terem sido marcados pelos dois fluorocromos em *Z. aff. confusus*, a marcação com o DAPI foi mais brilhante (DAPI<sup>++</sup>) quando comparada com o CMA<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>) indicando uma predominância de pares de bases AT. O estudo da composição da HC em Tenebrionidae através dos fluorocromos CMA<sub>3</sub> e DAPI e do seqüenciamento do DNA satélite presente nessa HC tem revelado uma riqueza de pares de bases AT em todas as espécies analisadas (Juan *et al.*, 1993; Plohl *et al.*, 1993; Pons *et al.*, 1993; Ugarkovic *et al.*, 1994; Pons *et al.*, 1997; Mestrovic *et al.*, 2000). Por sua vez, *N. gigas* não seguiu este padrão. Nessa espécie o CMA<sub>3</sub> revelou uma forte marcação (CMA<sub>3</sub><sup>++</sup>), enquanto o DAPI evidenciou uma coloração homogênea (DAPI<sup>N</sup>), indicando uma grande quantidade de bases GC na composição de sua heterocromatina. Esse mesmo tipo de padrão tem sido encontrado em outras espécies pertencentes a Scarabaeiodea como *Thorectes intermedius* (Geotrupidae) e *Gymnopleuros sturmi*, (Sacarabaeidae) (Vitturi *et al.*, 1999; Colomba *et al.*, 2000). No escarabeídeo *Phyllophaga (Phyllophaga) aff. capillata* o DAPI foi homogêneo e o CMA<sub>3</sub> marcou apenas o bivalente sexual Xy<sub>p</sub> e um dos bivalentes autossômicos onde está localizada a RON (Moura *et al.*, 2003).

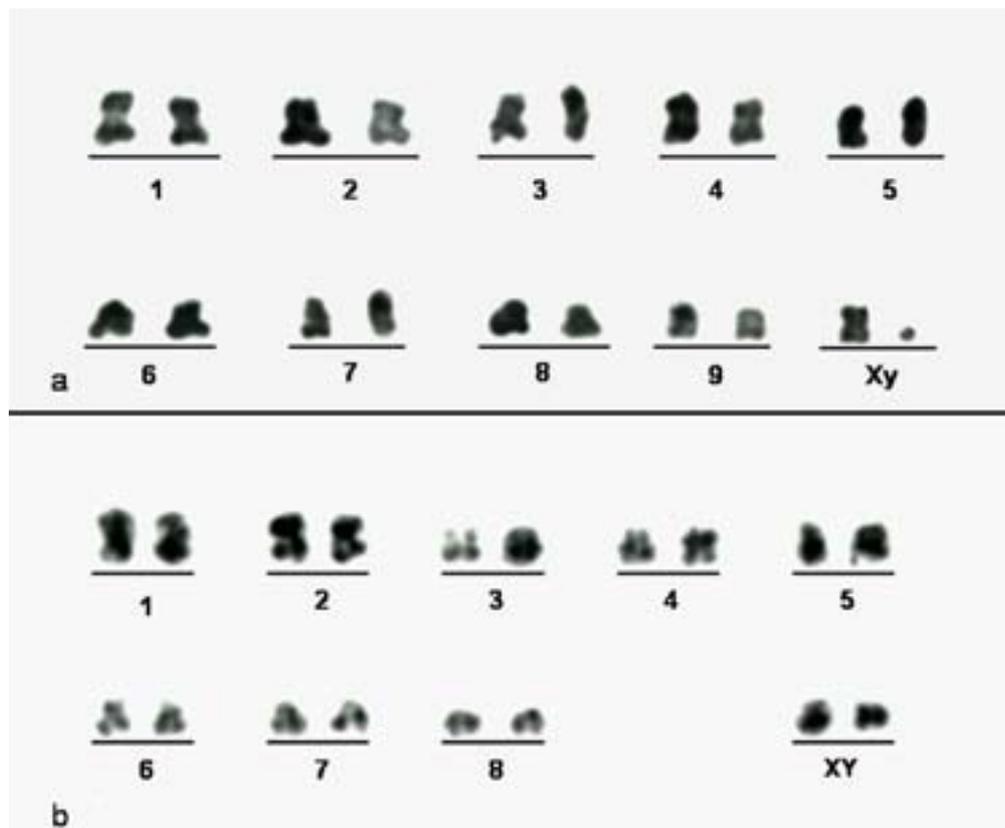
Estudos sobre a localização das regiões organizadoras de nucléolos (RONs) em Coleoptera ainda são escassos. Contudo, os dados obtidos têm indicado que um par de autossomos organizador de nucléolos pode estar amplamente distribuído nessa ordem (Drets *et al.*, 1983; Virkki, 1983; Postiglioni e Brum-Zorrilla, 1988; Rozek, 1998; Colomba *et al.*, 2000; Moura *et al.*, 2003). Esse padrão também foi observado em *Nyctobates gigas*. Entretanto, *Zophobas aff. confusus* apresentou uma RON ativa presente no bivalente Xy<sub>p</sub>. Por outro lado, *N. gigas* mostrou marcações positivas com nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>) em todos os cromossomos do complemento. Essas regiões, também positivas para o bandeamento C, são brilhantes após coloração com CMA<sub>3</sub> indicando que nessa espécie a AgNO<sub>3</sub> marca toda a heterocromatina e que este material genômico consiste de seqüências de DNA ricas em pares de bases GC. Padrão semelhante foi descrito em *Thorectes intermedius* (Vitturi *et al.*, 1999). Em *Z. aff. confusus* o nucléolo está presente até o final do paquíteno, entretanto, o Xy<sub>p</sub>

apresenta marcação com prata até a metáfase I. Esse comportamento também tem sido observado em algumas espécies de coleópteros independente da RON estar ou não associada ao  $Xy_p$  (Postiglioni e Brum-Zorrilla, 1988; Moura *et al.*, 2003).

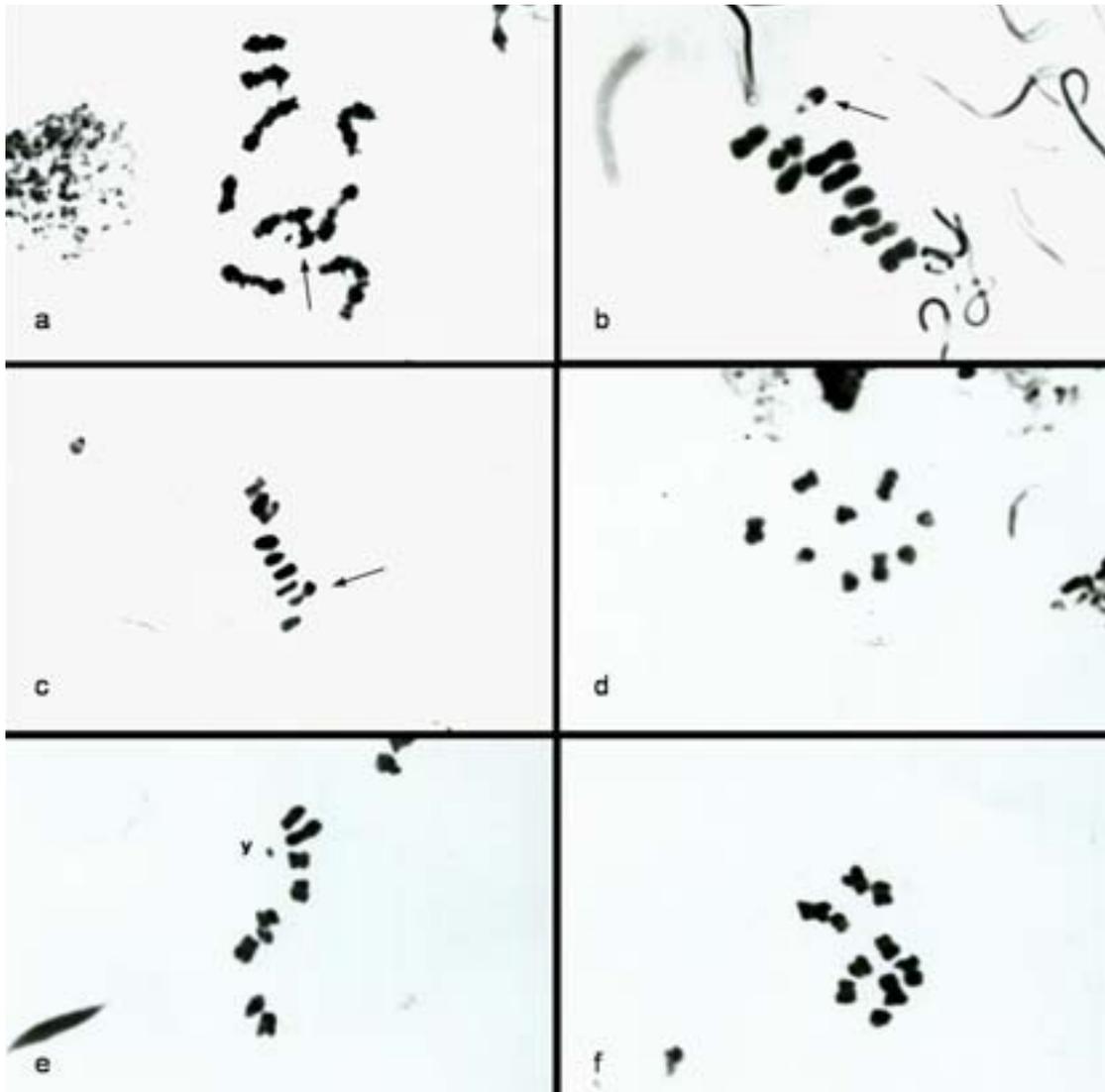
Apesar de pertencerem à mesma família, subfamília e tribo as duas espécies aqui estudadas diferiram quanto ao número cromossômico, sistema sexual, composição da HC e localização das RONS. Os resultados obtidos com *Z. aff. confusus* estão de acordo com os mais encontrados para Tenebrionidae, enquanto que o cariótipo de *N. gigas* apresenta como principal diferença o número diplóide  $2n=18$  e o sistema de determinação do sexo neoXY. Apesar de muito conservada cromossomicamente, essa família possui algumas tribos e gêneros com características cromossômicas derivadas, por isso torna-se necessário o estudo de mais representantes do gênero *Nyctobates* para uma melhor inferência sobre a evolução cariotípica deste grupo.

## **AGRADECIMENTOS**

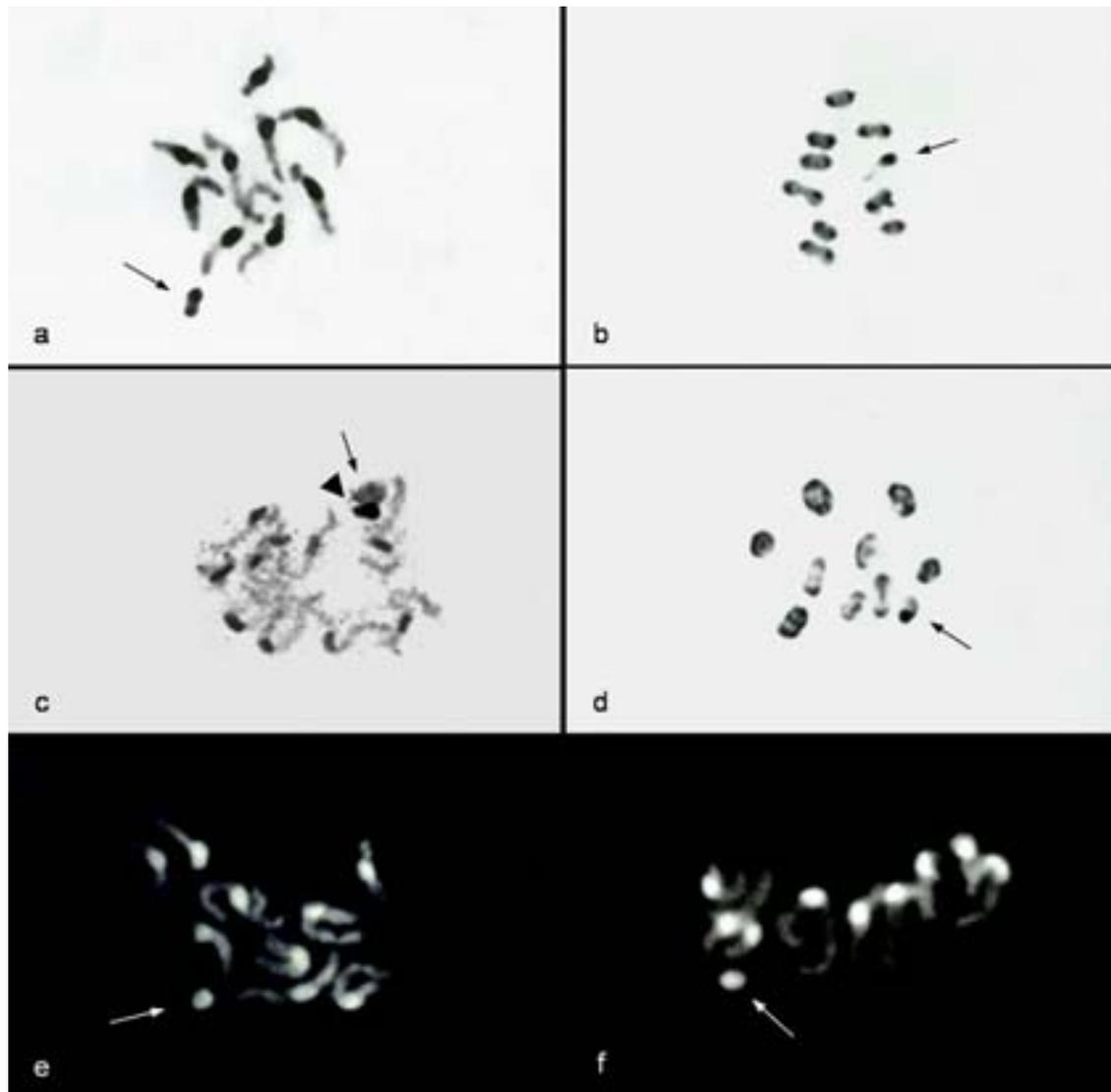
Os autores agradecem ao Dr. Carlos Campaner, curador do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (USP), pela identificação taxonômica das espécies aqui estudadas, a Francisca Tavares de Lira e a Cirlene Maria da Silva pela assistência técnica prestada. O suporte financeiro para o desenvolvimento deste trabalho foi concedido pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).



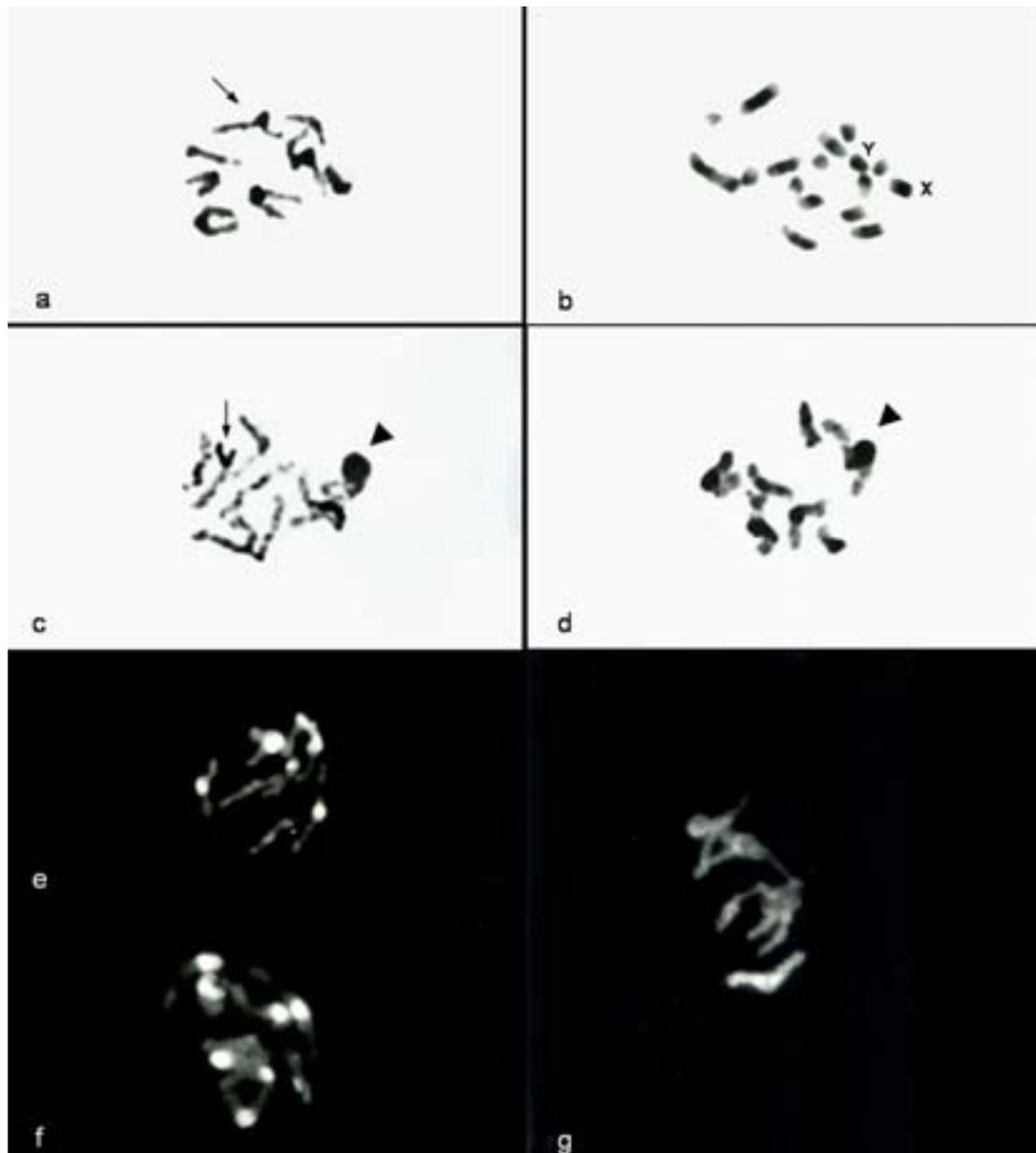
**Figura 1:** Metáfases espermatogoniais coradas convencionalmente: **a)** *Zophobas* aff. *confusus* ( $2n=20$ ,  $Xy_p$ ) e **b)** *Nyctobates gigas* ( $2n=18$ , neo XY).



**Figura 2:** Células meióticas de *Zophobas* aff. *confusus* (a, b, e, f) e *Nyctobates gigas* (c, d) coradas convencionalmente. a) diacinese; b) metáfase I; c) metáfase I; d) metáfase II; e) metáfase II com o y e f) metáfase II com o X. As setas em a e b indicam o bivalente sexual  $Xy_p$  enquanto que em c, o bivalente sexual neoXY.



**Figura 3:** Células meióticas de *Zophobas* aff. *confusus* após bandejamento C (a, b), coloração com nitrato de prata (c, d), CMA<sub>3</sub> (e) e DAPI (f). Células em paquíteno (a, c, e, f) e metáfase I (b, d). As setas indicam o X<sub>yp</sub>. A cabeça de seta em C indica a RON.



**Figura 4:** Células meióticas e mitóticas de *Nyctobates gigas* após bandejamento C (a, b), coloração com nitrato de prata (c, d), CMA<sub>3</sub> (e, f) e DAPI (g). Células em paquíteno (a, c, d, e, f, g) e metáfase espermatogonial (b). As setas em a e c indicam o bivalente neoXY. As cabeças de seta em c e d apontam a RON.

**REFERÊNCIAS**

- 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., 1983 – *Separation of *Helophorus grandis*, *maritimus* and *occidentalis* sp.n. (Coleoptera, Hydrophilidae) by chromosome banded analysis*. *Transactions of the Royal Entomological Society of London*, 8: 1-13.
- BRESSA M.J., PAPESCHI A.G., MOLA L.M. and LARRAMENDY M.L., 1999 – *Meiotic studies in *Dysdercus Guérin Méneville 1831* (Heteroptera: Pyrrhocoridae). I. Neo-XY in *Dysdercus albofasciatus* Berg 1878, a new sex chromosome determining system in Heteroptera*. *Chromosome Research*, 7: 503-508.
- COLOMBA M.S., VITTURI R. and ZUNINO M., 2000 – *Karyotype analysis, banding and fluorescent in situ hybridization in the scarab beetle *Gymnopleurus sturmi* McLeay (Coleoptera Scarabaeoidea: Scarabaeidae)*. *The Journal of Heredity*, 91(3): 260-264.
- COSTA C., 2000 – *Estado de conocimiento de los Coleoptera neotropicales*. In: F. Martín-Piera, J.J. Morrone & A. Melic (Eds.) - PriBES-2000, m3m: Monografías Tercer Milenio 1: 99-114.
- DRETS M.E., CORBELLA E., PANZERA F. and FOLLE G.A., 1983 – *C-banding and non-homologous association II. The “parachute”  $Xy_p$  sex bivalent and the behavior of heterocromatin segments in *Epilachna paenulata**. *Chromosoma (Berlin)* 88: 249-255.
- GALÍAN J., SERRANO J., DE LA RÚA, P., PETITPIERRE E. AND JUAN C., 1995 – *Localization and activity of rDNA genes in tiger beetles (Coleoptera: Cicindelidae)*. *Heredity*, 74: 524-530.
- JUAN C. and PETITPIERRE E., 1989 – *C-banding and DNA content in seven species of Tenebrionidae (Coleoptera)*. *Genome*, 32: 834-839.
- JUAN C. and PETITPIERRE E., 1991 – *Chromosome number and sex-determining systems in Tenebrionidae (Coleoptera)*. *Advances in Coleopterology*: 167-176

- JUAN C., GOSÁLVEZ J. and PETITPIERRE E., 1990 – *Improving beetle karyotype analysis: restriction endonuclease banding of Tenebrio molitor chromossomes*. 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 Research 1(3): 167-174.
- LORITE P., PAMOLEQUE T., GARNERÍA, I. and PETITPIERRE E., 2001 – *Characterization and chromosome location of satellite DNA in the leaf beetle Chrysolina americana (Coleoptera, Chrysomelidae)*. Genetica, 110: 143-150.
- MAFFEI E.M.D., GASPARINO E. and POMPOLO S.G., 2000 – *Karyotypic characterization by mitosis, meiosis and C-banding of Eriops 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., 2001a – *Sequential FISH analysis with rDNA genes and Ag-NOR banding in the lady beetle Olla v-nigrum (Coleoptera: Coccinellidae)*. Hereditas, 135: 13-18.
- MAFFEI E.M.D., POMPOLO S.G., SILVA-JUNIOR J.C., CAIXEIRO, ROCHA M.P. and DERGAM J.A., 2001b – *Silver staining of nucleolar organizer regions (NOR) in some species of Hymenoptera (bees and parasitic wasp) and Coleoptera (lady-beetle)*. Cytobios, 104: 119-125.
- MESA A. and FONTANETTI C.S., 1984 – *Multiple sex chromosomes, autossomal polymorphism and a high number of S chromosomes in Euchroma gigantes L. 1735 (Coleoptera, Buprestidae)*. Revista Brasileira de Genética, VII (4): 629-637.
- MESTROVIC N., MRAVINAC B., JUAN C., URGANOVIC D. and PLOHL M., 2000 – *Comparative study of satellite sequences and phylogeny of species from the genus Palorus (Insecta, Coleoptera)*. Genome, 43: 776-785.
- MOURA R.C., 2002 – *Análise Citogenética Comparativa em Coleópteros da Família Scarabaeidae e Caracterização de Polimorfismo Autossômico em Euchroma gigantea – Buprestidae (Polyphaga)*. Tese de Doutorado, UFPE, Brasil.

- 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.
- NOKKALA S. and NOKKALA C., 1999 – *Chromosomes in two bug species of Hebrus (Hebridae, Heteroptera). The occurrence of neo-XY sex chromosome system in Heteroptera*. *Caryologia*, 52 (1-2): 27-30.
- PETITPIERRE E., 1996 – *Molecular cytogenetics and taxonomy of insects, with particular reference to the Coleoptera*. *International Journal of Insect Morphology and Embryology* 25: 115-133.
- PETITPIERRE E., JUAN C. and ALVAREZ-FUSTER A., 1991 – *Evolution of chromosomes and genome size in Chysomelidae and Tenebrionidae*. *Advances in Coleopterology*: 129-144.
- PLOHL M., LUCIJANIC-JUSTIC V., HUGARKOVIC D., PETITPIERRE E. and JUAN C., 1993 – *Satellite DNA and heterochromatin of the flour beetle Tribolium confusum*. *Genome*, 36: 467-675.
- PONS J., PETITPIERRE E. and JUAN C., 1993 – *Characterization of the heterochromatin of the darkling beetle Miisolampus goudoi: cloning of two satellite DNA families and digestion of chromosomes with restriction enzymes*. *Hereditas*, 119; 179-185.
- PONS J., BRUVO B., JUAN C., PETITPIERRE E., PLOHL M. and HUGARKOVIC D., 1997 – *Conservation of satellite DNA in species of the genus Pimelia (Tenebrionidae, Coleoptera)*. *Gene*, 205: 183-190.
- POSTIGLIONI A. and BRUM-ZORRILLLA N., 1988 – *Non-relationship between nucleolus and sex chromosomes system  $Xy_p$  in Chelymorpha variabilis Boheman (Coleoptera: Chysomelidae)*. *Genetica*, 77: 134-141.
- PROENÇA S.J.R., SERRANO A.R.M. and COLLARES-PEREIRA M.J., 2002 – *Cytogenetic variability in genus Odontocheila (Coleoptera, Cicindelidae): karyotypes, C-banding, NORs and localisation of ribosomal genes of O. confusa and O. nodicornis*. *Genetica* 114: 237-245.

- ROZEK M. and MARYANSKA-NADACHOWSKA A., 1991 – *Studies on C-banding karyotype and meiosis of Harpalus affinis (Shrank, 1781) (Coleoptera, Carabidae)*. *Caryologia*, 44: 317-323.
- ROZEK M. and RUDEK Z., 1992 – *Karyotype analysis and C-banding pattern in two species of Carabidae (Coleoptera, Carabidae)*. *Folia Biologica (Kraków)*, 40(1-2): 47-52.
- ROZEK M., 1998 – *C-bands and NORs on chromosomes in four species of the genus Trechus Clairv. (Coleoptera, Carabidae)*. *Caryologia*, 51: 189-194.
- RUFAS J.S., GIMÉNEZ-ÁBIAN J., SUJA, J.A. and GARCIA DE LA VEJA C., 1987 – *Chromosome organization in meiosis revealed by light microscope analysis of silver-stained “cores”*. *Genome*, 29: 706-712.
- SERRANO J., 1981 – *Chromosome number and karyotype evolution of Caraboidea*. *Genetica*, 55: 51-60.
- SMITH S.G. and VIRKKI N., 1978 – *Coleoptera In: Animal Cytogenetics (John, B. ed.)*. Borntraeger, Berlin, Stuttgart. 366pp.
- SUMNER A.T., 1972 – *A simple technique form demonstrating centromeric heterocromatin*. *Experimental Cell Research*, 75: 304-306.
- SCHWEIZER D., MENDELACK M., WHITE M.J. and CONTRERAS N., 1983 – *Cytogenetics of partenogenetic grasshopper Warramaba virgo and its bisexual relatives X. Pattern of fluorescent banding*. *Chromosoma (Berlin)*, 88: 227-236.
- URGARKOVIC D., PLOHL M., PETITPIERRE E., LUCIJANIC-JUSTIC V. and JUAN C., 1994 – *Tenebrio obscurus satellite DNA is resistant to cleavage by restriction endonucleases in situ*. *Chromosome Research*, 2: 217-223.
- VIDAL O.R. and NOCERA C.P., 1984 – *Citogenética de la tribu Eucranini (Coleoptera, Scarabaeidae). Estudios convencionales y con bandeado C*. *Physis (Buenos Aires)* 42: 83-90.
- VIRKKI N., 1983 – *Banding of Oedionychna (Coleoptera: Alticinae) chromosomes: C-and Ag-bands*. *Journal of Agriculture of The University of Puerto Rico*, 67: 221-225.

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 Research. 7: 255-260.

## 5.0 CONCLUSÕES

No presente trabalho foram estudados, pela primeira vez, os tenebrionídeos *Zophobas* aff. *confusus* e *Nyctobates gigas*. A partir dos resultados obtidos com diferentes técnicas citogenéticas, chegamos às seguintes conclusões:

1. As duas espécies diferiram quanto ao número cromossômico e sistema sexual encontrados. *Zophobas* aff. *confusus* exibiu o cariótipo modal para Coleoptera ( $2n=20$ ;  $9+Xy_p$ ), enquanto que *N. gigas* apresentou redução de um par de cromossomos e sistema sexual neoXY ( $2n=18$ ;  $8+neoXY$ ). Essa redução se deve provavelmente a uma translocação X-autossomo que deu origem ao neoXY;
2. Como na maioria dos tenebrionídeos estudados através do bandeamento C, essas espécies também revelaram grandes blocos pericentroméricos de heterocromatina constitutiva (HC) em todos os autossomos. Entretanto, os cromossomos sexuais apresentaram-se quase que totalmente heterocromáticos;
3. A análise da composição da HC através dos fluorocromos CMA<sub>3</sub> e DAPI revelou resultados distintos para as duas espécies. A HC de *Zophobas* aff. *confusus* marcou mais intensamente com o DAPI, indicando uma maior riqueza de pares de bases AT. Por sua vez, em *N. gigas* a HC CMA<sub>3</sub> positiva indica uma forte riqueza de pares de bases GC;
4. Quanto ao estudo das RONS, *Z. aff. confusus* e *N. gigas* também apresentaram resultados distintos. A primeira espécie exibiu uma RON localizada no bivalente sexual  $Xy_p$  enquanto que a segunda revelou uma RON autossômica, estando de acordo o padrão mais encontrado para Coleoptera. A marcação do bivalente sexual pela prata até a metáfase I em *Z. aff. confusus* indica que o material nucleolar pode estar envolvido com a correta segregação desse bivalente.

## **6.0 ANEXOS**

## 6.1 Instruções Para Genetics and Molecular Biology

### NOTICE TO CONTRIBUTORS

#### *Scope and Policy*

**Genetics and Molecular Biology** (formerly named *Revista Brasileira de Genética/Brazilian Journal of Genetics* - ISSN 0100-8455) is published quarterly by the Sociedade Brasileira de Genética (Brazilian Society of Genetics).

The Journal considers contributions that present the results of original research in genetics, evolution and related scientific disciplines.

Although **Genetics and Molecular Biology** is an official publication of the Brazilian Society of Genetics, contributors are not required to be members of the Society.

It is a fundamental condition that submitted manuscripts have not been and will not be published elsewhere. With the acceptance of a manuscript for publication, the publishers acquire full and exclusive copyright for all languages and countries.

The use of registered names and trademarks does not imply, even in the absence of a specific statement, that such names are exempt from the relevant protective laws and regulations and therefore free for general use.

#### *Submission of Papers*

#### 1. Manuscripts should be submitted to:

*Fábio de Melo Sene, Editor-in-Chief  
Genetics and Molecular Biology  
Rua Capão Adelmiro Norberto da Silva, 736  
14025-670 Ribeirão Preto, SP - Brasil*

#### 2. A submission package sent to the Editorial Office must contain:

- a) A cover letter signed by all authors stating that they have approved the submission of the manuscript and that the findings have not been published or are not under consideration for publication elsewhere;
- b) Three copies of the manuscript and figures.
- c) Two copies of any unpublished or in-press companion articles referred to in the submission.
- d) A copy of the text, tables and figures on a disk. Be sure that the disk is adequately protected; if a disk arrives damaged, a new disk will be requested, causing delays in publication. Formats for text are Word or RTF, in Windows platform. Images in TIF or JPG formats should be sent in separate files (For Figures, see detailed instructions in 3.1.g). Disk must be labeled with the first author's last name, platform and software. (See detailed instructions below). Failure to adhere to these guidelines can delay the handling of your contribution, and manuscripts may be returned before being reviewed.

#### 3. Categories of Contribution

##### 3.1. Research Articles

Manuscripts must be written in English in double-spaced, 12-point type throughout, including the References Cited section, appendices, tables and legends; printed on one side only of A4 paper with 2.5 cm margins; marked with consecutive page numbers, beginning with the cover page.

The following elements must start on a new page and be ordered as they are listed below:

a) **The title page** must contain: a concise and informative title; the authors' names (first name at full length); the authors' institutional affiliation, including department, institution, and city, state or province, and country; different affiliations indicated with superscript numbers; a short running title of about 35 characters, including spaces; up to five key words; the corresponding author's name, postal address, phone and fax numbers and email address. The corresponding author is the person responsible for checking the page proofs, and arranging for the payment of color illustrations and author's alteration charges.

b) **The Abstract** must be a single paragraph that does not exceed 200 words and summarizes the main results and conclusions of the study. It should not contain references.

c) **The text** must be as succinct as possible. *Text citations*: articles should be referred to by authors' surnames and date of publication; citations with two authors must include both names; in citations with three or more authors, name the first author and use "et al". Only articles that are published or in press should be cited. In the case of personal communications or unpublished results, all contributors must be listed by initials and last name (*et al* should not be used). *Numbers*: In the text, numbers nine or less must be written out except as part of a date, a fraction or decimal, a percentage, or a unit of measurement. Use Arabic numerals for numbers larger than nine. Avoid starting a sentence with a number. *Binomial Names*: Latin names of genera, species and intraspecific taxa in the text must be printed in italics; names of orders and families should be in the Title.

The text includes the following elements:

*Introduction* – Description of the background that led to the study.

*Material (or Subjects) and Methods* – Details relevant to the conduct of the study. Statistical methods should be explained at the end of this section.

*Results* – Undue repetition in text and tables should be avoided. Comment on significance of results is appropriate but broader discussion should be part of the Discussion section.

*Discussion* – The findings of the study should be placed in context of relevant published data. Ideas presented in other publications should not be discussed solely to make an exhaustive presentation.

Some manuscripts may require different formats appropriate to their content.

**d) The Acknowledgments** must be a single paragraph that immediately follows the discussion and includes references to grant support.

**e) The References Section:** citations must be ordered alphabetically by the first author; only articles that are published or in press should be included; personal communications must be cited within the text; journal titles must be abbreviated according to Medline (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/jr/browser.cgi>).

*Sample journal article citation:*

Breuer ME and Pavan C (1955) Behaviour of polytene chromosomes of *Rhynchosciara angelae* at different stages of larval development. *Chromosoma* 7:371-386.

Bertollo LAC, Takahashi CS and Moreira-Filho O (1978) Cytotaxonomic consideration on *Hoplias lacerdæ* (Pisces, Erythrinidae). *Rev Bras Genet* 1:103-120.

*Sample book citation:*

Salzano FM and Freire-Maia N (1967) Populações Brasileiras. Companhia Editora Nacional and EDUSP, São Paulo, 178 pp.

Dobzhansky T (1951) Genetics and Origin of Species. 3rd edition, Columbia University Press, New York, 364 pp.

*Sample chapter-in-book citation:*

Carvalho A, Monaco LC and Krug CA (1966) Melhoramento genético das plantas e sua repercussão econômica. In: Pavan C and da Cunha AB (eds) Elementos de Genética. 2nd ed. EDUSP and Companhia Editora Nacional, São Paulo, pp 587-653.

*Sample abstracts in meeting citation:*

Basile R (1973) Cromossomos Politémicos em células nutritivas de ovócitos de ovário atrofiado de *Rhynchosciara*. *Ciênc e Cult* 25 (suppl): 248. XXV Reunião Anual da SBPC, Rio de Janeiro, Brazil.

*Sample Thesis/Dissertation citation:*

Frota-Pessoa O (1953) Revision of the *Tripunctatus* group of *Drosophila* with description of fifteen new species. PhD Thesis, Universidade do Brasil, Rio de Janeiro.

**f) Tables** each table must start on a new page. A concise title should be provided above the table. Tables must be numbered consecutively Arabic numerals. Each column must have a title in the box head. Footnotes, typed directly below the table, should be indicated in decrease superscript numbers.

**g) Figures** must be numbered consecutively in Arabic numerals. Legends should be typed on a separate sheet. Three sets of illustrations the highest quality must be provided, one original and two copies in glossy paper. If you have created figures electronically, submit them as hard copies. Scanned figures should not be submitted. Images should be in TIF or JPG format and provided in separate files. Figures Word format cannot be published. Journal quality reproduction will require grayscale and color at resolution yielding 300 ppi. Authors should submit bitmapped line art at resolution yielding 600-1200 ppi. These resolutions refer to the output size of the file; if it is anticipated that images will be enlarged or reduced, the resolutions should be adjusted accordingly. Identify each illustration by affixing on the back a label containing: the number of the figure, the name of the first author, and an arrow indicating top of illustration. Illustrations supplied on disks must follow instructions in item 2 (Submission package). Color illustration can be accepted, but authors are asked to defray the cost. For costs of color figures, check with the Editorial Office.

**h) Nomenclature:** current standard international nomenclature should be adhered to.

**i) Sequences** may appear in text or in figure. DNA must be sequenced on both strands. DNA, RNA, or protein sequences equal to or greater than 50 units must be entered into appropriate data bank and the accession number must be provided before publication of the article. Long sequences requiring more than two pages to reproduce will not be published unless the Editorial decision is that the publication is necessary. Complete mtDNA sequence will not be published.

**j) Data access:** reference should be made to availability of detailed data and materials used for reported studies.

**k) Ethical issues:** Reports of experiments on live vertebrates must include a brief statement that the work was approved by the institutional review board. For experiments involving human subjects, authors must also include a statement that informed consent was obtained from all subjects. If photos or any other identifiable data are included, a copy of the signed consent must accompany the manuscript.

**3.2 Short Communications** present brief observations that do not warrant full-length articles. They should not be considered preliminary communications. Their format is that of full-length article. The text must be kept to a minimum.

**3.3 Letters to the Editor** relate or respond to recent published items in the journal. Discussions of political, social and ethical issues of interest to geneticists are also welcome in this form.

**3.4 Review Articles** are welcome.

**3.5 Book Reviews:** publishers are invited to submit books on Genetics, Evolution and related disciplines, for review in the journal.

**3.6 History, Story and Memories:** accounts on historical aspects of Genetics relating to Brazil.

## Proofs

Page proofs will be sent to the corresponding author. Changes made to page proofs, apart from printer's errors, will be charged to the authors. Notes added in proof require Editorial approval.

## Subscription

Membership to the Brazilian Society of Genetics entitles subscription to **Genetics and Molecular Biology**. For nonmembers and institutions, the annual subscriptions rates (4 issues/year) are:

Brazil and other South American Countries (Air Mail): Institutional - R\$ 300,00; Personal: R\$ 150,00

Other Countries (Air Mail): Institutional - US\$ 300.00; Personal - US\$ 50.00

## 6.2 Instruções Para a Caryologia

Authors are asked to pay close attention to the instructions below concerning preparation of the manuscript: manuscripts that do not conform to these instructions will be returned

<i>Manuscript</i>	As short and concise as possible, should be written in English. Correct language is the responsibility of the authors. Manuscripts must be typed, with wide margins, and double-spaced throughout. All pages should be numbered. Authors must submit two copies (original and one photostatic copy). When a paper has joint authorship, one author must accept responsibility for all correspondence; the full postal address of the author who is to check proofs should be provided. Papers should conform to the following general layout
<i>Title page</i>	This should contain (a) the full title of the paper, (b) authors listed in the order in which they are to appear at the head of the printed article, (c) affiliation and address for each author, (d) telephone number, fax number and electronic mail address of the author responsible for correspondence and (d) a short running title.
<i>Abstract</i>	The abstract is of great importance as it may be reproduced elsewhere and is all that many may see of your work. The summary, not exceeding 250 words, will be published at the beginning of each paper; it should contain no discursive matter or references. The abstract should be followed by 5 (max 7) key words, identifying the subject matter for retrieval systems.
<i>Reference</i>	<p>Literature citations in the text should be in chronological order. Where there are more than two authors, only the first should be named, followed by "<i>et al.</i>": The list of references should include only publications cited in the text. In the list of references, titles of periodicals must be given in full, not abbreviated. The references should be arranged alphabetically and according to the following order: author's surname, name initials, year of publication, original title of the work, journal name, volume number, inclusive pages. References should conform as exactly as possible to one of these styles:</p> <p>LEVAN A., FREDGA K. and SANDBERG A.A., 1964. – <i>Nomenclature for centromeric position on chromosomes</i>. Hereditas, 52: 201-220.</p> <p>STUESSY T.F., 1990. - <i>Plant taxonomy</i>. Columbia University Press, New York, Oxford.</p> <p>GREILHUBER J., 1984. - <i>Chromosomal evidence in taxonomy</i>. In: V.H. Heywood and D.M. Moore (Eds), "Current concepts in plant taxonomy", Systematic Association n. 25, p. 157-180. Academic Press, London.</p> <p>Other citations such as papers 'in press' may appear on the list but not papers 'submitted' or 'in preparation'. A personal communication may be cited in the text but not in the reference list.</p>
<i>Table</i>	Keep Tables as simple as possible and avoid vertical rules. Data matrices and complex tables should be submitted on high quality paper in a form suitable for photographic reproduction.

<p style="text-align: center;"><i>Illustrations</i></p>	<p>Two sets of figures mounted on white illustration board must be submitted as sharp, glossy, high-quality photographic prints. Each figure or group of figures should be planned to fit, after appropriate reduction, into the area of either one or two columns of text. The dimension of the printed page (160 x 222 mm) should be kept in mind when preparing the figures for publication. The maximum finished size of a one-column illustration is 76 x 222 mm and that of a two-column illustration, corresponding to the whole printed page, is 160 x 222 mm. The figures must be numbered consecutively, and each one must be referred to in the text and the combined figure and legend must be self-explanatory. Only essential labelling should be used, with detailed information given in the caption. Each illustration must be identified by the figure number and the authors' names on the back of the page or in the left-hand corner, well away from the illustration area.</p> <p>The reviewers are invited, in confidence, to recommend on the suitability of the submission and provide comments for the authors. They are asked to make one of four recommendations: accept, accept after minor revision, accept after major revision, do not accept. The decision to accept a paper is made primarily on scientific content. The decision to ask for revisions is made in light of the reviewers' comments and recommendations, and after evaluation by the Associate Editor.</p> <p>The final decision on acceptance or rejection is made by the Editor on the advice of the Associate Editor.</p> <p>This decision, together with any relevant reasons, will be communicated by e-mail, fax or letter from the Editor to the corresponding author. One copy of the original submission is retained by the Editor.</p> <p>Do not send disks with the original submission. On acceptance, authors must return their manuscript with a 3.5" high density PC-compatible diskettes containing only the text. Documents should preferably be in Word for Windows format.</p>
<p style="text-align: center;"><i>GALLERY PROOFS</i></p>	<p>One set of galley proofs and a reprint order form are sent to corresponding author. Galley proofs must be checked very carefully and must be returned within one week from receipt. The proof stage is not the time to make extensive corrections, additions, or deletions.</p>
<p style="text-align: center;"><i>REPRINTS</i></p>	<p>To order reprints, the completed order form must be returned with payment together with the corrected proofs. The Journal does not provide free reprints and they may be obtained at cost specified in the order form.</p>
<p style="text-align: center;"><u><b>AMMINISTATIVE BOARD</b></u></p>	<p style="text-align: center;"><u><b>SUBSCRIPTION</b></u></p>