
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)**

**MECANISMOS DE DIFERENCIAÇÃO CROMOSSÔMICA EM BESOUROS
DA SUBFAMÍLIA CASSIDINAE S.L. (POLYPHAGA, CHRYSOMELIDAE)**

AMÁLIA TORREZAN LOPES

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências do Câmpus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutora em Ciências Biológicas
(Biologia Celular e Molecular)

Rio Claro, São Paulo, Brasil

Março de 2016

AMÁLIA TORREZAN LOPES

**MECANISMOS DE DIFERENCIAÇÃO CROMOSSÔMICA EM BESOUROS
DA SUBFAMÍLIA CASSIDINAE *S.L.* (POLYPHAGA, CHRYSOMELIDAE)**

Orientadora: Profa. Dra. Marielle Cristina Schneider

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências do Câmpus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista, como
parte dos requisitos para obtenção do título
de Doutora em Ciências Biológicas
(Biologia Celular e Molecular)

Rio Claro, São Paulo, Brasil

Março de 2016

591.15 L864m	Lopes, Amália Torrezan Mecanismos de diferenciação cromossômica em besouros da subfamília Cassidinae s.l. (Polyphaga, Chrysomelidae) / Amália Torrezan Lopes. - Rio Claro, 2016 145 f. : il., figs., tabs. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro Orientadora: Marielle Cristina Schneider 1. Genética animal. 2. Cariótipo. 3. Genes ribossomais. 4. Heterocromatina constitutiva. 5. Meiose. 6. Sistema cromossômico sexual. I. Título.
-----------------	---

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP Campus de Rio Claro/SP

Dedido este trabalho a família Lopes, Edison,
Iriana e Ramon, a minha avó Dulce, e a meu
marido Henrique, que sempre apoiaram e
incentivaram as minhas escolhas.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Edison Lopes e Iriana Lopes, por todo amor, carinho e compreensão. Por estarem sempre ao meu lado torcendo por mim e ajudando a passar mais esta etapa da vida.

Ao melhor irmão do mundo, Ramon Lopes, por todo amor, carinho, incentivo e pelas gargalhadas nos momentos mais difíceis. Por ser meu melhor amigo e por trocar o jogo do Brasil para fazer minha mudança.

À minha avó Dulce Torrezan, mulher guerreira que sempre esteve ao meu lado. Que me incentivou e rezou muito o terço para que minha FISH desse certo!

Ao meu marido, Henrique Coelho, que sempre torceu muito por mim, por todo amor, carinho e muita paciência. Pelo incentivo e calma nos momentos mais desesperadores.

À minha orientadora, Profa. Marielle Cristina Schneider, a Mari, pela confiança, pela paciência, pelos puxões de orelha, e pela excelente orientação, que foram imprescindíveis para o desenvolvimento deste trabalho. E acima de tudo pela amizade e pela preocupação com o meu futuro profissional.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelo apoio financeiro para a realização deste projeto de pesquisa.

As minha amigas e companheiras Juliete Costa, Tatiana Gimenez-Pinheiro e as escorpionetes, Crislaine Ubinski, Juliana de Lima, Renata Bueno, Viviane Mattos, por tudo!! E quando falo tudo, é tudo mesmo! Pelo apoio, pelo incentivo, pelas risadas, por fazerem a hora voar. Pelas palavras de conforto quando aquela lágrima teimosa escorria. Por ouvir Sydney Magal. E é claro, por todo o conhecimento que aprendi com vocês nas nossas discussões no lab 23!

Aos amigos do laboratório 23, Crislaine, Juliana, Renata, Vivi, Tati, professora Katia Pellegrino, André Justino, Marcel Fernandes, João Vicente Malvezzi (Jovi) e Alexandre Paes,

pela ótima convivência, pela ajuda, principalmente na hora de correr a eletroforese, pelas discussões, pelos cafés e pelas boas risadas.

Aos meus amigos da UNESP/Rio Claro, Ana Marcato (Matraca), Rafael Borba (Mão), Allison Anjos, Jorge Correia, Octavio Palacios e Simone Gruber, por sempre me receberem tão bem. E mesmo distante, mantem uma amizade verdadeira. Obrigada pelos almoços, e por todos os momentos de diversão que passamos.

Às meninas da república, Caroline de Paula, Tamires Barros e Lídia Durço, que me receberam tão bem quando cheguei em Diadema. Pelas nossas conversas até tarde da noite, pelas pizzas de hot dog, e por sempre me ouvirem quando eu mais precisava.

Aos Sr. José Luiz Barrichello, Sr. Antonio Bressan e Sr. Vinicius que permitiram a realização das coletas dos “bichinhos” em seus cultivos.

“Só se vê bem com o coração, o essencial é invisível aos olhos”

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

Os besouros da subfamília Cassidinae *s.l.* são popularmente conhecidos como “tortoise beetles” devido ao formato peculiar dos élitros que se assemelham ao casco de tartaruga. Esta subfamília inclui mais de 6000 espécies descritas taxonomicamente, das quais menos de 2% foram estudadas sob o ponto de vista citogenético, e evidenciaram número diploide variando entre $2n=16$ a $2n=51$ e sistemas cromossômicos sexuais dos tipos Xy_p , $X0$, Xy , Xy_c , Xy_r , $neoXY$, Xyy_p , $X_pneoXneoY_p$, entre outros sistemas múltiplos. No entanto, cerca de 85% das espécies apresentaram predominância do cariótipo $2n=16+Xy_p$, e esta característica cariotípica pode estar relacionada ao baixo número de espécies examinadas, a predominância de análises em espécies pertencentes a um mesmo gênero e/ou tribo, bem como a escassez ou até mesmo a inexistência de estudos que utilizaram marcação de regiões cromossômicas específicas. O objetivo deste trabalho é discutir sobre os mecanismos de evolução cromossômica em espécies de Cassidinae. As análises cromossômicas foram realizadas em 19 espécies de cassidíneos da fauna brasileira, através de coloração convencional, bandeamento C e hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sondas dos genes ribossomais 28S, 5S, dos clusters teloméricos (TTAGG) $_n$ e (TCAGG) $_n$, e do pequeno RNA nuclear (snRNA) U2. O estudo citogenético de 19 espécies de Cassidinae revelou uma grande diversidade em relação ao número diploide - Cassidini: $2n=38+Xy_p$ em *Agroiconota inedita*, $2n=20+Xy_p$ em *Charidotella immaculata*, *Charidotella sexpunctata* e *Microctenochira stigmatica*, $2n=16+Xy_p$ em *Deloyala cruciata*, *Microctenochira aciculata*, *Microctenochira optata* e *Microctenochira quadrata*, $2n=18$ em *Microctenochira gnata*; Goniocheniini: $2n=16+Xy_p$ em *Chlamydocassis cribripennis*; Ischyrosonychini: $2n=16+Xy_p$ em *Cistudinella obducta*; Mesomphaliini: $2n=34+Xy_p$ em *Botanochara tessellata*, $2n=20+Xy_p/Xy_r$ em *Chelymorpha cribraria*, $2n=20+Xy_p$ em *Chelymorpha inflata*, $2n=20$ em *Cteisella magica*, $2n=38+Xy_p$ em *Cyrtanota cyanea*, $2n=40+Xy_p$ em *Paraselenis flava*, $2n=22$ em *Stolas areolata*, e $2n=24+Xy_p$ em *Stolas redtembacheri*. O cariótipo $2n=16+Xy_p$ ocorreu em 26% das espécies analisadas pertencentes as tribos Cassidini, Goniocheniini e Ischyrosonychini. O sistema cromossômico sexual (SCS) Xy_p foi o mais frequente, sendo registrado inclusive em espécies da tribo Mesomphaliini, que caracteristicamente possui uma grande diversidade de SCS. Em relação ao padrão de heterocromatina constitutiva, 12 espécies exibiram cromossomos com marcações pericentroméricas, as quais estavam presentes em alguns ou até mesmo todos os elementos do conjunto diploide. Adicionalmente, quatro espécies revelaram blocos heterocromáticos nas regiões intersticial e terminal de alguns cromossomos autossômicos e/ou sexuais. O gene de rDNA 28S exibiu um padrão similar quanto ao número de clusters no cariótipo, uma vez que

10 das 11 espécies examinadas, tanto com cariótipos semelhantes quanto diferentes, exibiram dois sítios ribossomais. Entretanto, houve diferenças quanto a localização dos sítios de rDNA, especialmente em representantes de Cassidini, os quais exibiram a maior homogeneidade cariotípica. Entre as 12 espécies investigadas quanto a presença dos clusters teloméricos (TTAGG)_n e (TCAGG)_n, apenas nove mostraram marcações positivas para a sequência (TTAGG)_n, porém com variações no número de cromossomos portadores do sítio telomérico. Este resultado demonstra que, provavelmente, esta sequência telomérica está sendo repetidamente perdida ao longo da evolução cromossômica desta subfamília. A FISH com sonda de rDNA 5S não revelou sinais de hibridação positivos em todas as espécies investigadas, com exceção de *Cha. immaculata*, que exibiu um sinal tênue de marcação em núcleos interfásicos. O gene do snRNA U2 foi visualizado apenas em um par autossômico, mas com variação quanto a localização entre as espécies.

Palavras-chave: cariótipo, genes ribossomais, heterocromatina constitutiva, meiose, sistema cromossômico sexual, telômero.

ABSTRACT

The beetles of the subfamily Cassidinae *s.l.* are commonly known as tortoise beetles, due to the peculiar shape of the elytra. This subfamily possesses more than 6000 taxonomically described species, of which less than 2% were cytogenetically studied. The cassidines showed diploid number ranged from $2n=16$ to $2n=51$, and sex chromosome systems of the Xy_p , $X0$, Xy , Xy_c , Xy_r , $neoXY$, Xyy_p , $X_pneoXneoY_p$ types, in addition to other multiple systems. Despite the occurrence of this karyotype diversity, about 85% of the species presented the karyotype $2n=16+Xy_p$. However, this karyotype homogeneity may be related to the low number of species examined, the analyses with species included in the same genus and/or tribe, as well as the scarcity or lack of studies with techniques that identify specific chromosomal regions. The aim of this work is to discuss about the mechanism of chromosome evolution in species of Cassidinae. The chromosomal analysis were performed in 19 species of Cassidinae from Brazilian fauna, using standard staining, C-banding and fluorescent *in situ* hybridization (FISH) with probes of 28S rDNA, 5S rDNA, (TTAGG) $_n$ and (TCAGG) $_n$ telomeric clusters, and U2 small nuclear RNA (snRNA). The cytogenetic studies in 19 cassidine beetles revealed a high diversity of diploid number - Cassidini: $2n=38+Xy_p$ in *Agroiconota inedita*, $2n=20+Xy_p$ in *Charidotella immaculata*, *Charidotella sexpunctata* and *Microctenochira stigmatica*, $2n=16+Xy_p$ in *Deloyala cruciata*, *Microctenochira aciculata*, *Microctenochira optata* and *Microctenochira quadrata*, $2n=18$ in *Microctenochira gnata*; Goniocheniini: $2n=16+Xy_p$ in *Chlamydocassis cribripennis*; Ischyrosonychini: $2n=16+Xy_p$ in *Cistudinella obducta*; Mesomphaliini: $2n=34+Xy_p$ in *Botanochara tessellata*, $2n=20+Xy_p/Xy_r$ in *Chelymorpha cribraria*, $2n=20+Xy_p$ in *Chelymorpha inflata*, $2n=20$ in *Cteisella magica*, $2n=38+Xy_p$ in *Cyrtanota cyanea*, $2n=40+Xy_p$ in *Paraselenis flava*, $2n=22$ in *Stolas areolata*, and $2n=24+Xy_p$ in *Stolas redtembacheri*. The karyotype $2n=16+Xy_p$ occurred in 26% of the analyzed species, belonging to the tribes Cassidini, Goniocheniini and Ischyrosonychini. The Xy_p sex chromosome system (SCS) was the most frequent, occurring also in Mesomphaliini that exhibit the highest diversity of SCS within the Cassidinae. In relation to the pattern of constitutive heterochromatin, 12 species showed chromosomes with pericentromeric bands, which were present in some or all elements of the diploid set. Additionally, four species revealed heterochromatic blocks in the interstitial and terminal regions of some autosomal and/or sex chromosomes. In 10 of the 11 species investigated, the 28S ribosomal gene showed a similar pattern, occurring in only one autosomal pair. However, differences regarding the localization of the 28S rDNA sites were observed among the species, mainly in representatives of Cassidini, which showed the highest karyotype homogeneity. Among the 12 species studied for the

presence of the (TTAGG)_n and (TCAGG)_n telomere clusters, only nine showed (TTAGG)_n positive signals, but with variations regarding the number of chromosomes with the telomere sites. This result probably indicates that the TTAGG telomere sequence have repeatedly been lost during the chromosome evolution of this subfamily. The FISH with 5S rDNA probes did not revealed positive sites in all investigated species, with the exception of *Cha. immaculata* that exhibited a tenuous signal in interphase nuclei. The U2 snRNA gene was visualized in only one autosomal pair, but with variation in chromosomal location among the species.

Key words: karyotype, ribosomal genes, constitutive heterochromatin, meiosis, sex chromosome system, telomere.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
2.	OBJETIVOS	39
3.	MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1	Material	40
3.2	Métodos	40
3.2.1	Obtenção das preparações citológicas	40
3.2.2	Coloração convencional (Giemsa)	40
3.2.3	Técnica de obtenção da banda C	41
3.2.4	Hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH)	42
3.2.4.1	Extração do DNA e amplificação dos genes	42
3.2.4.2	Marcação das sondas	43
3.2.5	Análises cromossômicas	48
4.	RESULTADOS	49

CAPÍTULO I

“COMPARATIVE CYTOGENETIC ANALYSIS IN 13 TORTOISE BEETLES (CASSIDINAE, COLEOPTERA) FROM BRAZILIAN FAUNA”

ABSTRACT	52
INTRODUCTION	53
MATERIALS AND METHODS	54
RESULTS	55
DISCUSSION	66
Acknowledgements	70
REFERENCES	70

CAPÍTULO II

“MAPEAMENTO CROMOSSÔMICO DO GENE RIBOSSOMAL 28S EM 11 ESPÉCIES DE CASSIDINAE S.L. (COLEOPTERA, CHRYSOMELIDAE)”

INTRODUÇÃO	78
MATERIAL E MÉTODOS	80
RESULTADOS	82
DISCUSSÃO	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

CAPÍTULO III

“IDENTIFICAÇÃO DE SEQUENCIAS TELOMÉRICAS PENTANUCLEOTÍDICAS (TTAGG)_n e (TCAGG)_n EM CASSIDINAE *S.L.* (COLEOPTERA, CHRYSOMELIDAE)”

INTRODUÇÃO	99
MATERIAL E MÉTODOS	100
RESULTADOS	102
DISCUSSÃO	105
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107

CAPÍTULO IV

“EMPREGO DOS GENES rDNA 5S E snRNA U2 COMO MARCADORES CITOGENÉTICOS EM CASSIDINAE *s.l.* (COLEOPTERA, CHRYSOMELIDAE)”

INTRODUÇÃO	112
MATERIAL E MÉTODOS	113
RESULTADOS	115
DISCUSSÃO	118
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119

5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	125
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	126

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A ordem Coleoptera, possui aproximadamente 360.000 espécies descritas, as quais estão distribuídas por todo o mundo. Esta ordem corresponde ao mais rico e variado grupo da classe Insecta, incluindo cerca de 40% de todos os insetos e 30% dos animais existentes (Lawrence & Britton 1994; Costa 2003). Na região Neotropical, são conhecidas mais de 72.000 espécies de besouros, distribuídas em 127 famílias e 6.703 gêneros; no entanto, este número certamente é subestimado, uma vez que a maioria dos dados sobre a diversidade de espécies é de meados de 1950 (Costa 2003). A alta diversidade dos coleópteros usualmente é atribuída ao aparecimento dos élitros, o que resultou em uma maior proteção das asas. Além disso, algumas outras mudanças morfológicas no corpo dos besouros, acompanhadas pela redução de membranas expostas na superfície corpórea foram importantes para a proteção contra predadores e exploração de diversos nichos (Lawrence & Britton 1994).

De acordo com características morfológicas, os coleópteros podem ser agrupados em quatro subordens: Archostemata, Myxophaga, Adephaga e Polyphaga (Lawrence 1982; Lawrence & Britton 1991). A subordem Polyphaga inclui mais de 90% dos besouros conhecidos e exibe a maior diversidade estrutural e biológica de espécies, quando comparada às outras três subordens (Lawrence & Newton 1995; Costa 2003). Entre as 148 famílias conhecidas de Polyphaga, encontra-se Chrysomelidae, que corresponde a segunda maior quanto ao número de espécies, com cerca de 37.000 representantes, subdivididos em 19 subfamílias (Reid 1995; Chaboo 2007).

Os crisomelídeos apresentam coloração vistosa e brilhante e são popularmente conhecidos como joaninhas. Os adultos alimentam-se principalmente de flores e folhas e as larvas geralmente são fitófagas, sendo que algumas se alimentam de folhas e vivem em suas superfícies, enquanto outras cavam galerias nas folhas, raízes e caules. Este hábito alimentar dos besouros crisomelídeos faz com que muitas espécies sejam consideradas importantes pragas agrícolas (Borror 1988).

A subfamília Cassidinae, com aproximadamente 6.000 espécies descritas e distribuídas em 43 tribos (Figura 1), engloba 16% da diversidade dos crisomelídeos (Chaboo 2007). As espécies de Cassidinae passaram por um amplo histórico taxonômico quanto à sua classificação, tendo sido agrupadas em tribos (Clytrini, Cassidini e Hispini), subfamílias (Cassidinae e Hispinae), famílias (Cassididae e Hispidae) e até mesmo em uma superfamília (Cassidoidea). Finalmente, considerando caracteres morfológicos, Chaboo (2007) propôs que as subfamílias Cassidinae e Hispinae formavam um grupo monofilético e englobou estes dois clados em uma única subfamília, Cassidinae *sensu lato*. Os antigos grupos Cassidinae e Hispinae são

atualmente designados como *Cassidinae sensu stricto (s. str.)* e *Hispinae sensu stricto (s. str.)* (Figura 2)

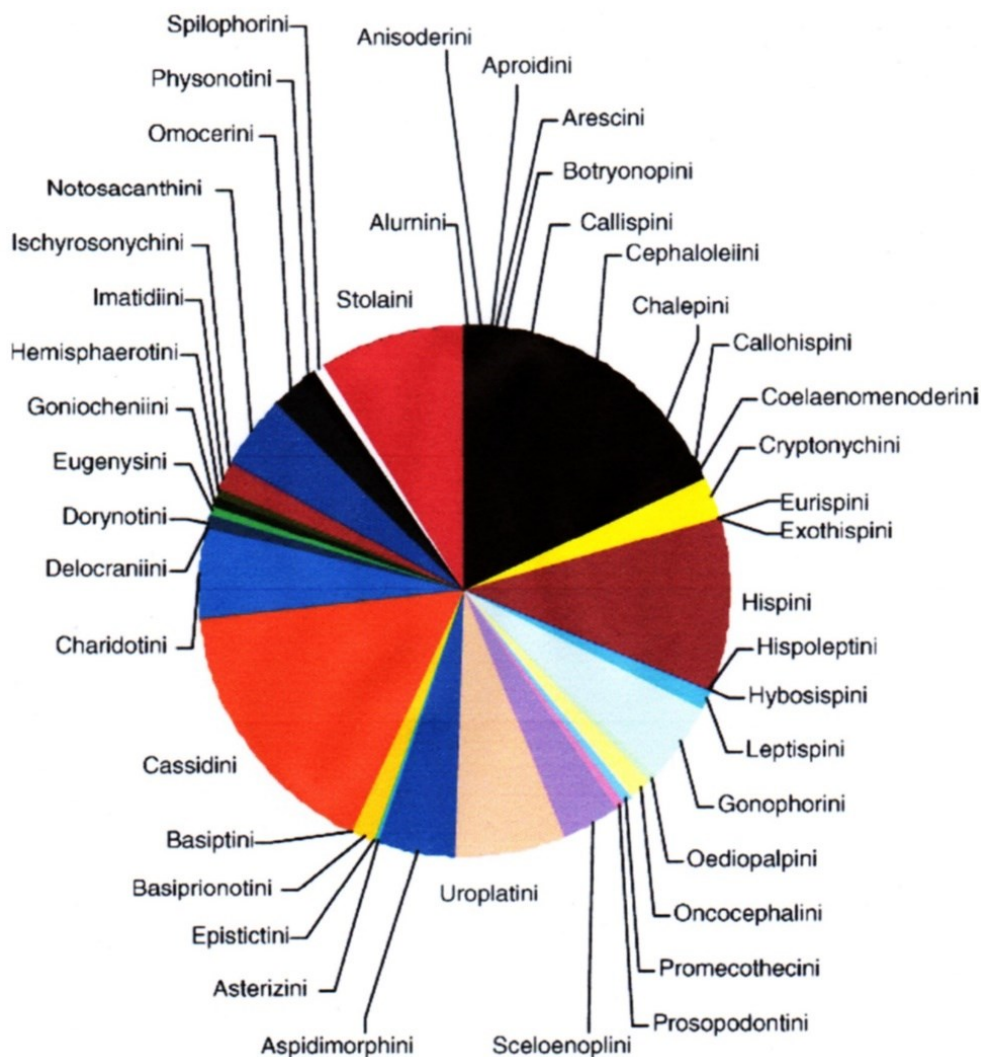


Figura 1 – Tribos da subfamília Cassidinae s.l. (extraído de Chaboo 2007), mostrando a diversidade de espécies.

Os representantes de Cassidinae têm uma distribuição quase que global, embora haja uma maior diversidade nos trópicos, especialmente na América do Sul, e sejam menos frequentes em regiões temperadas da América do Norte e Austrália (Borowiec 2007). Os cassidíneos possuem corpo com formato variável, podendo ser alongado e estreito ou curto e arredondado. Certas espécies apresentam o élitro coberto por espinhos, com coloração metálica,

e são capazes de mudar rapidamente de cor quando perturbadas. O élitro é protuberante, semelhante ao casco de tartaruga, motivo pelo qual esses besouros são denominados “tortoise-beetles” e não são bons voadores. Muitas espécies são importantes pragas de grãos e outras têm sido usadas para controle biológico de ervas daninhas. Os coleópteros representantes da subfamília Cassidinae geralmente vivem em plantas das famílias Boraginaceae, Bignoniaceae, Asteraceae, Convolvulaceae, Solanaceae, além de associarem-se com outras plantas, provavelmente não hospedeiras (Booth et al. 1990).

Do ponto de vista citogenético, os estudos na ordem Coleoptera ainda são escassos, pois somente cerca de 1,5% dos representantes, a maioria pertencente à subordem Polyphaga, foram analisados, principalmente através de técnicas de coloração convencional dos cromossomos (Blackmon & Demuth 2015). A fórmula cariotípica $2n=18+Xy_p$ com cromossomos meta/submetacêntricos foi observada com maior frequência no grupo e proposto por Smith & Virkki (1978) como o cariótipo ancestral para os Polyphaga.

Na subfamília Cassidinae, somente 117 espécies, pertencentes a 13 tribos (Figura 2) foram caracterizadas citogeneticamente. Os Cassidinae são considerados como um grupo portador de um cariótipo conservado, pois aproximadamente 52% das espécies apresentaram $2n=16+Xy_p$, com cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos (De Julio et al. 2010). No entanto, esta homogeneidade cariotípica pode ser aparente e estar relacionada ao pequeno número de espécies examinadas, a predominância de análises em espécies pertencentes a um mesmo gênero e/ou tribo, bem como a escassez ou até mesmo a inexistência de estudos que utilizam marcação de regiões cromossômicas específicas.

Apesar da predominância do $2n=16+Xy_p$, os registros citogenéticos nos Cassidinae mostram que o número diplóide varia entre $2n=16$ a $2n=51$, e os sistemas cromossômicos sexuais podem ser dos tipos Xy_p , $X0$, Xy , Xy_c , Xy_r , $neoXY$, Xyy_p , $X_pneoXneoY_p$, entre outros sistemas sexuais múltiplos (De Julio et al. 2010), em que a variação pode ser mais ou menos frequente de acordo com a tribo analisada.

O sistema cromossômico sexual do tipo Xy_p , exclusivo entre os animais, é também considerado ancestral nos coleópteros, pois ocorre em representantes tanto de famílias basais quanto derivadas (Smith & Virkki 1978; Kukalová-Peck & Lawrence 1993). O X e o y representam os cromossomos sexuais e a letra “p” indica a forma de associação dos cromossomos durante a meiose, a qual foi originalmente comparada a um pára-quedas por Stevens, em 1906. Assim, o cromossomo sexual X representa o pára-quedas e o cromossomo y, conectado ao X por estruturas semelhantes a dois fios tênues, representa a carga (Stevens 1906). Neste sistema, não há a formação de quiasmas, mas acredita-se que o contato dos

cromossomos X e y através do “pára-quedas” seja um vestígio de um pareamento quiasmático (Smith & Virkki 1978). Adicionalmente, a presença de outros sistemas cromossômicos sexuais nos coleópteros tem sido considerada uma característica derivada, que se originou a partir de alterações envolvendo apenas os cromossomos sexuais, como, por exemplo, nos sistemas X0 e Xyy_p, ou a partir de rearranjos entre cromossomos sexuais e autossomos, originando outros sistemas simples, como o neoXY, ou múltiplos, como o X_pneoXneoY_p (Smith & Virkki 1978).

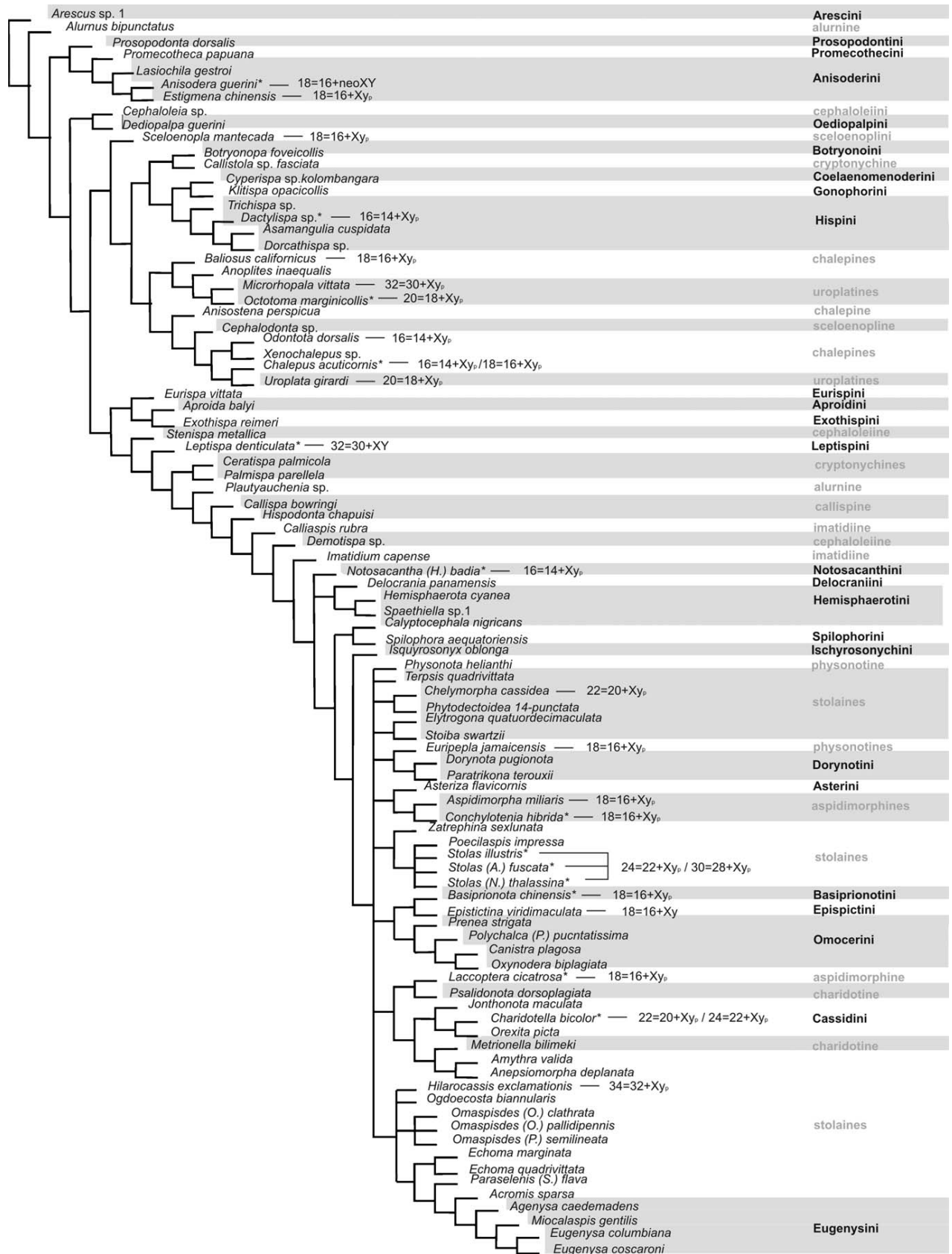


Figura 2 – Relação filogenética da subfamília Cassidinae s.l. (Chaboo 2007) com informações cariotípicas das espécies ou representantes do mesmo gênero (*) caracterizadas citogeneticamente (extraído de De Julio et al. 2010).

Nos cassidíneos, os dados na literatura sobre a distribuição de regiões cromossômicas específicas, como a heterocromatina constitutiva e cístrons ribossomais são inexistentes, e apenas duas espécies tiveram a região organizadora do nucléolo estudada (Yadav & Pillai 1975; Postiglioni et al. 1990). No entanto, é sabido que o emprego de metodologias que identificam regiões cromossômicas específicas fornece informações relevantes para o entendimento sobre a organização e evolução cromossômica que tem ocorrido entre grupos de animais relacionados (Almeida et al. 2000; Rozek et al 2004; Cabral de Mello et al. 2011a).

A heterocromatina constitutiva é formada por muitas sequências de DNA repetitivo em tandem nos cromossomos dos eucariotos, e está frequentemente localizada nas regiões centroméricas e teloméricas (Sumner 1990). O estabelecimento do padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva é realizado, principalmente, através da técnica de bandamento C ou por coloração com fluorocromos base-específicos. Essas metodologias têm permitido uma melhor diferenciação longitudinal dos cromossomos, possibilitando a identificação dos homólogos, como observado nos coleópteros, que possuem cromossomos geralmente pequenos e difíceis de serem identificados por técnicas citogenéticas convencionais, e não respondem aos tratamentos para obtenção de bandas eucromáticas (Juan et al. 1990; Petitpierre 1996). Além disso, o emprego desta metodologia tem sido útil para identificar heteromorfismos cromossômicos e esclarecer os processos envolvidos com a evolução dos cromossomos sexuais (Schneider et al. 2006), considerando que, em diversos organismos, o acúmulo desigual de heterocromatina constitutiva geralmente está associado com a diferenciação dos cromossomos sexuais (Steinemann & Steinemann 1998; Cioffi et al. 2012).

De modo geral, a heterocromatina constitutiva nos coleópteros localiza-se na região centromérica dos autossomos e do cromossomo sexual X, podendo estar presente também nas regiões intersticiais e teloméricas, porém com menor frequência. No cromossomo sexual y, a heterocromatina constitutiva tem ocorrência variável, aparecendo somente na região pericentromérica ou ao longo de todo o comprimento cromossômico, variando de acordo com o grau de diferenciação deste cromossomo na espécie (Almeida et al. 2000; Rozek et al. 2004).

Os elementos de DNA repetitivo representam uma grande porção do genoma eucarioto e compreendem sequências repetidas em tandem (satélites, microssatélites, minissatélites e as famílias multigênicas) e sequências dispersas (transposons e retrotransposons) (Charlesworth et al. 1994; Nielsen 2003). As famílias multigênicas são formadas por um grupo de genes com sequências de DNA e funções semelhantes que se originaram de um gene ancestral comum (Ney & Rooney 2005), e incluem os genes ribossomais, as histonas e os pequenos RNAs nucleares (snRNA) (Charlesworth et al. 1994; Nielsen 2003). Estes genes estão envolvidos em

importantes processos celulares, como formação dos ribossomos, organização da cromatina e expressão gênica (Long & Dawid 1980; Nei & Rooney 2005; Sashital et al. 2007).

Os genes ribossomais (rDNA) 45S e 5S representam duas famílias multigênicas, em que o maior cluster, o rDNA 45S, codifica os genes de RNA (rRNA) 28S, 18S e 5.8S através da RNA polimerase I, enquanto que o menor cluster, o rDNA 5S, é responsável pela transcrição dos genes rRNA 5S por meio da RNA polimerase III. Estruturalmente, o rDNA 45S é composto por uma unidade de transcrição e um espaçador intergênico não-transcrito (NTS). Assim, cada unidade de transcrição é formada pelos genes que codificam o RNA ribossômico (rRNA) 18S, 5.8S e 28S, dois espaçadores transcritos internos, ITS1 e ITS2, e um espaçador transcrito externo (ETS) (Long & Dawid 1980; Pisano & Ghigliotti 2009).

A região organizadora do nucléolo (RON) corresponde aos sítios cromossômicos responsáveis pela formação do nucléolo, que é onde ocorre a transcrição dos genes de rDNA 28S, 18S e 5.8S, e montagem dos ribossomos. No genoma de todos os organismos eucariontes, estas três classes de genes ribossomais estão repetidas em tandem, e podem estar localizadas em um número variável de loci, em apenas um cromossomo ou distribuída sobre diversos elementos (Long & David 1980; Cabrero & Camacho 2008).

A impregnação com o íon prata (Ag-RON) é a metodologia mais utilizada para a localização das RONS, devido, principalmente, ao baixo custo e rápida aplicação. Esta técnica se baseia no fato de proteínas argentofílicas se associarem com as RONS, permitindo a visualização dos sítios ribossomais a partir da impregnação pelo íon prata (Goodpasture & Bloom 1975). No entanto, esta técnica revela apenas os sítios de rDNA que tiveram atividade gênica durante a interfase (Cabrero & Camacho 2008). Por outro lado, técnicas citogenéticas moleculares, como a hibridação *in situ* fluorescente (FISH) tem sido uma ferramenta importante, pois permite o acesso a todos os genes de rDNA independente de sua ativação (Datson & Murray 2006; Nguyen et al. 2008).

As RONS em Coleoptera podem ser encontradas em pares autossômicos e/ou nos cromossomos sexuais (Tabela 1); porém, de acordo com a literatura, o padrão de distribuição mais frequente é a presença de duas RONS autossômicas (Schneider et al. 2007). Em Chrysomelidae, das 23 espécies cujos cromossomos foram submetidos à impregnação pelo íon prata e/ou técnica de FISH com sonda de rDNA, 16 espécies mostraram RONS autossômicas, uma espécie exibiu RON sobre o cromossomo sexual neoX, e três outras revelaram um padrão inespecífico de marcação (ver Tabela 1). Nas duas únicas espécies de Cassidinae *s.l.* que tiveram o padrão de RON estabelecido, verificou-se que em *Chelymophra variabilis*, com $2n=20+X_{yp}$, essa região encontra-se no braço curto do quinto par autossômico, portador de

constrição secundária, e em *Botanochara angulata*, com $2n=51=48+X_p\text{neo}X\text{neo}Y_p$, a RON está presente em alguns cromossomos autossômicos, os quais não foram determinados (Postiglioni et al. 1990; Yadav & Pillai 1975).

A identificação das RONs ou sítios ribossomais é de grande importância para comparações cariotípicas de espécies relacionadas, em estudos taxonômicos e evolutivos, no estabelecimento da arquitetura molecular dos cromossomos, e para a elucidação do modo de associação de alguns cromossomos sexuais durante a meiose, especialmente daqueles pertencentes ao sistema de determinação sexual do tipo Xy_p , cuja associação frequentemente está relacionada à presença de material nucleolar (Petitpierre 1996; Schneider et al. 2007)

Vários eventos têm sido propostos como responsáveis pela variação no número e localização das RONs que ocorrem de forma intra ou interespecífica, como alteração cromossômica estrutural, recombinação ectópica entre regiões cromossômicas terminais e transposição do rDNA (Cabrero & Camacho 2008). No entanto, somente com análises citogenéticas comparativas entre espécies relacionadas é possível inferir sobre os mecanismos que ocorrem de forma predominante em certo grupo de espécies.

O rDNA 5S é constituído por múltiplas sequências nucleotídicas, separadas por espaçadores intergênicos não-transcritos (ITS) e repetidas em tandem, formando clusters que se encontram localizados em um ou mais cromossomos (Long & David 1980; Martins & Wasko 2004). Ao contrário do rDNA 45S, o rRNA 5S encontra-se localizado fora do nucléolo e liga-se às proteínas ribossomais antes de incorporar-se ao ribossomo (Martins & Wasko 2004). O rRNA 5S é altamente conservado mesmo em espécies não relacionadas, e assim como os genes de rDNA 45S, o estudo do seu padrão de distribuição pode contribuir para a compreensão da estrutura, organização e evolução genômica.

A localização e o número de sítios do rDNA 5S vem sendo examinada em alguns grupos de animais, como mamíferos, peixes e insetos (Benes & Cave 1985; Martins & Wasko 2004; Cabral-de-Mello et al. 2011b, 2011c; Goll et al. 2015). Nos coleópteros, 37 espécies incluídas na família Scarabaeidae e uma espécie da família Tenebrionidae foram analisadas com relação a distribuição do gene 5S. Em Scarabaeinae, cerca de 78% das espécies apresentaram dois sítios de rDNA 5S localizados, principalmente, em um par de cromossomos autossômicos. Além disso, em *Eurysternus caribaeus* os sítios estavam localizados no cromossomo X, em *Coprophanaeus ensifer* nos cromossomos sexuais X e Y, e em *Diabroctis mimas* ocorreram cinco sítios de rRNA 5S em dois pares autossômicos e um sítio no cromossomo X. No tenebrionídeo *Lagria villosa* foram observados dois sítios do rDNA 5S no braço curto do quarto

par cromossômico, o qual está co-localizado com o rDNA 18S (Cabral-de-Mello et al. 2011b, 2011c; Oliveira et al. 2012; Arcanjo et al. 2013; Goll et al. 2015).

Marcadores moleculares associados a técnicas FISH vem sendo utilizados na identificação de outros sítios cromossômicos, como os pequenos RNA nucleolares (snRNA) e as sequências teloméricas, que assim como os genes ribossomais, podem exibir informações relevantes sobre os processos de evolução cromossômica dos organismos. Nos eucariotos, a garantia de sucesso da expressão gênica depende da remoção dos íntrons do RNA mensageiro (mRNA), num processo chamado de *splicing* do RNA. O *splicing* é executado por uma macromolécula chamada de spliceossomo, que possui atividade catalítica, e consiste em um complexo de mais de 200 proteínas e de uma família multigênica de RNA não-codificadores, os snRNA, que são formados por cinco unidades, U1, U2, U4, U5 e U6 (Sashital et al. 2007).

Os componentes do spliceossomo, incluindo o snRNA, são altamente conservados nos eucariotos (Mount & Slaz 2000; Barbosa-Morais et al. 2006), e já foram mapeados nos cromossomos de alguns organismos, como humanos (Lund et al. 1983) camundongos (Lund & Nesbitt 1988) e peixes (Manchado et al. 2006; Cabral-de-Mello et al. 2012). Nos insetos, apenas sete espécies de gafanhotos (Bueno et al. 2013; Palácios-Gimenez et al. 2013) e uma espécie de lepidóptera (Serra-Montes et al. 2005) foram analisadas. Os genes snRNA podem apresentar-se como múltiplas cópias dispersas no genoma, como observado em humanos e camundongos (Manser & Gesteland 1982; Marzluff et al. 1983), podem estar organizados em tandem, como encontrado em peixes (Marz et al. 2008), bem como co-localizado com outras famílias multigênicas (rDNA 5S) (Ebel et al. 1999; Machado et al. 2006) ou alocado no cromossomo sexual ou supernumerário em artrópodos (Bueno et al. 2013; Palácios-Gimenez et al. 2013).

Dentre a família do snRNA, o U2 tem função muito importante no *splicing* do mRNA, identificando o ponto de ramificação da adenosina, e interagindo com o snRNA U6 para a formação do sítio de ativação do spliceossomo (Valadkhan & Manley 2001, 2003). A sequência codificadora do snRNA U2 é uma das maiores sequências da família multigênica snRNA, e embora tenha se mostrado conservada nos eucariotos, difere entre as espécies quanto a localização nos cromossomos e número de repetições (Hernandez et al. 2001; Guthrie & Patterson, 1988). Através da técnica de FISH em peixes, o snRNA U2 foi observado em apenas um par cromossômico, disperso no genoma, ou co-localizado com genes ribossomais (Manchado et al. 2006; Úbeda-Manzaro et al. 2010). Em insetos, somente uma espécie de gafanhoto foi analisada, *Abractis flavolineata*, que exibiu apenas um par cromossômico portando o cluster do gene snRNA U2 (Bueno et al. 2013).

Os telômeros são estruturas formadas por DNA e proteínas, que estão localizados na porção final dos cromossomos, e tem como principais funções prevenir a ligação entre as extremidades cromossômicas e a degradação do DNA durante a replicação (Blackburn 1991). Em muitos organismos, o DNA telomérico é constituído por cópias de sequências simples repetidas em tandem e mantidos ao final da fita de DNA por uma transcriptase reversa, a telomerase (Blackburn 1991; Zakian 1995). Usualmente, qualquer alteração na localização telomérica pode representar a ocorrência de rearranjos cromossômicos.

As sequências teloméricas são bastante conservadas em grandes grupos taxonômicos, como o cluster TTTAGGG em plantas (Zellinger & Riha 2007), o hexâmetro TTAGGG nos vertebrados (Zakian 1995), e a sequência pentamérica TTAGG nos insetos (Okazaki et al. 1993; Sahara et al. 1999). O cluster TTAGG foi descrito pela primeira vez em um representante da ordem Lepidoptera, *Bombyx mori* (Okazaki et al. 1993), e depois observado em outros grupos de insetos, além de espécies de crustáceos, miriápodes e quelicerados (Sahara et al. 1999; Vitková et al. 2005).

Entretanto, a sequência consenso dos insetos e artrópodes TTAGG foi perdida em algumas espécies da ordem Coleoptera, como da família Tenebrionidae, onde houve a substituição para o cluster TCAGG (Mravinac et al. 2011). Além da variação na sequência, diferentes mecanismos de manutenção dos telômeros foram observados entre os insetos, como nos dípteros *Drosophila melanogaster*, no qual os elementos transponíveis HeT-A e TART são adicionados e mantidos na porção terminal do cromossomo através de transposição (Biessmann et al. 1990), e em espécies do gênero *Chironomus*, onde ocorre a recombinação desigual entre as sequências repetitivas localizadas na porção terminal dos cromossomos (Nielsen & Edstrom 1993). Nos coleópteros, algumas hipóteses surgiram sobre os mecanismos de manutenção dos telômeros em espécies TTAGG-negativas, tal como a formação de domínios localizados na região subtelomérica constituídos pelos retrotransposons TRAS1 e SART1, que são ativamente transcritos e não dependentes da telomerase (Pryde et al. 1997; Takahashi & Fujiwara 1999).

Tabela 1 - Espécies de Coleoptera com dados sobre as regiões organizadoras de nucléolo (atualizado de Schneider et al. 2007).

<i>Espécies</i>	<i>Fórmula cromossômica (2n machos)</i>	<i>Número de RONs</i>	<i>Cromossomo portador da RON</i>	<i>Técnica</i>	<i>Referência</i>
ADEPHAGA					
Carabidae					
Carabinae					
Carabini					
<i>Carabus cancellatus</i> Illiger, 1798	28=26+XY	2	1 par autossômico de tamanho grande	Ag RON e FISH	De la Rúa et al. 1996
<i>Carabus coarctatus</i> Brulle, 1838	28=26+XY	2	1 par autossômico de tamanho grande	Ag RON e FISH	De la Rúa et al. 1996
<i>Carabus coarctatus</i> La Ferté-Sénéctère, 1846	28=26+XY	2	1 par autossômico de tamanho grande	Ag RON e FISH	De la Rúa et al. 1996
<i>Carabus granulatus</i> Linnaeus, 1758	27=26+X0	2	1 par autossômico de tamanho grande	Ag RON e FISH	De la Rúa et al. 1996
<i>Carabus lusitanicus</i> Fabricius, 1801	28=26+XY	2	1 par autossômico de tamanho grande	Ag RON e FISH	De la Rúa et al. 1996
<i>Carabus macrocephalus</i> Dejean, 1826	28=26+XY	2	1 par autossômico de tamanho grande	Ag RON e FISH	De la Rúa et al. 1996
<i>Carabus melancholicus</i> Fabricius, 1798	28=26+XY	2	1 par autossômico de tamanho grande	Ag RON e FISH	De la Rúa et al. 1996
<i>Carabus morbillosus</i> Fabricius, 1792	28=26+XY	2	1 par autossômico de tamanho grande	Ag RON e FISH	De la Rúa et al. 1996
<i>Carabus nemoralis</i> Müller, 1764	28=26+XY	2	1 par autossômico de tamanho grande	Ag RON e FISH	De la Rúa et al. 1996
<i>Carabus problematicus</i> Herbst, 1786	28=26+XY	2	1 par autossômico de tamanho grande	Ag RON e FISH	De la Rúa et al. 1996
<i>Carabus rugosus</i> Fabricius, 1775	28=26+XY	2	1 par autossômico de tamanho grande	Ag RON e FISH	De la Rúa et al. 1996
<i>Carabus violaceus</i> Linnaeus, 1758	28=26+XY	2	1 par autossômico de tamanho grande	Ag RON e FISH	De la Rúa et al. 1996
<i>Calosoma maderae</i> (Fabricius, 1775)	28=26+XY	2	1 par autossômico de tamanho grande	Ag RON e FISH	De la Rúa et al. 1996
<i>Calosoma sycophanta</i> (Linnaeus, 1758)	28=26+XY	2	1 par autossômico de tamanho grande	Ag RON e FISH	De la Rúa et al. 1996
Ceroglossini					
<i>Ceroglossus chilensis</i> Eschscholtz, 1829	30=28+XY/41=38+III/ 42=40+XY	2	1 par autossômico de tamanho grande	Ag RON e FISH	De la Rúa et al. 1996; Galián et al. 1996
Cychrini					
<i>Cychrus caraboides</i> (Linnaeus, 1758)	35=34+X0(Bs)	2-4 4	----- 2 pares autossômicos de tamanho médio – região distal	Ag RON FISH	De la Rúa et al. 1996
Cicindelinae					
Cicindelini					
<i>Cephalota (Cassolaia) maura</i> (Linnaeus 1758)	2n=18+XXXXY	3	1 par autossômico e cromossomo X	Ag RON e FISH 18S	Proença et al. 2011
<i>Cephalota (Cephalota) hispanica</i> (Gory 1833)	2n=18+XXY	2	1 par autossômico	Ag RON e FISH - 18S	Proença et al. 2011
<i>Cephalota (Taenidia) circumdata imperialis</i> (Klug 1834)	2n=18+XXXXY	4	1 par autossômico e cromossomos XY	Ag RON e FISH - 18S	Proença et al. 2011
<i>Cephalota (Taenidia) deserticoloides</i> (Codina 1931)	2n=18+XXXXY	4	1 par autossômico e cromossomos XY	Ag RON e FISH - 18S	Proença et al. 2011
<i>Cicindela (Brasiella) argentata</i> Fabricius, 1801	21=18+ X ₁ X ₂ Y	2	2 cromossomos autossômicos de tamanho médio	FISH	Proença et al. 2004
<i>Cicindela (Cosmodela) aurulenta</i> Fabricius, 1801	22=18+ X ₁ X ₂ X ₃ Y	4	1 par autossômico e 2 X	FISH	Proença et al. 2004
<i>Cicindela campestris</i> Linnaeus, 1758	22=18+X ₁ X ₂ X ₃ Y	2	multivalente sexual	Ag RON	Serrano 1981; Serrano e Collares-Pereira 1992; Galián et al. 1995

<i>Cicindela cardinalba</i> Sumlin 1876	$2n\sigma = 20 + X_1X_2X_3Y$	2	2 cromossomos sexuais	Ag RON e FISH 18S/28S	Galián e Hudson 1999
<i>Cicindela deserticoloides</i> Codina, 1931	22=18+XXXXY	2	multivalente sexual	Ag RON	Galián et al. 1995
<i>Cicindela duodecimguttata</i>	$2n=18+X_1X_2X_3Y$	2	1 par autossômico	Ag RON e FISH 18S	Galián et al. 2007
<i>Cicindela formosa generosa</i>	$2n=18+X_1X_2X_3Y$		1 par autossômico	Ag RON e FISH 18S	Galián et al. 2007
<i>Cicindela flexuosa</i> Fabricius, 1787	22=18+ $X_1X_2X_3Y$	2	multivalente sexual	Ag RON	Galián et al. 1995
<i>Cicindela flexuosa</i> Fabricius, 1787	22=18+ $X_1X_2X_3Y$	2	1 par autossômico ou 2 cromossomos sexuais	Ag RON e FISH	Proença e Galián 2003
<i>Cicindela germanica</i> Linnaeus, 1758	16=14+XY	2-4	autossômico	FISH	Galián et al. 2002
<i>Cicindela gillesensis</i> Hudson 0883	$2n\sigma = 22 + X_1X_2X_3Y$	2	2 cromossomos sexuais	Ag RON e FISH 18S/28S	Galián e Hudson, 1999
<i>Cicindela littoralis</i> Fabricius, 1792	22=18+ $X_1X_2X_3Y$	3 ou 2	1 par autossômico e região distal ou 1 par autossômico de tamanho pequeno – região distal	Ag RON e FISH	Proença e Galián 2003
<i>Cicindela littorea</i> Forsk, 1775	22=18+ $X_1X_2X_3Y$ and $2n= 18+XXXXY$	2	multivalente sexual	Ag RON	Serrano et al. 1986; Galián et al. 1995
<i>Cicindela maura</i> Linnaeus, 1758	22=18+XXXXY	2	multivalente sexual	Ag RON	Galián et al. 1995
<i>Cicindela melancholica</i> Fabricius, 1798	22=18+XXXXY	2	multivalente sexual	Ag RON	Galián et al. 1995
<i>Cicindela oregona</i>	$2n=18+X_1X_2X_3Y$	2	região intersticial do X e região distal do Y 1 par autossômico	FISH – 18S Ag RON e FISH 18S	Galián et al.2007
<i>Cicindela (Cylindera) paludosa</i> Dufour, 1820	15=14+X0	2	1 par autossômico	Ag RON e FISH – 18S	Serrano et al. 1986; Galián et al. 1990; Galián et al. 1995
<i>Cicindela suturalis</i> Fabricius, 1798	23=18+ $X_1X_2X_3X_4Y$	2	X_3 e X_4	FISH	Proença et al. 2004
<i>Cicindela pimeriana</i>	$2n=18+X_1X_2X_3Y$	2	1 par autossômico	Ag RON e FISH 18S	Galián et al. 2007
<i>Cicindela repanda</i>	$2n=18+X_1X_2X_3Y$	2	1 par autossômico	Ag RON e FISH 18S	Galián et al. 2007
<i>Cicindela (Rivacindela) cardinalba</i> Sumlin, 1987	$24=20+X_1X_2X_3Y$	2	2 cromossomos sexuais – região distal	Ag RON e FISH	Galián e Hudson 1999
<i>Cicindela (Rivacindela) gillesensis</i> Hudson, 1994	$26=22+ X_1X_2X_3Y$	2	2 cromossomos sexuais – região distal	Ag RON e FISH	Galián e Hudson 1999
<i>Cicindela (Rivacindela) sp. (saetigera</i> Horn, 1893 group)	$26=22+ X_1X_2X_3Y$	2	2 cromossomos sexuais – região distal	Ag RON e FISH	Galián e Hudson 1999
<i>Cicindela sexguttata</i>	$2n=18+X_1X_2X_3Y$	2	1 par autossômico	Ag RON e FISH 18S	Galián et al. 2007
<i>Cicindela splendida</i>	$2n=18+X_1X_2X_3Y$	2	1 par autossômico	Ag RON e FISH 18S	Galián et al. 2007
<i>Cicindela sp. (saetigera group)</i>	$2n\sigma = 22 + X_1X_2X_3Y$	2	2 cromossomos sexuais	Ag RON e FISH 18S/28S	Galián e Hudson, 1999
<i>Cicindelidia aterrima</i>	$2n=18+X_1X_2X_3Y$	2	sexuais – 1 cromossomo X e Y	Ag RON e FISH 18S	Galián et al. 2007
<i>Cicindelidia flohri</i>	$2n=18+X_1X_2X_3Y$	2	1 par autossômico	Ag RON e FISH 18S	Galián et al. 2007
<i>Cicindelidia nebuligera</i>	$2n=18+X_1X_2Y$	2	1 par autossômico	Ag RON e FISH 18S	Galián et al. 2007

<i>Cicindelidia nigrocoerulea</i>	$2n=18+X_1X_2X_3X_4Y$	2	sexuais – 1 cromossomo X e Y	Ag RON e FISH 18S	Galián et al. 2007
<i>Cicindelidia obsoleta</i>	$2n=18+X_1X_2X_3Y$	2	1 par autossômico	Ag RON e FISH 18S	Galián et al. 2007
<i>Cicindelidia ocellata</i>	$2n=18+X_1X_2Y$	3	1 par autossômico e 1 cromossomo X	Ag RON e FISH 18S	Galián et al. 2007
<i>Cicindelidia punctulata</i>	$2n=18+X_1X_2X_3Y$	2	Sexuais – 1 cromossomo X e Y	Ag RON e FISH 18S	Galián et al. 2007
<i>Cicindelidia roseiventris mexicana</i>	$2n=18+X_1X_2X_3Y$	3	1 par autossômico e 1 cromossomo X	Ag RON e FISH 18S	Galián et al. 2007
<i>Cicindelidia rufiventris</i>	$2n=18+X_1X_2X_3Y$	2	1 par autossômico	Ag RON e FISH 18S	Galián et al. 2007
<i>Cicindelidia rugatilis</i>	$2n=18+X_1X_2Y$	3	1 par autossômico e 1 cromossomo X	Ag RON e FISH 18S	Galián et al. 2007
<i>Cicindelidia sedecimpunctata</i>	$2n=18+X_1X_2Y$	2	1 par autossômico	Ag RON e FISH 18S	Galián et al. 2007
<i>Cylindera hemichrysea</i>	$2n=18+X_1X_2X_3Y$	2	1 par autossômico	Ag RON e FISH 18S	Galián et al. 2007
<i>Cylindera lemniscata</i>	$2n=18+X_1X_2X_3X_4Y$	2	sexuais – 1 cromossomo X e Y	Ag RON e FISH 18S	Galián et al. 2007
<i>Cylindera (Cylindera) paludosa (Dufour 1820)</i>	$2n=14+X0$	2	1 par autossômico	Ag RON e FISH 18S	Proença et al. 2011
<i>Cylindera (Eugrapha) trisignata (Dejean 1822)</i>	$2n=18+XXXXY$	3	cromossomos XXY	Ag RON e FISH 18S	Proença et al. 2011
<i>Ellipsoptera marginata</i>	$2n=18+X_1X_2X_3X_4Y$	6	cromossomos sexuais (X e Y)	Ag RON e FISH 18S	Galián et al. 2007
<i>Ellipsoptera marutha</i>	$2n=18+X_1X_2X_3X_4Y$	2	cromossomos sexuais (X e Y)	Ag RON e FISH 18S	Galián et al. 2007
<i>Habroscelimorpha dorsalis</i>	$2n=18+X_1X_2X_3Y$	3	1 par autossômico e 1 cromossomo X	Ag RON e FISH 18S	Galián et al. 2007
<i>Habroscelimorpha fulgores</i>	$2n=18+X_1X_2X_3Y$	3	1 par autossômico e 1 cromossomo X	Ag RON e FISH 18S	Galián et al. 2007
<i>Habroscelimorpha severa</i>	$2n=18+X_1X_2X_3Y$	3	1 par autossômico e 1 cromossomo X	Ag RON e FISH 18S	Galián et al. 2007
<i>Odontocheila confusa</i> Dejean, 1825	$22=20+XY$	2	1 par autossômico de tamanho médio	Ag RON e FISH	Proença et al. 2002a
<i>Odontocheila nodicornis</i> (Dejean, 1825)	$35=34+X0$	2	1 par autossômico de tamanho médio	Ag RON e FISH	Proença et al. 2002a
<i>Pachydela scutellaris</i>	$2n=18+X_1X_2X_3Y$	2	1 par autossômico	Ag RON e FISH - 18S	Galián et al. 2007
<i>Prothymia</i> sp.	$24=20+XXXXY$	2	X e Y	FISH	Galián et al. 2002
<i>Pentacomia</i> sp.	$21=20+X0$	2	autossômico	FISH	Galián et al. 2002
<i>Tribonia tranquebarica</i>	$2n=18+X_1X_2X_3Y$	3	1 par autossômico e 1 cromossomo X	Ag RON e FISH - 18S	Galián et al. 2007
<i>Therates</i> sp.	$23=20+XXY$	2	X e Y	FISH	Galián et al. 2002
Ctenostomini					
<i>Ctenostoma (Procephalus) ornatum ornatum</i>	$2n=14+X_1X_2Y$	2	1 par autossômico menor cromossomo	FISH - 18S	Zacaro et al. 2004

Manticorini					
<i>Mantichora mygaloides</i> Thomson, 1857	38=36+XY	8	autossômico	FISH	Galián et al. 2002
Megacephalini					
<i>Amblycheila baroni</i> Rivers, 1890	44=42+XY	8	autossômico	FISH	Galián et al. 2002
<i>Megacephala brasiliensis</i> Kirby, 1818	12=10+XY	2	1 par autossômico de tamanho médio – região proximal	FISH	Proença et al. 2002b
<i>Megacephala (Phaeoxantha) cruciata</i> Brulle, 1837	31=30+X0	5	3 pares autossômicos de tamanho grande e pequeno – região telomérica	FISH	Proença et al. 2005
<i>Megacephala euphratica</i> Latreille & Dejean, 1822	31=30+X0	1-4	-----	Ag RON	Serrano et al. 1986; Galián et al. 1995
		6	3 pares autossômicos de tamanho médio	FISH	
<i>Megacephala (Tetracha) sobrina</i> Dejean, 1831	29=28+X0	8	6 pares autossômicos - região telomérica	FISH	Proença et al. 2005
<i>Megacephala (Tetracha) rutilans</i> Thompson, 1857	25=24+X0	2-3	2 pares autossômicos de tamanho médio – região proximal	FISH	Proença et al. 2005
<i>Megacephala whelani</i> Sumlin, 1992	26=24+XY	6	3 pares autossômicos de tamanho médio e pequeno – região telomérica	FISH 18S/28S	Galián e Hudson 1999
<i>Omus californicus</i> Eschscholtz, 1829	36=34+XY	6	autossômico	FISH	Galián et al. 2002
<i>Omus dejeani</i> Reiche, 1838	36=34+XY	6	autossômico	FISH	Galián et al. 2002
<i>Oxycheila (Oxycheila) tristis</i> (Fabricius, 1775)	29=24+ X ₁ X ₂ X ₃ X ₄ Y	6	3 pares autossômicos	FISH	Proença et al. 2005
Collyrinae					
<i>Ctenostoma (Procephalus) ornatum ornatum</i> Klug, 1834	17=14+X ₁ X ₂ Y	2	par 7 – região proximal	FISH	Zacaro et al. 2004
<i>Neocollyris</i> sp.	28=24+XXXXY	2	X e Y	FISH	Galián et al. 2002
Harpalinae					
Harpalini					
<i>Acinopus picipes</i> (Olivier, 1795)	37=36+X0	2	1 par autossômico – região distal	FISH	Martínez-Navarro et al. 2004
<i>Carterus fulvipes</i> (Latreille, 1817)	57=56+X0	2	1 par autossômico – região distal	FISH	Serrano 1981; Martínez-Navarro et al. 2004
<i>Cryptophonus tenebrosus</i> (Dejean, 1829)	37	2	1 par autossômico – região distal	FISH	Martínez-Navarro et al. 2004
<i>Dicheirotichus obsoletus</i> (Dejean, 1829)	37	2	1 par autossômico – região distal	FISH	Martínez-Navarro et al. 2004
<i>Ditonus tricuspidatus</i> (Fabricius, 1792)	59	2	1 par autossômico – região distal	FISH	Martínez-Navarro et al. 2004
<i>Dixus capito</i> (Serville, 1821)	69=68+X0	2	1 par autossômico – região distal	FISH	Martínez-Navarro et al. 2004
<i>Dixus clypeatus</i> (Rossi, 1790)	45=44+X0	4	2 pares autossômicos – região distal	FISH	Martínez-Navarro et al. 2004
<i>Dixus sphaerocephalus</i> (Olivier, 1795)	55=54+X0	4	2 bivalentes autossômicos	FISH	Martínez-Navarro et al. 2004
<i>Egadroma marginatum</i> (Dejean, 1829)	39=38+X0	2	1 par autossômico – região distal	FISH	Martínez-Navarro et al. 2004
<i>Egadroma piceus</i> (Guérin-Méneville, 1830)	37=36+X0	4	2 pares autossômicos – região distal	FISH	Martínez-Navarro et al. 2004
<i>Eocartermus amicorum</i> Wrase, 1993	41?=40+X0	2	1 par autossômico – região distal	FISH	Martínez-Navarro et al. 2004
<i>Harpalus affinis</i> (Schränk, 1781)	38	2	1 par autossômico – região distal	FISH	Martínez-Navarro et al. 2004
<i>Harpalus anxius</i> (Duftschmid, 1812)	37=36+X0	2	1 par autossômico – região distal	FISH	Martínez-Navarro et al. 2004
<i>Harpalus contemptus</i> Dejean, 1829	37=36+X0	2	1 par autossômico – região distal	FISH	Martínez-Navarro et al. 2004
<i>Harpalus decipiens</i> Dejean, 1829	37=36+X0	2	1 par autossômico – região distal	FISH	Martínez-Navarro et al. 2004
<i>Harpalus distinguendus</i> (Duftschmid, 1812)	37=36+X0	2 ou 4	1 ou 2 pares autossômicos	FISH	Martínez-Navarro et al. 2004
<i>Harpalus fuscipalpis</i> Sturm, 1818	38	4	4 cromossomos	FISH	Martínez-Navarro et al. 2004
<i>Harpalus honestus</i> (Duftschmid, 1812)	37=36+X0	2	1 par autossômico – região distal	FISH	Martínez-Navarro et al. 2004
<i>Harpalus microthorax salinator</i> Motschulsky, 1849	37=36+X0	2 ou 4	1 ou 2 pares autossômicos	FISH	Martínez-Navarro et al. 2004
<i>Harpalus nevadensis</i> K. Daniel & J. Daniel, 1898	?	2	1 par autossômico – região distal	FISH	Martínez-Navarro et al. 2004

<i>Harpalus rubripes</i> (Duftschmid, 1812)	37=36+X0	2	1 par autossômico – região distal	FISH	Martínez-Navarro et al. 2004
<i>Harpalus rufipalpis</i> Sturm, 1818	30=28+XY	2	1 par autossômico – região distal	FISH	Martínez-Navarro et al. 2004
<i>Harpalus</i> sp.	?	2	1 par autossômico – região distal	FISH	Martínez-Navarro et al. 2004
<i>Harpalus serrripes</i> (Quenzel, 1806)	37=36+X0	2	1 par autossômico – região distal	FISH	Martínez-Navarro et al. 2004
<i>Harpalus wagneri</i> Schauburger, 1926	30=28+XY	2	1 par autossômico – região distal	FISH	Martínez-Navarro et al. 2004
<i>Lecanomerus</i> sp.	37	2	1 par autossômico – região distal	FISH	Martínez-Navarro et al. 2004
<i>Nesarpalus fortunatus</i> (Wollaston, 1863)	37	2	1 par autossômico – região distal	FISH	Martínez-Navarro et al. 2004
<i>Odontocarus cephalotes</i> (Dejean, 1826)	40?	2	1 par autossômico – região distal	FISH	Martínez-Navarro et al. 2004
<i>Ophonus (Hesperophonus) azureus</i> (Fabricius, 1775)	37?	2	1 par autossômico – região distal	FISH	Martínez-Navarro et al. 2004
<i>Ophonus (Hesperophonus) cribricollis</i> (Dejean, 1829)	37?	2	1 par autossômico – região distal	FISH	Martínez-Navarro et al. 2004
<i>Ophonus (Hesperophonus) pumilio</i> (Dejean, 1829)	37=36+X0	2	1 par autossômico – região distal	FISH	Martínez-Navarro et al. 2004
<i>Ophonus (Ophonus) ardosiancus</i> (Lutshnik, 1922)	37=36+X0	2	1 par autossômico – região distal	FISH	Martínez-Navarro et al. 2004
<i>Ophonus (Ophonus) sabulicola hispanicus</i> (Schauburger, 1926)	37	6	6 cromossomos autossômicos	FISH	Martínez-Navarro et al. 2004
<i>Parophonus hespericus</i> Jeanne, 1985	38	2	1 par autossômico – região distal	FISH	Martínez-Navarro et al. 2004
<i>Parophonus hispanus</i> (Rambur, 1838)	37?	2	1 par autossômico – região distal	FISH	Martínez-Navarro et al. 2004
<i>Pseudoophonus griseus</i> (Panzer, 1797)	37	2	1 par autossômico – região distal	FISH	Martínez-Navarro et al. 2004
<i>Pseudoophonus rufipes</i> (DeGeer, 1774)	37=36+X0	2	1 par autossômico – região distal	FISH	Martínez-Navarro et al. 2004
<i>Pseudoophonus (Platus) calceatus</i> (Duftschmid, 1812)	?	2	1 par autossômico – região distal	FISH	Martínez-Navarro et al. 2004
<i>Stenolophus abdominalis</i> Gene, 1836	37=36+X0	2	1 par autossômico – região distal	FISH	Martínez-Navarro et al. 2004
Zabrini					
<i>Zabrus (Zabrus) ignavus</i> Csiki, 1907	47?	4	4 cromossomos	FISH	Sánchez-Gea et al. 2000
<i>Zabrus (Platyzabrus) pecoudi</i> Colas, 1942	49	4	2 pares autossômicos de tamanho médio – região distal	FISH	Sánchez-Gea et al. 2000
<i>Zabrus (Iberoabrus) ambiguus</i> Rambur, 1838	59=58+X0	8 ou 8-10 ou 10-11 ou 9-12	4 pares – todo o braço 8-12 cromossomos	FISH	Galián et al. 1991; Sánchez-Gea et al. 2000
<i>Zabrus (Iberoabrus) angustatus</i> Rambur, 1838	59	2	1 par de tamanho médio	FISH	Sánchez-Gea et al. 2000
<i>Zabrus (Iberoabrus) castroi</i> Martínez & Saez, 1833	59=58+X0(Bs)	6 ou 6-8 ou 12	3-4 pares ou 6 pares	FISH	Sánchez-Gea et al. 2000
<i>Zabrus (Iberoabrus) coiffaiti</i> Jeanne, 1981	59=58+X0	8	2 pares de tamanho grande – todo o braço e 2 pares de tamanho médio – região distal	FISH	Sánchez-Gea et al. 2000
<i>Zabrus (Iberoabrus) curtus arragonensis</i> Heyden, 1883	59=58+X0	4-6 ou 6	2 ou 3 pares autossômicos	FISH	Sánchez-Gea et al. 2000
<i>Zabrus (Iberoabrus) curtus neglectus</i> Schaum, 1864	59=58+X0	2	1 par	FISH	Sánchez-Gea et al. 2000
<i>Zabrus (Iberoabrus) eserensis</i> Bolívar, 1918	-----	6	3 pares	FISH	Sánchez-Gea et al. 2000
<i>Zabrus (Iberoabrus) marginicollis</i> Dejean, 1828	57?	4	2 pares de tamanho médio – todo o braço	FISH	Sánchez-Gea et al. 2000
<i>Zabrus (Iberoabrus) obesus</i> Audinet-Serville, 1821	59?	4	1 par de tamanho grande – região distal e par de tamanho médio – todo o braço	FISH	Sánchez-Gea et al. 2000
<i>Zabrus (Iberoabrus) rotundatus</i> Rambur, 1838	-----	7-8	7-8 cromossomos; 1 cromossomo – região intersticial	FISH	Sánchez-Gea et al. 2000
<i>Zabrus (Iberoabrus) seidlitz gredosanus</i> Jeanne, 1970	57=56+X0	5 ou 5-6 ou 6	-----	FISH	Sánchez-Gea et al. 2000
<i>Zabrus (Iberoabrus) seidlitz laurae</i> Toribio, 1989	-----	5-6 ou 6-7 ou 8	-----	FISH	Sánchez-Gea et al. 2000

<i>Zabrus (Iberoabrus) seidlitzii</i> Schaum, 1864	57=56+X0	5 ou 6	-----	FISH	Sánchez-Gea et al. 2000
<i>Zabrus (Iberoabrus) silphoides</i> Dejean, 1828	59=58+X0	8	4 pares – todo o braço	FISH	Sánchez-Gea et al. 2000
<i>Zabrus (Iberoabrus) theveneti</i> Chevrolat, 1874	59?	2	1 par de tamanho médio	FISH	Sánchez-Gea et al. 2000
<i>Zabrus (Iberoabrus) urbionensis</i> Jeanne, 1970	60?	4	1 par de tamanho grande – região distal e 1 par de tamanho médio – todo o braço	FISH	Sánchez-Gea et al. 2000
<i>Zabrus (Iberoabrus) vasconicus</i> Uhagón, 1904	63=62+X0(Bs)	10 ou 8-12	5 pares / /8-12 cromossomos	FISH	Sánchez-Gea et al.2000
Scaritinae					
<i>Distichus planus</i> (Bonelli, 1813)	39=38+X0	5	2 pares autossômicos e X	FISH	Galián et al. 1999
<i>Scarites (Scallophorites) buparius</i> (Forster, 1771)	39-37=34+X ₁ X ₂ Y(Bs)	4	4 cromossomos autossômicos	FISH	Serrano 1980; Galián et al. 1999
<i>pyracmon</i> Bonelli, 1813)					
<i>Scarites (Scallophorites) hespericus</i> Dejean, 1831	53=52+X0	4	4 cromossomos autossômicos	FISH	Galián et al. 1999
<i>(impressus</i> Fabricius, 1801)					
<i>Scarites (Scallophorites) occidentalis</i> Bedel, 1895	41=38+X ₁ X ₂ Y	4	4 cromossomos autossômicos	FISH	Serrano 1984; Galián et al. 1999
<i>(cyclops</i> Crotch, 1871)					
<i>Scarites (Scarites) eurytus</i> (Fischer, 1825)	45=44+X0	6	3 pares autossômicos de tamanho grande	FISH	Galián et al. 1999
<i>Scarites (Parallelomorphus) laevigatus</i> Fabricius, 1792	61=60+X0	4	4 cromossomos autossômicos	FISH	Galián et al. 1999
<i>Scarites (Parallelomorphus) terricola</i> Bonelli, 1813	57=56+X0	4	2 pares autossômicos de tamanho grande e pequeno – região distal	FISH	Galián et al. 1999
Trechinae					
<i>Bembidion lampros</i> (Herbst, 1784)	23=22+X0	2	1 par autossômico – região distal	Ag RON	Rozek 1998a
<i>Bembidion properans</i> (Stephens, 1828)	23=22+X0	2	1 par autossômico – região distal	Ag RON	Rozek 1998a
<i>Trechus latus</i> Putzeys, 1847	23=22+X0	2	1 par autossômico – região distal	Ag RON	Rozek 1998b
<i>Trechus pilisensis</i> Csiki, 1907	23=22+X0	2	1 par autossômico – região distal	Ag RON	Rozek 1998b
<i>Trechus pulchellus</i> Putzeys, 1846	23=22+X0	2	1 par autossômico – região distal	Ag RON	Rozek 1998b
<i>Trechus quadristriatus</i> (Schrank, 1781)	23=22+X0	2	1 par autossômico – região distal	Ag RON	Rozek 1998b
POLYPHAGA					
HYDROPHILOIDEA					
Hydrophilidae					
Helophorinae					
<i>Helophorus aequalis</i> Thomson, 1868	18=16+XY	2	par 6	Ag RON	Angus 1982
<i>Helophorus grandis</i> Illiger, 1798	18=16+XY	2	par 6	Ag RON	Angus 1983
SCARABAEOIDEA					
Geotrupidae					
Geotrupini					
<i>Thorectes intermedius</i> (Costa, 1827)	22=20+XY	----- 4 and 1 specimen with 1 or 4	coincidente com HC pares 1 e 3 – região distal	Ag RON e FISH	Vitturi et al. 1999
		2		Ag RON	
<i>Anoplotrupes stercorosus</i> (Scriba, 1791)	22=20+XY	----- 2	par 6 autossômico - acrocêntrico XY e coincidente com HC	Ag RON e FISH – 18S	Colomba et al. 2004
		2	2 cromossomos de tamanho médio-grande par 6 autossômico - acrocêntrico	Ag RON	

Lucanidae Lucaninae Lucanini					
<i>Dorcus parallelipedus</i> (Linnaeus, 1758)	18=16+XY	----- 2	coincidente com HC par 2- região distal par 5 autossômico – acrocêntrico	Ag RON e FISH	Colomba et al. 2000a; Dutrillaux et al. 2007a
	18=16+neoXY	2	1 par autossômico – pequeno acrocêntrico		
<i>Dorcus titanus</i> Boisduval 1835	2n=14	2	par 5 autossômico – acrocêntrico	Ag RON	Abe and Kudoh 2005
<i>Lucanus cervus</i> Linnaeus 1758	2n=22	1	cromossomo X	Ag RON	Dutrillaux and Dutrillaux 2012
Passalidae Passalinae Passalini					
<i>Passalus unicornis</i> S. Fargeau, Serville 1825	2n=25/26 25=24+X0	4 2	pares 11 e 12 – acrocêntrico 1 par cromossômico – pequeno acrocêntrico	Ag RON	Dutrillaux et al. 2007a
Lamprimini					
<i>Lamprima adolphinae</i> Gestro 1875	2n=18	2	par 6 autossômico - metacêntrico	Ag RON	Dutrillaux e Dutrillaux 2012
Melyridae					
<i>Astylus antis</i> (Perty, 1830)	18=16+ X _{yp}	2	1 bivalente autossômico	FISH - 18S	Mendes-Neto et al. 2010
Scarabaeidae Cetoniinae Cetoniini					
<i>Cetonia aurata</i> Linnaeus 1758	20=18+ X _{yp}	2	1 par cromossômico – pequeno acrocêntrico	Ag RON	Dutrillaux et al. 2007a
<i>Cetonia aurataeformis</i> Curti 1913	2n=20	2	par 6 autossômico - acrocêntrico	Ag RON	Dutrillaux et al. 2008
<i>Oxythyrea funesta</i> Poda 1761	2n=20	2	par 8 autossômico - submetacêntrico	Ag RON	Virkki 1951; Dutrillaux et al. 2008
<i>Protaetia aeruginosa</i> Linnaeus 1767	2n=20	2	par 6 autossômico - submetacêntrico	Ag RON	Dutrillaux et al. 2008
<i>Protaetia angustata</i> Germar 1817	2n=20	2	par 6 autossômico - submetacêntrico	Ag RON	Dutrillaux e Dutrillaux 2012
<i>Protaetia aurichalcea</i> Fabricius 1779	2n=20	2	par 6 autossômico - submetacêntrico	Ag RON	Dutrillaux e Dutrillaux 2012
<i>Protaetia cuprea metallica</i> Herbst 1782	2n=20	2	par 6 autossômico - submetacêntrico	Ag RON	Virkki 1954a; Dutrillaux et al. 2008
<i>Protaetia cuprea obscura</i> Andersch 1797	2n=20	2	par 6 autossômico - submetacêntrico	Ag RON	Dutrillaux et al. 2008
<i>Protaetia fieberi</i> Kraatz 1880	2n=20	2	par 6 autossômico - submetacêntrico	Ag RON	Dutrillaux et al. 2008
<i>Protaetia lugubris</i> Herbst 1786	2n=20	2	par 6 autossômico - submetacêntrico	Ag RON	Dutrillaux et al. 2008
<i>Protaetia mirifica</i> Mulsant 1842	2n=20	2	par 6 autossômico - submetacêntrico	Ag RON	Dutrillaux et al. 2008
<i>Protaetia morio</i> Fabricius 1782	2n=20	2	par 6 autossômico - submetacêntrico	Ag RON	Virkki 1954a; Dutrillaux et al. 2008
<i>Protaetia opaca</i> Fabricius 1787	2n=20	2	par 6 autossômico - submetacêntrico	Ag RON	Dutrillaux et al. 2008
<i>Protaetia speciosa</i> Adams 1817	2n=20	2	par 6 autossômico - submetacêntrico	Ag RON	Dutrillaux et al. 2008
<i>Protaecia (Potosia) opaca</i> Fabricius 1787	20=18+ X _{yp}	2	par 6 autossômico – intersticial em um submetacêntrico	Ag RON	Dutrillaux et al. 2007a
<i>Tropinota hirta</i> Poda 1761	2n=20	2	par 9 autossômico - acrocêntrico	Ag RON	Virkki 1951

Goliathini					
<i>Amaurodes passerini</i> Westwood 1844	2n=20	1	cromossomo X	Ag RON	Dutrillaux e Dutrillaux 2012
<i>Chlorocala africana</i> Drury 1773	2n=14	5	pares 5 e 6 e cromossomo X - acrocêntrico	Ag RON	Dutrillaux e Dutrillaux 2012
<i>Cyprolais hornimani</i> Bates 1877	2n=20	1	cromossomo X	Ag RON	Dutrillaux e Dutrillaux 2012
<i>Dichranocephalus wallichii</i> Hope 1831	2n=20	2	par 8 autossômico - acrocêntrico	Ag RON	Dutrillaux e Dutrillaux 2012
<i>Dicronorhina micans</i> Drury 1773	2n=20	2	par 8 autossômico - acrocêntrico	Ag RON	Dutrillaux e Dutrillaux 2012
<i>Dicronorhina derbyana</i> Westwood 1844	2n=20	2	par 7 autossômico - submetacêntrico	Ag RON	Dutrillaux e Dutrillaux 2012
<i>Dicronorhina derbyana oberthuri</i> Deyrolle 1876	2n=20	2	par 7 autossômico - submetacêntrico	Ag RON	Dutrillaux e Dutrillaux 2012
<i>Eudicella aethiopica</i> Müller 1941	2n=20	1	cromossomo X	Ag RON	Dutrillaux e Dutrillaux 2012
<i>Eudicella gralli</i> Buquet 1836	2n=20	1	cromossomo X	Ag RON	Dutrillaux e Dutrillaux 2012
<i>Eudicella smithi</i> MacLeay 1838	2n=20	1	cromossomo X	Ag RON	Dutrillaux e Dutrillaux 2012
<i>Goliathus goliathus</i> Drury 1770	2n=20	2	par 7 autossômico - acrocêntrico	Ag RON	Dutrillaux e Dutrillaux 2012
<i>Jumnos ruckeri</i> (Saunders)	14=12+XY	2	cromossomos X e Y	Ag RON	Macaisne et al. 2006
<i>Mecynorrhina torquata</i> Drury 1782	2n=20	2	par 6 autossômico - submetacêntrico	Ag RON	Dutrillaux e Dutrillaux 2012
<i>Mecynorrhina polyphemus confluens</i> Kraatz 1870	2n=20	2	par 3 autossômico - submetacêntrico	Ag RON	Dutrillaux e Dutrillaux 2012
<i>Megalorrhina harrisi</i> Westwood 1847	2n=20	1	cromossomo X	Ag RON	Dutrillaux e Dutrillaux 2012
<i>Plaesiorrhinella watkinsiana</i> Lewis 1879	2n=20	2	pair 6 autosomal - acrocentric	Ag RON	Dutrillaux e Dutrillaux 2012
<i>Rhamphorrhina bertolonii</i> Lucas 1879	2n=20	1	cromossomo X	Ag RON	Dutrillaux e Dutrillaux 2012
<i>Stephanorrhina guttata</i> Olivier 1789	2n=20	1	cromossomo X	Ag RON	Dutrillaux e Dutrillaux 2012
<i>Stephanorrhina princeps</i> Allard 1984	2n=20	1	cromossomo X	Ag RON	Dutrillaux e Dutrillaux 2012
Gymnetini					
<i>Gymnetis pantherina</i> Burmeister 1842	2n=20	2	par 7 autossômico - acrocêntrico	Ag RON	Dutrillaux e Dutrillaux 2012
Trichiini					
<i>Gnorimus nobilis</i> Linnaeus 1758	2n=20	2	par 6 autossômico - submetacêntrico	Ag RON	Dutrillaux e Dutrillaux 2012
<i>Osmoderma eremita</i> Scopoli 1763	2n=18+B	2	par 3 autossômico - acrocêntrico	Ag RON	Dutrillaux e Dutrillaux 2012
<i>Osmoderma lassallei</i> Baraud & Tauzin 1991	2n=18	2	par 3 autossômico - acrocêntrico	Ag RON	Dutrillaux e Dutrillaux 2012
<i>Osmoderma scabra</i> P. de Beauvois 1805	2n=18+B	1	cromossomo neoX	Ag RON	Dutrillaux e Dutrillaux 2009a
<i>Trichiotinus assimilis</i> Kirby 1837	2n=20	1	cromossomo X	Ag RON	Smith 1953
<i>Trichius fasciatus</i> Linnaeus 1758	2n=20	1	cromossomo X	Ag RON	Dutrillaux e Dutrillaux 2012
<i>Trichius rosaceus zonatus</i> Germar 1829	2n=20	1	cromossomo X	Ag RON	Virkki 1954a
<i>Trichius sexualis</i> Bedel 1906	2n=20	1	cromossomo X	Ag RON	Dutrillaux e Dutrillaux 2012
Dynastinae					
Cyclocephalini					
<i>Cyclocephala insulicola</i> Arrow 1937	2n=20	1	cromossomo X	Ag RON	Dutrillaux et al. 2007b
<i>Cyclocephala mafaffa</i> Burmeister 1847	2n=20	1	cromossomo X	Ag RON	Dutrillaux et al. 2007b
<i>Cyclocephala melanocephala rubiginosa</i> Burmeister 1847	2n=20	1	cromossomo X	Ag RON	Dutrillaux e Dutrillaux 2012
<i>Cyclocephala tridentata</i> Fabricius 1801	2n=20	1	cromossomo X	Ag RON	Dutrillaux et al. 2007b
<i>Cyclocephala tridentata dominicensis</i> Cartwright & Chalumeau 1977	2n=20	1	cromossomo X	Ag RON	Dutrillaux and Dutrillaux 2012
Dynastini					
<i>Augosoma centaurus</i> Fabricius, 1775	18=16+neoXY	2	1 par autossômico - pequeno	Ag RON	Dutrillaux et al. 2013
<i>Chalcosoma atlas</i> Linnaeus 1758	2n=20	2	Par 3 autossômico	Ag RON	Dutrillaux e Dutrillaux 2012
<i>Dynastes hercules</i> Linnaeus 1758	2n=18	1	cromossomo neoX	Ag RON	Dutrillaux et al. 2007c

<i>Dynastes tityus</i> Linnaeus 1758	2n=18	1	cromossomo neoX	Ag RON	Dutrillaux e Dutrillaux 2012
<i>Megasoma actaeon</i> Linnaeus 1758	2n=20	1	cromossomo X	Ag RON	Dutrillaux et al. 2007b
<i>Xylotrupes gideon</i> G-Ménéville 1830	2n=20	1	cromossomo X - submetacêntrico	Ag RON	Dutrillaux e Dutrillaux 2012
Pentodontini					
<i>Ligyris cuniculus</i> Fabricius 1801	2n=20	1	cromossomo X	Ag RON	Dutrillaux et al. 2007b
<i>Ligyris ebenus</i> De Geer, 1774	20=18+X _{yp}	2	par 9 autossômico - metacêntrico	Ag RON	Bione et al. 2005b
<i>Pentodon bidens punctatum</i> Villers, 1899	19=18+X0	-----	X- região distal e coincidente com HC	Ag RON	Vitturi et al. 2003
		1	X- região distal	FISH – 18S	
<i>Pentodon idiota</i> Herbst 1789	2n=20	1	cromossomo X	Ag RON	Dutrillaux e Dutrillaux 2012
Oryctini					
<i>Oryctes nasicornis</i> Linnaeus 1758	2n=18	2	par 6 autossômico - acrocêntrico	Ag RON	Virkki 1954b; Dutrillaux e Dutrillaux 2009a
<i>Strategus surinamensis hirtus</i> Sternberg, 1910	20=18+X _{yp}	-----	X _{yp}	Ag RON	Bione et al. 2005b
<i>Strategus syphax</i> Fabricius 1775	2n=20	1	cromossomo X	Ag RON	Dutrillaux e Dutrillaux 2012
Phyleurini					
<i>Phileurus didymus</i> Linnaeus 1758	2n=16	1	cromossomo neo X	Ag RON	Dutrillaux e Dutrillaux 2012
<i>Phileurus valgus antillarum</i> Prell 1912	2n=20	1	cromossomo X	Ag RON	Dutrillaux e Dutrillaux 2012
Melolonthinae					
Melolonthini					
<i>Amphimallon majale</i> Razoumowski 1789	2n=20	2	par 6 autossômico - submetacêntrico	Ag RON	Dutrillaux e Dutrillaux 2012
<i>Haplidia transversa</i> Fabricius 1801	2n=20	1	cromossomo X	Ag RON	Dutrillaux e Dutrillaux 2012
<i>Lyogenys fuscus</i> Blanchard, 1850	20=18+X _{yp}	-----	X _{yp} e coincidente com HC	Ag RON e FISH	Moura et al. 2003
		1	X		
<i>Melolontha melolontha</i> Linnaeus 1758	2n=20	2	par 6 autossômico - submetacêntrico	Ag RON	Giannoulis et al. 2011
<i>Melolontha pectoralis</i> Megerle 1812	2n=20	2	par 6 autossômico - submetacêntrico	Ag RON	Giannoulis et al. 2011
<i>Phyllophaga pleei</i> Blanchard 1850	2n=20	1	cromossomo X	Ag RON	Dutrillaux e Dutrillaux 2012
<i>Phyllophaga sandersoniella</i> Chalumeau & Gruner 1976	2n=20	2	par 6 autossômico - submetacêntrico	Ag RON	Dutrillaux e Dutrillaux 2012
<i>Phyllophaga (Phyllophaga) aff capillata</i> Blanchard, 1850	20=18+XY _p	-----	1 bivalente autossômico e coincidente com HC	Ag RON FISH	Moura et al. 2003
		2	1 bivalente autossômico de tamanho pequeno		
<i>Phyllophaga (Phytalus) vestita</i> Moser, 1918	20=18+X _{yp}	-----	X _{yp} coincidente com HC	Ag RON e FISH	Moura et al. 2003
		1	X		
Hopliini					
<i>Hoplia uniformis</i> Reitter 1885	2n=20	1	cromossomo X	Ag RON	Dutrillaux e Dutrillaux 2012
Euchirini					
<i>Propomacrus bimucronatus</i> Pallas 1781	2n=20	2	par 9 autossômico - submetacêntrico	Ag RON	Dutrillaux e Dutrillaux 2012
Rutelinae					
<i>Pelidnota pallidipennis</i> Bates, 1904	20=18+X _{yp}	-----	X _{yp}	Ag RON FISH	Bione et al. 2005b
		1	X		

Anomalini					
<i>Anomala dubia</i> Scopoli 1763	2n=20	1	cromossomo X	Ag RON	Dutrillaux e Dutrillaux 2012
<i>Anomala luciae</i> Blanchard 1850	2n=20	1	cromossomo X	Ag RON	Dutrillaux e Dutrillaux 2012
<i>Exomala hirtella</i> Brullé 1832	2n=20	1	cromossomo X	Ag RON	Dutrillaux e Dutrillaux 2012
Leucothyreini					
<i>Leucothyreus guadulpiensis</i> Burmeister 1844	2n=20	2	par 1 autossômico - metacêntrico	Ag RON	Dutrillaux e Dutrillaux 2012
<i>Leucothyreus nolleti</i> Paulian 1947	2n=20	2	par 1 autossômico - metacêntrico	Ag RON	Dutrillaux e Dutrillaux 2012
Rutelini					
<i>Macraspis festiva</i> Burmeister, 1844	18=16+Xy _p	----- 1	Xy _p X	Ag RON e FISH	Bione et al. 2005b
<i>Macraspis tristis</i> Castelnau 1850	2n=18	4	pares 5 e 7 autossômico - submetacêntrico cromossomo X	Ag RON	Dutrillaux e Dutrillaux 2009b
<i>Rutela striata</i> Olivier 1789	2n=20	1		Ag RON	Dutrillaux e Dutrillaux 2012
<i>Geniates borelli</i> Camerano, 1894	20=18+Xy _p	----- 1	Xy _p X	Ag RON e FISH	Bione et al. 2005b
Scarabaeinae					
<i>Glyphoderus sterquilinus</i> (Westwood, 1837)	18=16+XY	-----	coincidente com HC	Ag RON	Colomba et al. 1996
<i>Gymnopleurus sturmi</i> MacLeay, 1821	20=18+XY	----- 4 ou 5	coincidente com HC 4 ou 5 cromossomos de tamanho médio	Ag RON e FISH	Colomba et al. 2000b
Ateuchini					
<i>Atheuchus</i> sp.	16=14+Xy	4	2 pares autossômicos – região pericêntrica	FISH - 45S	Cabral de Mello et al. 2011b
Cantonini					
<i>Canthon staigi</i>	18=16+Xy _p	2	1 par autossômico – região pericêntrica	FISH - 45S	Cabral de Mello et al 2011b
<i>Deltochilum (Deltohyboma) calcaratum</i> (Laporte, 1840)	14=12+neoXY	6 9	coincidente com HC em 4 pares autossômicos; pares 1 e 2 e cromossomo X- região terminal pares autossômicos, 2 X e Y – região pericêntrica e cromossomos difásicos	Ag RON e FISH – 45S	Cabral de Mello et al. 2010; Cabral de Mello et al. 2011b
<i>Deltochilum elevatum</i>	20=18+Xy _p	2	1 par autossômico	FISH – 45S	Cabral de Mello et al. 2011b
<i>Deltochilum (Deltohyboma) aff morbillosum</i> Burmeister, 1848	14=12+neoXY	6	coincidente com HC em 4 pares autossômicos pares 1, 2 e cromossomo X na região terminal	Ag RON e FISH – 45S	Cabral de Mello et al. 2010
<i>Deltochilum verruciferum</i>	20=18+Xy _p	5	pares autossômicos e cromossomo y – região pericêntrica e cromossomos difásicos	FISH – 45S	Cabral de Mello et al. 2011b
Coprini					
<i>Dichotomius affinis</i>	18=16+Xy _p	2	1 par autossômico	FISH - 45S	Cabral de Mello et al. 2011c

<i>Dichotomius bos</i>	18=16+Xy _p	2	1 par autossômico – região pericentromérica	FISH - 45S	Cabral de Mello et al. 2011c
<i>Dichotomius crinicollis</i>	18=16+Xy _p	3	1 par autossômico e cromossomo X – região pericentromérica	FISH - 45S	Cabral de Mello et al. 2011c
<i>Dichotomius depresicollis</i>	18=16+Xy _p	2	1 par autossômico – região pericentromérica	FISH - 45S	Cabral de Mello et al. 2011c
<i>Dichotomius geminatus</i>	18=16+Xy _p 20=18+ Xy _p	4	1 par autossômico – região pericentromérica e terminal	FISH - 45S	Cabral de Mello et al. 2010; Cabral de Mello et al. 2011c
<i>Dichotomius laevicollis</i>	18=16+Xy _p	4 2	Pares 3 e 4 – braço pequeno 1 par autossômico – região pericentromérica	FISH - 18S FISH - 45S	Cabral de Mello et al. 2011c
<i>Dichotomius mórmon</i>	18=16+Xy _p	6	2 pares autossômicos e 2 cromossomos X	FISH - 45S	Cabral de Mello et al. 2011c
<i>Dichotomius aff mundus</i>	18=16+Xy _p	2	1 par autossômico	FISH - 45S	Cabral de Mello et al. 2011c
<i>Dichotomius nesus</i>	18=16+Xy _p	2	cromossomo X e y – região pericentromérica	FISH - 45S	Silva et al. 2009; Cabral de Mello et al. 2011c
<i>Dichotomius semianeus</i>	18=16+Xy _p	1	cromossomo X	FISH - 45S	Cabral de Mello et al. 2011c
<i>Dichotomius semisquamosus</i>	18=16+Xy _p	3	1 par autossômico e cromossomo X – região pericentromérica	FISH - 45S	Silva et al. 2009; Cabral de Mello et al. 2011c
<i>Dichotomius sericeus</i>	18=16+Xy _p	2	1 par autossômico – região pericentromérica	FISH - 45S	Silva et al. 2009; Cabral de Mello et al. 2011c
<i>Dichotomius aff sericeus</i>	18=16+Xy _p	2	1 par autossômico	FISH - 45S	Cabral de Mello et al. 2011c
<i>Dichotomius sp.</i>	18=16+Xy _p	2	1 par autossômico	FISH - 45S	Cabral de Mello et al. 2011c
<i>Ontherus appendiculatus</i>	20=18+Xy _p	2	1 par autossômico – região pericentromérica e terminal	FISH - 45S	Cabral de Mello et al. 2011b
<i>Ontherus sulcator</i>	20=18+Xy _p	8	4 pares autossômicos	FISH - 45S	Cabral de Mello et al. 2011b
Gymnopleurini					
<i>Gymnopleurus sturmi</i>	2n =18+Xy	5	2 autossômicos + 1 cromossomo – regiões pericentromérica e subterminal	FISH - 45S	Colomba et al. 2000
Oniticellini					
<i>Eurysternus caribaeus</i>	8=6+neoXY	2	cromossomo X eY – região pericentromérica	FISH - 45S	Arcanjo et al. 2009; Cabral de Mello et al. 2011b
Onitini					
<i>Bubas bison</i> (Linnaeus, 1767)	20=18+XY	8	coincidente com HC e 8 cromossomo	Ag RON FISH - 45S	Colomba et al. 1996, 2006
Onthophagini					
<i>Digitonthophagus gazella</i>	20=18+Xy _p /Xy/Xy _r	2	1 par autossômico – região pericentromérica	FISH - 45S	Cabral de Mello et al. 2011b
Phanaenini					
<i>Coprophanæus (Coprophanæus) acrisius</i> (MacLeay, 1819)	20=18+XY	6	3 pares autossômicos - terminal	FISH - 18S	Oliveira et al. 2012b
<i>Coprophanæus (Coprophanæus) cyanescens</i> (Olivier, 1789)	20=18+Xy _p	6 9	2 pares autossômicos e cromossomo X – cromossomos difásicos 4 pares autossômicos + 1 cromossomo	FISH - 45S FISH - 18S	Oliveira et al. 2010; Cabral de Mello et al. 2011b Oliveira et al. 2012a

<i>Coprophanaeus (Coprophanaeus) dardanus</i> (Mac-Leay, 1819)	20=18+Xy	4	2 pares autossômicos - pericentromérico	FISH - 18S	Oliveira et al. 2012b
<i>Coprophanaeus (Megaphanaeus) bellicosus</i> (Olivier, 1789)	20=18+Xy	16	8 pares autossômicos - pericentromérico	FISH - 18S	Oliveira et al. 2012b
<i>Coprophanaeus (Megaphanaeus) ensifer</i> (Germar, 1824)	20=18+XY	16	região pericentromérica de todos os cromossomos 7 bivalentes autossômicos e cromossomo X	Ag RON and FISH - 45S	Oliveira et al. 2010; Cabral de Mello et al. 2011b
<i>Coprophanaeus (Metallophanaeus) pertyi</i> (Olsoufieff, 1924)	20=18+ Xy _p	2	1 par autossômico - terminal	FISH - 18S	Oliveira et al. 2012b
<i>Coprophanaeus (Metallophanaeus) horus</i> (Waterhouse, 1891)	20=18+ Xy _p	2	par autossômico - terminal / cromossomo X - pericentromérico	FISH - 18S	Oliveira et al. 2012b
<i>Diabroctis mimas</i> (Linnaeus, 1767)	20=18+Xy _p	8	6 pares autossômicos e 2 cromossomos X s – região pericentromérica e cromossomos difásicos	Ag RON FISH - 45S	Bione et al. 2005a; Cabral de Mello et al. 2011b
<i>Isocoprins inhiata</i> (Germar, 1824)	18=16+Xy _p	----- 2	Xy _p e coincidente com HC 1 par autossômico de tamanho médio	Ag RON FISH - 45S	Bione et al. 2005a
<i>Phanaeus (Notiophanaeus) chalconelas</i>	12=10+neoXY	2	1 par autossômico	Ag RON and FISH - 18S	Arcanjo et al. 2013
<i>Phanaeus splendidulus</i>	20=18+Xy _p	7 10	3 pares autossômicos + 1 cromossomo 5 pares autossômicos	FISH - 45S Ag RON and FISH - 18S	Cabral de Mello et al. 2011b; Arcanjo et al. 2013
BUPRESTOIDEA					
Buprestidae					
Buprestinae					
Chrysobothrini					
<i>Sphaerobothris aghababiani</i>	16=14+ Xy _p		alguns bivalentes autossômicos – telomérico e perto do telômero e no sexual	Ag RON	Karagyan 2001
Polycestinae					
<i>Acmaeoderella boryi</i> (Brulle, 1832)	18=16+Xy _r	-----	alguns bivalentes e y	Ag RON	Karagyan 2001
<i>Acmaeoderella flavofasciata</i> (Piller & Mitterpacher, 1783)	18=16+Xy _r	1	Y	Ag RON	Karagyan 2001
<i>Acmaeoderella gibbulosa</i> (Menetries, 1832)	18=16+Xy _r	-----	Xy _r	Ag RON	Karagyan 2001
<i>Acmaeoderella vetusta</i> (Menetries, 1832)	18=16+Xy _r	1	Y	Ag RON	Karagyan 2001
Acmaeoderini					
<i>Acmaeodera pilosellae pérsica</i>	20♂=18+neoXY	2	1 bivalente autossômico	Ag RON	Karagyan et al. 2012
Chrysochroinae					
<i>Euchroma gigantea</i> L. 1735	36 = 30+ X ₁ X ₂ X ₃ Y ₁ Y ₂ Y ₃ ; 34 = 28+X ₁ X ₂ X ₃ Y ₁ Y ₂ Y ₃ ; 32 = 26+X ₁ X ₂ X ₃ Y ₁ Y ₂ Y ₃ ; 2n = 33	2	cromossomos X ₁ e X ₂	FISH - 45S	Moura et al. 2008

Dicercini					
<i>Dicerca aenea validiuscula</i>	20=18+X _{Yp}	2	1 bivalente autossômico – coincidente com CMA3	Ag RON	Karagyan et al. 2012
Sphenopterini					
<i>Sphenoptera mesopotamica</i> Marseul, 1865	24=22+X _{Yp}	2	1 bivalente de tamanho grande	Ag RON	Karagyan 2001
<i>Sphenoptera scovitzii</i> Faldermann, 1835	46?	4 ou 6	2 ou 3 bivalentes de tamanho grande	Ag RON	Karagyan 2001;
		6	3 bivalentes - coincidente com CMA3		Karagyan et al. 2012
<i>Stigmodera (Stigmodera) goryi</i> Hope, 1836	22=20+X _{Yp}	2	pares 7 ou 8- região distal	provavelmente Ag RON	Gardner 1988
<i>Stigmodera (Stigmodera) porosa</i> Carter, 1916	22=20+X _{Yp}	2	pares 7 ou 8- região distal	provavelmente Ag RON	Gardner 1988
<i>Stigmodera (Themognatha) alternata</i> Lumholtz, 1889	20=18+X _{Yp}	2	par 8- região distal	provavelmente Ag RON	Gardner 1988
<i>Stigmodera (Themognatha) donovani</i> Castelnau & Gory, 1838	22=20+X _{Yp}	2	pares 6, 7 e 8- região distal	provavelmente Ag RON	Gardner 1988
<i>Stigmodera (Themognatha) nickerli</i> Obenberger, 1922	20=18+X _{Yp}	2	par 8- região distal	provavelmente Ag RON	Gardner 1988
<i>Stigmodera (Themognatha) tricolorata</i> Waterhouse, 1874	22=20+X _{Yp}	2	pares 7 ou 8- região distal	provavelmente Ag RON	Gardner 1988
<i>Stigmodera (Themognatha) variabilis</i> (Donovan, 1805)	22=20+X _{Yp}	2	pares 7, 8 ou 9 - região distal	provavelmente Ag RON	Gardner 1988
ELATEROIDEA					
Elateridae					
Agrypninae					
Conoderini					
<i>Conoderus malleatus</i> (Germar, 1824)	17=16+X0	2	par 4 região distal	Ag RON	Schneider et al. 2007
<i>Conoderus dimidiatus</i> Germar, 1839	17=16+X0	4	pares 2 e 4 - região distal	Ag RON	Schneider et al. 2006
<i>Conoderus scalaris</i> (Germar, 1824)	17=16+X0	4	pares 2 e 4 - região distal	Ag RON	Schneider et al. 2006
<i>Conoderus stigmatus</i> Germar, 1839	16=14+neoXY	2	par 1 - região distal	Ag RON	Schneider et al. 2006
<i>Conoderus ternarius</i> Germar, 1839	17=16+X0	2	par 2 - região distal	Ag RON	Schneider et al. 2006
Pyrophorini					
<i>Ignelater luminosus</i> Costa, 1975 (under <i>Pyrophorus luminosus</i> Illiger, 1807)	17=14+X _p neoX _{neoYp}	2	1 bivalente de tamanho grande	Ag RON	Virkki et al. 1984
<i>Pyrearinus candelarius</i> (Germar, 1841)	15=14+X0	2	par 2 - região distal	Ag RON	Schneider et al. 2007
<i>Pyrophorus divergens</i> Eschscholtz, 1829	15=14+X0	2	par 2 - região distal	Ag RON	Schneider et al. 2007
<i>Pyrophorus punctatissimus</i> Blanchard, 1843	15=14+X0	2	par 2 - região distal	Ag RON	Schneider et al. 2007
CUCUJOIDEA					
Coccinellidae					
Coccinellinae					
<i>Cycloneda sanguinea</i> (Linnaeus, 1763)	20=18+X _{Yp}	2	1 par autossômico	Ag RON e FISH	Maffei et al. 2001c
		3	1 par autossômico e X _{Yp}		Maffei et al. 2004
<i>Eriopis connexa</i> (Germar, 1824)	20=18+X _{Yp}	2	1 par autossômico (⊗)/	Ag RON	Maffei et al. 2001a

<i>Olla v-nigrum</i> (Mulsant, 1866)	20=18+Xy _p	-----	1 bivalente e Xy _p (♂) Xy _p	Ag RON e FISH	Maffei et al. 2001b
Epilachninae <i>Epilachna paenulata</i> (Germar, 1824)	18=16+Xy _p	-----	autossômico	Ag RON	Drets et al. 1983
TENEBRIONOIDEA Meloidae Meloinae <i>Epicauta atomaria</i> (Germar, 1821)	20=18+Xy _p	----- 3	não específico bivalente 7 e Xy _p	Ag RON e SC	Almeida et al. 2000; Zacaro et al. 2003
Tenebrionidae Lagriinae <i>Laena reitteri</i> Weise, 1877	18=16+Xy _p	6	-----	Ag RON	Helecová et al. 2008
Tenebrioninae <i>Blaps gibba</i> Castelnau, 1840	38=30+X ₁ X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ Y	-----	multivalente sexual	Ag RON	Vitturi et al. 1996
<i>Blaps gigas</i> (Linnaeus, 1767) <i>Lagria villosa</i>	35=30+X ₁ X ₂ X ₃ X ₄ Y 18=16+ Xy _p	----- 2	multivalente sexual par 4 autossômico	Ag RON Ag RON e FISH 18S	Vitturi et al. 1996 Lira-Neto et al. 2012; Goll et al. 2012
<i>Misolampus goudoti</i> Guérin-Méneville, 1834	20=18+Xy _p	3 2	1 bivalente e Xy _p 1 bivalente autossômico de tamanho médio	Ag RON e FISH	Juan et al. 1993
<i>Nyctobates gigas</i>	18=16+neoXY	2	1 par autossômico e coincidente com HC	Ag RON	Lira-Neto et al. 2012
<i>Palembus dermestoides</i> (Fairmaire, 1893)	20=18+Xy _p	----- 5	não específico bivalente 3, 7 e Xy _p	Ag RON e SC	Almeida et al. 2000; Zacaro et al. 2003
<i>Tenebrio molitor</i> Linnaeus, 1758	20=18+Xy _p	1 6	Xy _p , 2 pares autossômicos de tamanho médio, X, e y- região distal	Ag RON e FISH	Juan et al. 1993
<i>Zophobas aff. confusus</i>	20=18+ Xy _p	2	bivalente sexual e coincidente com HC	Ag RON	Lira-Neto et al. 2012
CHRYSOMELOIDEA Chrysomelidae Chrysomelinae <i>Chrysolina americana</i> (Linnaeus, 1758) <i>Chrysolina bankii</i> (Fabricius, 1775) <i>Timarcha aurichalcea</i> Bechyné, 1948 <i>Timarcha espanoli</i> Bechyné, 1948	24=22+Xy _p 23=22+X0 18=16+neoXY 26=24+Xy _p	2 2 1 2	par 1 par 1 neoX 1 par autossômico	FISH FISH Ag RON and FISH Ag RON and FISH	Petitpierre 1975, 1996 Petitpierre 1975, 1996 Gómez-Zurita et al. 2004 Petitpierre 1970; Gómez-Zurita et al. 2004
<i>Timarcha fallax</i> Pérez, 1865	20=18+Xy _p	2	par 4- região distal	FISH	Petitpierre 1970; Gómez-Zurita et al. 2004
<i>Timarcha granadensis</i> Bechyné, 1948 <i>Timarcha lugens</i> Rosenhauer, 1856	22=20+Xy _p 20=18+Xy _p	2 2	1 bivalente 1 par autossômico	Ag RON FISH	Gómez-Zurita et al. 2004 Petitpierre 1976; Gómez-Zurita et al. 2004

<i>Timarcha marginicollis</i> Rosenhauer, 1856	20=18+Xy _p	2	1 bivalente	Ag RON	Petitpierre 1976; Gómez-Zurita et al. 2004
<i>Timarcha perezi</i> Fairmaire, 1884	20=18+Xy _p	2	par 4- região distal	FISH	Petitpierre 1970; Gómez-Zurita et al. 2004
<i>Timarcha punctella</i> Marseul, 1870	28=26+Xy _p	2	1 bivalente	Ag RON	Gómez-Zurita et al. 2004
<i>Zygogramma bicolorata</i> Pallister, 1953	24=22+Xy _p	4	4 cromossomos – regiões proximal e distal	Ag RON	Yadav et al. 1992
Alticinae					
<i>Alagoasa bicolor</i> (Linnaeus, 1767)	22=20+X+y	-----	não específico	Ag RON	Virkki e Denton 1987b
<i>Alagoasa januarua</i> Bechyné, 1955	22=20+X+Y	-----	autossômico – região proximal e cromossomo Y – intersticial e proximal	Ag RON	Virkki 1983
<i>Diabrotica speciosa</i> (Germar, 1824)	21=20+X0(Bs)	2	par 9 – região distal	Ag RON	Schneider et al. 2002
<i>Omophoita albicollis</i> (Fabricius, 1787)	22=20+X+y	-----	não específico	Ag RON	Virkki e Denton 1987b
<i>Omophoita annularis</i> (Illiger, 1807)	22=20+X+Y	-----	autossômico – região proximal	Ag RON	Virkki 1983
<i>Omophoita cyanipennis</i> (Fabricius, 1798)	22=20+X+y	-----	não específico	Ag RON	Virkki e Denton 1987b
<i>Omophoita magniguttis</i>	22=20+Xy	4	pares 2 e 6 - autossômico	FISH- 18S	Almeida et al. 2010
<i>Omophoita octoguttata</i> (Fabricius, 1775)	22=20+X+Y	-----	autossômico - região proximal	Ag RON e FISH- 18S	Virkki 1983; Almeida et al. 2010
<i>Omophoita personata</i> (Illiger, 1807)	22=20+X+Y	-----	autossômico – região proximal	Ag RON e FISH- 18S	Virkki 1983; Almeida et al. 2010
<i>Paranaita opima</i> (Germar, 1824)	22=20+XY	2	pequeno par autossômico	18S	
		2	par 6 – região intersticial	Ag RON	Almeida et al. 2006
Cassidinae					
<i>Botanochara angulata</i> (Germar, 1824)	51=48+X _p neoXneoY _p	-----	alguns bivalentes	SC	Postiglioni et al. 1990
<i>Chelymophra variabilis</i> Boheman, 1854	22=20+Xy _p	2	par 5 – região distal	Ag RON e SC	Postiglioni e Brum-Zorrilla 1988; Postiglioni et al. 1990, 1991
CURCULIONOIDEA					
Curculionidae					
Entiminae					
Eustylini					
<i>Diaprepes abbreviatus</i> (Linnaeus, 1764)	22=20+Xy _p	-----	Xy _p e coincidente com HC	Ag RON	Virkki e Sepúlveda 1990; Virkki et al. 1990
Sciaphilini					
<i>Barypeithes chevrolati</i> (Boheman 1843)	22=20+Xy _p	2	bivalente sexual	Ag RON	Dorota et al. 2012
<i>Barypeithes formaneki</i> (Fremuth 1971)	22=20+Xy _p	2	bivalente sexual	Ag RON	Dorota et al. 2012
<i>Barypeithes interpositus</i> (Roubal 1920)	22=20+Xy _p	2	bivalente sexual	Ag RON	Dorota et al. 2012
<i>Barypeithes pellucidus</i> (Boheman 1834)	22=20+Xy _p	2	bivalente sexual	Ag RON	Dorota et al. 2012
Otiorhynchini					
<i>Cirrorhynchus kelecsenyi</i> Frivaldszky, 1892	32=30+Xy _p	2	cromossomos sexuais	Ag RON	Lachowska et al. 2008
<i>Dodecastichus inflatus</i> (Gyllenhal, 1834)	22=20+Xy _p	2	cromossomos sexuais	Ag RON	Lachowska et al. 2008
<i>Otiorynchus</i> (s. str.) <i>coecus</i> Germar, 1824	22=20+Xy _p	4	par 4 autossômico e cromossomos sexuais	Ag RON	Lachowska et al. 2008
<i>Otiorynchus</i> (s. str.) <i>cornicinus</i> Stierlin, 1861	22=20+Xy _p	2		Ag RON	Lachowska et al. 2008
<i>Otiorynchus</i> (s. str.) <i>multipunctatus</i> (Fabricius, 1792)	22=20+Xy _p	4	1 par cromossômico e cromossomos sexuais	Ag RON	Lachowska et al. 2008

<i>Otiiorhynchus (Phalantorrhynchus) morio</i> (Fabricius, 1781)	22=20+Xy _p	4	1 par cromossômico e cromossomos sexuais	Ag RON	Lachowska et al. 2008
<i>Otiiorhynchus bisulcatus</i> (Fabricius, 1781)	22=20+Xy _p	2	cromossomos sexuais	Ag RON	Helecová et al. 2013
<i>Otiiorhynchus (Zadrehus) atroapterus</i> (De Geer, 1775)	22=20+Xy _p	2	Cromossomos sexuais	Ag RON	Helecová et al. 2013
Peritelini					
<i>Centricnemus leucogrammus</i>	22=20+ Xy _p	4	1 par cromossômico e cromossomos X e y	Ag RON	Lachowska et al. 2006
<i>Peritelus familiaris</i>	24=22+ Xy _p	4	1 par cromossômico e cromossomos X e y	Ag RON	Lachowska et al. 2006
Cryptorhynchinae					
<i>Acalles echinatus</i>	30=28+Xy _p	4	1 par autossômico e cromossomos X e y	Ag RON	Lachowska et al. 2009
<i>Acalles fallax</i>	30=28+Xy _p	4	1 par autossômico e cromossomos X e y	Ag RON	Lachowska et al. 2009
<i>Acalles petryszaki</i>	30=28+Xy _p	6	2 pares autossômicos e cromossomos X e y	Ag RON	Lachowska et al. 2009

B- cromossomo supranumerário; M- metacêntrico; Sm- submetacêntrico; St- subtelocêntrico; A- acrocêntrico; Sa- subacrocêntrico; HC- heterocromatina constitutiva; AgRON- RON impregnada por nitrato de prata; FISH- hibridação *in situ* fluorescente utilizando a sonda rDNA; SC- espalhando celular para visualização complexo sinaptonêmico.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é discutir sobre os mecanismos de diferenciação cromossômica em espécies da subfamília Cassidinae *s.l.*, levando-se em conta as características cariotípicas, o padrão de distribuição das regiões heterocromáticas e das famílias multigênicas rDNA 28S, rDNA 5S, snRNA U2 e DNA telomérico, bem como as informações disponíveis na literatura sobre a filogenia deste grupo. Para tal, os cromossomos de 19 espécies foram estudados, visando estabelecer:

- o número diploide, tipo de sistema cromossômico sexual, morfologia dos cromossomos e comportamento dos cromossomos durante a meiose quanto ao emparelhamento, número e localização de quiasmas, e associação dos cromossomos sexuais;
- o padrão de distribuição das regiões de heterocromatina constitutiva através da técnica de bandamento C;
- a localização dos genes ribossomais 28S, 5S e do pequeno RNA nuclear U2 com a técnica de FISH;
- a presença e localização das sequências teloméricas pentanucleotídicas (TTAGG)_n e (TACGG)_n com FISH.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

Um total de 427 indivíduos foram coletados e dissecados para as análises citogenéticas. Na tabela 2, estão mencionados os 120 indivíduos pertencentes as 19 espécies que apresentaram células em divisão. Os exemplares machos e fêmeas adultos foram coletados manualmente durante os períodos de Outubro/2012 a Fevereiro/2013, Outubro/2013 a Fevereiro/2014 e Outubro/2014 a Fevereiro/2015 em cultivos de batata-doce e em vegetação rasteira. A identificação taxonômica dos espécimes foi realizada pela Dra. Flavia Rodrigues Fernandes, do Museu de Paraense Emílio Goeldi, Belém, Pará.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Obtenção das preparações citológicas

As preparações citológicas, para estudo dos cromossomos mitóticos e meióticos, foram obtidas a partir de gônadas de indivíduos adultos e de embriões, de acordo com a técnica descrita a seguir (Schneider et al. 2007), com algumas modificações:

- 1 - Remover a gônada em solução fisiológica (7,5g de NaCl, 2,38g de Na_2HPO_4 , 2,72g de KH_2PO_4 , em 1 litro de água destilada);
- 2 - Imergir o material em solução de colchicina a 0,05%, preparada com solução fisiológica, durante 2 horas, para que ocorra o acúmulo de metáfases;
- 3 - Adicionar um volume de água de torneira igual ao de colchicina, para atuar como solução hipotônica, deixando agir durante 15 minutos;
- 4 - Fixar em Carnoy I (metanol-ácido acético, na proporção de 3:1), durante 30 minutos, no mínimo;
- 5 – Macerar porções do material em uma lâmina de vidro, juntamente com uma gota de solução de ácido acético a 60% para obter de uma suspensão celular;
- 6 - Secar a lâmina em uma placa de metal, à temperatura de 35 a 40° C.

Obs: O passo 2 não foi realizado em todos os exemplares, pois observou-se que algumas técnicas citogenéticas moleculares respondiam melhor às preparações cromossômicas sem o uso da colchicina.

3.2.2. Coloração convencional (Giemsa)

As lâminas com as preparações cromossômicas foram coradas em solução de Giemsa 3% (47 mL de água destilada, 1,5 mL de solução comercial de Giemsa, 1,5 mL de tampão fosfato pH 6.8) durante 15 minutos, e em seguida, lavadas em água destilada e secas ao ar.

Tabela 2 - Espécies de Cassidinae analisadas no presente estudo, incluindo o número de indivíduos e a localidade de coleta. PR=Paraná; RS=Rio Grande do Sul; SP= São Paulo.

Espécie	Número de indivíduos	Locais de coleta
Tribo Cassidini		
<i>Agroiconota inedita</i> (Boheman, 1855)	1 macho 5 machos 2 machos	Piracicaba Saltinho São Pedro
<i>Charidotella immaculata</i> (Oliver, 1790)	1 macho 1 macho 17 machos 3 machos	Piracicaba Rio Claro Saltinho São Pedro
<i>Charidotella sexpunctata</i> (Fabricius, 1781)	5 machos 1 macho	Saltinho São Pedro
<i>Deloyala cruciata</i> (Linnaeus, 1758)	1 macho 12 machos 2 machos	Rio Claro Saltinho São Pedro
<i>Microctenochira aciculata</i> (Boheman, 1855)	1 macho/ 1 embrião fêmea	Rio Claro
<i>Microctenochira gnata</i> (Spaeth, 1926)	1 macho	São Pedro
<i>Microctenochira optata</i> (Boheman, 1855)	1 macho 4 machos	Rio Claro Saltinho
<i>Microctenochira quadrata</i> (Degeer, 1775)	1 macho 3 machos	Rio Claro Saltinho
<i>Microctenochira stigmatica</i> (Boheman, 1855)	1 macho	Saltinho
Tribo Goniocheniini		
<i>Chlamydocassis cribripennis</i> (Boheman, 1850)	1 macho	Nonoai
Tribo Ischyrosomychini		
<i>Cistudinella obducta</i> (Boheman, 1854)	1 macho	Nonoai
Tribo Mesomphaliini		
<i>Botanochara tessellata</i> (Burmeister, 1870)	1 macho	Saltinho
<i>Chelymorpha cribraria</i> (Fabricius, 1775)	1 macho 1 macho 5 machos 7 machos 5 machos	Avaré Ponta Grossa Rio Claro Saltinho São Pedro
<i>Chelymorpha inflata</i> (Boheman, 1854)	3 machos 1 macho	Jundiá São Pedro
<i>Cteisella magica</i> (Boheman, 1855)	2 machos	Jundiá
<i>Cyrtonota cyanea</i> (Linnaeus, 1758)	3 machos	São Pedro
<i>Paraselenis flava</i> (Linnaeus, 1758)	22 machos 1 macho	Saltinho São Pedro
<i>Stolas areolata</i> (Germar, 1824)	2 machos	Jundiá
<i>Stolas redtenbacheri</i> (Boheman, 1850)	1 macho	Rio Claro

Coordenadas geográficas: Avaré (23°24'S, 48°56'W), SP; Jundiá (23°8'S, 46°53'W), SP; Piracicaba (22°50'S, 47°38'W), SP; Rio Claro (22°24'S, 47°3'W), SP; Saltinho (22°50'S, 47°40'W), SP; São Pedro (22°3'S, 47°57'W), SP; Nonoai (27°21'S, 52°45'W), RS; Ponta Grossa (25°5'S, 50°9'W), PR.

3.2.3. Técnica de obtenção de bandas C

A metodologia utilizada foi aquela descrita por Sumner (1972), com algumas modificações:

- 1 - Incubar as lâminas em solução de ácido clorídrico 0.1N, durante 5 minutos à temperatura ambiente;
- 2 - Tratar as preparações cromossômicas com solução de hidróxido de bário octahidratado a 5%, durante 15 segundos, à temperatura de 60°C;
- 3 - Lavar as lâminas, duas vezes, em solução de ácido clorídrico 0.1N, à temperatura ambiente;
- 4 - Lavar as lâminas várias vezes em água destilada;
- 5 - Lavar as lâminas em tampão 2xSSC (pH 7,0), à temperatura ambiente;
- 6 - Incubar as lâminas em tampão 2xSSC (pH 7,0), por 30 minutos, à temperatura de 60°C;
- 7 - Lavar as lâminas várias vezes com água destilada e secar ao ar;
- 8 - Colocar sobre cada lâmina 30 µl com solução de do fluorocromo 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) e cobrir com lamínula.

3.2.4. Hibridização *in situ* fluorescente (FISH)

3.2.4.1. Extração do DNA e amplificação dos genes

O DNA foi extraído da porção abdominal dos besouros das espécies *Charidotella immaculata* e *Paraselenis flava*, de acordo com a metodologia descrita no Kit Comercial Qiagen Dneasy Blood and Tissue.

Após a extração, uma amostra de DNA total foi colocada em um gel de agarose 1% corado com Gel Red, e submetido a eletroforese para verificação da qualidade do DNA.

Para a amplificação do DNA foram utilizados *primers* para os genes nucleares 28S, 18S, 5S e o snRNA U2. As sequencias dos *primers* estão mencionados na Tabela 3.

Tabela 3 - Sequência dos *primers* utilizados na amplificação do DNA.

Nome da sequência	Sequência 5' – 3'	Referência
28S – F	GACCCGTCTTGAAACACGGA	Dados pessoais
28S – R	TCGGAAGGAACCAGCTACTA	
18S – F	TTGTCTCAAAGATTAAGCCA	Almeida et al. 2010
18S – R	TGGCCCGCCCTTGCGAGCTA	
5S - F	TAGCGGTCGCGCATCGATGTACTAACCGCGCCCA	Almeida,MC. (Comunicação pessoal)
5S – R	ACACTGCCTGACTGCGGTGATC GGACGAGAACCGGTATATCCAGCGTGCTATGGCC GTTA	
Artro 5S - F	ACTTAGATGGGGGACCGCTT	Dados pessoais
Artro 5S - R	TTCAGCGTGGTATGGTCGTT	
U2 Artro - F	TCTCGGCCTATATTGGCTAA	Colgan et al. 1998
U2 Artro - R	GACGGTAGCTGCAATACCGG	

F- Foward; R- Reverse

Cada reação de PCR foi realizada com variação no volume do produto e no programa do termociclador Applied Biosystem de acordo com o gene:

- a- Genes de rDNA 18S e 28S: 3 min a 94 °C para desnaturação inicial; 35 ciclos: a 30 segundos a 94 °C para desnaturação, 30 segundos a 50 °C para anelamento, 1 min a 72 °C para extensão; 10 min a 72 °C para extensão final.
- b- Gene de rDNA 5S: 3 min a 94 °C para desnaturação inicial; 35 ciclos: a 30 segundos a 94 °C para desnaturação, 30 segundos a 54 °C para anelamento, 1 min a 72 °C para extensão; 10 min a 72 °C para extensão final.
- c- Gene snRNA U2: 3 min a 94 °C para desnaturação inicial; 35 ciclos: a 30 segundos a 94 °C para desnaturação, 30 segundos a 48 °C para anelamento, 1 min a 72 °C para extensão; 10 min a 72 °C para extensão final.

Para verificação da amplificação e da qualidade dos produtos de PCR, uma alíquota da reação foi submetida à eletroforese em gel de agarose 2%, corado com Gel Red e visualizados em transluminador de luz ultravioleta. Os géis foram fotografados e digitalizados.

3.2.4.2. Marcação das sondas

a-) Sonda de rDNA 18S e 28S

Para a detecção do gene ribossomal maior foram testadas duas sondas: 1-) o rDNA 18S extraído de *Omophoita octoguttata* (Coleoptera, Alticinae) (Almeida et al. 2010), que foi marcada com biotina por Nick Translation Mix - Roche®; 2-) o rDNA 28S extraído de *Charidotella immaculata* marcado com digoxigenina por DIG-Nick Translation Mix - Roche®, na concentração de 10,0µl de DNA, 6,0µl de água estéril e 4,0µl de DIG-Nick.

b-) Sonda de rRNA 5S

A marcação da sonda de rDNA 5S foi realizada por PCR em um termociclador Applied Biosystems para um volume total de reação de 50µl: 25,7µL de H₂O, 5µL de tampão 10X, 2µL de MgCl₂ (50mM), 2,5µL dATP (2mM), 2,5µL dGTP (2mM), 2,5µL dCTP (2mM), 1,7µL dTTP (2mM), 1,5µL biotina 16dUTP (1mM), 2,0µL Artro 5S F (10mM), 2,5µL Artro 5S R (10mM), 2,0 µl do DNA, e 0,6µL Taq Polymerase. Os ciclos de reação para marcação da sonda seguiram os seguintes parâmetros: 3 min a 94 °C para desnaturação inicial; 40 ciclos: a 30 segundos a 94°C para desnaturação, 30 segundos a 54 °C para anelamento, 1 min a 72 °C para extensão; 10 min a 72 °C para extensão final.

Para a detecção das sequências teloméricas foram utilizados como sondas os *primers* Tel F 5'-TAGGTTAGGTTAGGTTAGG e Tel R 5'-AACCTAACCTAACCTAACC para a sequência (TTAGG)_n e, os primers Tel F 5'- CAGGTCAGGTCAGGTCAGGTCAGGT e Tel R 5'- CTGACCTGACCTGACCTGACCTGAC para a sequência (TCAGG)_n (Osanai et al. 2006). A marcação da sonda foi realizada por PCR em um termociclador Applied Biosystems, para um volume total de 50 µL de reação: 31,2µL de H₂O, 5µL de tampão 10X, 8µL de MgCl₂ (25mM), 1µL dATP (2mM), 1µL dGTP (2mM), 1µL dCTP (2mM), 0,7µL dTTP (2mM), 0,6µL biotina 16dUTP (1mM), 0,5µL Tel F (10mM), 0,5µL Tel R (10mM), 0,5µL Taq Polymerase. Os ciclos de reação para marcação da sonda seguiram os seguintes parâmetros: 5 min a 94 °C para desnaturação inicial; 20 ciclos: a 1 min a 95 °C para desnaturação, 1 min a 50 °C para anelamento, 1,3 min a 72 °C para extensão; 7 min a 72 °C para extensão final.

1-) *DNA ribossômico 18S e DNA telomérico da sequência (TTAGG)_n*

- 1 - Tratar as lâminas com RNAase (10µl/mL em 2xSSC) a 37°C por 60 minutos em câmara úmida;
- 2 - Desidratar as lâminas em série alcoólica 70%, 90% e 100% a temperatura ambiente durante cinco minutos cada e secar;
- 3 - Desnaturar as lâminas em solução de formamida 70%/2xSSC a 70°C por dois minutos;
- 4 - Desidratar as lâminas em série alcoólica gelada 70%, 90% e 100% por cinco minutos e secar;

- 5 - Desnaturar a solução de hibridização (6µl da sonda marcada e 24 µl do tampão de hibridização) em termociclador a 95°C por 10 minutos;
- 6 - Colocar sobre cada lâmina 30µl da solução de hibridização, cobrir com lamínula de *parafilm* e deixar os cromossomos hibridizando *overnight* a 37°C em câmara úmida;
- 7 - Retirar a lamínula e enxaguar as lâminas em 0,4xSSC + 0,3% de Triton a 70°C por exatos dois minutos, agitando;
- 8 - Enxaguar as lâminas em 2xSSC + 0,1% de Triton a temperatura ambiente por dois minutos, agitando;
- 9 - Colocar sobre cada lâmina 30µl de tampão bloqueio (1000µl 2xSSC, 10µl de Triton 100x, 0,05g de leite em pó desnatado), cobrir com parafilm e incubar por cinco minutos;
- 10 - Retirar o parafilm e enxaguar as lâminas brevemente em 2xSSC a temperatura ambiente;
- 11 - Incubar a lâmina com 4µl de conjugado streptavidina Alexa Fluor 488 (200µg/mL) e 26µl de tampão bloqueio por uma hora à 37°C em câmara úmida;
- 12 - Lavar as lâminas com 2xSSC a 43°C por dois minutos, agitando;
- 13 - Lavar as lâminas duas vezes com 2xSSC + 0,1% de Triton a 43°C, agitando;
- 14 - Colocar sobre as lâminas 20µl do fluorocromo DAPI com Vectashield, cobrir com lamínula e retirar o excesso do corante com papel filtro e vedar a lâmina com esmalte.

2-) *DNA ribossômico 18S*

- 1- Desidratar as lâminas em série alcoólica 70%, 90% e 100% a temperatura ambiente durante cinco minutos cada e secar;
- 2 - Tratar a lâminas com RNAase (10µl/mL em 2xSSC) a 37°C por 60 minutos em câmara úmida;
- 3 - Fixar o material em formaldeído 1% por cinco minutos a temperatura ambiente;
- 4 - Desidratar as lâminas em séria alcoólica 70%, 90% e 100% a temperatura ambiente por cinco minutos cada e secar;
- 5 - Desnaturar as lâminas em solução de formamida 70%/2xSSC à 70°C por cinco minutos;
- 6 - Desidratar as lâminas em séria alcoólica gelada 70%, 90% e 100% durante cinco minutos cada e secar;
- 7 - Desnaturar a solução de hibridização (50% formamida, 2xSSC, 10% sulfato dextrano e da sonda desnaturada (6ng/µL)) em termocilador a 95°C por 10 minutos;
- 8 - Colocar sobre cada lâmina 30µl de solução de hibridização, cobrir com lamínula e deixar os cromossomos hibridizando *overnight* a 37°C;

- 9 - Lavar as lâminas duas vezes em solução de formamida 15% à 35°C por 10 minutos, agitando;
- 10 - Lavar as lâminas em solução de Tween 0,5% a temperatura ambiente por cinco minutos, agitando;
- 11 - Incubar as lâminas em tampão bloqueio (1000µl 2xSSC, 10µl de Triton 100x, 0,05g de leite em pó desnatado) por 10 minutos;
- 12 - Enxaguar as lâminas em PBS 1X a temperatura ambiente por cinco minutos;
- 13 - Incubar a lâmina com 2µl de conjugado streptavidina Alexa Fluor 488 (200µg/mL) e 28µl de tampão bloqueio por uma hora à 37°C em câmara úmida;
- 14 - Lavar as lâminas em Tween 0,5% a temperatura ambiente duas vezes por cinco minutos, agitando;
- 15 - Desidratar as lâminas novamente em série alcoólica 70%, 90% e 100% a temperatura ambiente durante cinco minutos e secar;
- 16 - Colocar sobre as lâminas 20µl de DAPI com Vectashield.

3-) *DNA telomérico da sequência (TTAGG)_n*

- 1 - Repetir os passos 1 – 6 do protocolo mencionados no item 1;
- 2 - Retirar a lamínula e enxaguar as lâminas em formamida 50%/2xSSC a 35°C por cinco minutos;
- 3 - Enxaguar as lâminas em 1xSSC a 35°C por cinco minutos;
- 4 - Colocar sobre cada lâmina 30µl de tampão bloqueio (1mL de 4xT (100mL de 20xSSC + 400mL de água + 250µL de Triton 100x) + 0,01g de leite em pó desnatado), cobrir com parafilm e incubar por cinco minutos;
- 5 - Repetir os passos 10 - 11 do protocolo mencionados no item 1;
- 6 - Lavar as lâminas duas vezes em 4xT a 45°C por cinco minutos;
- 7 - Colocar sobre as lâminas 20µl de DAPI com Vectashield.

4-) *DNA ribossômico 28S*

- 1 - Deixar as lâminas de um dia para o outro banhadas em solução de ácido acético 70%;
- 2 - Deixar as lâminas por 60 minutos em solução de pepsina em câmara úmida a 37°C;
- 3 - Lavar as lâminas em tampão de PBS 1x durante 5 minutos em temperatura ambiente, agitando;
- 4 - Desidratar as lâminas em série alcoólica 70, 90 e 100% por 5 minutos e secar;

- 5 - Incubar as lâminas em 100µl de RNase (10µl/mL em 2xSSC) a 37°C por 60 minutos em câmara úmida;
- 6 - Lavar as lâminas três vezes por 5 minutos em solução de 2xSSC;
- 7 - Lavar as lâminas durante 5 minutos em solução de PBS 1x;
- 8 - Fixar o material em formaldeído 1% em PBS 1X/50mM MgCl₂ durante 10 minutos em temperatura ambiente;
- 9 - Lavar as lâminas em PBS 1x por 5 minutos, agitando;
- 10 - Desidratar as lâminas em série alcoólica 70, 90 e 100% por 5 minutos cada e deixar secar;
- 11 - Denaturar o DNA cromossômico em formamida 70% em 2xSSC a 70°C por 5 minutos;
- 12 - Desidratar o material em série alcólica gelada 70, 90 e 100% por 5 minutos cada e secar rapidamente as lâminas;
- 13 - Usar 6µl de sonda e 24µl de tampão de hibridação;
- 14 - Denaturar a sonda em termociclador 95°C por 10 minutos e depois manter em gelo;
- 15 - Colocar 30µl da solução de hibridação em cada lâmina, cobrir com lamínula. Manter o material voltado para baixo em câmara úmida a 37°C *overnight*;
- 16 - Lavar as lâminas duas vezes em solução de formamida 15% durante 10 minutos cada;
- 17 - Lavar as lâminas durante 5 minutos em solução de Tween 0,5% em temperatura ambiente, agitando;
- 18 - Incubar as lâminas em tampão NFDm (20mL 20xSSC, 5g leite em pó desnatado, 80mL água destilada) por 15 minutos;
- 19 - Lavar duas vezes com solução de Tween 0,5% a temperatura ambiente por 5 minutos, agitando;
- 20 - Incubar as lâminas com 2 µl de anti-digoxigenina e 28µl de tampão bloqueio por 60 minutos em câmara úmida a 37°C;
- 21 - Lavar as lâminas duas vezes em solução de Tween 0,5% a temperatura ambiente por 5 minutos, agitando;
- 22 - Desidratar as lâminas em série alcoólica 70, 90 e 100% e deixar secar;
- 23 - Colocar sobre as lâminas 30µl do fluorocromo DAPI com Vectashield.

5-) *DNA ribossômico 5S e snRNA U2*

- 1 - Repetir os passos 1 – 15 do protocolo mencionados no item 4;
- 2 - Lavar as lâminas em solução de formamida 15% a 42°C por 5 minutos;
- 3 - Repetir os passos 17- 19 mencionado no ítem 4;

- 4 - Incubar cada lâmina com 6µl de Avidina-FITC e 24µl de tampão bloqueio (NFDM) por 30 minutos em câmara úmida a 37°C;
- 5 - Lavar as lâminas 3 vezes por 5 minutos em solução de Tween 0,5% em temperatura ambiente, agitando;
- 6 - Incubar cada lâmina com 2µl de anti-avidina biotinilada e 38µl de tampão bloqueio (NFDM) por 30 minutos em câmara úmida a 37°C;
- 7 - Lavar as lâminas 3 vezes por 5 minutos em solução de Tween 0,5% em temperatura ambiente (shaker);
- 8 - Repetir os passos 4 - 7 deste protocolo;
- 9 - Repetir os passos 4 - 5 deste protocolo;
- 10 - Desidratar o material em série alcoólica 70, 90 e 100% por 5 minutos cada e deixar secar;
- 11 - Colocar sobre as lâminas 30µl de DAPI com Vectashield.

3.2.5. Análises cromossômicas

As análises dos cromossomos foram realizadas em microscopia de luz. As imagens das células mitóticas e meióticas foram capturadas em um fotomicroscópio óptico Olympus BX51 e Zeiss A2, com objetiva 100x de imersão, optovar 1.6, com filtros específicos para os fluorocromos DAPI, Rodamina e FITC, utilizando os *softwares* DP Controller e Axion Vision, respectivamente. A classificação morfológica dos cromossomos foi feita de acordo com a nomenclatura proposta de Levan et al. (1964).

4. RESULTADOS

Os resultados obtidos com a análise citogenética de 19 espécies de Cassidinae estão organizados no formato de capítulos, os quais estão mencionados a seguir:

Capítulo I – COMPARATIVE CYTOGENETIC ANALYSIS IN 13 TORTOISE BEETLES (CASSIDINAE, COLEOPTERA) FROM BRAZILIAN FAUNA

Capítulo II – MAPEAMENTO CROMOSSÔMICO DO GENE RIBOSSOMAL 28S EM 11 ESPÉCIES DE CASSIDINAE *S.L.* (COLEOPTERA, CHRYSOMELIDAE)

Capítulo III – IDENTIFICAÇÃO DE SEQUÊNCIAS TELOMÉRICAS PENTANUCLEOTÍDICAS (TTAGG)_n e (TCAGG)_n EM CASSIDINAE *S.L.* (COLEOPTERA, CHRYSOMELIDAE)

Capítulo IV – EMPREGO DOS GENES rDNA 5S E snRNA U2 COMO MARCADORES CITOGENÉTICOS EM CASSIDINAE *s.l.* (COLEOPTERA, CHRYSOMELIDAE)

CAPÍTULO I

COMPARATIVE CYTOGENETIC ANALYSIS IN 13 TORTOISE BEETLES
(CASSIDINAE, COLEOPTERA) FROM BRAZILIAN FAUNA

LOPES, Amália Torrezan¹, FERNANDES, Flávia Rodrigues², SCHNEIDER, Marielle Cristina³

1- Universidade Estadual Paulista, UNESP, Departamento de Biologia, Avenida 24A, 1515, Bela Vista, 13506-900, Rio Claro, São Paulo, Brasil. E-mail: amalia.torrezan@gmail.com

2- Museu Paraense Emílio Goeldi, MPEG, Departamento de Entomologia, Avenida Perimetral, 1901, Terra Firme, 66077-830, Belém, Para, Brasil. E-mail: flarfer@gmail.com

3- Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, Departamento de Ciências Biológicas, Avenida Professor Artur Riedel, 275, 09972-270, Diadema, São Paulo, Brasil. E-mail: marielle.unifesp@gmail.com

ABSTRACT

In this work, we performed the chromosome characterization of 13 Cassidinae beetles, belonging to four tribes, aiming to increase the cytogenetic data and establish the mechanisms involved in chromosome evolution of this subfamily, which seemed to be a conserved karyotype constitution of $2n=16+Xy_p$. The analysis of mitotic and meiotic cells revealed a high diversity of diploid numbers ($2n=18$, $2n=22$, $2n=26$, $2n=32$, $2n=36$, $2n=40$, $2n=42$), and the presence of sex chromosome system of the Xy_p type in most species, with the exception of two representatives that exhibited the Xy_r and XY systems. C-banding showed constitutive heterochromatin predominantly localized in the pericentromeric region of the chromosomes, but differences regarding the number of chromosomes with positive C-bands, intensity of the blocks, and presence of additional bands in autosomes and/or sex chromosomes were observed among these species. Our data revealed that the karyotype $2n=16+Xy_p$ did not occur in all 13 tribes of Cassidinae cytogenetically characterized, seeming to be only a shared feature among the species of the Cassidini. Variations in the C-band pattern, mainly in closely related species, suggested that the interspecific karyotype diversification occurred by change in quantity and distribution of constitutive heterochromatin. The occurrence of the Xy_p sex chromosome system in the tribe Mesomphaliini, which revealed the high diversity of simple and multiple systems among the coleopteran as a whole, reinforced the idea that derived systems were originated by chromosome rearrangements involving the Xy_p ancestral system.

Keywords: C-band, Chrysomelidae, chromosome, karyotype, meiosis, sex chromosome system.

INTRODUCTION

Chrysomelidae is the second largest beetle family of the suborder Polyphaga, including around 37.000 species grouped into 19 subfamilies (Reid, 1995; Chaboo, 2007). Tortoise beetles are members of one these subfamilies, the Cassidinae (Borowiec & Swietojanska, 2015), which is the second most numerous clade after Galerucinae, comprising approximately 6000 species distributed into 43 tribes around the world (Chaboo, 2007). The taxonomic status of the cassidines has been changed by many researches. They have been ranked as tribes, subfamilies, families, and even in a superfamily (Stephens, 1829; Westwood, 1920; Chen, 1964, 1973; Seeno & Wilcox, 1982; Suzuki, 1988). Finally, taking into account morphological characters, Chaboo (2007) proposed that the subfamilies Cassidinae *sensu stricto* (*s. str.*) and Hispinae *s. str.* constituted a monophyletic group and incorporated these two clades in a single subfamily, the Cassidinae *sensu lato*. This finding was corroborated by a phylogenetic study using molecular data (Gomez-Zurita et al. 2008).

Cytogenetically, only 117 Cassidinae species belonging to 13 tribes were investigated. The tortoise beetles are considered as a group with conserved karyotype, in which approximately 52% of the analyzed species showed $2n=16+Xy_p$, with metacentric and/or submetacentric chromosomes (De Julio et al. 2010). However, cytogenetic records demonstrated that the diploid numbers can range from $2n=16$ to $2n=51$, as well the sex chromosomal systems, which can be of the simple type - Xy_p , $X0$, Xy , Xyc , Xy_r , $neoXY$, or multiple type - Xyy_p , $X_pneoXneoY_p$, $X_pneoXneoy_p$, $neoX_pneoyy_p$, $neoX_{p1}neoX_{p2}neoXneoy_p$, $neoX_{p1}neoX_{p2}neoXneoy$, $X_{p1}X_{p2}neoXneoy$ (to review see De Julio et al. 2010). These variations in the diploid number and sex chromosome systems are more or less frequent according to the tribe considered. In Cassidini and Mesomphaliini, 44% and 100% of the species, respectively exhibited chromosome number higher than $2n=18$, but in Cassidini, the sex chromosome system of the Xy_p type was conserved in 96% of the species. Contrasting, in Mesomphaliini occurred a differentiation of the sex chromosome system, giving rise to multiple X and/or Y chromosomes. In the tribe Hispini, all nine analyzed species exhibited a reduction in the diploid number and the maintenance of the Xy_p sex chromosome system (Saha & Manna, 1971; Saha, 1973; Kacker, 1976; Sharma & Sood, 1978; Sood, 1978; Alegre & Petitpierre, 1984; Petitpierre, 1988)

In Cassidinae, there are no data regarding the identification of specific chromosomal sites, such as the constitutive heterochromatin, that is constituted by multiple copies of repetitive DNA sequences, which are commonly transcriptionally inactive and have importance to the chromosome structure and evolution. The heterochromatin can be localized in any part

of the chromosome, but it is often found in the centromeric region (Charlesworth et al. 1994). The most simple technique to visualize the chromosomal distribution of the constitutive heterochromatin is the C-banding, which provides data about the location, amount and variations that were resulted from chromosome rearrangements. In Chrysomelidae beetles, differences in the C-band pattern were registered in species with similar karyotype features, such as observed in the genus *Omophoita* (Mello et al. 2014) as well as between individuals of the same species, as occurred in one specimen of the three populations of *Diabrotica speciosa* (Schneider et al. 2002). Therefore, this specific chromosome region has been useful as cytogenetic marker in studies on chromosome evolution (Sumner, 1972, 1992; Charlesworth et al. 1994; Mello et al. 2014).

In Chrysomelidae, the constitutive heterochromatin occurs predominantly in the pericentromeric region (Almeida et al. 2006, 2009; Mello et al. 2014). This same pattern was also observed in the autosomal chromosomes of Coleoptera as a whole (Virkki, 1983, Schneider et al. 2006; Mello et al. 2014). In the sex chromosomes, the heterochromatin can be extended to all chromosomes arm or exclusively in the pericentromeric region (Almeida et al. 2000; Rozek et al. 2004).

With the aim of adding cytogenetic data to the subfamily Cassidinae (Cassidini, Goniocheniini, Ischyrosonychini and Mesomphaliini) and try to understand the mechanisms involved in the chromosomal evolution of these groups, 13 species, belonging to four tribes were analyzed. Specifically, the diploid number, chromosomal morphology, sex chromosome system, behavior of the chromosomes during meiosis and the distribution of constitutive heterochromatin were determined for seven species of Cassidini, one of Goniocheniini, one of Ischyrosonychini and four of Mesomphaliini. It is important to note that this is the first cytogenetic description of species belonging to the genera *Microctenochira* (Cassidini) and to the tribe Ischyrosonychini.

MATERIALS AND METHODS

A sample of 52 individuals, belonging to 13 species, collected in the states of Paraná, São Paulo and Rio Grande do Sul – Brazil, was analyzed in this work (Table 1). The vouchers were deposited in the entomological collection of the Museu Paraense Emilio Goeldi (MPEG - curator Orlando Tobias Silveira), Belém, state of Pará, Brazil.

Chromosomal preparations were obtained from embryos and testes of adult individuals, according to the technique described by Schneider et al. (2007), with modifications in the time of hypotonization for 15 min and concentration of the acetic acid solution for 60%. The slides

were stained with 3% Giemsa solution (3% commercial Giemsa and 3% phosphate buffer pH 6.8 in distilled water). Constitutive heterochromatin was detected by C-banding technique (Sumner, 1972) with modifications. To obtain a better resolution of the C-banding pattern, chromosomes were stained with the 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) fluorochrome. Chromosomal morphology was determined according to the nomenclature proposed by Levan et al. (1964). The images of the cells were captured using an Olympus BX51 light microscope coupled to an Olympus DP71 digital camera with DP Controller *software*.

Table 1. Cassidinae species analyzed in this study, including the number of individuals and the collection locality in the Brazilian states. PR=Paraná; RS=Rio Grande do Sul; SP= São Paulo.

Species	Number of specimens	Collection locality
Cassidini		
<i>Agroiconota inedita</i> (Boheman, 1855)	1 male	Piracicaba
	1 male	Saltinho
<i>Charidotella immaculata</i> (Oliver, 1790)	8 males	Saltinho
	1 male	Rio Claro
	1 male	Piracicaba
<i>Charidotella sexpunctata</i> Fabricius, 1781)	1 male	Saltinho
<i>Deloyala cruciata</i> (Linnaeus, 1758)	6 males	Saltinho
	1 male	Rio Claro
<i>Microtenochira aciculata</i> (Boheman, 1855)	1 male/1 female embryo	Rio Claro
<i>Microtenochira optata</i> (Boheman, 1855)	1 male	Saltinho
	1 male	Rio Claro
<i>Microtenochira quadrata</i> (Degeer, 1775)	1 male	Saltinho
	1 male	Rio Claro
Goniogeniini		
<i>Chlamydocassis cribripennis</i> (Boheman, 1850)	1 male	Nonoai
Ischyrosomychini		
<i>Cistudinella obducta</i> (Boheman, 1854)	1 male	Nonoai
Mesomphaliini		
<i>Botanochara tessellata</i> (Burmeister, 1870)	1 male	Saltinho
<i>Chelympha cribraria</i> (Fabricius, 1775)	1 male	Ponta Grossa
	5 males	Rio Claro
	2 males	Saltinho
<i>Paraselenis flava</i> (Linnaeus, 1758)	13 males	Saltinho
<i>Stolas redtenbacheri</i> (Boheman, 1850)	1 male	Rio Claro

Geographical coordinates: Avaré (23°24'S, 48°56'W), SP; Piracicaba (22°50'S, 47°38'W), SP; Rio Claro (22°24'S, 47°3'W), SP; Saltinho (22°50'S, 47°40'W), SP; Nonoai (27°21'S, 52°45'W), RS; Ponta Grossa (25°5'S, 50°9'W), PR

RESULTS

The analysis of mitotic cells of seven Cassidini species revealed the diploid numbers: $2n=40$ in *Agroiconota inedita*, $2n=22$ in both species of *Charidotella*, *Cha. immaculata* and *Cha. sexpunctata*, and $2n=18$ in *Deloyala cruciata*, *Microtenochira aciculata*, *M. optata* and *M. quadrata* (Fig. 1) (Table 2). Despite the variation in the diploid number, all species exhibited the same sex chromosome system of the X_{yp} type. Additionally, the karyotype analysis showed

the following chromosomal morphology in Cassidini species: *A. inedita* possesses the majority of chromosomes submetacentric, except the pairs 7, 10, 12, 14, 17 and 18, which were metacentric, and the pair 19 and X chromosome, which were subtelocentrics (Fig. 1a). In two *Charidotella* species, the chromosomes were metacentrics, with exception of pair 7 of *Cha. immaculata* (Fig. 1b) and pair 10 of *Cha. sexpunctata* that were submetacentrics (Fig. 1c). In *D. cruciata* and in three *Michroctenochira* species, a predominance of metacentric chromosomes was observed (Figs. 1d – g). However, in these species, some autosomes were submetacentrics, such as the pairs 6 and 8 of *D. cruciata*, pairs 1, 2 and 3 of *M. aciculata*, and pairs 1 and 2 of *M. optata* and *M. quadrata* (Table 2). The autosomal chromosomes of the seven Cassidini species gradually decreased in size, with the exception of *A. inedita* (Fig. 1a), in which the last autosomal pair was small, and *M. aciculata* (Fig. 1e), in which the first autosomal pair was large and the other pairs ranged in size from medium to small (Table 2). Regarding to the sex chromosomes, only *Cha. immaculata* exhibited the X chromosome with medium size, located between the pairs 9 and 10 (Fig. 1b). In the other species, the sex chromosomes were the smallest elements of the diploid set, and the y chromosome was dot-like without defined morphology.

Pachytene testicular cells of the Cassidini species (Fig. 2a) showed autosomal bivalents synapsed along their entire chromosomal length, sex chromosomes highly condensed and with positive heteropycnosis. Diplotene nuclei confirmed the chromosome number previously observed in mitotic cells and revealed sex chromosomes associated in a typical parachute configuration (Figs. 2b-g). Furthermore, most autosomal bivalents exhibited one interstitial or terminal chiasma, except in *D. cruciata*, that presented in the majority of diplotene nuclei up to five bivalents with two chiasmata (Fig. 2e). Spermatocytes in metaphase II showed chromosomes with morphology predominantly meta/submetacentric and exhibited the haploid sets $n=19 + X$ or $n=19 + y$ in *A. inedita*, $n=10 + X$ or $n=10 + y$ in *Cha. immaculata* and *Cha. sexpunctata*, and $n=8 + X$ or $n=8 + y$ in *D. cruciata*, *M. aciculata*, *M. optata* and *M. quadrata* (Figs. 2h - l).

One species of each tribe Goniocheniini and Ischyrosomychini was analyzed in this work. In *Chl. cribripennis* (Goniocheniini), male meiotic cells allowed to establish the karyotype formula $2n=30+Xy_p$ with meta/submetacentric chromosomes (Figs. 3a – c) (Table 2). In the pachytene nuclei, the autosomal bivalents were totally synapsed and the sex chromosomes appeared as a positive heteropycnotic block (Fig. 3a). In diplotene cells, the occurrence of only one terminal or interstitial chiasma was observed in the autosomal bivalents (Fig. 3b). Metaphase II cells confirmed the regular behavior and reductional segregation of all

chromosomes (Fig. 3c). In the chromosomal preparations of *Cistudinella obducta* (Ischyrosynychini), only mitotic metaphase cells were obtained, which exhibited the diploid number $2n=18$ (Fig. 3d). The karyotype analysis showed metacentric (pairs 1, 2, 3, 4, 7 and 8) and submetacentric chromosomes (pairs 5, 6 and X chromosome), which gradually decreased in size (Table 2). The sex chromosomes were the smallest elements of the set, and the y chromosome was easily identified due to its extremely small size.

Among the four Mesomphaliini species studied here, only *Stolas redtenbacheri* exhibited mitotic metaphase cells, in which the diploid number $2n=26$ was observed. All chromosomes presented metacentric morphology, except the pair 10 that was submetacentric (Fig. 4a). In relation to the size, the chromosomes were classified as large (pair 1), medium (pairs 2 – 12) and small (X and y chromosomes). In the other species, cells in meiosis I showed $2n=17\text{II} + \text{Xy}_p$ in *B. tessellata*, $2n=10\text{II} + \text{Xy}_p$ in *Che. cribraria*, with exception of one representative from the Ponta Grossa population that exhibited $2n=10\text{II} + \text{Xy}_r$ and $2n=20\text{II} + \text{Xy}_p$ in *Paraselenis flava* (Figs. 4d – g) (Table 2). Pachytene cells revealed sex chromosomes highly condensed and positively heteropycnotic (Figs. 4b – c). In the diplotene nuclei of only one representative of *Che. cribraria* from Ponta Grossa, the sex chromosomes were associated in a typical rod configuration, being classified as Xy_r . In *B. tessellata*, the others *Che. cribraria* specimens and *P. flava*, the sex chromosomes exhibited a parachute association. Additionally, the analysis of diplotene cells showed more than two bivalents with two chiasmata in *B. tessellata*, one bivalent with two chiasmata in *Che. cribraria* and *P. flava* (Figs. 4d, 4f – g), and bivalents with one chiasma in the specimen of *Che. cribraria* from Ponta Grossa (Fig. 4e). Metaphase II cells of *B. tessellata*, *Che. cribraria* and *P. flava* revealed haploid sets in agreement with the meioformula verified in meiosis I and exhibited meta/submetacentric chromosome morphology (Figs. 4h – j) (Table 2).

Cells of the 13 Cassidinae species investigated here were submitted to the C-banding technique and subsequently stained with DAPI. In Cassidini, the chromosome of all species exhibited positive C-bands (Table 2). In *A. inedita*, *D. cruciata* and *M. optata*, heterochromatic blocks were observed in the pericentromeric region of all chromosomes, with exception of the y chromosome of the three species that was totally heterochromatic (Figs. 5a – b; 5g – h; 5k – l). In *Cha. sexpunctata*, the pericentromeric region of pairs 1, 3, 4 and 6 showed constitutive heterochromatin, but in the 6th pair the C-band was tenuous; additionally the y chromosome was totally heterochromatic (Figs. 5e – f). In the three other Cassidini species, the heterochromatic bands were very tenuous. In *Cha. immaculata*, the positive C-bands were localized in the pericentromeric region of pairs 2, 4, 6, 7, 8, terminal region of six autosomal

pairs, and interstitial region of the short arm of pair 9 and long arm of pair 10. The X chromosome showed interstitial C-band in both arms and y chromosome was totally heterochromatic (Figs. 5c – d). In *M. aciculata*, the constitutive heterochromatin occurred in the pericentromeric regions of pairs 1, 2, 3, 4, 7 and y chromosome; an additional band was also verified in the long arm terminal region of pair 1 (Figs. 5i – j). In *M. quadrata*, the heterochromatic bands were localized in the pericentromeric region of five autosomal pairs and X chromosome, terminal region of four autosomal pairs, and the y chromosome was heterochromatic (Figs. 5m – n).

Chlamydocassis cribripennis and *Cis. obducta*, belonging to the tribes Goniocheniini and Ischryrosonochini, respectively, showed C-bands in the pericentromeric region of all chromosomes, except the y chromosome of both species, that was totally euchromatic (Figs. 6a – d) (Table 2). Additionally, most chromosomes of Mesomphaliini species, *B. tessellata*, *Che. cribraria* and *S. redtenbacheri*, exhibited constitutive heterochromatin in the pericentromeric region. The C-bands were absent in three autosomal bivalents and X chromosome of *Che. cribraria* (Figs. 6i – j). Furthermore, the y chromosome of all specimens of *Che. cribraria* was totally heterochromatic. In *P. flava*, the constitutive heterochromatin was localized only in the short arm of the last autosomal pair (Figs. 6k – l).

Table 2. Cytogenetic information of Cassidinae species analyzed in the present work: diploid number in males (2n), sex chromosome system (SCS), chromosome morphology, size of the autosomes and distribution of constitutive heterochromatin.

Species	Karyotype			Constitutive heterochromatin	
	2n and SCS	Chromosomal morphology	Autosomal size	Chromosome	Localization
Cassidini					
<i>Agroiconota inedita</i>	40 = 38+X _{Yp}	12M+24SM+2ST+XST	Pairs 1-18GD; pair 19S	Pairs 1-18, X and y	P
<i>Charidotella immaculata</i>	22 = 20+X _{Yp}	18M+2SM+XM	GD	Pairs 2, 4, 6, 7, 8, 9 and 10	P/T/I
<i>Charidotella sexpunctata</i>	22 = 20+X _{Yp}	18M+2SM+XM	GD	Pairs 1, 3, 4, 6 and y	P
<i>Deloyala cruciata</i>	18 = 16+X _{Yp}	12M+4SM+XM	GD	Pairs 1 – 8, X and y	P
<i>Microctenochira aciculata</i>	18 = 16+X _{Yp}	10M+6SM+XM	Pair 1L; pairs 2-7 GD	Pairs 1, 2, 3, 4, 7 and y	P/T
<i>Microctenochira optata</i>	18 = 16+X _{Yp}	12M+4SM+XM	GD	Pairs 1 – 8, X and y	P
<i>Microctenochira quadrata</i>	18 = 16+X _{Yp}	12M+4SM+XM	GD	Pairs 1, 2-8, X and y	P/T
Goniocheniini					
<i>Chlamydocassis cribripennis</i>	32 = 30+X _{Yp}	26M+2SM	GD	15 bivalents and X	P
Ischyrosomychini					
<i>Cistudinella obducta</i>	18 = 16+X _Y *	12M+4SM+XM+yM	GD	Pairs 1 – 8 and X	P
Mesomphaliini					
<i>Botanochara tessellata</i>	36 = 34+X _{Yp}	10M+6SM	Pair 1-3L/ 4-7M/ 8-16S	17 bivalents, X and y	P
<i>Chelymorpha cribraria</i>	22 = 20+X _{Yp}	7M+3SM+XM	GD	7 bivalents and y	P
<i>Chelymorpha cribraria</i>	22 = 20+X _{Yr}	-	-	7 bivalents and y	P
<i>Paraselenis flava</i>	42 = 40+X _{Yp}	14M+6SM+XM	GD	Pair 20	I
<i>Stolas redtenbacheri</i>	26 = 24+X _Y	22M+2SM+XM	Pairs 1L; pairs 2-12M	Pairs 1 – 12, X and y	P

M= metacentric; SM= submetacentric; ST= subtelocentric; GD= gradually decreased in size; S= small; L = large; M = medium; P= pericentromeric region; I= interstitial region; T= telomeric region. *Probably X_{Yp} sex chromosome system.

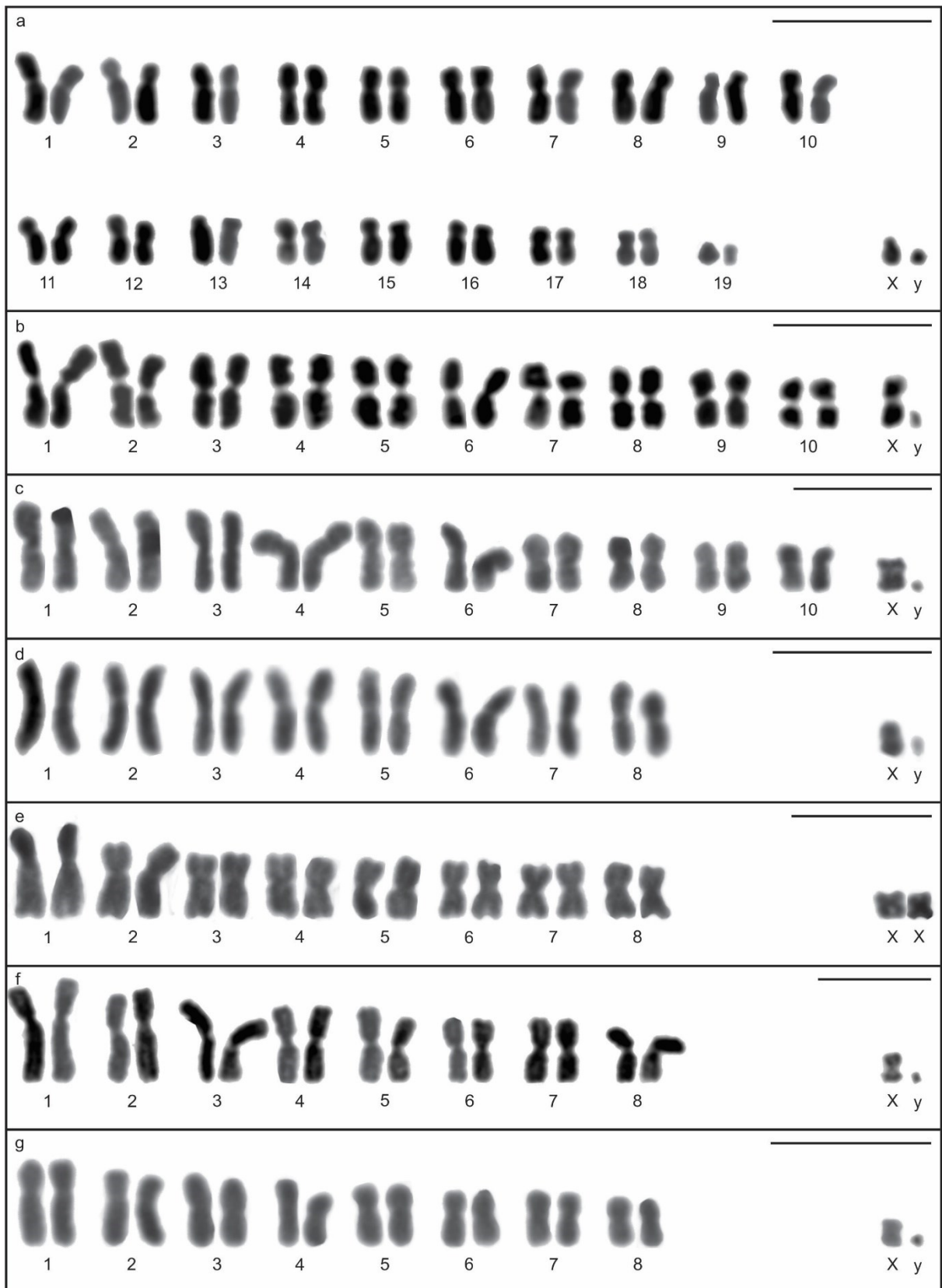


Figure 1. Karyotypes of seven Cassidini species stained with Giemsa. a. *Agroiconota inedita* with $2n \text{ ♂} = 38 + Xy_p$. b-c. *Charidotella immaculata* and *Charidotella sexpunctata*, respectively, with $2n \text{ ♂} = 20 + Xy_p$. d. *Deloyala cruciata*, $2n \text{ ♂} = 16 + Xy_p$. e. *Microtenochira aciculata*, $2n \text{ ♀} = 16 + XX$. f-g. *Microtenochira optata* and *Microtenochira quadrata*, respectively, with $2n \text{ ♂} = 16 + Xy_p$. Scale bar = $10\mu\text{m}$.

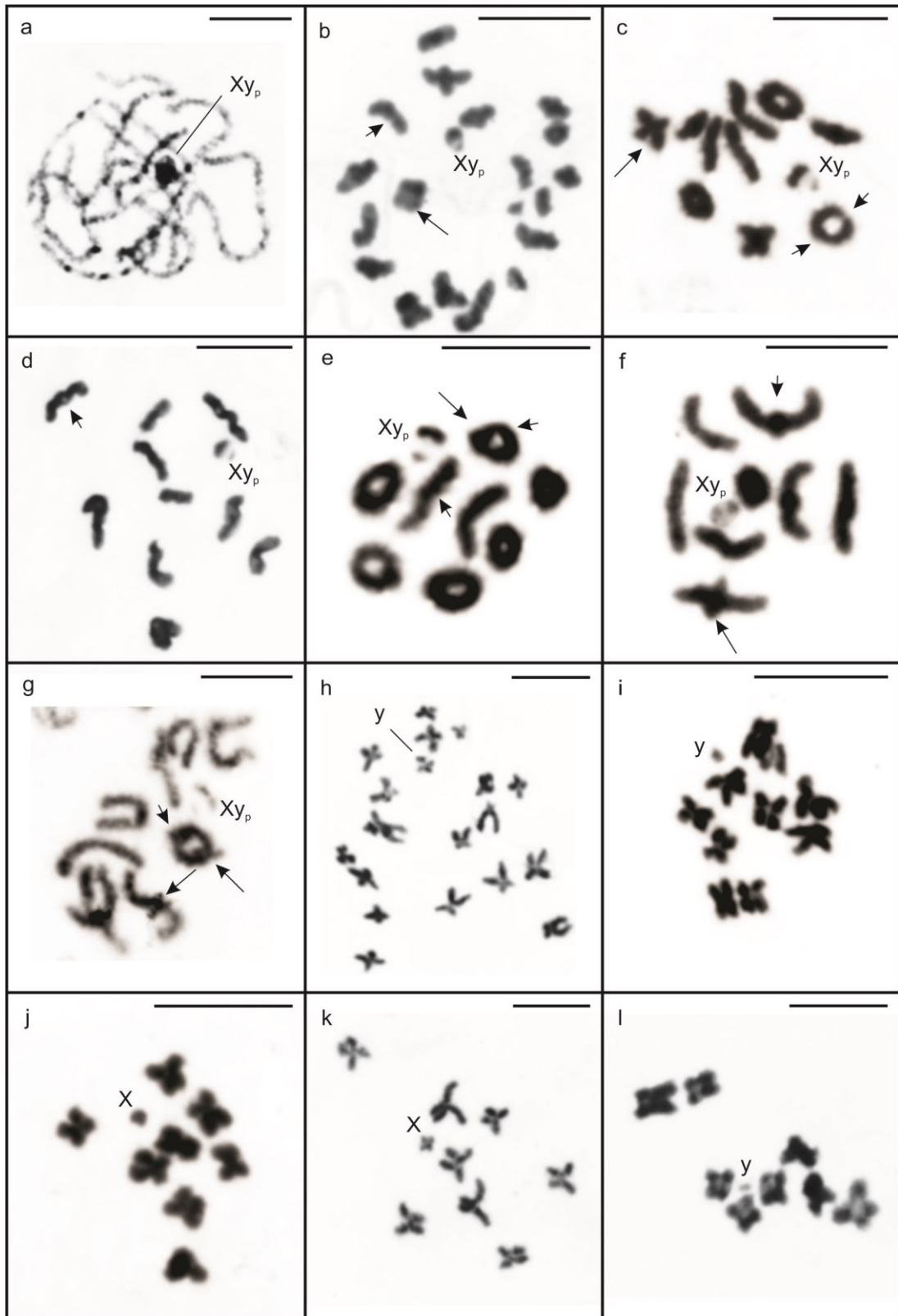


Figure 2. Testicular cells of Cassidini species after Giemsa staining. a, b, h. *Agroiconota inedita*. c, i. *Charidotella immaculata*. d. *Charidotella sexpunctata*. e, j. *Deloyala cruciata*. f. *Microctenochira aciculata*. g, k. *Microctenochira optata*. l. *Microctenochira quadrata*. a. Pachytene. b – g. Diplotene nuclei with $2n = 19\text{II} + \text{Xy}_p$ (b), $2n = 10\text{II} + \text{Xy}_p$ (c, d), $2n = 8\text{II} + \text{Xy}_p$ (e, f, g). Large arrow=interstitial chiasma. Small arrow= terminal chiasma. h – l. Metaphase II cells with $n = 19 + y$ (h), $n = 10 + y$ (i), $n = 8 + X$ (j, k), $n = 8 + y$ (l). Scale bar = $10\mu\text{m}$.

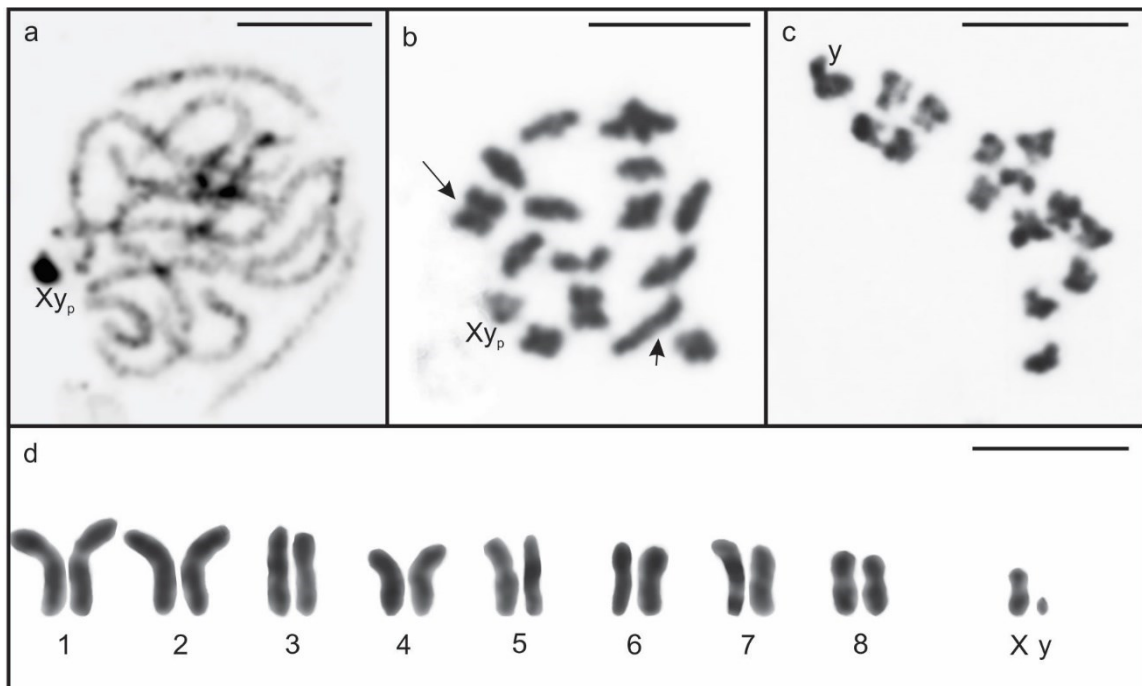


Figure 3. Testicular cells of *Chlamydocassis cribripennis* (a-c) and *Cistudinella obducta* (d), standard stained with Giemsa. a. Pachytene. b. Diplotene with $2n = 15II + Xy_p$. Large arrow= interstitial chiasma. Small arrow= terminal chiasma. c. Metaphase II with $n = 15 + y$. d. Karyotype with $2n \text{ ♂} = 16 + Xy$. Scale bar $10 = \mu\text{m}$.

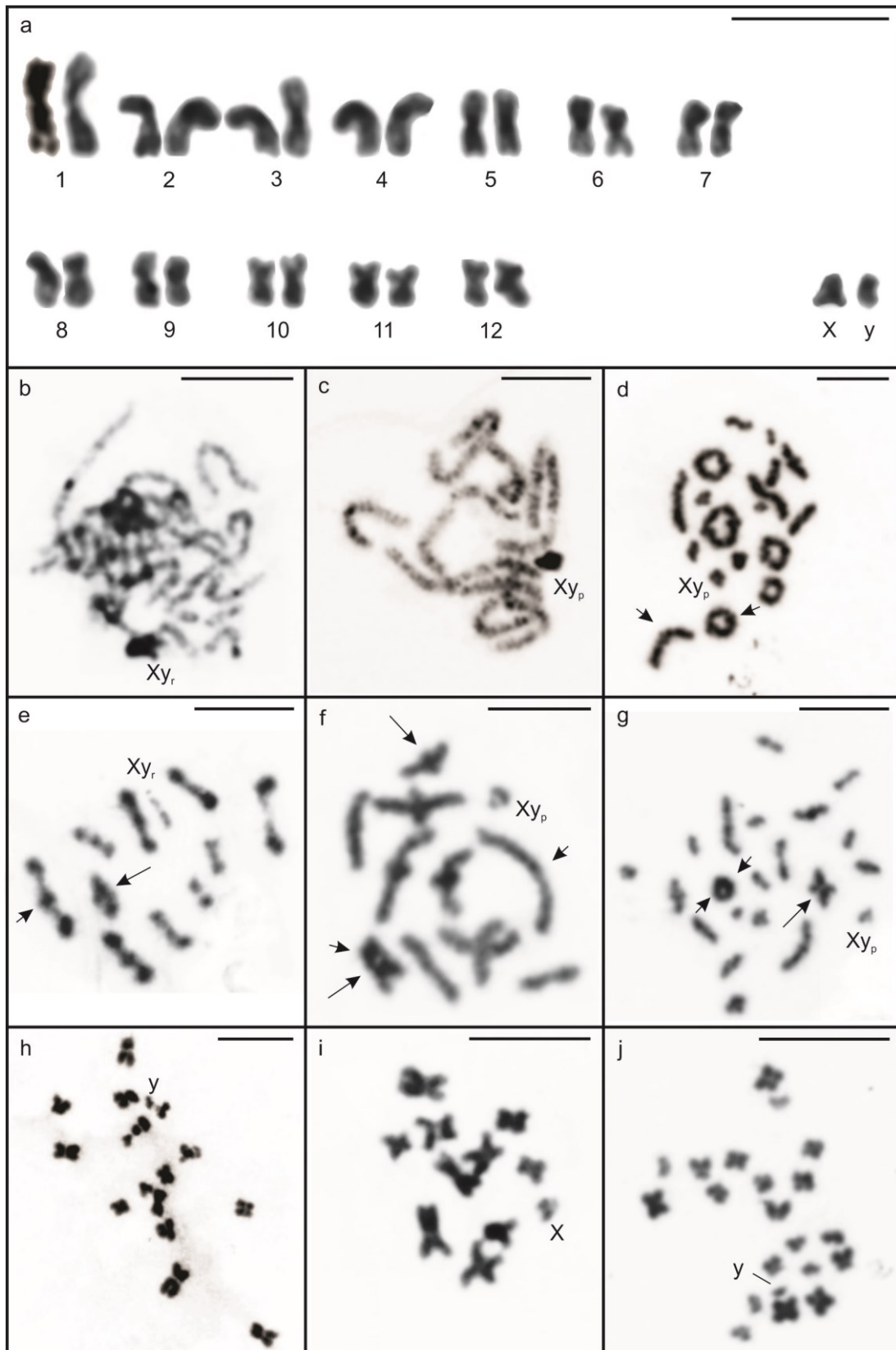


Figure 4. Karyotype of *Stolas redtenbacheri* (a) and prophase I cells of *Chelymorpha cribraria* ($2n=10\text{II} + \text{Xy}_r$) (b, e), *Chelymorpha cribraria* ($2n= 10\text{II} + \text{Xy}_p$) (c, f, i), *Botanochara tessellata* (d, h), and *Paraselenis flava* (g, j), stained with Giemsa. a. Karyotype with $2n \text{ ♂} = 24 + \text{Xy}$. b, c. Pachytene. d – g. Diplotene nuclei with $2n = 17\text{II} + \text{Xy}_p$ (d), $2n = 10\text{II} + \text{Xy}_r$ (e), $2n = 10\text{II} + \text{Xy}_p$ (f), $2n = 20\text{II} + \text{Xy}_p$ (g). h – j. Metaphase cells II with $n = 17 + y$ (h), $n = 10 + \text{X}$ (i) $n = 20 + y$ (j). Large arrow = interstitial chiasma. Small arrow = terminal chiasma. Scale bar = $10\mu\text{m}$.

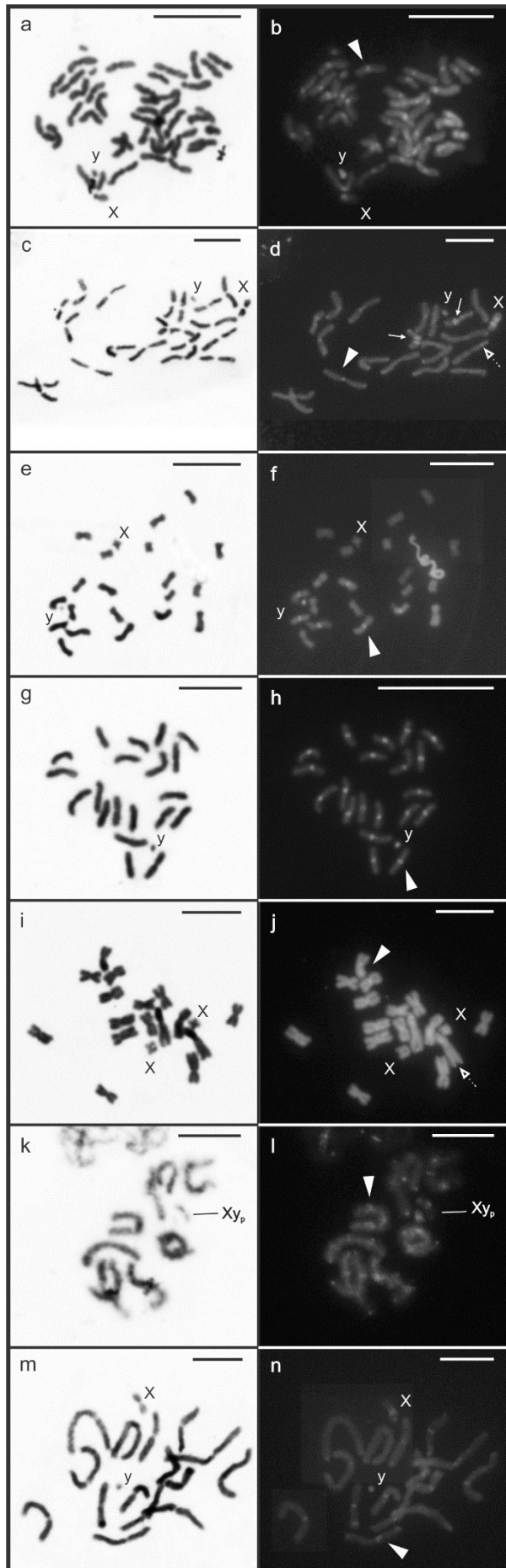


Figure 5. Distribution of constitutive heterochromatin in mitotic and meiotic cells of seven Cassidini species, submitted to the Giemsa staining (a, c, e, g, i, k, m) and C-banding technique (b, d, f, h, j, l, n). a, b. *Agroiconota inedita*. c, d. *Charidotella immaculata*. e, f. *Charidotella sexpunctata*. g, h. *Deloyala cruciata*. i, j. *Microctenochira aciculata*. k, l. *Microctenochira optata*. m, n. *Microctenochira quadrata*. Arrowhead = pericentromeric C-band. Small arrow = interstitial C-band. Dotted arrow = terminal C-band. Scale bar = 10μm.

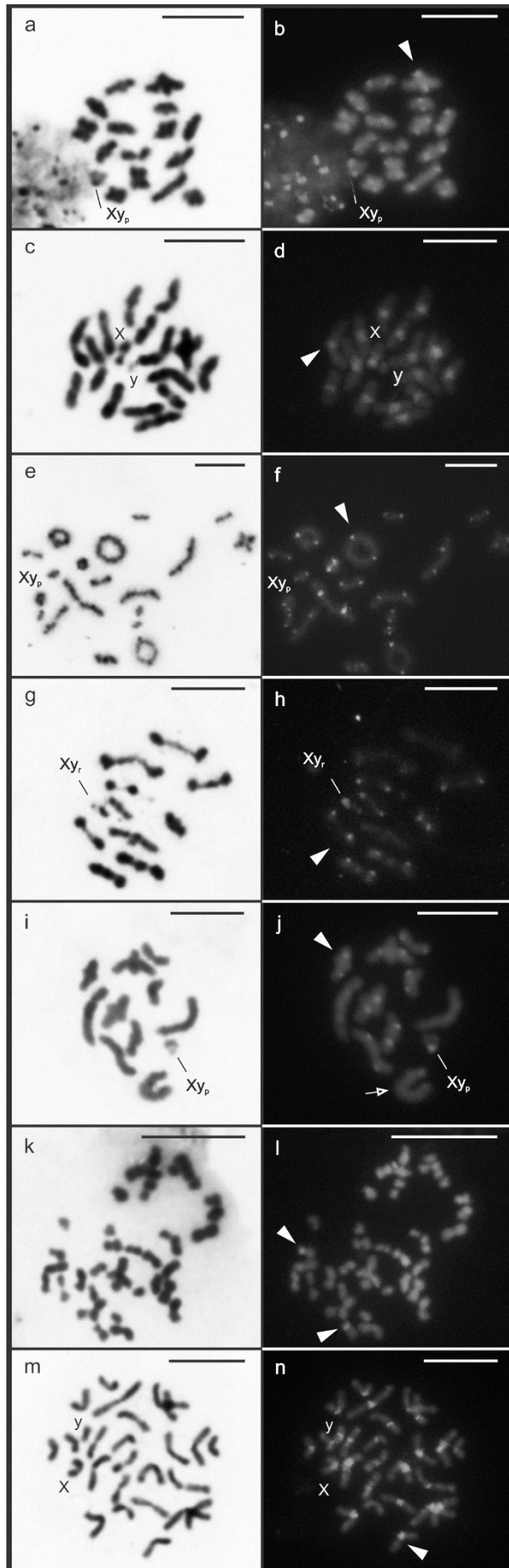


Figure 6. Distribution of constitutive heterochromatin in testicular cells of Goniocheniini Ischyrosonochini and Mesomphaliini species, stained with Giemsa (a, c, e, g, i, k, m) and submitted to the C-banding technique (b, d, f, h, j, l, n). a, b. *Chlamydocassis cribripennis*. c, d. *Cistudinella obducta*. e, f. *Botanochara tessellata*. g, h. *Chelymorpha cribraria* $2n = 10II + Xy_r$. i, j. *Chelymorpha cribraria* $2n = 10II + Xy_p$. k, l. *Paraselenis flava*. m, n. *Stolas redtenbacheri*. Arrowhead = pericentromeric C-band. Small arrow = interstitial C-band. Dotted arrow = terminal C-band. Scale bar = $10\mu m$.

DISCUSSION

Cassidinae is known as a subfamily with conserved karyotype, however, among the nine species herein analyzed for the first time, five exhibited karyotype formula different from $2n=16+X_{yp}$. The tribe Cassidini, which was considered as a monophyletic group by Chaboo (2007), includes 16% of the diversity of species of the subfamily (around 1000 species), but only 55 species, belonging to 16 genera, were cytogenetically studied (De Julio et al. 2010). Although this number is small when compared to the total of known species, Cassidini is the tribe with the majority of cytogenetic information for the subfamily. Among these species, 36 exhibited the diploid number $2n=18$ and the sex chromosome system of the X_{yp} type (This work; De Julio et al. 2010). Additionally, in Cassidini, approximately 60% of the studied species are included in the genus *Cassida*, however, the karyotype $2n=16+X_{yp}$ also occurs in other 12 genera, including *Microctenochira* (present work). This data reveals that these karyotype characteristics are shared among the species of Cassidini and may correspond to an ancestral condition for the tribe. However, this idea will be only confirmed after a phylogenetically reconstruction for the Cassidini. The karyotype changes, when occur, are related to the increase in diploid number, as observed in 18 species of eight distinct genera. Among these genera, three had only one species investigated (*Chirida*, *Hypocassida* and *Oocassida*), and among the other, only *Agroiconota* and *Charidotella* presented karyotype with diploid number higher than $2n=18$ for all species (present work; for review see De Julio et al. 2010).

The tribe Goniocheniini, with five genera and 30 species taxonomically recognized, has not had its monophyly tested (Chaboo, 2007). The available results for two species of this tribe, *Chlamydocassis metallica* (Vidal, 1984) and *Chl. cribripennis*, revealed similarities in the diploid number $2n=32$ and X_{yp} sex chromosome system. However, investigation of representatives of other genera not yet analyzed is of utmost importance to verify if the high diploid number is a characteristic of this tribe or if it is restricted to representatives of the genus *Chlamydocassis*.

The tribe Ischyrosonychini, with seven genera and 68 species (Borowiec & Swietojska, 2015), did not have representatives cytogenetically studied. Data found for *Cis. obducta* in this work showed karyotype characteristics similar to the majority of Cassidini species and to other related tribes which were also considered by Chaboo (2007) as monophyletic.

Mesomphaliini is the third largest tribe of Cassidinae in relation to diversity, including 25 genera distributed in 526 species. Nevertheless, Chaboo (2007) did not recover the

monophyly of this tribe; this result seems to be consistent with chromosomal information, once Mesomphaliini evidences the highest karyotype heterogeneity among the Cassidinae beetles. This heterogeneity includes different sex chromosome system, as observed in this work in one representative of *Che. cribraria* from a population of Ponta Grossa, state of Paraná, Brazil, that exhibited the system Xy_r different from that observed in the representatives from Rio Claro and Saltinho, that was Xy_p . This difference was also observed in the genus *Botanochara*, where the systems can vary inside one species, e.g. *B. bonariensis* with $X_pneoXneoY_p$, $neoX_pneoY_p$, $neoX_{p1}neoX_{p2}neoXneoY_p$, $X_{p1}X_{p2}neoXneoY$ (Mazzella & Panzera, 1983; Panzera et al. 1983; Postiglioni et al. 1990; Stolar & Bidau, 1997). The simple sex chromosome system of the Xy_p type is being described here in *B. tessellata* for the first time for the genus, corroborating the hypothesis that the multiple systems were originated from the original sex chromosomes of the Xy_p system by centric fission and/or translocation between sex chromosomes and autosomes (Smith & Virkki, 1978).

The Xy_r sex chromosome system observed in one representative of *Che. cribraria* had not been registered for the tribe Mesomphaliini, occurring in only one species of Cassidinae, *Lacoptera (Lacopteroidea) nepalensis* (tribe Aspidimorphini). In *Che. cribraria* as well *L. (L.) nepalensis* the Xy_r system occurred as an interpopulational variation of the Xy_p system (Dey, 1986). In Coleoptera as a whole, the Xy_r sex chromosome system is rare, having been observed in last than 2% of the species chromosomally described of the families Carabidae, Buprestidae, Chrysomelidae, Coccinellidae, Hydrophilidae, Lucanidae, Meloidae, Scarabaeidae and Tenebrionidae (Blackmon & Demuth, 2015). The origin of the Xy_r systems seems to be related to processes of heterochromatization and inversions of the sex chromosomes of the neoXY system (Smith, 1952; Smith & Virkki, 1978). Nevertheless, in *Che. cribraria* the y_r chromosome can have a different origin, from the Xy_p system, considering that there are no registers of the neoXY system for the genus, as well as for other species of Mesomphaliini. One hypothesis is that the y_r chromosome was originated from the y_p through the adding of heterochromatic material, what led to the increase in size and modification in the association with the X chromosome during meiosis I.

Additionally, the results found in *P. flava* and *S. redtenbacheri* increase even more the diversity of karyotypes in Mesomphaliini, once $2n=40+Xy_p$ and $2n=24+Xy_p$ had not been verified for this tribe. The five species of the tribe Cassidini (*A. inedita*, *Cha. immaculata*, *Cha. sexpunctata*, *D. cruciata*) that had already been cytogenetically studied and are being analyzed in this work, exhibited karyotype characteristics similar to those previously described (Vidal, 1984; Virkki et al. 1992; De Julio et al. 2010). The exception was *A. inedita* which presented

$2n=38+Xy_p$, differing from the $2n=40+Xy_p$ recorded by De Julio et al. (2010) for a population from Rio Claro, state of São Paulo, Brazil. Intraspecific variations involving one autosomal pair are not rare among the cassidines, being registered for two species of the tribe Aspidimorphini and three of the tribe Cassidini (Nowlin, 1906; Geitler, 1940; Smith, 1960; Yadav, 1973; Yadav & Pillai, 1975; Petitpierre, 1977, 1985, 1988; Yadav et al. 1987, 1995; Gill et al. 1987; Virkki et al. 1992). In *A. inedita*, this variation in diploid number can have occurred by chromosomal fissions or fusions, which did not involve the last autosomal pair; this last pair remains small-sized and similar in the population analyzed by De Julio et al. (2010) and in this work.

The study of meiotic cells in Coleoptera is very important to determine the type of sex chromosome system, considering that the association of the chromosomes in the meiosis can vary, allowing, for example, to differentiate systems of the Xy_p and Xy_r types. Due to the absence of cells in prophase I of *Cis. obducta* (Ischyrosomychini) and *S. redtenbacheri* (Mesomphaliini), the sex chromosome system was classified only as of the Xy type. However, it is probable that these species have different systems, because in *Cis. obducta* the y chromosome was extremely small, such as of a Xy_p system, and in *S. redtenbacheri*, the y had a small size in relation to the other elements of the karyotype, but similar to the X chromosome. This last result reinforces the great diversity of sex chromosome systems for Mesomphaliini species.

In Cassidinae, the behavior of the bivalents during meiosis was similar to that observed in most species of Coleoptera (Smith & Virkki, 1978), i.e., autosomal bivalents totally synapsed and with one terminal or interstitial chiasma, and sex chromosomes highly condensed and with positive heteropycnosis in early prophase I. However, four species, *D. cruciata* (Cassidini), *B. tessellata*, *Che. cribraria* and *P. flava* (Mesomphaliini) exhibited variable number of bivalents with two chiasmata. Bichiasmatic bivalents have already been observed in two species of Cassidinae, which belong to the genus *Chalepus* (Chalepini) and *Octotoma* (Uroplatini) and have distinct diploid number, $2n=16+Xy_p$ and $2n=18+Xy_p$, respectively (Yadav & Pillai, 1974; Virkki et al. 1992). It is interesting to outline that in the cassidines here examined, differences regarding the presence of bivalents with one or two chiasmata were observed in species with very similar karyotypes (*D. cruciata* and *M. optata*), indicating that this characteristic can be an additional criteria to distinguish species. Additionally, this result demonstrated that although the macro karyotype structure is similar, the organization of the genome and/or the controlling factors of the genetic recombination can differ among these species, which could constitute a selective factor and/or a genetic barrier. Pinho & Hey (2010) suggested that the efficiency of the genetic isolation among different populations can be related to the suppression of

recombination. Among the species of Mesomphaliini, bichiasmatic bivalents appeared in species with very distinct diploid numbers, such as *B. tessellata* with $2n=36$, *Che. cribaria* $2n=22$, and *P. flava* with $2n=42$. This data shows that at least among the representatives of this tribe, the presence of bivalents with two chiasmata is not more frequent in species with lower diploid number, whose karyotypes were originated by chromosomal fusions, as suggested by Schneider et al. (2007) for other families of beetles (Elateridae, Lampyridae and Melyridae).

The distribution of constitutive heterochromatin has been described for different families and subfamilies of Coleoptera, in which the C-bands are generally located in the pericentromeric region of the autosomal chromosomes (Vidal et al. 1977; Virkki, 1983; Juan & Petitpierre, 1989; Rozek & Lachowska, 2001; Zacaro et al. 2004; Bione et al. 2005; Almeida et al. 2009). The chromosomes of Chrysomelidae also exhibited this pattern (Virkki, 1983; Almeida et al. 2006, 2009; Mello et al. 2014), but with low amount of heterochromatin when compared to other groups, as Elateridae and Tenebrionidae (Juan & Petitpierre, 1989; Rozek et al. 2004; Schneider et al. 2006). In the subfamily Cassidinae, this is the first study on the distribution of constitutive heterochromatin. The 13 species analyzed showed similar pattern of pericentromeric bands, but with variations related to the number of autosomes with constitutive heterochromatin, the intensity of the bands, the presence in telomeric and interstitial regions, and the occurrence in the sex chromosomes. These C-bands variations occurred even in species of the same genus and with similar karyotypes, such as *Cha. immaculata* and *Cha. sexpunctata*, *M. optata* and *M. quadrata*. In Cassidinae, changes in the distribution of constitutive heterochromatin may have been responsible for the karyotype differentiation, considering that the heterochromatin can act in the gene regulation and control of the functioning of certain chromosomal regions (Henikoff, 2000). Furthermore, it is still possible that species that showed the same C-band pattern, as *D. cruciata* and *M. optata*, may differ in the molecular constitution of the heterochromatin, such as verified in three species of *Omophoita* (Alticinae) and in two species of *Deltochilum* (Scarabaeidae) (Cabral-de-Mello et al. 2010; Mello et al. 2014).

The data obtained in this work and those available in the literature revealed that the diploid number $2n=18$ is not conserved in all tribes of Cassidinae, occurring only with high frequency in Cassidini. The karyotype uniformity previously reported in some species and/or tribes is challenged by the almost species-specific pattern of constitutive heterochromatin found in this study. The Xy_p sex chromosome system is present in most species and could be a shared characteristic among all tribes, including Mesomphaliini, in which a variety of derived sex chromosomes systems has been observed.

Acknowledgments

This research was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP (2011/21643-1; 2012/12619-2). FRF was supported by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq (302416/2013-7).

REFERENCES

- Alegre C. & Petitpierre E. 1984: Karyotypic analyses in four species of Hispinae (Coleoptera: Chrysomelidae) – *Zool. Anz.* **212**: 329-336.
- Almeida M.C., Zacaro A.A. & Cella D. 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**: 47–157.
- Almeida M.C., Campaner C. & Cella D.M. 2006: Karyotype characterization, constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions of *Paranaita opima* (Coleoptera, Chrysomelidae, Alticinae) – *Genet. Mol. Biol.* **29**: 475–481.
- Almeida M.C., Campaner C. & Cella D.M. 2009: Cytogenetics of four *Omophoita* species (Coleoptera, Chrysomelidae, Alticinae): A comparative analysis using mitotic and meiotic cells submitted to the standard staining and C-banding technique. - *Micron.* **40**: 586–596.
- Bione, E., Camparoto M.L. & Simões Z.L.P. 2005: A study of the constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions of *Isocopriss inhiata* and *Diabroctis mimas* (Coleoptera: Scarabaeidae, Scarabaeinae) using C-banding, AgNO₃ staining and FISH techniques. – *Genet. Mol. Biol.* **28**: 111–116.
- Blackmon H. & Demuth J.P. 2015: "Coleoptera Karyotype Database." *The Coleopterists Bulletin* **69.1**: 174-175.
- Borowiec L. & Swietojanska J. 2015: Referências Bibliográficas de documento eletrônico. Polônia. *Cassidines of the world an interactive manual (Coleoptera: Chrysomelidae)*. Available in: <http://biol.uni.wroc.pl/cassidae/katalog%20internetowy/index.htm>.

- Cabral-de-Mello D.C., Moura R.C., Carvalho R. & Souza M.J. 2010: Cytogenetic analysis of two related *Deltochilum* (Coleoptera, Scarabaeidae) species: Diploid number reduction, extensive heterochromatin addition and differentiation. – *Micron*. **41**: 112-117.
- Chaboo C.S. 2007: Biology and phylogeny of the Cassidinae Gyllenhal sensu lato (tortoise and leaf-mining beetles) (Coleoptera: Chrysomelidae). – *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* No. 305, 250 pp.
- Charlesworth B., Sniegowski O. & Stephan W. 1994: The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. – *Nature*. **371**: 215–220.
- Chen S. 1964: Evolution and classification of the Chrysomelid beetles. – *Acta Entomol. Sinica*. **13**: 469–483.
- Chen, S. 1973: The classification of the leaf beetles. – *Acta Entomol. Sinica*. **16**: 47–56.
- De Julio M., Fernandes F.R., Costa C., Almeida M.C. & Cella D.M. 2010: Mechanisms of karyotype differentiation in Cassidinae *sensu lato* (Coleoptera, Polyphaga, Chrysomelidae) based on seven species of Brazilian fauna and an overview of the cytogenetic data. – *Micron*. **41**: 26-28.
- Dey S.K. 1986: A study of chromosomes in two species of Cassidinae (Coleoptera, Chrysomelidae). – *Chromosome Inf. Serv.* **41**: 26-29.
- Geitler L. 1940: Neue Untersuchungen über Bau und Wachstum des Zellkerns in Geweben. – *Naturwiss.* **16**: 242-248.
- Gill T.K., Mittal O.P. & Bhatia N. 1987: A karyological study in four species of Indian chrysomelids. – *Kromosomo*. **47-48**: 1533-1537.
- Gómez-Zurita J., Hunt T. & Vogler A.P. 2008: Multilocus ribosomal RNA phylogeny of the leaf beetles (Chrysomelidae). – *Cladistics*. **24**: 34-50.
- Henikoff S. 2000: Heterochromatin function in complex genomes. – *Biochim. Biophys. Acta*. **1470**: 1-8.

- Juan C. & Petitpierre E. 1989: C-banding and DNA content in seven species of Tenebrionidae (Coleoptera). – *Genome*. **32**: 834-839.
- Kacker R.K. 1976: Studies on the chromosomes of Indian Coleoptera IV. Chromosome number and sex-determining mechanisms in 15 species Coleoptera. - *Newsl. Zool. Surv. India*. **2**: 48-49.
- Levan A., Fredga K. & Sandberg A. A. 1964: Nomenclature for centromeric position on chromosomes. – *Hereditas*. **52**: 201–220.
- Mazzella M.C. & Panzera F. 1983: Estudio citogenetico de tres especies de Casidinos (Coleoptera, Chrysomelidae). – *Bol. Soc. Zool.* **1**: 85-92.
- Mello L.R.A., Tasior D., Goll L.G., Artoni R.F., Vicari M.R., Nogaroto V. & Almeida M.C. 2014: Physical map of repetitive DNA and karyotype evolution in three species of the genus *Omophoita* (Coleoptera: Alticinae). – *Ital. J. Zool.* **81**: 16–24.
- Nowlin W.N. 1906: A study of the spermatogenesis of *Coptocycla aurichalcea* and *Coptocycla guttata*, with special reference to the problem of sex-determination. - *The J. Exp. Zool.* **3**: 583-602.
- Panzera F., Mazzella M.C. & De Vaio E.S. 1983: Cytological studies on three species of neotropical cassidinae (Coleoptera, Chrysomelidae). – *Genetica*. **62**: 62-68.
- Petitpierre E. 1977. A chromosome survey of five species of Cassidinae (Coleoptera, Chrysomelidae). – *Cytobios*. **18**: 135-142.
- Petitpierre E. 1985: New chromosomal findings on the Cassidinae (Coleoptera, Chrysomelidae). - *Chromosome Inf. Serv.* **39**: 19-21.
- Petitpierre E. 1988: Cytogenetics, cytotaxonomy and genetics of Chrysomelidae. In Jolivet P., Petitpierre E. & Hsiao T. H. (eds.): *Biology of Chrysomelidae*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 131-159.

Pinho C. & Hey J. 2010: Divergence with gene flow: models and data. – *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **41**: 215-230.

Postiglioni A., Mazzella M.C., Panzera F., Da Silva A., Ponce de León, R., Vasina L.K. & Scvortzoff E. 1990: Sex chromosomes of Neotropical Coleoptera from Uruguay. – *Nucleus*. **33**: 25-30.

Reid C.A.M. 1995: A cladistic analysis of subfamilial relationships in the Chrysomelidae *sensu lato* (Chrysomeloidea). In: Pakaluk J. & Slopinski S.A. (eds.): *Biology, Phylogeny and Classification of Coleoptera: papers celebrating the 80th birthday of Roy A. Crowson*. Muzeum i Instytut Zoologii PAN, Warszawa, pp. 559-631.

Rozek M. & Lachowska D. 2001: C-bands on chromosomes of four beetle species (Coleoptera: Carabidae, Silphidae, Elateridae, Scarabaeidae). – *Folia Biol. (Krakow)* **49**: 179-182.

Rozek M., Lachowska D., Petitpierre E. & Holecova M. 2004: C-bands on chromosomes of 32 beetle species (Coleoptera: Elateridae, Cantharidae, Oedemeridae, Cerambycidae, Chrysomelidae and Curculionidae). – *Hereditas*. **140**: 1–10.

Saha A.K. 1973: Chromosomal studies of the Indian Coleopterans (Indian Beetles). – *Cytologia*. **38**: 363-373.

Saha A.K. & Manna G.K. 1971: Cytological investigations of Indian Coleopteran Insects. In: *Proc. 58th Indian Sci. Cong.* 4. p. 20.

Schneider M.C., Artoni R.F. & Almeida M.C. 2002: Cytogenetic analysis of 3 populations of *Diabrotica speciosa* (Chrysomelidae, Galerucinae): Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions. – *Cytologia*. **67**: 281-287.

Schneider M.C., Almeida M.C., Rosa S.P., Costa C. & Cella D.M. 2006: Evolutionary chromosomal differentiation among four species of *Conoderus* Eschscholtz, 1829 (Coleoptera, Elateridae, Agrypninae, Conoderini) detected by standard staining, C-banding, silver nitrate impregnation, and CMA₃/DA/DAPI staining. – *Genetica*. **128**: 333–346.

- Schneider M.C., Rosa S.P., Almeida M.C., Costa C. & Cella D.M. 2007: Chromosomal similarities and differences among four Neotropical Elateridae (Conoderini and Pyrophorini) and other related species, with comments on the NOR patterns in Coleoptera. – *J. Zool. Syst. Evol. Res.* **45**: 308–316.
- Seeno T.N. & Wilcox J.A. 1982: Leaf beetle genera. – *Entomography*. **1**: 1–221.
- Sharma G.P. & Sood V.B. 1978: Chromosome number and sex-determining mechanism in 30 species of Chrysomelidae. – *Natl. Acad. Sci. Lett.* **1**: 351–352.
- Smith S.G. 1952: The evolution of heterochromatin in the genus *Tribolium* (Tenebrionidae: Coleoptera). – *Chromosoma*. **4**: 585–610.
- Smith S.G. 1960: Chromosome number of Coleoptera II. – *Can. J. Genet. Cytol.* **2**: 66–88.
- Smith S.G. & Virkki N. 1978: *Animal Cytogenetic*, v.3, Insecta 5. Coleoptera. Gebruder Borntraeger, Berlin.
- Sood V.B. 1978: Meiosis in seven species of Chrysomelidae (Insecta: Coleoptera). In: *Proc. 65th Indian Sci. Congr.* **3**. p. 239.
- Stephens J.F. 1829: *A systematic catalogue of British insects: being an attempt to bring all the hitherto discovered indigenous insects in accordance with their natural affinities containing also the references to every English writer on entomology, and to the principal foreign authors. With all the published British genera to the present time.* Baldwin and Cradock, London, v. 416, 388 pp.
- Stolar C.E. & Bidau C.J. 1997: Chromosomal multiformity in *Botanochara bonariensis* (Coleoptera, Chrysomelidae, Cassidinae). – *Rev. Bras. Genet.* **20**:193–196.
- Sumner A.T. 1972: A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. – *Exp. Cell Res.* **75**: 304–306.

Sumner A.T. 1992: Chromosome banding: Methods, myths, and misconceptions. – *Cell*. **68**: 1005-1006.

Suzuki K. 1988: Comparative morphology of the internal reproductive system of the Chrysomelidae (Coleoptera). In Jolivet P., Petitpierre E. & Hsiao T.H. (eds): *Biology of the Chrysomelidae*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston and London pp. 317–355.

Vidal O.R. 1984: Chromosome numbers of Coleoptera from Argentina. – *Genetica*. **65**: 235-239.

Vidal O.R., Giacomozzi R.O. & Riva R. 1977: Los cromossomas de la subfamilia Dynastinae (Coleoptera, Scarabaeidae). I. Inversión pericéntrica en *Diloboderus abderus* (Sturm) 1862. – *Physis*. **37**: 303-309.

Virkki N. 1983: Banding of *Oedionychina* (Coleoptera, Alticinae) chromosomes. C- and Ag-bands. – *J. Agr. U. Puerto Rico*. **67**: 221-255.

Virkki N., Santiago-Blay J.A. & Riley E.G. 1992: Chromosomes of Puerto Rican Hispinae and Cassidinae (Coleoptera: Chrysomelidae). – *Coleop. Bull*. **46**: 29-42.

Westwood J.O. 1920: *An introduction to the modern classification of beetles*. v. 1, p. 462.

Yadav J.K. 1973: Chromosome number and sex-determining mechanism in fourteen species of Coleoptera. – *Curr. Sci*. **42**: 514.

Yadav J.S. & Pillai R.K. 1974: Cytology of two species of Australian leafminers (Hispinae, Chrysomelidae). – *Cytobios*. **11**: 75-79.

Yadav J.S. & Pillai R.K. 1975: Karyological notes on four species of Cassidinae (Coleoptera: Chrysomelidae). – *Genen. Phaenen*. **18**: 55-63.

Yadav J.S., Burra M.R. & Singh J. 1987: Chromosome number and meioformulae in thirtysix species of Indian Coleoptera (Insecta). – *Natl. Acad. Sci*. **10**: 223- 227.

Yadav J.S., Singh J. & Yadav A.S. 1995: Karyological analysis of six species of Cassidinae (Chrysomelidae: Coleoptera). – *J. Cytol. Genet.* **30**: 199-206.

Zacaro A.A., Proença S.J.R., Lopes-Andrade C. & Serrano A.R.M. 2004: Cytogenetic analysis of Ctenostomini by C-banding and rDNA localization and its relevance to the knowledge of the evolution of tiger beetles (Coleoptera: Cicindelidae). – *Genetica.* **122**: 261–268.

CAPÍTULO II

MAPEAMENTO CROMOSSÔMICO DO GENE RIBOSSOMAL 28S EM 11 ESPÉCIES DE CASSIDINAE S.L. (COLEOPTERA, CHRYSOMELIDAE)

INTRODUÇÃO

As sequências de DNA repetitivo constituem uma grande porção do genoma eucarioto e incluem as regiões satélites, microssatélites, minissatélites, as famílias multigênicas e os elementos transponíveis (Charlesworth et al. 1994). O gene ribossomal 45S representa uma destas famílias multigênicas e é formado por uma unidade de transcrição que codifica os genes de RNA (rRNA) 18S, 5.8S e 28S. No genoma, este gene ocorre como múltiplas cópias organizadas em tandem, as quais estão localizadas em um ou mais loci (Long e Dawid 1980; Cabrero e Camacho 2008; Nguyen et al. 2008). O rDNA é considerado um importante marcador cromossômico em estudos citogenéticos, pois pode fornecer informações sobre os mecanismos de diferenciação cromossômica em certos grupos de espécies (Bombarová et al. 2007; Cabrero e Camacho 2008).

A localização dos genes rDNA é amplamente utilizada nos estudos citogenéticos de diferentes grupos de animais, principalmente através da impregnação pelo íon prata (Ag-RON) (Howell e Black 1980), por ser uma técnica simples e pouco custosa (Rufas et al. 1982). Entretanto, a técnica de Ag-RON evidencia apenas sítios ativos de rDNA. Por outro lado, marcadores citogenéticos associados a técnicas de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) tem sido empregado em estudos sobre a organização e evolução cromossômica de grupos taxonomicamente relacionados, pois permite a localização precisa dos genes de rDNA, independente da sua atividade, bem como pode revelar variações no tamanho das repetições (Datson e Murray 2006; Nguyen et al. 2008).

A ordem Coleoptera possui cerca de 360.000 espécies descritas taxonomicamente (Costa 2003), sendo que 4.797 foram analisadas sob o ponto de vista citogenético (Blackmon e Demuth 2015). Dentre estas espécies, apenas 372 pertencentes as subordens Adephaga (Carabidae) e Polygrapha (Geotrupidae, Lucanidae, Passalidae, Melyridae, Scarabaeidae, Buprestidae, Elateridae, Coccinelidae, Meloidea, Tenebrionidae, Chrysomelidae e Curculionidae) tiveram a localização dos genes de rDNA determinados. Destas espécies, 158 foram analisadas através da técnica de Ag-RON, 126 espécies através da FISH com sonda de rDNA, e 88 espécies foram analisadas com ambas as técnicas. Neste último grupo, 16 espécies exibiram diferente localização do rDNA quando analisado com o íon prata e a FISH (Schneider et al. 2007; Dutrillaux et al. 2008; Helecová et al. 2008, 2013; Lachowska et al. 2008; Moura et al. 2008; Arcanjo et al. 2009, 2013; Dutrillaux e Dutrillaux 2009, 2012; Silva et al. 2009;

Almeida et al. 2010; Cabral de Mello et al. 2010, 2011a, 2011b; Mendes-Neto et al. 2010; Oliveira et al. 2010, 2012a, 2012b; Giannoulis et al. 2011; Proença et al. 2011; Goll et al. 2012; Lira-Neto et al. 2012; Karagyan et al. 2012).

A maioria das espécies de Coleoptera mostrou a presença de dois clusters de rDNA, os quais estão localizados em um par autossômico (82% das espécies de Adephaga e 63% das espécies de Polyphaga). Este padrão ocorre tanto em espécies que apresentam o cariótipo basal $2n=18+X_{yp}$ (Smith e Virkki 1978) quanto naquelas que exibem número diploide e/ou sistema cromossômico sexual derivado, indicando que dois sítios de rDNA autossômicos pode representar uma condição ancestral para os besouros (Schneider et al. 2007). Adicionalmente, apesar de alguns grupos, como a subfamília Scarabaeinae, exibirem homogeneidade quanto a distribuição de rDNA, foram identificadas variações entre as espécies, em que algumas exibiram mais de um cluster ribossomal no conjunto autossômico bem como a ocorrência do rDNA em cromossomos sexuais (Colomba et al. 2006; Silva et al. 2009; Cabral-de-Mello et al. 2010, 2011a, 2011b; Oliveira et al. 2010, 2012b).

Em Chrysomelidae, as análises sobre a região organizadora do nucléolo (RON) foram realizadas em 23 espécies das subfamílias Alticinae, Cassidinae e Chrysomelinae. Entre as 17 espécies que tiveram o número de RONS caracterizadas, mais de 80% exibiu apenas um sítio de rDNA localizado em um par autossômico (Petitpierre 1970, 1976, 1996; Virkki 1983; Virkki e Denton 1987; Postiglioni et al. 1990, 1991; Yadav et al. 1992; Schneider et al. 2002; Gómez-Zurita et al. 2004; Almeida et al. 2006, 2010).

A subfamília Cassidinae *s.l.* compreende aproximadamente 6.000 espécies distribuídas em 43 tribos (Chaboo 2007), das quais apenas 117 espécies, pertencentes a 13 tribos, foram estudadas citogeneticamente. Através da análise cariotípica, 52% dos cassidíneos apresentaram $2n=16+X_{yp}$, com cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos (De Julio et al. 2010). Dentre as 13 tribos de Cassidinae caracterizadas citogeneticamente, Cassidini e Mesomphaliini exibiram as maiores frequências de homogeneidade e diversidade cariotípica da subfamília, respectivamente (Lopes et al. *In press*). Em Cassidinae, apenas duas espécies foram caracterizadas quanto a localização dos genes ribossomais através da impregnação com o íon prata. Em *Chelymorpha variabilis* ($2n=20+X_{yp}$), a RON está localizada no braço curto do quinto par autossômico, portador de constrição secundária. Em *Botanochara angulata* ($2n=51=48+X_{pneo}X_{neo}Y_p$), os sítios de Ag-RON foram visualizados em alguns cromossomos autossômicos, os quais não foram determinados (Postiglioni et al. 1990; Yadav e Pillai 1975).

Neste trabalho, o estudo do número e localização do gene de rDNA 28S foi realizado em 11 espécies da subfamília Cassidinae, visando entender o papel deste gene na evolução

cromossômica das tribos Cassidini e Mesomphaliini, as quais apresentam, respectivamente, a maior homogeneidade e variabilidade cariotípica dentro do grupo.

MATERIAL E MÉTODOS

Uma amostra de 31 indivíduos, pertencentes a 11 espécies, coletadas no estado de São Paulo – Brasil, foi analisada neste trabalho (Tabela 1). A identificação taxonômica dos espécimes foi realizada pela Dra. Flávia R. Fernandes, do Museu Paraense Emilio Goeldi (MPEG), UFPA, Belém, Pará. Os espécimes foram depositados na coleção entomológica do MPEG.

Obtenção das preparações citológicas

As preparações cromossômicas foram obtidas a partir de testículos de indivíduos adultos, de acordo com a técnica descrita por Schneider et al. (2007), com modificação no tempo de hipotonização, que foi de 15 minutos.

Extração do DNA de Charidotella immaculata e amplificação dos genes

O DNA nuclear de *C. immaculata* foi extraído do abdome total, de acordo com a metodologia descrita no Kit Comercial Qiagen Dneasy Blood and Tissue. Após a extração, a qualidade do DNA foi avaliada através de eletroforese em um gel de agarose 1% corado com Gel Red.

As amplificações das regiões do rDNA 28S foram realizadas utilizando os oligonucleotídeos: 28S F 5' – GACCCGTCTTGAAACACGGA e 28S R 5' – TCGGAAGGAACCAGCTACTA. A reação de cadeia da polimerase (PCR) foi realizada em um termociclador Applied Biosystems para um volume total de reação de 25µl: 2,5µl de Tampão 10X, 5,0µl de dNTP mix (2mM), 1,0µl de *primer* 28S F (10mM), 1,0µl de *primer* 28S R (10mM), 1,0µl de MgCl₂ (50mM), 0,3µl de Taq Polymerase, 1,0µl de DNA, 13,2µl de H₂O, com o programa: 3 min a 94 °C para desnaturação inicial; 35 ciclos: a 30 segundos a 94 °C para desnaturação, 30 segundos a 50 °C para anelamento, 1 min a 72 °C para extensão; 10 min a 72 °C para extensão final.

Tabela 1 – Representantes de Cassidinae *s.l.* analisados no presente estudo, incluindo o número de indivíduos e a localidade da coleta no estado de São Paulo.

Espécie	Número de indivíduos	Locais de coleta
Cassidini		
<i>Agroiconota inedita</i> (Boheman 1855)	1 macho	Saltinho
	1 macho	São Pedro
<i>Charidotella immaculata</i> (Oliver 1790)	3 machos	Saltinho
	3 machos	São Pedro
<i>Charidotella sexpunctata</i> (Fabricius 1781)	2 machos	Saltinho
	1 macho	São Pedro
<i>Deloyala cruciata</i> (Linnaeus 1758)	3 machos	Saltinho
<i>Microctenochira gnata</i> (Spaeth 1926)	1 macho	São Pedro
<i>Microctenochira optata</i> (Boheman 1855)	1 macho	Saltinho
<i>Microctenochira stigmatica</i> (Boheman 1855)	1 macho	Saltinho
Mesomphaliini		
<i>Chelymorpha cribraria</i> (Fabricius 1775)	1 macho	Saltinho
	4 machos	São Pedro
<i>Chelymorpha inflata</i> (Boheman 1854)	1 macho	Jundiaí
	1 macho	São Pedro
<i>Cyrtonota cyanea</i> (Linnaeus 1758)	2 machos	São Pedro
<i>Paraselenis flava</i> (Linnaeus 1758)	3 machos	Saltinho
	1 macho	São Pedro

Coordenadas geográficas: Jundiaí (23°8'S, 46°53'W); Saltinho (22°50'S, 47°40'W); São Pedro (22°3'S, 47°57'W).

Hibridação in situ fluorescente (FISH)

Para a localização cromossômica dos genes de rDNA, as preparações citológicas foram submetidas à técnica de FISH, utilizando como sonda o rDNA 28S extraído de *Charidotella immaculata* e marcado por DIG-Nick Translation Mix - Roche®.

Após a marcação das sondas, a hibridização foi realizada utilizando a metodologia descrita por Pinkel et al. (1986) com modificações: a-) Deixar as lâminas de um dia para o outro banhadas em solução de ácido acético 70%; b-) Colocar sob as lâminas 150µl de solução de pepsina e deixar por 60 minutos em câmara úmida a 37°C; c-) Lavar as lâminas em tampão de PBS 1X durante 5 minutos em temperatura ambiente (shaker); d-) Desidratar as lâminas em

série alcoólica 70, 90 e 100% por 5 minutos e secar; e-) Incubar as lâminas em 100 μ l de RNase (10 μ l/mL em 2xSSC) a 37°C por 60 minutos em câmara úmida; f-) Lavar as lâminas três vezes por 5 minutos em solução de 2xSSC; g-) Lavar as lâminas durante 5 minutos em solução de PBS 1X; h-) Fixar o material em formaldeído 1% em PBS 1X/50mM MgCl₂ durante 10 minutos em temperatura ambiente; i-) Lavar as lâminas em PBS 1X por 5 minutos (shaker); j-) Desidratar as lâminas em série alcoólica 70, 90 e 100% por 5 minutos cada e deixar secar; k-) Desnaturar o DNA cromossômico em formamida 70% em 2xSSC a 70°C por 5 minutos; l-) Desidratar o material em série alcoólica gelada 70, 90 e 100% por 5 minutos cada e secar rapidamente as lâminas; m-) Usar 6 μ l de sonda e 24 μ l de tampão de hibridação; n-) Desnaturar a sonda em termociclador 95°C por 10 minutos e depois manter em gelo; o-) Colocar 30 μ l da solução de hibridação em cada lâmina, cobrir com lamínula. Manter o material voltado para baixo em câmara úmida a 37°C *overnight*; p-) Lavar as lâminas duas vezes em solução de formamida 15% durante 10 minutos cada; q-) Lavar as lâminas durante 5 minutos em solução de Tween 0,5% em temperatura ambiente (shaker); r-) Incubar as lâminas em tampão NFDm por 15 minutos; s-) Lavar duas vezes com solução de Tween 0,5% a temperatura ambiente por 5 minutos (shaker); t-) Incubar as lâminas com 2 μ l de anti-digoxigenina e 28 μ l de tampão bloqueio por 60 minutos em câmara úmida a 37°C; u-) Lavar as lâminas duas vezes em solução de Tween 0,5% a temperatura ambiente por 5 minutos (shaker); v-) Desidratar as lâminas em série alcoólica 70, 90 e 100% e deixar secar; x-) Colocar sobre as lâminas 30 μ l do fluorocromo 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) com Vectashield, cobrir com lamínulas e retirar o excesso com papel filtro.

Cerca de 30 células foram analisadas por espécie. As imagens dos cromossomos foram capturadas em fotomicroscópio óptico Zeiss A2, com objetiva 100X de imersão, optovar 1.6, utilizando o *software* Axion Vision.

RESULTADOS

As análises citogenéticas de cinco espécies de Cassidini: *A. inedita* - 2n=38+Xy_p, *Cha. immaculata* e *Cha. sexpunctata* - 2n=20+Xy_p, *D. cruciata* e *M. optata* - 2n=16+Xy_p, e de duas espécies de Mesomphaliini: *Che. cribraria* - 2n=20+Xy_p, e *P. flava* 2n=40+Xy_p confirmaram o número diploide e sistema cromossômico sexual. Adicionalmente, foi descrito pela primeira vez neste trabalho o cariótipo de duas espécies de Cassidini: 2n=18 em *M. gnata* e 2n=20+Xy_p em *M. stigmatica*, e duas espécies de Mesomphaliini: 2n=20+Xy_p em *C. inflata* e 2n=38+Xy_p em *C. cyanea*.

Células meióticas de quatro das sete espécies de Cassidini submetidas à técnica de FISH com a sonda ribossomal 28S revelaram um padrão conservado de distribuição dos clusters de rDNA na região terminal de um bivalente autossômico. Em *A. inedita*, *Cha. immaculata* e *M. stigmatica*, o rDNA estava localizado em um bivalente com morfologia metacêntrica e tamanho médio (Figura 1a – b, 1h – i), e em *Cha. sexpuctata* os sítios ribossomais também estavam presentes em um bivalente metacêntrico, porém de tamanho grande (Figura 1c). Em *D. cruciata* e *M. gnata*, marcações brilhantes foram observadas na região intersticial de um bivalente com morfologia metacêntrica e tamanho médio (Figura 1d – f). Adicionalmente, embora em *M. gnata* não tenha sido possível identificar os cromossomos sexuais, células profásicas revelaram que o sítio de rDNA estava localizado em um bivalente autossômico. Ao contrário dos resultados encontrados nas demais espécies de Cassidini analisadas neste trabalho, *M. optata* exibiu três clusters de rDNA 28S localizados na região terminal de dois bivalentes metacêntricos de tamanho médio, e intersticial de um bivalente também com morfologia metacêntrica e tamanho médio (Figura 1g).

Na tribo Mesomphaliini, células testiculares mitóticas de *Che. cribraria*, e meióticas de *Che. inflata*, *Cyr. cyanea* e *P. flava* submetidas à FISH com sonda de rDNA 28S mostraram que o cístron ribossomal estava localizado na região terminal de um par e /ou bivalente autossômico nas quatro espécies analisadas. Entretanto, em *Che. cribraria* e *Che. inflata* o cluster estava alocado em um par cromossômico submetacêntrico de tamanho grande e em um bivalente submetacêntrico de tamanho médio, respectivamente (Figura 2a – b), e em *Cyr. cyanea* e *P. flava* em um bivalente com morfologia metacêntrica e tamanho pequeno (Figura 2c – d).

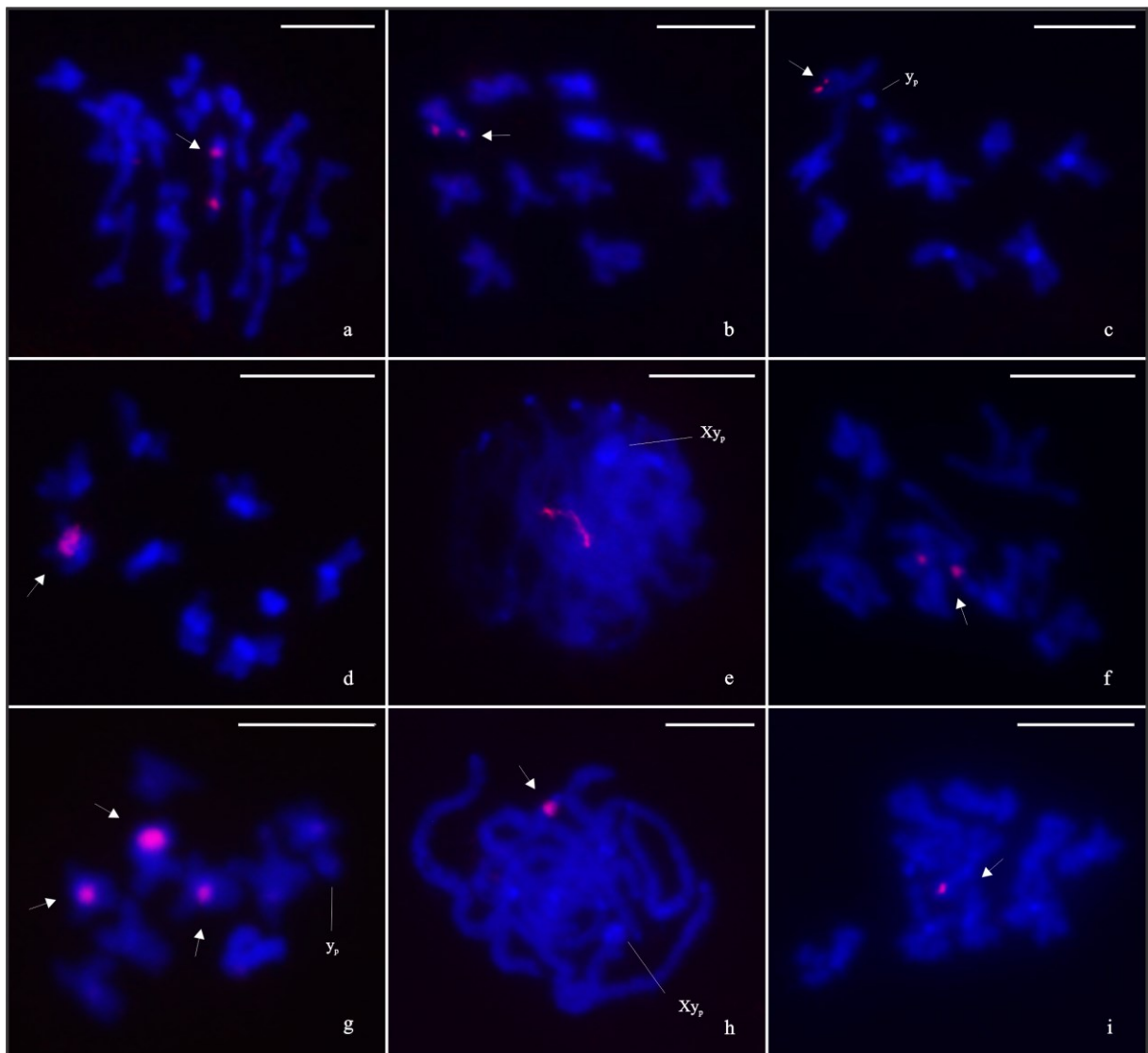


Figura 1 – Localização do gene ribossomal 28S em células meióticas de Cassidini. **a.** *Agroiconota inedita*, $2n=20\text{II}+Xy_p$. **b.** *Charidotella immaculata*, $n=10\text{II}+X$. **c.** *Charidotella sexpunctata*, $n=10\text{II}+y_p$. **d.** *Deloyala cruciata*, $n=8\text{II}+X$ ou y_p . **e-f.** *Microctenochira gnata*, $2n=9\text{II}$. **g.** *Microctenochira optata*, $n=8\text{II}+y_p$. **h-i.** *Microctenochira stigmatica*, $n=10\text{II}+y_p$. As regiões vermelhas nos cromossomos (seta) correspondem aos sítios de rDNA 28S. Escala= $10\mu\text{m}$.

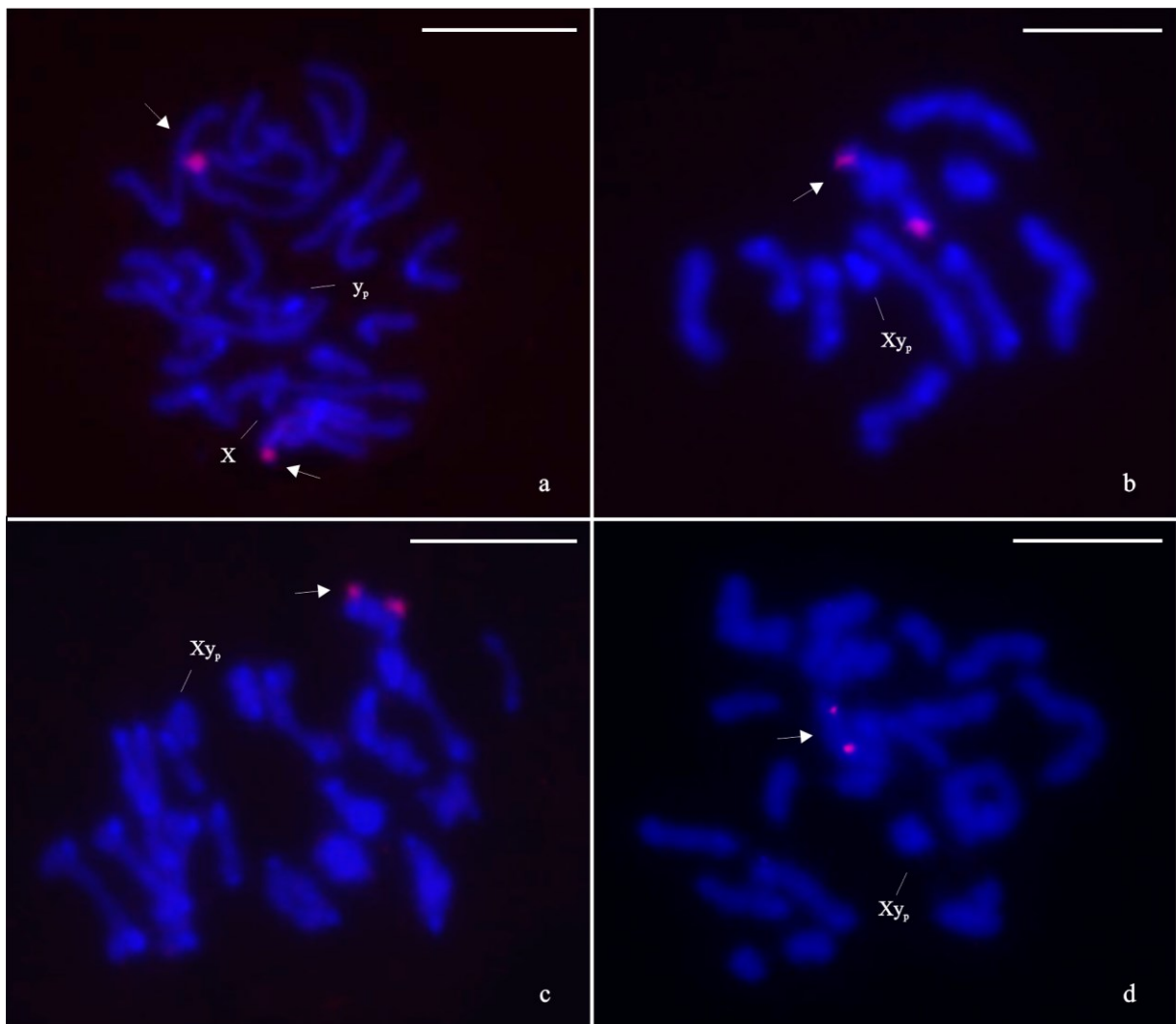


Figura 2 – Distribuição dos cistrons ribossomais 28S em Mesomphaliini. **a.** *Chelymorphe cribraria*, $2n=20+X_{yp}$. **b.** *Chelymorphe inflata*, $2n=10II+X_{yp}$. **c.** *Cyrtonota cyanea*, $2n=19II+ X_{yp}$. **d.** *Paraselenis flava*, $2n=20II+X_{yp}$. As setas indicam os sinais fluorescentes relacionados aos sítios de rDNA 28S. Escala= 10 μ m.

DISCUSSÃO

A análise das células meióticas de cinco representantes de Cassidini – *A. inedita*, *Cha. immaculata*, *Cha. sexpunctata*, *D. cruciata* e *M. optata*, e mitóticas e meióticas de duas espécies de Mesomphaliini – *Che. cribraria* e *P. flava* confirmaram o número diploide e sistema cromossômico sexual previamente descritos para as mesmas populações destas espécies (Lopes et al. *In press*). Adicionalmente, foram caracterizadas citogeneticamente duas espécies de Cassidini pertencentes ao gênero *Microtenochira*, que exibiram $2n=18$ em *M. gnata*, na qual não foi possível identificar o sistema cromossômico sexual, e $2n=20+Xy_p$ em *M. stigmatica*. Nesta última espécie, o número diploide encontrado foi maior do que aquele observado em *M. gnata*, e em três outras espécies anteriormente analisadas pertencentes ao mesmo gênero, *M. aciculata*, *M. optata* e *M. quadrata*, que possuem o cariótipo $2n=16+Xy_p$ (Lopes et al. *In press*), em que o aumento no número diploide pode estar relacionado a eventos de rearranjos cromossômicos, como fissões.

Na tribo Mesomphiliini, os cariótipos de duas espécies, *Che. inflata* e *Cyr. cyanea*, também estão sendo descritos pela primeira vez neste trabalho. *Chelymorpha inflata* exibiu $2n=22$ e sistema cromossômico sexual Xy_p , os quais são semelhantes aqueles observado em sete outras espécies deste mesmo gênero – *Che. cassidea* (Stevens 1906), *Che. cinctipennis* (Vidal 1984), *Che. cribraria* (Lopes et al. *In press*), *Che. indigesta* (De Vaio e Postiglioni 1974), *Che. multipunctata* (Virkki et al. 1992), *Che. nigricolis* (Vidal 1984), e *Che. variabilis* (De Vaio e Postiglioni 1974; Postiglioni et al. 1990; Postiglioni et al. 1991). Por outro lado, *Cyr. cyanea* revelou o cariótipo $2n=38+Xy_p$. Dentre as espécies de Mesomphiliini, números diploides próximos ou maiores que $2n=40$ ocorrem predominantemente no gênero *Botanochara*, cujas espécies invariavelmente também apresentaram sistema cromossômico sexual múltiplo (para revisão ver De Julio et al. 2010). A única exceção em toda a tribo foi *P. flava*, que exibiu $2n=40+Xy_p$. No entanto, somente após um estudo filogenético dos representantes de Mesomphiliini será possível afirmar se número diploide alto é um caráter compartilhado ou surgiu de forma independente em alguns gêneros.

O mapeamento do gene de rDNA 28S em representantes da subfamília Cassidinae mostrou que 10 das 11 espécies estudadas exibiram um padrão conservado quanto ao número de sítios ribossomais, sendo um par autossômico. Esta condição manteve-se constante nos sete gêneros examinados e em espécies de ambas as tribos Cassidini e Mesomphaliini, que apesar de apresentarem o sistema cromossômico sexual do tipo Xy_p e heterocromatina constitutiva predominantemente pericentromérica, diferiram quanto ao número diploide, tamanho cromossômico, e número de pares cromossômicos portadores da heterocromatina constitutiva

(para detalhes ver Lopes et al. *In press*). Estes resultados corroboram os dados obtidos nos Coleoptera, nos quais, de maneira geral, a presença de dois sítios de rDNA em cromossomos autossômicos parece ser a condição mais frequente. Além disso, a conservação no número de RONS e/ou rDNA autossomais nos besouros se mantém inalterada tanto entre espécies com número diploide e sistema cromossômico sexual conservado, bem como naqueles que apresentam variação cariotípica (Schneider et al. 2007).

A ocorrência de duas RONS ou sítios de rDNA foi também observada em 82% das espécies de Chrysomelidae que tiveram esta característica determinada, como *Chrysolina americana* ($2n=22+Xy_p$), *Chr. bankii* ($2n=22+X_0$), *Timarcha espanoli* ($2n=24+Xy_p$), *T. fallax*, *T. lugens*, *T. marginicollis*, *T. perezi* ($2n=18+Xy_p$), *T. granadensis* ($2n=20+Xy_p$), *T. punctella* ($2n=26+Xy_p$), *Diabrotica speciosa* ($2n=20+X_0$), *O. octoguttata*, *O. personata* ($2n=20+X+Y$) e *Paranaita opima* ($2n=20+XY$) (Petitpierre 1970, 1976, 1996; Virkki 1983; Schneider et al. 2002; Gómez-Zurita et al. 2004; Almeida et al. 2006, 2010). Somente em quatro espécies, os genes de rDNA estavam presentes em dois pares autossômicos, como em *Zigogramma bicolorata* ($2n=22+Xy_p$) e *Omophoita magniguttis* ($2n=20+Xy$), apenas no cromossomo sexual, como o neoX em *Timarcha aurichalcea* ($2n=16+neoXY$), ou em cromossomos autossômicos e no cromossomo Y, como em *Alagoasa januararia* ($2n=20+X+Y$) (Virkki 1983; Yadav et al. 1992; Gómez-Zurita et al. 2004; Almeida et al. 2010).

Em *Cha. immaculata*, embora os cístrons ribossomais apareceram somente em um par autossômico, estes estavam co-localizados com a heterocromatina constitutiva presente na região terminal dos cromossomos. A co-localização destes dois marcadores cromossômicos já foi observada em outras famílias de Coleoptera, como Curculionidae, Elateridae, Geotrupidae, Lucanidae, Scarabaeidae e Tenebrionidae (Virkki e Sepúlveda 1990; Virkki et al. 1990; Colomba et al. 1996, 2000a, 2000b, 2004; Vitturi et al. 1999, 2003; Moura et al. 2003; Bione et al. 2005; Schneider et al. 2006; Dutrillaux et al. 2007; Cabral-de-Mello et al. 2010; Lira-Neto et al. 2012). Cabral-de-Mello e colaboradores (2011a), investigando 13 representantes da subfamília Scarabaeinae, verificaram que nas espécies onde a heterocromatina constitutiva é predominantemente centromérica/pericentromérica há uma estabilidade no número de sítios de rDNA (um bivalente autossômico), e naquelas espécies em que a heterocromatina estava dispersa ocorreu um aumento no número de sítios ribossomais. Desta forma, os autores sugeriram que o mesmo mecanismo de alteração cromossômica poderia estar relacionado com a dispersão destes dois sítios cromossômicos. Entretanto, *Cha. immaculata* revelou apenas variação da heterocromatina constitutiva quando comparado com a maioria das espécies de Cassidinae (blocos pericentroméricos, na região terminal de seis pares autossômicos e

intersticial de um par autossômico) (Lopes et al. *In press*), mantendo constante o número e localização do cluster de rDNA. Contrariamente, *D. cruciata* e *M. optata*, que apresentaram heterocromatina constitutiva na região pericentromérica dos cromossomos, exibiram uma mudança no número e/ou localização dos sítios ribossomais. Este resultado indica que nos cassidíneos parece não existir uma correlação direta entre a dispersão da heterocromatina e do gene de rDNA 28S e que outros tipos de rearranjos cromossômicos, como inversões ou translocações, podem estar envolvidos com o reposicionamento e aumento no número dos sítios de rDNA.

Na maioria das espécies aqui estudadas, o rDNA 28S estava localizado na região terminal, com exceção de *D. cruciata*, *M. gnata* e *M. optata*, que mostraram sinais de hibridação na região intersticial dos cromossomos. É importante enfatizar que estas três espécies exibiram o número diploide e o sistema cromossômico sexual mais frequente para os Cassidini, ou seja, $2n=16+X_{yp}$. Em Coleoptera, a localização da RON foi estabelecida em apenas 30% das espécies investigadas, das quais 22% apresentaram RON terminal, 1,6% intersticial e 6,4% centromérica. Este grupo de espécies estudadas em que a RON foi intersticial e centromérica pertencem, principalmente, as famílias Scarabaeidae e Chrysomelidae (subfamília Alticinae). Assim como observado no presente trabalho, as mudanças na localização dos sítios de rDNA foram observadas em espécies com características cariotípicas semelhantes (Virkki 1983; Yadav et al. 1992; Arcanjo et al. 2009; Silva et al. 2009; Bione et al. 2005; Almeida et al. 2006, 2010; Cabral de Mello et al. 2010, 2011b; Oliveira et al. 2010, 2012b). Estas alterações na localização do rDNA, principalmente, entre espécies próximas e com características cromossômicas similares podem ser resultado de pequenos rearranjos cromossômicos, do tipo inversão, translocação ou até mesmo transposição, os quais promoveram a dispersão dos sítios ribossomais e mantiveram preservada a morfologia cromossômica metacêntrica.

Em resumo, os dados obtidos neste trabalho demonstraram que as mudanças envolvendo o rDNA 28S foram mais acentuadas na tribo Cassidini, a qual apresenta a maior homogeneidade cariotípica dentro da subfamília Cassidinae. Além disso, as alterações no número e localização do rDNA 28S ocorreram entre espécies com características cariotípicas conservadas, indicando que alterações em genes específicos podem ser as responsáveis pela evolução cromossômica deste grupo. Na tribo Mesomphaliini, o aumento do número diploide não foi acompanhado pelo aumento do número de genes ribossomais. Finalmente, este estudo mostrou que a técnica de FISH com gene de rDNA pode ser bastante útil para revelar diferenças entre espécies com cariótipos muito similares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, M.C.; CAMPANER, C.; CELLA, D.M. Karyotype characterization, constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions of *Paranaita opima* (Coleoptera, Chrysomelidae, Alticinae) *Genetics and Molecular Biology*, v. 29, p. 475 – 481, 2006.

ALMEIDA, M.C.; GOLL, L.G.; ARTONI, R.F.; NAGAROTO, V.; MATIELLO, R.R.; VICARI, M.R. Physical mapping of 18S rDNA cistron in species of the *Omophoita* genus (Coleoptera, Alticinae) using fluorescent *in situ* hybridization. *Micron*, v. 41, p. 729 – 734, 2010.

ARCANJO, A.M.; CABRAL-DE-MELLO, D.C.; BARROS E SILVA, A.E.; MOURA, R.C. Cytogenetic characterization of *Eurysternus caribaeus* (Coleoptera: Scarabaeidae): evidence of sex-autosome fusion and diploid number reduction prior to species dispersion. *Journal of Genetics*, v. 88, p. 177–182, 2009.

ARCANJO, AM.; CABRAL-DE-MELLO, D.C.; MARTINS, C.; MOURA, R.C.; SOUZA, M.J. Chromosomal diversification of diploid number, heterochromatin and rDNAs in two species of *Phanaeus* beetles (Scarabaeidae, Scarabaeinae). *Genetics and Molecular Biology*, v. 36, p. 341-346, 2013.

BIONE, E.; MOURA, R.C.; CARVALHO, R.; SOUZA, M.J. Karyotype, C-and fluorescence banding pattern, NOR location and FISH study of five Scarabaeidae (Coleoptera) species. *Genetics and Molecular Biology*, v. 28, p. 376-381, 2005.

BLACKMON, H.; DEMUTH, J.P. "Coleoptera Karyotype Database." *The Coleopterists Bulletin*, v. 69.1, p. 174-175, 2015.

BOMBAROVÁ, M.; MAREC, F.; NGUYEN, P.; SPAKULOVÁ, M. Divergent location of ribosomal genes in fish thorny-headed worms, *Pomphorhynchus laevis* and *Pomphorhynchus tereticollis* (Acanthocephala). *Genetica*, v. 131, p. 141-149, 2007.

CABRAL-DE-MELLO, D.C.; MOURA, R.C.; MARTINS, C. Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the beetle *Dichotomius geminatus* provides the first evidence for an

association of 5S rRNA and histone H3 genes in insects, and repetitive DNA similarity between the B chromosome and A complement. *Heredity*, v.104, p. 393–400, 2010.

CABRAL-DE-MELLO, D.C.; OLIVEIRA, S.G.; MOURA, R.C.; MARTINS, C. Chromosomal organization of the 18S and 5S rRNAs and histone H3 genes in Scarabaeinae coleopterans: insights into the evolutionary dynamics of multigene families and heterochromatin. *BioMed Central Genetics*, v. 12, p. 1471-2156, 2011a.

CABRAL-DE-MELLO, D.C.; MOURA, R.C.; MARTINS, C. Cytogenetic Mapping of rRNAs and Histone H3 Genes in 14 Species of *Dichotomius* (Coleoptera, Scarabaeidae, Scarabaeinae) Beetles. *Cytogenetic and Genome Research*, v. 134, p. 127-135, 2011b.

CABRERO, J.; CAMACHO, J.P. Location and expression of ribosomal RNA genes in grasshoppers: Abundance of silent and cryptic loci. *Chromosome Research*, v. 16, p. 595 – 607, 2008.

CHABOO, C.S. Biology and phylogeny of the Cassidinae Gyllenhal *sensu lato* (tortoise and leaf-mining beetles) (Coleoptera: Chrysomelidae). *Bulletin of the American Museum of Natural History*, p. 305, 2007.

CHARLESWORTH, B.; SNIEGOWSKI, O.; STEPHAN, W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature*, v. 371, p. 215 – 220, 1994.

COLOMBA, M.S.; MONTERESINO, E.; VITTURI, R.; ZUNINO, M. Characterization of mitotic chromosomes of the scarab beetles *Glyphoderus sterquilinus* (Westwood) and *Bubas bison* (L.) (Coleoptera: Scarabaeidae) using conventional and banding techniques. *Biologisches Zentralblatt*, v. 115, p. 58-70, 1996.

COLOMBA, M.S.; VITTURI, R.; ZUNINO, M. Chromosome analysis and rDNA FISH in the stag beetle *Dorcus parallelipipedus* L. (Coleoptera: Scarabaeoidea: Lucanidae). *Hereditas*, v. 133, p. 249-253, 2000a.

COLOMBA, M.S.; VITTURI, R.; ZUNINO, M. Karyotype analysis, banding, and fluorescent *in situ* hybridization in the scarab beetle *Gymnopleurus sturmi* McLeay (Coleoptera Scarabaeoidea: Scarabaeidae). *Journal of Heredity*, v. 91, p. 260-264, 2000b.

COLOMBA, M.; VITTURI, R.; VOLPE, N.; LANNINO, A.; ZUNINO, M. Karyotype, banding and rDNA FISH in the scarab beetle *Anoplotrupes stercorosus* (Coleoptera Scarabaeoidea: Geotrupidae). Description and comparative analysis. *Micron*, v. 35, p. 717–720, 2004.

COLOMBA, M.; VITTURI, R.; LIBERTINI, A.; GREGORINI, A.; ZUNINO, M. Heterochromatin of the scarab beetle, *Bubas bison* (Coleoptera: Scarabaeidae) II. Evidence for AT-rich compartmentalization and a high amount of rDNA copies. *Micron*, v. 37, p. 1-5, 2006.

COSTA, C. Estado de conocimiento de los Coleoptera neotropicales. Bol SEA (Versión Eletronica 32). <http://www.sea-entomologia.org/aracnet/11/01/index.htm>. 2003.

DATSON, P.M.; MURRAY B.G. Ribosomal DNA locus evolution in *Nemesia*: transposition rather than structural rearrangement as the key mechanism? *Chromosome Research* v. 14, p. 845-857, 2006.

DE JULIO, M.; FERNANDES, F.R.; COSTA, C.; ALMEIDA, M.C.; CELLA, D.M. Mechanisms of karyotype differentiation in Cassidinae *sensu latu* (Coleoptera, Polyphaga, Chrysomelidae) based on seven species of Brazilian fauna and an overview of the cytogenetic data. *Micron*, v. 41, p. 26-28, 2010.

DE VAIO, E.S.; POSTIGLIONI, A. Stoline cassidinaes (Coleoptera, Chrysomelidae) with Xyp sex chromosomes and derivative system XpneoXneoYp. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, v. 16, p. 433 - 40, 1974.

DUTRILLAUX, A.M.; DUTRILLAUX, B. Chromosome polymorphism and Fanconi-like instability in the Scarabaeid beetle *Macraspis tristis* from Guadeloupe. *Cytogenetic and Genome Research*, v. 125, p. 142-148, 2009.

DUTRILLAUX, A.M.; DUTRILLAUX, B. Chromosome analysis of 82 species of Scarabaeoidea (Coleoptera), with special focus on NOR localization. *Cytogenetic and Genome Research*, v. 136, p. 208-219, 2012.

DUTRILLAUX, A.M.; XIE, H.; DUTRILLAUX, B. Nucleolus and chromosome relationships at pachynema in four Scarabaeoidea (Coleoptera) species with various combinations of NOR and sex chromosomes. *Chromosome Research*, v. 15, p. 417–427, 2007.

DUTRILLAUX, A.M.; MERCIER, J.; XIE, H.; DUTRILLAUX, B. Etude chromosomique de 16 espèces ou sous-espèces de Cetoniini (Coleoptera: Scarabaeidae: Cetoniinae) d'Europe. *Annales de la Société. Entomologique de France*, v. 44, p. 443–450, 2008.

GIANNOULIS, T.; DUTRILLAUX, A.M.; MAMURIS, Z.; MONTREUIL, O.; STAMATIS, C.; DUTRILLAUX, B. Evolution of European cockchafers (Melolonthinae: Scarabaeidae: Coleoptera): a morphological, molecular and chromosomal study of intra- and interspecific variations. *Bulletin of Entomological Research*, v. 101, p. 345–352, 2011.

GOLL, L.G.; ARTONI, R.F.; VICARI, M.R.; NAGAROTO, V.; PETITPIERRE, E.; ALMEIDA, M.C. Cytogenetic Analysis of *Lagria villosa* (Coleoptera, Tenebrionidae): Emphasis on the Mechanism of Association of the Xy p Sex Chromosomes. *Cytogenetic and Genome Research*, v. 139, p. 29–35, 2012.

GÓMEZ-ZURITA, J.; PONS, J.; PETITPIERRE, E. The evolutionary origin of a novel karyotype in *Timarcha* (Coleoptera, Chrysomelidae) and general trends of chromosome evolution in the genus. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, v. 42, p. 332–341, 2004.

HELECOVÁ, M.; ROZEK, M.; LACHOWSKA, D. The First Cytogenetic Report on *Laena reitteri* Weise, 1877 (Coleoptera, Tenebrionidae, Lagriinae) with Notes on Karyotypes of Darkling Beetles. *Folia biologica* (Kraków), v. 56, p. 213–217, 2008.

HELECOVÁ, M.; MARYAŃSKA-NADACHOWSKA, A.; ROZEK, M. Cytogenetic Analysis of *Otiorhynchus bisulcatus* (Fabricius, 1781) and *O.(Zadrehus) atroapterus* (De Geer, 1775)

(Coleoptera, Curculionidae, Entiminae) using C Bands, NORs, and DAPI/CMA3 Staining. *Folia Biologica* (Kraków), v. 61, p. 177–183, 2013.

HOWELL, W.M.; BLACK, D.A. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, v. 36, p. 1014 – 1015, 1980.

KARAGYAN, G.; LACHOWSKA, D.; KALASHIAN, M. Karyotype analysis of four jewel-beetle species (Coleoptera, Buprestidae) detected by standard staining, C-banding, AgNOR-banding and CMA3/DAPI staining. *Cytogen*, v. 6, p. 183–197, 2012.

LACHOWSKA, D.; ROZEK, M.; HELECOVÁ, M. Cytotaxonomy and karyology of the tribe Otiorhynchini (Coleoptera: Curculionidae). *European Journal of Entomology*, v. 105, p. 175–184, 2008.

LIRA-NETO, A.C.; SILVA, G.M.; MOURA, R.C.; SOUZA, M.J. Cytogenetics of the darkling beetles *Zophobas* aff. *confusus* and *Nyctobates gigas* (Coleoptera, Tenebrionidae). *Genetics and Molecular Research*, v. 11, p. 2432–2440, 2012.

LONG, E.O.; DAWID, I.B. Repeated genes in Eucaryotes. *Annual Review of Biochemistry*, v. 49, p. 727-764, 1980.

LOPES, A.T.; FERNANDES, F.R.; SCHNEIDER, M.C. Comparative cytogenetic analysis in 13 tortoise beetles (Cassidinae, Coleoptera) from Brazilian fauna. *European Journal of Entomology*. In Press.

MENDES-NETO, E.O.; VICARI, M.R.; CAMPANER, C.; NOGAROTO, V.; ARTONI, R.F.; ALMEIDA, M.C. Cytogenetic analysis of *Astylus antis* (Perty, 1830) (Coleoptera, Melyridae): Karyotype, heterochromatin and location of ribosomal genes. *Genetics and Molecular Biology*, v. 33, p. 237–243, 2010.

MOURA, R.C.; SOUZA, M.J.; MELO, N.F.; LIRA-NETO, A.C. Karyotypic characterization of representatives from Melolonthinae (Coleoptera: Scarabaeidae): karyotypic analysis, banding and fluorescent *in situ* hybridization (FISH). *Hereditas*, v. 138, p. 200-206, 2003.

MOURA, R.C.; MELO, N.F.; SOUZA, M.J. High Levels of Chromosomal Differentiation in *Euchroma gigantea* L. 1735 (Coleoptera, Buprestidae). *Genetics and Molecular Biology*, v. 31, p. 431–437, 2008.

NGUYEN, T.T.; ANISKIN, V.M.; GERBAULT-SEUREAU, M.; PLANTON, H.; RENARD, J.P.; NGUYEN, B.X.; HASSANIN, A.; VOLOBOUEV, V.T. Phylogenetic position of the saola (*Pseudoryx nghetinhensis*) inferred from cytogenetic analysis of eleven species of Bovidae. *Cytogenetic and Genome Research*, v. 122, p. 41 – 54, 2008.

OLIVEIRA, S.G.; MOURA, R.C.; SILVA, A.E.B.; SOUZA, M.J. Cytogenetic analysis of two *Coprophanaeus species* (Scarabaeidae) revealing wide constitutive heterochromatin variability and the largest number of 45S rDNA sites among Coleoptera. *Micron*, v. 41, p. 960–965, 2010.

OLIVEIRA, S.G.; MOURA, R.C.; MARTINS, C. B chromosome in the beetle *Coprophanaeus cyanescens* (Scarabaeidae): emphasis in the organization of repetitive DNA sequences. *BioMed Central Genetics*, v. 13, p. 96-101, 2012a.

OLIVEIRA, S.G.; CABRAL-DE-MELLO, D.C.; ARCANJO, A.P.; XAVIER, C.; SOUZA, M.J.; MARTINS, C.; MOURA, R.C. Heterochromatin, Sex Chromosomes and rRNA Gene Clusters in *Coprophanaeus* Beetles (Coleoptera, Scarabaeidae). *Cytogenetic and Genome Research*, v. 138, p. 46–55, 2012b.

PETITPIERRE, E. Cytotaxonomy and evolution of *Timarcha* Latr. (Coleoptera: Chrysomelidae). *Genet Iber*, v. 22, p. 67-120, 1970.

PETITPIERRE, E. Further cytotaxonomical and evolutionary studies on the genus *Timarcha* Latr. (Coleoptera: Chrysomelidae). *Genet Iber*, v. 28, p.57-81, 1976

PETITPIERRE, E. Molecular cytogenetics and taxonomy of insects, with particular reference to the Coleoptera. *International Journal Insect Morphology & Embryology*, v. 25, p. 115 -134, 1996.

PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J.W. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 83, p. 2934–2938, 1986.

POSTIGLIONI, A.; MAZZELLA, M.C.; PANZERA, F.; DA SILVA, A.; PONCE DE LEÓN, R.; VASINA, L.K.; SCVORTZOFF, E. Sex chromosomes of Neotropical Coleoptera from Uruguay. *The Nucleus*, v. 33, p. 25-30, 1990.

POSTIGLIONI, A.; STOLL, M.; BRUM-ZORRILLA, N. Haploid Karyotype analysis of *Chelymorpha variabilis* Bohemam (Coleoptera, Chrysomelidae) with 63 microspreading techniques. *Revista Brasileira de Genética*, v. 14, p. 653-60, 1991.

PROENÇA, S.J.R.; SERRANO, A.R.M.; SERRANO, J.; GALIÁN, J. Patterns of rDNA chromosomal localization in Palearctic *Cephalota* and *Cylindera* (Coleoptera: Carabidae: Cicindelini) with different numbers of X-chromosomes. *Comp Cyto Gen*, v. 5, p. 47–59, 2011.

RUFAS, J.S.; ITURRA, P.; DE SOUZA, W.; ESPONDA, P. Simple silver staining procedure for the localization of nucleolus and nucleolar organizers under light and electron microscopy. *Archives of Biological Science*, v. 93, p. 267-276, 1982.

SCHNEIDER, M.C.; ARTONI, R.F.; ALMEIDA, M.C. Cytogenetic analysis of 3 populations of *Diabrotica speciosa* (Chrysomelidae, Galerucinae): Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions. *Cytologia* v. 67, p. 281-287, 2002.

SCHNEIDER, M.C.; ALMEIDA, M.C.; ROSA, S.P.; COSTA, C.; CELLA, D.M. Evolutionary chromosomal differentiation among four species of *Conoderus* Eschscholtz, 1829 (Coleoptera, Elateridae, Agrypninae, Conoderini) detected by standard staining, C-banding, silver nitrate impregnation, and CMA3/DA/ DAPI staining. *Genetica*, v. 128, p. 333–346, 2006.

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

SILVA, G.M.; BIONE, E.G.; CABRAL-DE-MELLO, D.C.; MOURA, R.C.; SIMÕES, Z.L.P.; SOUZA, M.J. Comparative cytogenetics of three species of *Dichotomius* (Coleoptera, Scarabaeidae). *Genetics and Molecular Biology*, v. 32, p. 276–280, 2009.

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

STEVENS, N.M. Studies in spermatogenesis. II. A comparative study of the heterochromosomes in certain species of Coleoptera, Hemiptera, and Lepidoptera, with special reference to sex determination. *Carnegie Institute of Washington Publication*, v. 36, p. 33–74, 1906.

VIDAL, O.R. Chromosome numbers of Coleoptera from Argentina. *Genetica*, v. 65, p. 235–239, 1984.

VIRKKI, N. Banding of Oedionychina (Coleoptera, Alticinae) chromosomes C- and Ag-bands. *Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico*, v. 67, p. 221-255, 1983.

VIRKKI, N.; DENTON, A. Brief notes on the cytology of Neotropical Coleoptera. 4. *Chalcolepidius silbermanni* Chevrolat (Elateridae: Pyrophorini). *Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico*, v. 71, p. 323–326, 1987.

VIRKKI, N.; SEPÚLVEDA, J.M. Chromosomes of the Puerto Rican “vaquita”, *Diaprepes abbreviatus* (L.) (Curculionidae: Otiorrhynchinae: Phyllobiini). *Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico*, v. 74, p. 121-132, 1990.

VIRKKI, N.; MAZZELLA, C.; DENTON, A. Staining of substances adjacent to the X_{yp} sex bivalent of some weevils (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico*, v. 74, p. 405-418, 1990

VIRKKI, N.; SANTIAGO-BLAY, J.A.; RILEY, E.G. Chromosomes of Puerto Rican Hispinae and Cassidinae (Coleoptera: Chrysomelidae). *The Coleopterists Bulletin*, v. 46, p. 29–42, 1992.

VITTURI, R.; COLOMBA, M.S.; BARBIERI, R.; ZUNINO, M. Ribosomal DNA location in the scarab beetle *Thorectes intermedius* (Costa) (Coleoptera: Geotrupidae) using banding and fluorescent in-situ hybridization. *Chromosome Research*, v. 7, p. 255 – 260, 1999.

VITTURI, R.; COLOMBA, M.; VOLPE, N.; LANNINO, A.; ZUNINO, M. Evidence for male X0 chromosome system in *Pentodon bidens punctatum* (Coleoptera: Scarabaeoidea: Scarabaeidae) with X-linked 18S-28S rDNA clusters. *Genes and Genetic Systems*, v. 78, p. 427–432, 2003.

YADAV, J.S.; PILLAI, R.K. Karyological notes on four species of Cassidinae (Coleoptera: Chrysomelidae). *Genen Phaenen*, v. 18, p. 55-63, 1975.

YADAV, J.S.; VYAS, S.; YADAV, A.S. Chromosome studies on five species of economically important beetles (Coleoptera). *Nucleus*, v. 35, p. 119-126, 1992.

CAPÍTULO III

IDENTIFICAÇÃO DE SEQUENCIAS TELOMÉRICAS PENTANUCLEOTÍDICAS (TTAGG)_n e (TCAGG)_n EM CASSIDINAE S.L. (COLEOPTERA, CHRYSOMELIDAE)

INTRODUÇÃO

Os telômeros são complexos de DNA e proteínas presentes nas extremidades cromossômicas, essenciais para a manutenção da integridade e estabilidade da estrutura. Os telômeros participam também da organização dos cromossomos dentro do núcleo e do emparelhamento durante a meiose (Blackburn 1991; Zakian 1995; Cech 2004). Estes sítios cromossômicos são constituídos por cópias de sequências simples repetidas em tandem e mantidas no final da fita de DNA por uma transcriptase reversa, a telomerase (Blackburn 1991; Zakian 1995). Citogeneticamente, a identificação de qualquer alteração na localização dos telômeros pode representar a ocorrência de rearranjos cromossômicos, como fusões, inversões e translocações (Ruiz-Herrera et al. 2008).

Algumas sequências teloméricas são altamente conservadas em grandes grupos taxonômicos, como o hexâmero (TTAGGG)_n nos vertebrados (Zakian 1995; Sahara et al. 1999) e a sequência (TTTAGGG)_n nas plantas (Zellinger & Riha 2007). Os insetos, no entanto, representam um grupo heterogêneo quanto à organização telomérica, pois, embora a sequência (TTAGG)_n encontre-se amplamente distribuída em vários grupos e seja considerada padrão, esta não é a única (Okazaki et al. 1993; Sahara et al. 1999; Vitková et al. 2005). Entre os insetos, já foram identificadas algumas espécies (TTAGG)_n-negativas (Frydrychová et al. 2004) e mecanismos de manutenção do telômero independentes da telomerase, tais como aqueles observados em Diptera: elementos transponíveis HeT-A e TART em *Drosophila melanogaster* que são adicionados na porção terminal do cromossomo através de transposição (Biessmann et al. 1990), e recombinação desigual entre as sequências repetitivas observadas no gênero *Chrironomus* (Nielsen & Edstrom 1993).

Em Coleoptera, 51 espécies alocadas em 16 famílias – Adephaga: Carabidae, Dytiscidae e Gyrinidae; e Polyphaga: Anobiidae, Buprestidae, Cerambycidae, Chrysomelidae, Cleridae, Cucujidae, Curculionidae, Elateridae, Geotrupidae, Meloidae, Mycetophagidae, Silphidae e Tenebrionidae - foram estudadas, visando observar a ocorrência e a distribuição do cluster de DNA telomérico (TTAGG)_n, através de diferentes metodologias, como *Southern Blot*, Exonuclease BAL-31 e hibridação *in situ* fluorescente (Okazaki et al. 1993; Sahara et al. 1999; Frydrychova & Marec 2002; Mravinac et al. 2011). Espécies de 13 destas famílias, Anobiidae (*Stegobium paniceum*), Buprestidae (*Agrilus viridis*), Carabidae (*Pterostichus oblongopunctatus*), Chrysomelidae (*Chrysolina americana* e *Lepnotarsa decemlineata*),

CTGACCTGACCTGACCTGACCTGAC para a sequência (TCAGG)_n (Osanai et al. 2006). A marcação das sondas foi realizada através de reação em cadeia da polimerase (PCR) em um termociclador Applied Biosystems para um volume total de 50 µL de reação: 31,2µL de H₂O, 5µL de tampão 10X, 8µL de MgCl₂ (25mM), 1µL dATP (2mM), 1µL dGTP (2mM), 1µL dCTP (2mM), 0,7µL dTTP (2mM), 0,6µL biotina 16-dUTP (1mM), 0,5µL Tel F (10mM), 0,5µL Tel R (10mM), 0,5µL Taq Polymerase. A sonda do cluster (TCAGG)_n foi marcada com digoxigenina 11-dUTP (1mM) na quantidade de 0,6µL. Os ciclos de reação para marcação da sonda seguiram os seguintes parâmetros: 5 min a 94 °C para desnaturação inicial; 20 ciclos: a 1 min a 95 °C para desnaturação, 1 min a 50 °C para anelamento, 1,3 min a 72 °C para extensão; 7 min a 72 °C para extensão final.

Após a marcação das sondas, a hibridização foi realizada utilizando o protocolo descrito por Pinkel et al. (1986) com modificações:

a-) Tratar as lâminas com RNAase (10µl/mL em 2xSSC) a 37°C por 60 minutos em câmara úmida; b-) Desidratar as lâminas em série alcoólica 70%, 90% e 100% a temperatura ambiente durante cinco minutos cada e secar; c-) Desnaturar as lâminas em solução de formamida 70%/2xSSC a 70°C por dois minutos; d-) Desidratar as lâminas em série alcoólica gelada 70%, 90% e 100% por cinco minutos e secar; e-) Desnaturar a solução de hibridização (15µl de formamida, 6µl da sonda marcada, 6µl de sulfato dextrano e 3µl de 2xSSC) em termociclador a 95°C por 10 minutos; f-) Colocar sobre cada lâmina 30µl da solução de hibridização, cobrir com lamínula e deixar os cromossomos hibridizando *overnight* a 37°C; g-) Retirar a lamínula e enxaguar as lâminas em 0,4xSSC + 0,3% de Triton a 70°C por exatos dois minutos, agitando; h-) Enxaguar as lâminas em 2xSSC + 0,1% de Triton a temperatura ambiente por dois minutos, agitando; i-) Colocar sobre cada lâmina 30µl de tampão bloqueio (1000µl 2xSSC, 10µl de Triton 100x, 0,05g de leite em pó desnatado), cobrir com parafilm e incubar por cinco minutos; j-) Retirar o parafilm e enxaguar as lâminas brevemente em 2xSSC a temperatura ambiente; k-) Incubar a lâmina com 4µl de anti-biotina conjugada com streptavidina Alexa Fluor 488 (200µg/mL) e 26µl de tampão bloqueio por uma hora à 37°C em câmara úmida; l-) Lavar as lâminas com 2xSSC a 43°C por dois minutos, agitando; m-) Lavar as lâminas duas vezes com 2xSSC + 0,1% de Triton a 43°C agitando; n-) Colocar sobre as lâminas 20µl do fluorocromo 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) com Vectashield, cobrir com lamínulas e retirar o excesso com papel filtro. As sondas marcadas com digoxigenina foram detectadas com anti-digoxigenina, com a mesma concentração e metodologia utilizada para a anti-biotina.

As análises cromossômicas foram realizadas em microscópio de fluorescência Zeiss Imager A2 e as imagens capturadas com objetiva de 100X, utilizando o *software* Axion Vision.

Tabela 1 – Representantes de Cassidinae *s.l.* analisados no presente estudo, incluindo o número de indivíduos, tipo de sequência examinada e a localidade de coleta.

Espécie	Número de indivíduos	Sequência analisada	Locais de coleta
Cassidini			
<i>Agroiconota inedita</i> (Boheman 1855)	3 machos	TTAGG	Saltinho
<i>Charidotella immaculata</i> (Oliver 1790)	4 machos	TTAGG/TCAGG	Saltinho
<i>Charidotella sexpunctata</i> (Fabricius 1781)	1 macho	TTAGG	Saltinho
<i>Deloyala cruciata</i> (Linnaeus 1758)	3 machos	TTAGG/TCAGG	Saltinho
	2 machos		São Pedro
<i>Microctenochira optata</i> (Boheman 1855)	2 machos	TTAGG	Saltinho
<i>Microctenochira quadrata</i> (Degeer 1775)	2 machos	TTAGG	Saltinho
Mesomphaliini			
<i>Botanochara tessellata</i> (Burmeister, 1870)	1 macho	TTAGG	Saltinho
<i>Chelymorphia cribraria</i> (Fabricius 1775)	4 machos	TTAGG	Saltinho
<i>Chelymorphia inflata</i> (Boheman 1854)	2 machos	TTAGG	Jundiá
<i>Cteisella magica</i> (Boheman 1855)	2 machos	TTAGG	Jundiá
<i>Paraselenis flava</i> (Linnaeus 1758)	5 machos	TTAGG/TCAGG	Saltinho
<i>Stolas areolata</i> (Germar 1824)	2 machos	TTAGG	Jundiá
Coordenadas geográficas: Jundiá (23°8'S, 46°53'W), SP; Saltinho (22°50'S, 47°40'W), SP; São Pedro (22°3'S, 47°57'W), SP			

RESULTADOS

Neste trabalho, 12 espécies de cassidíneos foram estudadas com sonda da sequência telomérica (TTAGG)_n e três espécies com sonda (TCAGG)_n. Deste total, sete espécies (cinco de Cassidini e duas de Mesomphaliini) apresentaram marcações positivas para a sequência telomérica (TTAGG)_n. Para o clusters (TCAGG)_n, nenhuma das três espécies analisadas exibiu sinais positivos.

Hibridizações com sonda de DNA telomérico (TTAGG)_n em células meióticas de espécies da tribo Cassidini mostraram que *Cha. immaculata* (2n=20+Xy_p), *Cha. sexpunctata* (2n=20+Xy_p), *M. optata* (2n=16+Xy_p) e *M. quadrata* (2n=16+Xy_p) possuem clusters de sequências teloméricas na região terminal dos bivalentes autossômicos (Figura 1a – c, 1e – f). No entanto, estas marcações positivas não estavam presentes em todos os cromossomos do complemento. Em *Cha. immaculata* foi possível observar sinais fluorescentes em seis pares autossômicos, e em *Cha. sexpunctata* e *M. optata* em três pares autossômicos (Figura 1b – c, 1e). Nos paquítenos de *M. quadrata*, marcações terminais foram observadas em alguns bivalentes autossômicos, os quais não foram identificados (Figura 1f). Além disso, *Cha. immaculata* exibiu um sinal intersticial em um par de cromossomos autossômicos e uma marcação terminal em uma das extremidades do cromossomo X e em ambas as extremidades do y (Figuras 1a-b). *Charidotella sexpunctata* apresentou uma região brilhante em uma das extremidades do cromossomo X (Figura 1c) e *M. quadrata* exibiu marcação no bivalente sexual

(Figura 1f), não sendo possível determinar a sua localização precisa. *Deloyala cruciata* ($2n=16+X_{yp}$) não mostrou sinais teloméricos em cromossomos autossômicos, porém, apresentou marcação em uma das extremidades do cromossomo sexual X (Figura 1d).

Na tribo Mesomphaliini, a análise de células diplotênicas submetidas à técnica de FISH com sonda telomérica mostrou clusters da sequência (TTAGG) $_n$ na região final de três bivalentes autossômicos, além de uma marcação em apenas uma das extremidades do cromossomo sexual X em *Che. cribraria* ($2n=20+X_{yp}$) (Figura 1g), e na região terminal de todos os cromossomos em *P. flava* ($2n=40+X_{yp}$) (Figura 1h).

Para confirmar os resultados bem como verificar se *A. inedita*, *B. tessellata*, *Che. inflata*, *Cte. magica* e *S. areolata* eram realmente (TTAGG) $_n$ -negativas, alterações na técnica de FISH foram realizadas com diferentes tratamentos nas lâminas na pré-hibridação, como banho *overnight* em ácido acético 70%, o uso da pepsina e da RNase, assim como a diminuição da estringência pós-hibridação. Porém, em todos estes experimentos, os resultados obtidos foram similares.

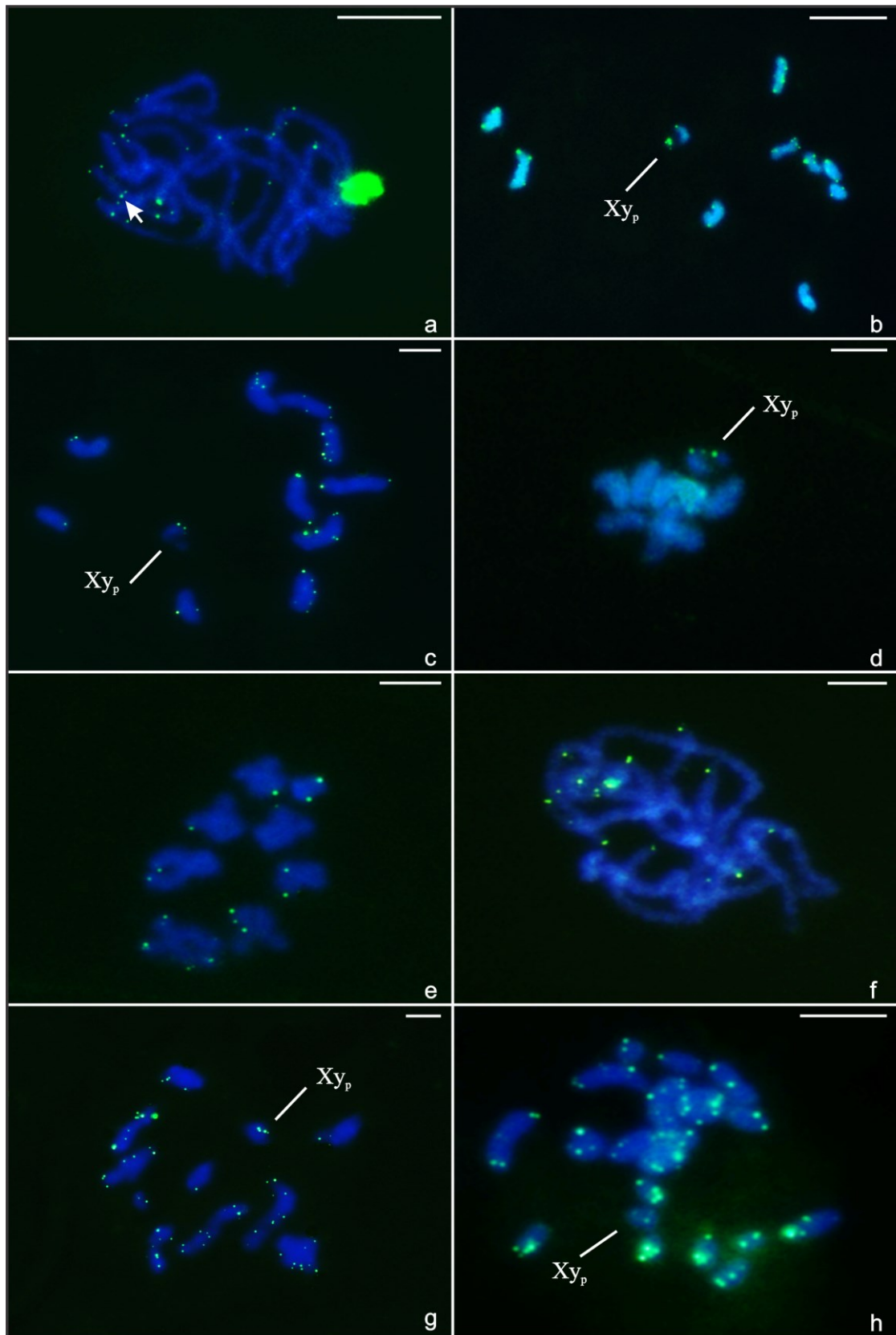


Figura 1 - Localização da sequência telomérica (TTAGG)_n em células meióticas de espécies das tribos Cassidini (a – f) e Mesomphaliini (g – h). **a-b.** *Charidotella immaculata*, paquíteno e diplóteno, respectivamente. **c.** *Charidotella sexpunctata*, diplóteno. **d.** *Deloyala cruciata*, diplóteno. **e.** *Microctenochyra optata*, metáfase II. **f.** *Microctenochyra quadrata*, paquíteno. **g.** *Chelymormpha cribraria*, diplóteno. **h.** *Paraselenis flava*, diplóteno. Escala= 10µm.

DISCUSSÃO

O estudo sobre a localização e presença do DNA telomérico tem sido realizado em diferentes organismos, como vertebrados, leveduras, flagelados, nematoides e plantas (Brown et al. 1990), e trata-se de uma importante ferramenta que pode revelar a diferenciação e a evolução dos cromossomos. Apesar do pequeno número de representante analisados, Coleoptera é uma das ordens mais conhecidas entre os insetos (Kuznetsova et al. 2012), revelando uma heterogeneidade quanto a presença do motivo (TTAGG)_n entre as espécies (Sahara et al. 1999; Frydrychová & Marec 2002; Mravinac et al. 2011).

Embora o cluster telomérico (TTAGG)_n tenha sido observado em sete das 12 espécies estudadas neste trabalho, somente *P. flava* (tribo Mesompahliini) exibiu marcações terminais típicas em todos os cromossomos do complemento. Nas outras seis espécies, apesar da ocorrência de sinais de hibridação na região terminal dos cromossomos, estas não estavam presentes em todos os elementos do conjunto diploide. Tal variação no número de cromossomos (TTAGG)_n-positivos foi observada em espécies de um mesmo gênero e com número diploide semelhante, como em *Charidotella* e *Microctenochira*, demonstrando que a diferença não está relacionada ao fato das espécies estudadas apresentarem ou não cariótipos distintos, tampouco pertencerem a clados filogeneticamente não-relacionados.

A presença de sítios (TTAGG)_n na região terminal de apenas alguns cromossomos de *Cha. immaculata*, *Cha. sexpunctata*, *D. cruciata*, *M. optata*, *M. quadrata* e *Che. cribraria*, e intersticial em um par autossômico de *Cha. immaculata* pode indicar que as marcações não evidenciaram apenas sítios teloméricos, mas regiões cromossômicas com sequências de DNA repetitivo, como as de heterocromatina constitutiva. Resultados similares e, principalmente a ocorrência de sítios teloméricos intersticiais coincidentes com regiões de heterocromatina constitutiva, foram encontrados em diferentes grupos de vertebrados, indicando que a repetição (TTAGG)_n pode ser um componente do DNA satélite (Meyne et al. 1990; Pagnozzi et al. 2002). No entanto, nos Cassidinae não existe uma correlação clara entre as marcações TTAGG com as regiões de heterocromatina evidenciada pela técnica de bandamento C (Lopes et al. *In press*). Isso poderia ser explicado pelo fato de que em Cassidinae a quantidade de heterocromatina constitutiva é pequena quando comparado com outras famílias de Coleoptera, como Elateridae e Tenebrionidae (Lopes et al. *In Press*). Alternativamente, pode ser que a técnica de bandamento C não tenha revelado todos os tipos de heterocromatina presente nos cromossomos destas espécies. Isso pode ser comprovado pelo fato de que o cromossomo y de *Cha. immaculata* parece ser inteiramente constituído por sequências TTAGG mas com o bandamento C ele apareceu totalmente eucromático (ver Lopes et al. *In press*).

De maneira geral, variações entre as espécies quanto à presença do cluster telomérico (TTAGG)_n é frequente na ordem Coleoptera. Em uma análise realizada em 12 espécies de besouros com as metodologias da FISH e *southern hybridization*, Frydrychová & Marec (2002) verificaram que seis espécies de Polyphaga e uma espécie de Adephaga eram (TTAGG)_n-positivas, enquanto que outras três polífagas e duas adefagas foram (TTAGG)_n-negativas. Em Tenebrionidae, a ocorrência de um pentanucleotídeo alternativo, o (TCAGG)_n, foi observado em diversas espécies analisadas, além daquelas que possuem o cluster (TTAGG)_n (Frydrychová & Marec 2002; Mravinac et al. 2011), indicando mudanças recentes na composição do telômero em espécies filogeneticamente próximas. Em crisomelídeos, Mravinac e colaboradores (2011) observaram em quatro espécies (*Timarcha balearica*, *Chrysolina americana*, *Chrysolina herbacea* e *Chrysolina polita*), através da técnica de FISH e pela utilização da exonuclease BAL-31, que houve variação no tamanho e localização dos clusters teloméricos: em *C. americana*, *C. herbacea* e *C. polita*. A FISH revelou a sequência (TTAGG)_n na região final dos cromossomos, enquanto que em *C. americana*, a análise do BAL-31 mostrou que o cluster telomérico é pequeno. Em *T. balearica*, verificou-se que a sequência (TTAGG)_n teve o número de cópias reduzido e que clusters (TTAGG)_n também ocorrem em sítios não-teloméricos. Assim como registrado em *C. americana*, em todas as espécies de Cassidinae examinadas aqui, como exceção de *P. flava*, a ausência de sinais fluorescentes na região terminal de todos os cromossomos poderia estar relacionada a pequena quantidade de repetições do pentanucleotídeo TTAGG ou, como observado em diversas famílias de Coleoptera, a perda total desta sequência em espécies filogeneticamente próximas.

A ausência de uma sequência telomérica está relacionada a perda ou inatividade da enzima telomerase, que tem como função a manutenção dos telômeros. Por isso, para que ocorram mudanças nos clusters de DNA telomérico é também necessário que ocorram mutações na enzima telomerase ou a substituição por algum outro mecanismo que compense esta perda (Sasaki & Fujiwara, 2000; Frydrychová & Marec 2002). Pryde e colaboradores (1997) observaram que regiões subteloméricas são similares em estrutura em um grupo variado de organismos, como nas leveduras e no homem, e contém domínios que podem ser utilizados para a evolução e/ou manutenção dos telômeros sem a presença da telomerase, pois são capazes de se auto transcrever. No bicho-da-seda *Bombyx mori*, que é (TTAGG)_n-positivo, foram descritos os domínios conhecidos por retrotransposons TRAS1 e SART 1 (Takahashi & Fujiwara 1999), que se misturam com as repetições (TTAGG)_n. Adicionalmente, Osanai-Futahashi & Fujiwara (2011) relataram que a sequência (TCAGG)_n, encontrada

exclusivamente em representantes da família Tenebrionidae, é mantida por retrotransposons similares aqueles observados em *B. mori*.

Em Cassidinae, a heterogeneidade de marcação dos clusters teloméricos em diferentes cromossomos e a presença de espécies com cromossomos (TTAGG)_n-positivos ou negativos, indica que este grupo possui a sequência ancestral dos insetos, mas que ela está passando por um processo evolutivo, sendo repetidamente perdida, atingindo um limite em que não são mais identificadas em qualquer elemento do conjunto cromossômico. Estas constantes perdas do pentanucleotídeo podem ser consequência da inatividade da telomerase, o que significa que embora a sequência (TTAGG)_n esteja presente em alguns cromossomos, ela não está mais relacionada ao telômero. Neste caso, a manutenção telomérica pode estar sendo realizada por domínios subteloméricos, como aqueles observados no lepidóptero *B. mori*. No entanto, a ocorrência destes domínios, bem como a presença ou não da enzima telomerase nos cassidineos ainda precisam ser investigados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEISSMANN, H.; MASON, J.M.; FERRY, K.; D'HULST, M; VALGEIRSDOTTIR, K.; TRAVERSE, K.L.; PARDUE, M.L. Addition of telomere-associated HeT DNA sequences "heals" broken chromosome ends in *Drosophila*. *Cell*, v. 61, p. 663 – 673, 1990.

BLACKBURN, E.H. Structure and function of telomeres. *Nature*, v. 350, p. 569-573, 1991.

BROWN, S.J.; HENRY, J.K.; BLACK, W.C.I.V.; DENELL, R.E. Molecular genetic manipulation of the red flour beetle: genome organization and cloning of a ribosomal protein gene. *Insect Biochemistry*, v. 20, p. 185-193, 1990.

CECH, T.R. Beginning to understand the end of the chromosome. *Cell*, v. 116, p. 273 – 279, 2004.

FRYDRYCHOVÁ, R.; MAREC, F. Repeated losses of TTAGG telomere repeats in evolution of beetles (Coleoptera). *Genetica*, v. 115, p. 179 – 187, 2002.

FRYDRYCHOVA, R.; GROSSMANN, P.; TRUBAC, P.; VITKOVA, M.; MAREC, F. Phylogenetic distribution of TTAGG telomeric repeats in insects. *Genome*, 47, p. 163 – 178, 2004.

KUZNETSOVA, V.G.; SNEJANA, M.G.; ANOKHIN, B.A. The first finding of (TTAGG)_n telomeric repeat in chromosomes of true bugs (Heteroptera, Belostomatidae). *Comparative Cytogenetics*, v. 6, p. 341–346, 2012.

LOPES, A.T.; FERNANDES, F.R.; SCHNEIDER, M.C. Comparative cytogenetic analysis in 13 tortoise beetles (Cassidinae, Coleoptera) from Brazilian fauna. *European Journal of Entomology*. In Press.

MAYNE, J.; BAKER, R.J.; HOBART, H.H.; HSU, T.C.; RYDER, O.A.; WARD, O.G.; WILEY, J. E.; WURSTER-HILL, D.H.; YATES, T.L.; MOYZIS, R.K. Distribution of non-telomeric sites of the (TTAGGG)_n telomeric sequence in vertebrate chromosomes. *Chromosoma*, v. 99, p. 3 10, 1990.

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

NIELSEN, L.; EDSTROM, J.E. Complex telomere associated repeats units in members of the genus *Chironomus* evolve from sequences similar to simple telomeric repeats. *Molecular and Cellular Biology*, v.13, p. 1583 – 1589, 1993.

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

OSANAI, M.; KOJIMA, K.K.; FUTAHASHI, R.; YAGUCHI, S.; FUJIWARA, H. Identification and characterization of the telomerase reverse transcriptase of *Bombyx mori* (silkworm) and *Tribolium castaneum* (flour beetle). *Gene*, v. 376, p. 281–289, 2006.

OSANAI-FUTAHASHI, M.; FUJIWARA, H. Coevolution of telomeric repeats and telomeric repeat-specific non-LTR retrotransposons in insects. *Molecular Biology Evolution*, v. 28, p. 2983–2986, 2011.

PAGNOZZI, J.M.; DITCHFIELD, A.D.; YONENAGA-YASSUDA, Y. Mapping the distribution of the interstitial telomeric (TTAGGG)_n sequences in eight species of Brazilian marsupials (Didelphidae) by FISH and the correlation with constitutive heterochromatin. Do ITS represent evidence for fusion events in American marsupials? *Cytogenetic and Genome Research*, v. 98, p. 278–284, 2002.

PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J.W. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 83, p. 2934–2938, 1986.

PRYDE, F.E.; GORHAM, H.C.; LOUIS, E.J. Chromosome ends: all the same under their caps. *Current Opinion in Genetics & Development*, v. 7, p. 822-828, 1997.

RUIZ-HERRERA, A.; NERGADZE, S.G.; SATAGOSTINO, M.; GIULOTTO, E. Telomeric repeats far from the ends: mechanisms of origin and role evolution. *Cytogenetic and Genoma Research*, v. 122. P. 219-228, 2008.

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

SASAKI, T.; FUJIWARA, H. Detection and distribution patterns of telomerase activity in insects. *European Journal of Biochemistry*, v. 267, p. 3015-3031, 2000.

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

TAKAHASHI, H.; FUJIWARA, H. Transcription analysis of the telomeric repeat-specific retrotransposons TRAS1 and SART1 of the silkworm *Bombyx mori*. *Nuclei Acid Research*, v. 27, p. 2015-2021, 1999.

VÍTKOVÁ, M.; KRÁL, J.; TRAUT, W.; ZRZAVÝ, J.; MAREC, F. The evolutionary origin of insect telomeric repeats, (TTAGG)_n. *Chromosome Research*, v.13, p. 145–156, 2005.

ZAKIAN, V.A. Telomeres: beginning to understand the end. *Science*, v. 270, p. 1601 – 1607, 1995.

ZELLINGER, B.; RIHA, K. Composition of plant telomeres. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1769, p. 399-409, 2007.

CAPÍTULO IV

EMPREGO DOS GENES rDNA 5S E snRNA U2 COMO MARCADORES CITOGENÉTICOS EM CASSIDINAE *s.l.* (COLEOPTERA, CHRYSOMELIDAE)

INTRODUÇÃO

Os elementos de DNA repetitivo representam uma grande porção do genoma eucarioto e incluem as regiões satélites, minissatélites, microsatélites, os elementos transponíveis e as famílias multigênicas (Charlesworth et al. 1994). Dentre as famílias multigênicas, os genes ribossomais (rDNA), acompanhado pelo pequeno RNA nuclear (snRNA) têm sido utilizados como marcadores em diversos estudos citogenéticos, revelando clusters que podem ser encontrados no genoma como sequências dispersas, repetidas em tandem ou co-localizadas com outros genes (Zaller et al. 1984; Manchado et al. 2006; Cabral-de-Mello et al. 2010).

O gene ribossomal 5S consiste de sequências conservadas, repetidas em tandem e separadas por espaçadores intergênicos, que formam clusters em um ou mais cromossomos. Ao contrário do rDNA 45S, o gene 5S localiza-se fora do nucléolo e junta-se ao 28S e 5.8S para formar a subunidade maior dos ribossomos (Long & David 1980; Moscone et al. 1999). Entre os insetos, a presença do gene de rDNA 5S foi estudada em gafanhotos e besouros (Cabral-de-Mello et al. 2010, 2011a, 2011b, 2011c, 2011d; Oliveira et al. 2011; Oliveira et al. 2012; Arcanjo et al. 2013; Goll et al. 2015). Nos besouros, o mapeamento foi realizado em 37 espécies da família Scarabaeidae, que exibiu em 62% dos representantes dois sítios ribossomais localizados em um par autossômico, e nas demais espécies ocorreram co-localização entre o rDNA 5S e o gene da histona H3. E em uma espécie de Tenebrionidae, *Lagria villosa*, que exibiu dois clusters de rDNA 5S localizados no braço curto do quarto par autossômico e co-localizados com o gene ribossomal rDNA 18S (Cabral-de-Mello et al. 2011a, Oliveira et al. 2012; Arcanjo et al. 2013; Goll et al. 2015).

O snRNA é formado por cinco unidades, U1, U2, U4, U5 e U6, que exercem um papel fundamental no *splicing* do RNA, realizando a remoção dos íntrons e junção dos éxons na maturação do RNA mensageiro (mRNA) (Nielsen 2003; Vladkhan 2005). Os snRNA são altamente conservados nos eucariotos; no entanto, podem ocorrer como múltiplas cópias dispersas no genoma, organizados em tandem, co-localizados com outras famílias multigênicas, ou alocados no cromossomo sexual ou supernumerário em artrópodos (Manser & Gesteland 1982; Marzluff et al. 1983; Ebel et al. 1999; Manchado et al. 2006; Marz et al. 2008; Bueno et al. 2013; Palácios-Gimenez et al. 2013). Dentre as cinco unidades do snRNA, o U2 é o segundo mais abundante (Adams et al. 1985; Guthrie & Patterson 1988; Yu et al. 1999) e vem sendo utilizado como marcador citogenético, principalmente nos peixes (Manchado et al. 2006;

Ubeda-Manzanaro et al. 2010). Nos insetos, somente uma espécie de gafanhoto, *Abracris flavolineata*, foi caracterizada quanto a presença e localização do gene snRNA U2, que foi reconhecido em apenas um par cromossômico (Bueno et al. 2013).

A subfamília Cassidinae *s.l.* inclui mais de 6.000 espécies, das quais apenas 130 foram estudadas sob o ponto de vista citogenético (Chaboo 2007; De Julio et al. 2010; Lopes et al. *In press*), o que representa 2,1% da diversidade de espécies deste grupo. Os resultados obtidos a partir de análise cromossômica convencional demonstraram em 52% das espécies o número diploide $2n=18$ e sistema cromossômico sexual do tipo Xy_p (De Vaio & Postiglioni 1974; De Julio et al. 2010). Entretanto, esta uniformidade cariotípica é aparente, pois o cariótipo $2n=16+Xy_p$ ocorre com maior frequência apenas em representantes da tribo Cassidini (Lopes et al. *In press*). Assim, com o objetivo de acrescentar dados que possam contribuir sobre os mecanismos envolvidos na organização das famílias multigênicas, assim como avaliar a eficiência dos genes de rDNA 5S e snRNA U2 como marcadores citogenéticos na subfamília Cassidinae, o mapeamento físico de ambos os genes, através da hibridação *in situ* fluorescente, foi realizado pela primeira vez neste trabalho.

MATERIAL E MÉTODOS

Um total de 14 indivíduos pertencentes a sete espécies foram estudadas neste trabalho (Tabela 1). Os espécimes foram coletados manualmente, nas cidades de Saltinho e São Pedro, estado de São Paulo, Brasil. A identificação taxonômica dos exemplares foi realizada pela Dra. Flávia R. Fernandes, do Museu Paraense Emilio Goeldi (MPEG), UFPA, Belém, Pará. Os espécimes foram depositados na coleção entomológica do MPEG (curador: Orlando Tobias Silveira).

Tabela 1 – Representantes de Cassidinae *s.l.* analisados no presente estudo, incluindo o número de indivíduos, a sequência examinada e a localidade da coleta no estado de São Paulo.

Espécie	Número de indivíduos	Sequência analisada	Locais de coleta
Cassidini			
<i>Agroiconota inedita</i> (Boheman 1855)	2 machos	U2/5S	São Pedro
<i>Charidotella immaculata</i> (Oliver 1790)	3 machos	U2/5S	Saltinho
<i>Charidotella sexpunctata</i> (Fabricius 1781)	2 machos	U2/5S	Saltinho
<i>Deloyala cruciata</i> (Linnaeus 1758)	1 macho	5S	São Pedro
Mesomphaliini			
<i>Chelymorphism cribraria</i> (Fabricius 1775)	2 machos	U2/5S	São Pedro
<i>Cyrttonota cyanea</i> (Linnaeus 1758)	2 machos	U2/5S	São Pedro
<i>Paraselenis flava</i> (Linnaeus 1758)	2 machos	U2/5S	Saltinho

Coordenadas geográficas: Saltinho (22°50'S, 47°40'W); São Pedro (22°3'S, 47°57'W).

As preparações cromossômicas foram obtidas a partir de testículos de indivíduos adultos de acordo com a técnica descrita por Schneider et al. (2007), com modificação no tempo de hipotonização, que foi de 15 minutos.

O DNA genômico do abdome total de besouros da espécie *Cha. immaculata* foi extraído de acordo com a metodologia descrita no Kit Comercial Qiagen Dneasy Blood and Tissue. A qualidade do DNA extraído foi avaliada através de eletroforese, utilizando gel de agarose 1% corado com Gel Red.

A amplificação de regiões dos genes snRNA U2 e rDNA 5S foi realizada por uma reação de polimerase em cadeia (PCR) para um volume de 25µl, utilizando oligonucleotídeos específicos descritos por Colgan et al. (1998) para snRNA U2-F-5' - TCTCGGCCTATATTGGCTAA e U2-R-5' - GACGGTAGCTGCAATACCGG e para o rDNA 5S-F5' - ACTTAGATGGGGGACCGCTT e rDNA 5S-R-5' - TTCAGCGTGGTATGGTCGTT, com variações nos programas de acordo com o gene:

a-) Gene snRNA U2: Programa: 3 min a 94 °C para desnaturação inicial; 35 ciclos: a 30 segundos a 94 °C para desnaturação, 30 segundos a 48 °C para anelamento, 1 min a 72 °C para extensão; 10 min a 72 °C para extensão final.

b-) Gene rDNA 5S: Programa: 3 min a 94 °C para desnaturação inicial; 35 ciclos: a 30 segundos a 94 °C para desnaturação, 30 segundos a 54 °C para anelamento, 1 min a 72 °C para extensão; 10 min a 72 °C para extensão final.

As sondas do snRNA U2 e do rDNA 5S foram marcadas por PCR com biotina 16-dUTP. Adicionalmente, foi utilizado uma sonda rDNA 5S pTZ_Ooct_5S (Almeida et al. *In press*) marcada por DIG-Nick Translation Mix - Roche®.

A hibridização foi realizada utilizando a metodologia descrita por Pinkel et al. (1986) com modificações:

- 1-) Deixar as lâminas de um dia para o outro banhadas em solução de ácido acético 70%; 2-) Deixar as lâminas por 60 minutos em solução de pepsina em câmara úmida a 37°C; 3-) Lavar as lâminas em tampão de PBS 1X durante 5 minutos em temperatura ambiente (shaker); 4-) Desidratar as lâminas em série alcoólica 70, 90 e 100% por 5 minutos e secar; 5-) Incubar as lâminas em 100µl de RNase (10µl/mL em 2xSSC) a 37°C por 60 minutos em câmara úmida; 6-) Lavar as lâminas três vezes por 5 minutos em solução de 2xSSC; 7-) Lavar as lâminas durante 5 minutos em solução de PBS 1X; 8-) Fixar o material em formaldeído 1% em PBS 1X/50mM MgCl₂ durante 10 minutos em temperatura ambiente; 9-) Lavar as lâminas em PBS 1X por 5 minutos (shaker); 10-) Desidratar as lâminas em série alcoólica 70, 90 e 100% por 5 minutos cada e deixar secar; 11-) Desnaturar o DNA cromossômico em formamida 70% em

2xSSC a 70°C por 5 minutos; 12-) Desidratar o material em série alcoólica gelada 70, 90 e 100% por 5 minutos cada e secar rapidamente as lâminas; 13-) Usar 6µl de sonda e 24µl de tampão de hibridação; 14-) Desnaturar a sonda em termociclador 95°C por 10 minutos e depois manter em gelo; 15-) Colocar 30µl da solução de hibridação em cada lâmina, cobrir com lamínula. 16-) Lavar as lâminas em solução de formamida 15% a 42°C por 5 minutos; 17-) Lavar as lâminas durante 5 minutos em solução de Tween 0,5% em temperatura ambiente (shaker); 18-) Incubar as lâminas em tampão NFDM por 15 minutos; 19-) Lavar duas vezes com solução de Tween 0,5% a temperatura ambiente por 5 minutos (shaker); 20-) Incubar cada lâmina com 6µl de Avidina-FITC e 24µl de tampão bloqueio (NFDM) por 30 minutos em câmara úmida a 37°C; 21-) Lavar as lâminas 3 vezes por 5 minutos em solução de Tween 0,5% em temperatura ambiente (shaker); 22-) Incubar cada lâmina com 2µl de anti-avidina biotinilada e 38µl de tampão bloqueio (NFDM) por 30 minutos em câmara úmida a 37°C; 23-) Lavar as lâminas 3 vezes por 5 minutos em solução de Tween 0,5% em temperatura ambiente (shaker); 24-) Repetir os passos 20-23 deste protocolo; 25-) Repetir os passos 20 e 21 deste protocolo; 26-) Desidratar o material em série alcoólica 70, 90 e 100% por 5 minutos cada e deixar secar; 27-) Colocar sobre as lâminas 30µl do fluorocromo 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) com Vectashield, cobrir com lamínulas e retirar o excesso com papel filtro.

Para a hibridação do gene rDNA 5S marcado por Dig-Nick, a metodologia de hibridação foi a mesma até o passo 18, onde então as lâminas foram incubadas por 60 minutos em câmara úmida a 37°C com 2µl de anti-digoxigenina e 28µl de tampão bloqueio e então lavadas duas vezes em solução de Tween 0,5% a temperatura ambiente por 5 minutos (shaker). A seguir foram mantidos os passos 26 e 27 do protocolo acima mencionado.

As imagens dos cromossomos foram capturadas em fotomicroscópio óptico Zeiss A2, com objetiva 100x de imersão, optovar 1.6, utilizando o *software* Axion Vision.

RESULTADOS

A amplificação do gene de rDNA 5S de *Cha. immaculata* foi avaliada em um gel de eletroforese a 2%, revelando uma banda forte, conforme mostra a Figura 1. No entanto, após o emprego da técnica de FISH, somente *Cha. immaculata* exibiu uma marcação positiva para o gene rDNA 5S, quando utilizada a sonda pTZ_Ooct_5S (Almeida et al. *In press*) em núcleo interfásico (Figura 2a).

Das seis espécies pertencentes as tribos Cassidini e Mesomphaliini examinadas com relação a distribuição do gene de snRNA U2, cinco exibiram resultados positivos, revelando marcações tênues em um par autossômico (Figura 2b-f). Em Cassidini, *A. inedita* e *Cha.*

sempunctata apresentaram sítios de snRNA U2 localizados na região intersticial de um bivalente com tamanho grande (Figura 2b e 2d), enquanto que *Cha. immaculata* exibiu a marcação na região terminal de um bivalente de tamanho grande (Figura 2c). Em Mesomphaliini, *Che. cribraria* (Figura 2e) e *P. flava* (Figura 2f) mostraram marcações na região intersticial de um par cromossômico com tamanho pequeno e terminal de um bivalente também de tamanho pequeno, respectivamente.

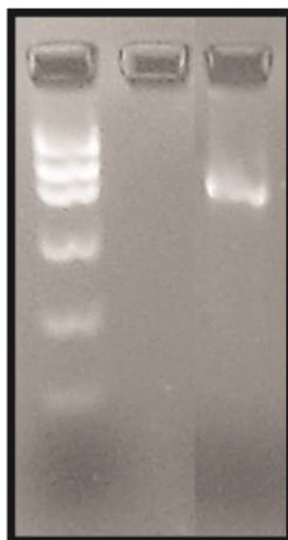


Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose do produto de amplificação do primer de rDNA 5S no DNA de *Charidotella immaculata*.

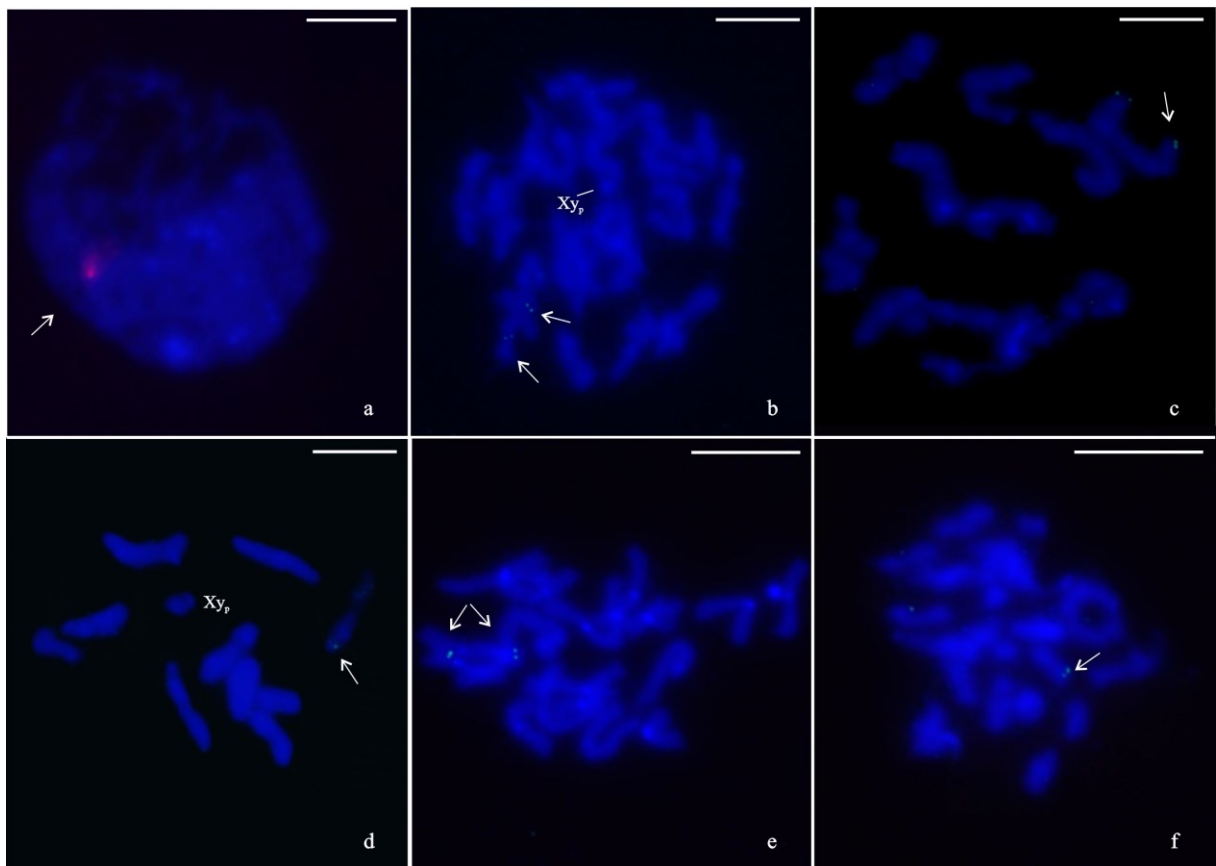


Figura 2 – Mapeamento dos genes de rDNA 5S (vermelho) e snRNA U2 (verde) em células testiculares de Cassidini (a-d) e Mesomphaliini (e-f). **a, c.** *Charidotella immaculata* ($2n=10II+Xy_p$). **b.** *Agroiconota inedita* ($2n=20II+Xy_p$). **d.** *Charidotella sexpunctata* ($2n=10II+Xy_p$). **e.** *Chelymorphia cribraria* ($2n=20+Xy_p$). **f.** *Paraselenis flava* ($2n=20II+Xy_p$). As setas indicam os sinais de hibridação. Escala= 10 μ m.

DISCUSSÃO

Uma quantidade significativa de informações sobre a distribuição do gene de rDNA 5S tem sido registrada para diversos organismos, como mamíferos (Leah et al. 1990), plantas (Adacchi et al. 1997), peixes (Carrera et al. 2000, Martins & Wasko 2004) e insetos das ordens Orthoptera (Cabral-de-Mello et al. 2011c, 2011d) e Coleoptera (Cabral-de-Mello et al. 2011a, 2011b; Oliveira et al. 2012; Arcanjo et al. 2013; Goll et al. 2015), revelando variações quanto a localização e número de clusters entre as espécies. Dentre os gafanhotos, duas famílias foram estudadas, Proscopiidae e Acrididae, sendo que na primeira foi encontrado um padrão conservado de distribuição e número do rDNA 5S, e na última houve uma intensa variação (Cabral-de-Mello et al. 2011c, 2011d). Nos besouros, as 37 espécies da subfamília Scarabaeinae e uma de Tenebrionidae exibiram padrão conservado de localização da sequência de rDNA 5S, que foi dois clusters em um par autossômico (Cabral -de-Mello et al. 2010, 2011a, 2011b; Oliveira et al. 2012; Arcanjo et al. 2013; Goll et al. 2015). Adicionalmente, o grupo dos peixes foi um dos mais estudados quanto a organização e estrutura do rDNA 5S (Martins & Wasko 2004), onde os resultados podem ser utilizados na diferenciação de espécies, assim como na diferenciação sexual, como observado em *Oncorhynchus mykiss*, na qual a fêmea se distingue do macho por exibir maior número de clusters do rDNA 5S (Pendás et al. 1995; Mórán et al. 1996; Carrera et al. 2000; Martins & Wasko 2004).

Este foi o primeiro estudo sobre a localização dos sítios de rDNA 5S em Cassidinae, sendo que apenas em *Cha. immaculata*, submetida a FISH com a sonda pTZ_Ooct_5S (Almeida et al. *In press*) revelou sinal tênue de hibridação em núcleos interfásicos. Em relação à sonda com DNA extraído de *Cha. immaculata*, apesar da evidência de amplificação do gene de rDNA 5S por PCR, a hibridação nos cromossomos não ocorreu, mesmo após diversas alterações na metodologia da FISH, quer seja nas lavagens ou na amplificação do sinal. O gene de rDNA 5S é uma sequência, que embora conservada, é bastante pequena, compreendendo cerca de 120 pb, (Pendás et al. 1995), o que pode ter dificultado a hibridação, principalmente se o cromossomo está muito condensado e é pequeno, características que condizem com os cassidíneos.

Por outro lado, embora o snRNA U2 seja uma sequência conservada, tem sido pouco mapeada entre os animais, nos quais foram observadas variações na localização. Em peixes, por exemplo, os clusters apareceram localizados em apenas um par autossômico, como observado em *Halobatrachus didactylus* e *Plectorhynchus mediterraneus*, de forma dispersa nos cromossomos, exibindo-se em praticamente todos os cromossomos do conjunto, como em *Amphichthys cryptocentrus*, e co-localizados com genes ribossomais 18S, como em *Thalassophryne maculosa* (Manchado et al. 2006; Ubeda-Manzanaro et al. 2010; Merlo et al.

2012). Neste trabalho, o cluster de snRNA U2 foi observado em cinco das seis espécies analisadas, as quais estão alocadas em duas tribos e quatro gêneros distintos, e exibiram o mesmo padrão do gafanhoto *A. flavolineata* (Bueno et al. 2013), que foram dois sítios localizados em um par autossômico. No entanto, ocorreram variações na localização cromossômica dos clusters entre as espécies, inclusive naquelas pertencentes a um mesmo gênero e com cariótipo semelhante, como no caso de *Cha. immaculata* e *Cha. sexpunctata*, o que permitiu diferenciá-las cariotipicamente. Adicionalmente, a ocorrência de um cluster do gene snRNA U2 em cromossomos autossômicos ocorreu com maior frequência na maioria das espécies tanto de invertebrados quanto vertebrados até agora analisados. Porém, somente com informações para um maior número de espécies será possível relacionar esta alta frequência de um sítio de snRNA U2 autossômico como uma característica ancestral de ambos os grupos.

Assim como o gene rDNA 5S, o snRNA U2 também possui uma sequência pequena (Busch et al. 1982), e aliado ao fato dos cassidíneos apresentarem cromossomos com tamanho pequeno, os sinais fluorescentes exibiram-se como pontos diminutos e fracos; este padrão foi mantido mesmo na ausência da utilização da colchicina, que garante que os cromossomos fiquem mais descondensados, favorecendo a hibridação. Além disso, somente após a amplificação do sinal de hibridação foi possível observar as marcações de snRNA U2 positivas. Porém, essa alteração na metodologia da FISH gerou muito *background* nas preparações cromossômicas, o que dificultou visualização dos sinais de hibridação.

Embora a sequência dos genes de rDNA 5S e snRNA U2 sejam conservadas no genoma, e no caso do RNA nuclear U2 tenha sido possível observar a hibridação, a dificuldade em se obter repetitibilidade dos resultados tornam a utilização de ambos os genes pouco viável em espécies de Cassidinae, visto que outros marcadores, como o gene ribossomal rDNA 28S, fornecem melhores resultados e informações relevantes quanto à organização cromossômica do grupo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADACCHI, J.; WATANABE, K.; FUKUI, K.; OHMIDO, N.; KOSUGE, K. Chromosomal localization and reorganization of the 45S and 5S rDNA in the *Brachyscome lineariloba* complex (Asteraceae). *Journal Plant Research*, v. 110, p. 371-377, 1997.

ADAMS, D.S.; HERRERA, R.J.; LUHRMANN, R.; LIZARDI, P.M. Isolation and partial characterization of U1–U6 small RNAs from *Bombyx mori*. *Biochemistry*, v. 24, p. 117–125, 1985.

ARCANJO, AM.; CABRAL-DE-MELLO, D.C.; MARTINS, C.; MOURA, R.C.; SOUZA, M.J. Chromosomal diversification of diploid number, heterochromatin and rDNAs in two species of *Phanaeus* beetles (Scarabaeidae, Scarabaeinae). *Genetics and Molecular Biology*, v. 36, p. 341–346, 2013.

BUENO, D.; PALACIOS-GIMENEZ, O.M.; CABRAL-DE-MELLO, D.V. Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the grasshopper *Abracris flavolineata* reveal possible ancestry of the B chromosome and H3 histone spreading. *Plos One*, v. 8, e66532, 2013.

BUSCH, H.; REDDY, R.; ROTHBLUM, L.; CHOI, Y.C. SnRNAs, snRNPs, and RNA processing. *Annual Review Biochemistry*, v.51, p. 617–654, 1982.

CABRAL-DE-MELLO, D.C.; MOURA, R.C.; MARTINS, C. Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the beetle *Dichotomius geminatus* provides the first evidence for an association of 5S rRNA and histone H3 genes in insects, and repetitive DNA similarity between the B chromosome and A complement. *Heredity*, v.104, p. 393–400, 2010.

CABRAL-DE-MELLO, D.C.; OLIVEIRA, S.G.; MOURA, R.C.; MARTINS, C. Chromosomal organization of the 18S and 5S rRNAs and histone H3 genes in Scarabaeinae coleopterans: insights into the evolutionary dynamics of multigene families and heterochromatin. *BioMed Central Genetics*, v. 12, p. 1471–2156, 2011a.

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

CABRAL-DE-MELLO, D.C.; MARTINS, C.; SOUZA, M.J.; MOURA, R.C.; Cytogenetic mapping of 5S and 18S rRNAs and H3 histone genes in 4 ancient proscopiidae grasshopper species: contribution to understanding the evolutionary dynamics of multigene families. *Cytogenetic and Genome Research*, v. 132, p. 89–93, 2011c.

CABRAL-DE-MELLO, D.C.; CABRERO, J.; LÓPEZ-LEÓN, M.D.; CAMACHO, J.P. Evolutionary dynamics of 5S rDNA location in acridid grasshoppers and its relationship with H3 histone gene and 45S rDNA location. *Genetica*, v. 139, p. 921-931, 2011d.

CARRERA, E.; GARCIA, T.; CÉPEDES, A.; GONZALES, I.; FERNANDEZ, A.; ASENSIO, L.M.; HERNANDEZ, P.E.; MANTIN, R. Differentiation of smoked *Salmo salar*, *Oncorhynchus mykiss* and *Brama raii* using the nuclear marker 5S rDNA. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 35, p. 401-406, 2000.

CHABOO, C.S. Biology and phylogeny of the Cassidinae Gyllenhal sensu lato (tortoise and leaf-mining beetles) (Coleoptera: Chrysomelidae). *Bulletin of the American Museum of Natural History*, p. 305, 2007.

CHARLESWORTH, B.; SNIEGOWSKI, O.; STEPHAN, W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature*, v. 371, p. 215 – 220, 1994.

COLGAN, D.J.; McLAUCHLAN, A.; WILSON, G.D.F.; LIVINGSTON, S.P.; EDGECOMBE, G.D. Histone H3 and U2 snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution. *Australian Journal of Zoology*, v. 46, p. 419–437, 1998.

DE JULIO, M.; FERNANDES, F.R.; COSTA, C.; ALMEIDA, M.C.; CELLA, D.M. Mechanisms of karyotype differentiation in Cassidinae sensu lato (Coleoptera, Polyphaga, Chrysomelidae) based on seven species of Brazilian fauna and an overview of the cytogenetic data. *Micron*, v. 41, p. 26-28, 2010.

DE VAIO, E.S.; POSTIGLIONI, A. Stoline cassidinae (Coleoptera, Chrysomelidae) with X_Y_p sex chromosomes and derivative system X_pneoXneoY_p. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, v. 16, p. 433 - 40, 1974.

EBEL, C.; FRANTZ, C.; PAULUS, F.; IMBAULT, P. Trans-splicing and cis-splicing in the colourless euglenoid, *Entosiphon sulcatum*. *Current Genetics*, v. 35, p. 542–550, 1999.

GOLL, L.G.; MATIELLO, R.R.; ARTONI, R.F.; VICARI, M.R.; NOGAROTO, V.; BARROS, A.V.; ALMEIDA, M.C. High-resolution physical chromosome mapping of multigene families

in *Lagria villosa* (Tenebrionidae): occurrence of interspersed ribosomal genes in Coleoptera. *Cytogenetic and Genome Research*, v. 146, p. 64-70, 2015.

GUTHRIE, C.; PATTERSON, B. Spliceosomal snRNAs. *Annual Review of Genetics*, v. 22, p. 387–419, 1988.

LEAH, R.; FREDERIKSEN, S.; ENGBERG, J.; SORENSEN, P.D. Nucleotide sequence of a mouse 5S rRNA variant gene. *Nucleic Acids Research*, v.18, p. 7441-7441, 1990.

LONG, E.O.; DAWID, I.B. Repeated genes in Eucaryotes. *Annual Review of Biochemistry*, v. 49, p. 727-764, 1980.

MANCHADO, M.; ZUASTI, E.; CROSS, I.; MERLO, A.; INFANTE, C.; REBORDINOS, L. Molecular characterization and chromosomal mapping of the 5S rRNA gene in *Solea senegalensis*: a new linkage to the U1, U2, and U5 small nuclear RNA genes. *Genome*, v. 49, p. 79–86, 2006.

MANSER, T.; GESTELAND, R.F. Human U1 Loci: Genes for Human U1 RNA Have Dramatically Similar Genomic Environments. *Cell*, v.29, p. 257-264, 1982.

MARTINS, C.; WASKO, A.P. Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. In: *Focus on genome research*. Edited by WILLIAMS, C.R. New York: Nova Science Publishers, p. 335–363, 2004.

MARZ, M.; KIRSTEN, T.; STADLER, P.F. Evolution of Spliceosomal snRNA Genes in Metazoan Animals. *Journal of Molecular Evolution*, v. 67, p. 594–607, 2008.

MARZLUFF, W.F.; BROWN, D.T.; LOBO, S.; WANG, S. Isolation and characterization of two mouse U1b small nuclear RNA genes. *Nucleic Acids Research*, v. 11, p. 6255-6270, 1983.

MERLO, M.A.; CROSS, I.; PALAZÓN, J.L.; ÚBEDA-MAZANARO, M.; SARASQUETE, C.; REBORDINOS, L. Evidence for 5S rDNA horizontal transfer in the toadfish *Halobatrachus didactylus* (Schneider, 1801) based on the analysis of three multigene families. *BMC Evolutionary Biology*, v. 12, p. 201-213, 2012.

MÓRAN, P.; MARTÍNEZ, J.L.; GARCIA-VÁSQUEZ, E.; PENDÁS, A.M. Sex linkage of 5S rDNA in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cytogenetics Cell Genetics*, v. 75, p. 145-150, 1996.

MOSCONE, E.A.; KLEIN, F.; LAMBROU, M.; FUCHS, J.; SCHWEIZER, D. Quantitative karyotyping and dual-color FISH mapping of 5S and 18S–25S rDNA probes in the cultivated *Phaseolus species* (Leguminosae). *Genome*, v. 42, p. 1224–1233, 1999.

NILSEN, T.W. The spliceosome: the most complex macromolecular machine in the cell? *BioEssays*, v.25, p. 1147–1149, 2003.

OLIVEIRA, N.L.; CABRAL-DE-MELLO, D.C.; ROCHA, M.F.; LORETO, V. MARTINS, C.; MOURA, R.C. Chromosomal mapping of rDNAs and H3 histone sequences in the grasshopper *Rhammatocerus brasiliensis* (acrididae, gomphocerinae): extensive chromosomal dispersion and co-localization of 5S rDNA/H3 histone clusters in the A complemente and B chromosome. *Molecular Cytogenetics*, v. 4, p. 24-30, 2011.

OLIVEIRA, S.G.; MOURA, R.C.; MARTINS, C. B chromosome in the beetle *Coprophanaeus cyanescens* (Scarabaeidae): emphasis in the organization of repetitive DNA sequences. *BioMed Central Genetics*, v. 13, p. 96-101, 2012.

PALÁCIOS-GIMENEZ, O.M.; CASTILLO, E.R.; MARTÍ, D.A.; CABRAL-DE-MELLO, D.C. Tracking the evolution of sex chromosome systems in Melanoplinae grasshoppers through chromosomal mapping of repetitive DNA sequences. *BMC Evolutionary Biology*, v.13 p. 167, 2013.

PENDÁS, A.M.; MÓRAN, P.; MARTÍNEZ, J.L.; GARCIA-VÁSQUEZ, E. Applications of 5S rDNA in Atlantic salmon, brown trout, and in Atlantic salmon x brown trout hybrid identification. *Molecular Ecology*, v. 4, p. 275-276, 1995.

PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J.W. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 83, p. 2934–2938, 1986.

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

ÚBEDA-MANZANARO, M.; MERLO, M.A.; PALAZÓN, J.L.; CROSS, I.; SARASQUETE, C.; REBORDINOS, L. Chromosomal mapping of the major and minor ribosomal genes, (GATA)_n and U2 snRNA gene by double-colour FISH in species of the Batrachoididae family. *Genetica*, v. 38, p. 787–794, 2010.

VALADKHAM, S. SnRNAs as the catalysts of pre-mRNA splicing. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 9, p. 603–608, 2005.

YU, Y.T.; SCHARL, E.C.; SMITH, C.M.; STEITZ, J.A. The growing world of small nuclear ribonucleoproteins. In: *The RNA World*, 2nd edition, GESTELAND, R.F. CECH, T.R.; ATKINS, J.F. s, eds. (Cold Spring Harbor, NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 487–524, 1999.

ZELLER, R.; CARRI, M.T.; MATTAJ, I.W.; DE ROBERTIS, E.M. *Xenopus laevis* U1 snRNA genes: characterisation of transcriptionally active genes reveals major and minor repeated gene families. *EMBO Journal*, v.3, p. 1075-1081, 1984.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos com a análise citogenética de 19 espécies de cassidíneos estudadas no presente trabalho permitiram constatar que:

- O número diploide $2n=18$ não é conservado entre todos os Cassidinae, mas ocorre com maior frequência em representantes da tribo Cassidini;
- A tribo Mesomphaliini exibe a maior heterogeneidade quanto ao número diploide e tipo de sistemas cromossômicos sexuais dentre os Cassidinae;
- O sistema cromossômico sexual Xy_p está presente na maioria das tribos e pode representar uma característica compartilhada entre as espécies de Cassidinae como um todo;
- Embora a distribuição da heterocromatina constitutiva tenha sido predominantemente pericentromérica nas 13 espécies estudadas, um padrão quase que espécie-específico foi encontrado. Este resultado indica que mudanças na distribuição da heterocromatina constitutiva podem ter sido responsáveis pela diferenciação cariotípica dos cassidíneos;
- O gene ribossomal 28S estava localizado em apenas um par autossômico em 10 das 11 espécies examinadas. Contudo, diferenças quanto a localização cromossômica dos clusters de rDNA ocorreram entre as espécies, especialmente na tribo Cassidini que possui a maior uniformidade de número diploide e tipo de sistema cromossômico sexual;
- A utilização do gene rDNA 28S como marcador cromossômico mostrou ser eficiente nos estudos de Cassidinae, pois permitiu revelar diferenças entre espécies com cariótipos semelhantes;
- Marcações teloméricas típicas do cluster (TTAGG) $_n$ foram observadas apenas nos cromossomos de *P. flava* (Mesomphaliini). Nas demais espécies estudadas, ocorreram variações no número de cromossomos portadores dos sítios teloméricos, o que pode indicar que a sequência (TTAGG) $_n$ vem sendo repetidamente perdida ao longo da evolução deste grupo;
- Embora diferenças quanto a localização do gene snRNA U2 tenham sido observadas em espécies pertencentes a um mesmo gênero e com cariótipo semelhante, a dificuldade em se obter resultados torna a utilização deste gene pouco viável nos estudos citogenéticos de Cassidinae.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, A.; KUDOH, K. Chromosomes of three species of *Dorcus* (Coleoptera, Lucanidae), with a note on their sex chromosome evolution. *Elytra*, v. 33, p. 513–521, 2005.

ALMEIDA, M.C.; ZACARO, A.A.; CELLA, D. Cytogenetic analysis of *Epicauta atomaria* (Meloidae) and *Palembus dermestoides* (Tenebrionidae) with Xyp sex determination system using standard staining, C-bands, NOR and synaptonemal complex microspreading techniques. *Hereditas*, v.133, p.47–157, 2000.

ALMEIDA, M.C.; CAMPANER, C.; CELLA, D.M. Karyotype characterization, constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions of *Paranaita opima* (Coleoptera, Chrysomelidae, Alticinae). *Genetic and Molecular Biology*, v. 29, p. 475-481, 2006.

ALMEIDA, M.C.; GOLL, L.G.; ARTONI, R.F.; NOGAROTOA. V.; MATIELLO, R.R.; VICARI, M.R. Physical mapping of 18S rDNA cistron in species of the *Omophoita* genus (Coleoptera, Alticinae) using fluorescent in situ hybridization. *Micron*, v. 41, p. 729–734, 2010.

ANGUS, R.B. Separation of two species standing as *Helophorus aquaticus* (L.) (Coleoptera, Hydrophilidae) by banded chromosome analysis. *Systematic Entomology*, v. 7, p. 265-281, 1982.

ANGUS, R.B. Separation of *Helophorus grandis*, *maritimus* and *occidentalis* sp. n. (Coleoptera, Hydrophilidae) by banded chromosome analysis. *Systematic Entomology*, v. 8, p. 1-13, 1983.

ARCANJO, A.M.; CABRAL-DE-MELLO, D.C.; BARROS E SILVA, A.E.; MOURA, R.C. Cytogenetic characterization of *Eurysternus caribaeus* (Coleoptera: Scarabaeidae): evidence of sex-autosome fusion and diploid number reduction prior to species dispersion. *Journal of Genetics*, v. 88, p. 177–182, 2009.

ARCANJO, AM.; CABRAL-DE-MELLO, D.C.; MARTINS, C.; MOURA, R.C.; SOUZA, M.J. Chromosomal diversification of diploid number, heterochromatin and rDNAs in two

species of *Phanaeus* beetles (Scarabaeidae, Scarabaeinae). *Genetics and Molecular Biology*, v. 36, p. 341-346, 2013.

BARBOSA-MORAIS, N.L.; CARMO-FONSECA, M.; APARICIO, S. Systematic genome-wide annotation of spliceosomal proteins reveals differential gene family expansion. *Genome Research*, v.16, p. 66–77, 2006.

BEISSMANN, H.; MASON, J.M.; FERRY, K.; D'HULST, M; VALGEIRSDOTTIR, K.; TRAVERSE, K.L.; PARDUE, M.L. Addition of telomere-associated HeT DNA sequences "heals" broken chromosome ends in *Drosophila*. *Cell*, v. 61, p. 663 – 673, 1990.

BENES, H.; CAVE, M.D. Distribution of 5S ribosomal RNA genes in somatic and germ cells of the house cricket, *Acheta domesticus*. *Chromosoma*, v. 93, p. 31- 37, 1985.

BIONE, E.; CAMPAROTO, M.L.; SIMÕES, Z.L.P. A study of the constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions of *Isocopris inhiata* and *Diabroctis mimas* (Coleoptera: Scarabaeidae, Scarabaeinae) using C-banding, AgNO₃ staining and FISH techniques. *Genetic and Molecular Biology*, v. 28, p. 111-116, 2005a.

BIONE, E.; MOURA, R.C.; CARVALHO, R.; SOUZA, M.J. Karyotype, C-and fluorescence banding pattern, NOR location and FISH study of five Scarabaeidae (Coleoptera) species. *Genetic and Molecular Biology*, v. 28, p. 376-381, 2005b.

BLACKBURN, E.H. Structure and function of telomeres. *Nature*, v. 350, p. 569-573, 1991.

BLACKMON, H.; DEMUTH, J.P. "Coleoptera Karyotype Database." *The Coleopterists Bulletin*, v. 69.1, p. 174-175, 2015.

BOOTH, R.G.; COX, M.L.; MADGE, R.B. Guides to insects of importance to man: Coleoptera. *International Institute of Entomology: The Natural History Museum*, p.153 - 157, 1990.

BOROWIEC, E.L.; WIETOJANSKA, J. Referências Bibliográficas de documento eletrônico. Polônia, 2007. *Cassidinae of the world an interactive manual (Coleoptera: Chrysomelidae)*.

Disponível em <http://www.biol.uni.wroc.pl/cassidae/katalog%20internetowy/index.htm>. Acesso em 24 de fevereiro de 2016.

BORROR, D.J.; DE LONG, D.M. *Introdução ao estudo dos insetos*. São Paulo: Edgard Blücher, 653p, 1988.

BUENO, D.; PALACIOS-GIMENEZ, O.M.; CABRAL-DE-MELLO, D.V. Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the grasshopper *Abracris flavolineata* reveal possible ancestry of the B chromosome and H3 histone spreading. *Plos One*, v. 8, e66532, 2013.

CABRAL-DE-MELLO, D.C.; MOURA, R.C.; CARVALHO, R.; SOUZA, M.J. Cytogenetic analysis of two related *Deltochilum* (Coleoptera, Scarabaeidae) species: Diploid number reduction, extensive heterochromatin addition and differentiation. *Micron*, v. 41, p. 112–117, 2010a.

CABRAL-DE-MELLO, D.C.; MOURA, R.C.; MARTINS, C. Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the beetle *Dichotomius geminatus* provides the first evidence for an association of 5S rRNA and histone H3 genes in insects, and repetitive DNA similarity between the B chromosome and A complement. *Heredity*, v. 104, p. 393–400, 2010b.

CABRAL-DE-MELLO, D.C.; MARTINS, C.; SOUZA, M.J.; MOURA, R.C.; Cytogenetic mapping of 5S and 18S rRNAs and H3 histone genes in 4 ancient proscopiidae grasshopper species: contribution to understanding the evolutionary dynamics of multigene families. *Cytogenetic and Genome Research*, v. 132, p. 89–93, 2011a.

CABRAL-DE-MELLO, D.C.; OLIVEIRA, S.G.; MOURA, R.C.; MARTINS, C. Chromosomal organization of the 18S and 5S rRNAs and histone H3 genes in Scarabaeinae coleopterans: insights into the evolutionary dynamics of multigene families and heterochromatin. *BioMed Central Genetics*, v. 12, p. 1471-2156, 2011b.

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

CABRAL-DE-MELLO, D.C.; VALENTE, G.T.; NAKAJIMA, R.T.; MARTINS, C. Genomic organization and comparative chromosome mapping of the U1 snRNA gene in cichlid fish, with an emphasis in *Oreochromis niloticus*. *Chromosome Research*, v. 20, p. 279–292, 2012

CABRERO, J.; CAMACHO, J.P. Location and expression of ribosomal RNA genes in grasshoppers: Abundance of silent and cryptic loci. *Chromosome Research*, v. 16, p. 595 – 607, 2008.

CHABOO, C.S. Biology and phylogeny of the Cassidinae Gyllenhal sensu lato (tortoise and leaf-mining beetles) (Coleoptera: Chrysomelidae). *Bulletin of the American Museum of Natural History*, p.305, 2007.

CHARLESWORTH, B.; SNIEGOWSKI, O.; STEPHAN, W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature*, v. 371, p. 215 – 220, 1994.

CIOFFI, M.B.; MOREIRA-FILHO, O.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; BERTOLLO, L.A.C. The contrasting role of heterochromatin in the differentiation of sex chromosomes: An overview from Neotropical fishes. *Journal of Fish Biology*, v.80, p.2125 - 2139, 2012.

COLGAN, D.J.; McLAUCHLAN, A.; WILSON, G.D.F.; LIVINGSTON, S.P.; EDGECOMBE, G.D. Histone H3 and U2 snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution. *Australian Journal of Zoology*, v. 46, p. 419–437, 1998.

COLOMBA, M.S.; MONTERESINO, E.; VITTURI, R.; ZUNINO, M. Characterization of mitotic chromosomes of the scarab beetles *Glyphoderus sterquilinus* (Westwood) and *Bubas bison* (L.) (Coleoptera: Scarabaeidae) using conventional and banding techniques. *Biologisches Zentralblatt*, v. 115, p. 58-70, 1996.

COLOMBA, M.S.; VITTURI, R.; ZUNINO, M. Chromosome analysis and rDNA FISH in the stag beetle *Dorcus parallelipipedus* L. (Coleoptera: Scarabaeoidea: Lucanidae). *Hereditas*, v. 133, p. 249-253, 2000a.

COLOMBA, M.S.; VITTURI, R.; ZUNINO, M. Karyotype analysis, banding, and fluorescent *in situ* hybridization in the scarab beetle *Gymnopleurus sturmi* McLeay (Coleoptera Scarabaeoidea: Scarabaeidae). *Journal of Heredity*, v.91, p. 260-264, 2000b.

COLOMBA, M.; VITTURI, R.; VOLPE, N.; LANNINO, A.; ZUNINO, M. Karyotype, banding and rDNA FISH in the scarab beetle *Anoplotrupes stercorosus* (Coleoptera Scarabaeoidea: Geotrupidae). Description and comparative analysis. *Micron*, v. 35, p. 717–720, 2004.

COLOMBA, M.; VITTURI, R.; LIBERTINI, A.; GREGORINI, A.; ZUNINO, M. Heterochromatin of the scarab beetle, *Bubas bison* (Coleoptera: Scarabaeidae) II. Evidence for AT-rich compartmentalization and a high amount of rDNA copies. *Micron*, v. 37, p. 1-5, 2006.

COSTA, C. Estado de conocimiento de los Coleoptera neotropicales. *Boletín de La Sociedad Entomológica Aragonesa* (Versión Eletronica), 2003.

DATSON, P.M.; MURRAY B.G. Ribosomal DNA locus evolution in *Nemesia*: transposition rather than structural rearrangement as the key mechanism? *Chromosome Research* v. 14, p. 845-857, 2006.

DE JULIO, M.; FERNANDES, F.R.; COSTA, C.; ALMEIDA, M.C.; CELLA, D.M. Mechanisms of karyotype differentiation in Cassidinae *sensu latu* (Coleoptera, Polyphaga, Chrysomelidae) based on seven species of Brazilian fauna and an overview of the cytogenetic data. *Micron* (Oxford, 1993), v.41, p. 26-28, 2010.

DE LA RÚA, P.; SERRANO, J.; HEWITT, G.M.; GALIÁN, J. Physical mapping of rDNA genes in the ground beetle *Carabus* and related genera (Carabidae: Coleoptera). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, v. 34, p. 95-101, 1996.

DOROTA, L.; ROŽEK, M.; HOLECOVÁ, M. C-banding karyotype and NORs analyse in eight species of *Barypeithes* Duval from Central Europe (Coleoptera, Curculionidae, Entiminae). *Caryologia*, v. 58, p. 274-280, 2005.

DRETS, M.E.; CORBELLA, E.; PANZERA, F.; FOLLE, G.A. C-banding and non-homologous associations. II. The “parachute” X_y sex bivalent and the behavior of heterochromatic segments in *Epilachna paenulata*. *Chromosoma*, v. 88, p. 249-255, 1983.

DUTRILLAUX, A.M.; DUTRILLAUX, B. Sex chromosome rearrangements in Polyphaga beetles. *Sexual Development*, v. 3, p. 43–54, 2009a.

DUTRILLAUX, A.M.; DUTRILLAUX, B. Chromosome polymorphism and Fanconi-like instability in the Scarabaeid beetle *Macraspis tristis* from Guadeloupe. *Cytogenetic and Genome Research*, v. 125, p. 142-148, 2009b.

DUTRILLAUX, A.M.; DUTRILLAUX, B. Chromosome Analysis of 82 Species of Scarabaeoidea (Coleoptera), with Special Focus on NOR Localization. *Cytogenetic and Genome Research*, v. 136, p. 208–219, 2012.

DUTRILLAUX, A.M.; XIE, H.; DUTRILLAUX, B. Nucleolus and chromosome relationships at pachynema in four Scarabaeoidea (Coleoptera) species with various combinations of NOR and sex chromosomes. *Chromosome Research*, v. 15, p. 417–427, 2007a.

DUTRILLAUX, A.M.; XIE, H.; DUTRILLAUX, B. High chromosomal polymorphism and heterozygosity in *Cyclocephala tridentata* from Guadeloupe: chromosome comparison with some other species of Dynastinae (Coleoptera: Scarabaeidae). *Cytogenetic and Genome Research*, v. 119, p. 248–254, 2007b.

DUTRILLAUX, A.M.; MERCIER, J.; DUTRILLAUX, B. X-Y-autosome translocation, chromosome compaction, NOR expression and heterochromatin insulation in the Scarabaeid beetle *Dynastes hercules hercules*. *Cytogenetic and Genome Research*, v. 116, p. 305–310, 2007c.

DUTRILLAUX, A.M.; MERCIER, J.; XIE, H.; DUTRILLAUX, B. Etude chromosomique de 16 espèces ou sous-espèces de Cetoniini (Coleoptera: Scarabaeidae: Cetoniinae) d'Europe. *Annales de la Société Entomologique de France*, v. 44, p. 443–450, 2008.

DUTRILLAUX, A.M.; MAMURIS, Z.; DUTRILLAUX, B. Chromosome analyses challenge the taxonomic position of *Augosoma centaurus* Fabricius, 1775 (Coleoptera: Scarabaeidae: Dynastinae) and the separation of Dynastini and Oryctini. *Zoosystema*, v. 35, p. 537-549, 2013.

EBEL, C.; FRANTZ, C.; PAULUS, F.; IMBAULT, P. Trans-splicing and cissplicing in the colourless euglenoid, *Entosiphon sulcatum*. *Current Genetics*, v. 35, p. 542–550, 1999.

GALIÁN, J.; ORTIZ, A.S.; SERRANO, J. Karyotypes of nine species of Cicindelini and cytotaxonomic notes on Cicindelinae (Coleoptera, Carabidae). *Genetica*, v. 82, p. 17-24, 1990.

GALIÁN, J.; ORTIZ, A.S.; SERRANO, J. *Amara* and *Zabrus*, two different patterns of karyotypic evolution (Coleoptera, Carabidae). *Caryologia*, v. 44, p. 75-84, 1991.

GALIÁN, J.; SERRANO, J.; DE LA RUA, P.; PETITPIERRE, E.; JUAN, C. Localization and activity of rDNA genes in tiger beetles (Coleoptera: Cicindelinae). *Heredity*, v. 74, p. 524–530, 1995.

GALIÁN, J.; PRÜSER, F.; DE LA RÚA, P.; SERRANO, J.; MOSSAKOWSKI, D. Cytological and molecular differences in the *Ceroglossus chilensis* species complex (Coleoptera: Carabidae). *Annales Zoologici Fennici*, v. 33, p. 23-30, 1996.

GALIÁN, J.; DE LA RÚA, P.; SERRANO, J.; JUAN, C.; HEWITT, G.M. Phylogenetic relationships in West Mediterranean Scaritina (Coleoptera: Carabidae) inferred from mitochondrial COI sequences and karyotype analysis. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, v. 37, p. 85-92, 1999.

GALIÁN, J.; HUDSON, P. Cytogenetic analysis of Australian tiger beetles (Coleoptera: Cicindelidae): chromosome number, sex-determining system and localization of rDNA genes. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, v. 26, p. 1–6, 1999.

GALIÁN, J.; HOGAN, J.E.; VOGLER, A.P. The origin of multiple sex chromosome in tiger beetles. *Molecular Biology and Evolution*, v. 19, p. 1792–1796, 2002.

GALIÁN, J.; PROENÇA, S.J.R.; VOGLER, A.P. Evolutionary dynamics of autosomal-heterosomal rearrangements in a multiple-X chromosome system of tiger beetles (Cicindelidae). *BMC Evolutionary Biology*, v. 7, p. 158, 2007.

GARDNER, J.A. Chromosome numbers and karyotypes of some Australian Stigmoderini (Coleoptera: Buprestidae). *Transaction of Royal Society of South Australia*, v. 112, p. 163-167, 1998.

GIANNOULIS, T.; DUTRILLAUX, A.M.; MAMURIS, Z.; MONTREUIL, O.; STAMATIS, C.; DUTRILLAUX, B. Evolution of European cockchafers (Melolonthinae: Scarabaeidae: Coleoptera): a morphological, molecular and chromosomal study of intra- and interspecific variations. *Bulletin Entomological Research*, v. 101, p. 345–352, 2011.

GOLL, L.G.; ARTONI, R.F.; VICARI, M.R.; NOGAROTO, V.; PETITPIERRE, E.; ALMEIDA, M.C. Cytogenetic Analysis of *Lagria villosa* (Coleoptera, Tenebrionidae): Emphasis on the Mechanism of Association of the Xy p Sex Chromosomes. *Cytogenetic and Genome Research*, v. 139, p. 29–35, 2012.

GOLL, L.G.; MATIELLO, R.R.; ARTONI, R.F.; VICARI, M.R.; NOGAROTO, V.; BARROS, A.V.; ALMEIDA, M.C. High-resolution physical chromosome mapping of multigene families in *Lagria villosa* (Tenebrionidae): occurrence of interspersed ribosomal genes in Coleoptera. *Cytogenetic and Genome Research*, v. 146, p. 64-70, 2015.

GÓMEZ-ZURITA, J.; PONS, J.; PETITPIERRE, E. The evolutionary origin of a novel karyotype in *Timarcha* (Coleoptera, Chrysomelidae) and general trends of chromosome evolution in the genus. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, v. 42, p. 332–341, 2004.

GOODPASTURE, C.; BLOOM, S.E. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver stain. *Chromosoma*, v. 53, p. 37-5, 1975.

GUTHRIE, C.; PATTERSON, B. Spliceosomal snRNAs. *Annual Review of Genetics*, v. 22, p. 387–419, 1988.

HELECOVÁ, M.; ROZAK, M.; LACHOWSKA, D. The First Cytogenetic Report on *Laena reitteri* Weise, 1877 (Coleoptera, Tenebrionidae, Lagriinae) with Notes on Karyotypes of Darkling Beetles. *Folia biologica* (Kraków), v. 56, p. 213–217, 2008.

HELECOVÁ, M.; MARYAŃSKA-NADACHOWSKA, A.; ROZEK, M. Cytogenetic Analysis of *Otiorhynchus bisulcatus* (Fabricius, 1781) and *O.(Zadrehus) atroapterus* (De Geer, 1775) (Coleoptera, Curculionidae, Entiminae) using C Bands, NORs, and DAPI/CMA3 Staining. *Folia Biologica* (Kraków), v. 61, p. 177–183, 2013.

HERNANDEZ, N. 2001. Small nuclear RNA genes: A model system to study fundamental mechanisms of transcription. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 276, p. 26733–26736, 2001.

JUAN, C.; GOSALVEZ, J.; PETITPIERRE, E. 1990. Improving beetle karyotype analysis: Restriction endonuclease banding of *Tenebrio molitor* chromosomes. *Heredity*, v.65, p.157 - 162, 1990.

JUAN, C.; PONS, J.; PETITPIERRE, E. Localization of tandemly repeated DNA sequences in beetle chromosomes by fluorescent *in situ* hybridization. *Chromosome Research*, v. 1, p. 167-174, 1993.

KARAGYAN, G. Ag-banded karyotypes in six species of jewel-beetles (Coleoptera, Buprestidae). *Folia Biologica* (Kraków), v. 49, p. 43-47, 2001.

KARAGYAN, G.; LACHOWSKA, D.; KALASHIAN, M. Karyotype analysis of four jewel-beetle species (Coleoptera, Buprestidae) detected by standard staining, C-banding, AgNOR-banding and CMA3/DAPI staining. *Cytogen*, v. 6, p. 183–197, 2012.

KUKALOVÁ-PECK, J.; LAWRENCE, J.F. Evolution of the wing in Coleoptera. *The Canadian Entomologist*, v.125, p.181 - 258, 1993.

LACHOWSKA, D.; ROZEK, M.; HELECOVÁ, M.; KAJTOCH, L. Cytogenetic differences between *Peritelus familiaris* and *Centricnemus leucogrammus* (Coleoptera: Curculionidae: Entiminae: Peritelini). *European Journal of Entomology*, v. 103, p. 687–690, 2006.

LACHOWSKA, D.; ROZEK, M.; HELECOVÁ, M. Cytotaxonomy and karyology of the tribe Otiorhynchini (Coleoptera: Curculionidae). *European Journal of Entomology*, v. 105, p. 175–184, 2008.

LACHOWSKA, D.; ROZEK, M.; HELECOVÁ, M. Chromosomal similarities and differences among three sibling species of the *Acalles echinatus* group (Coleoptera, Curculionidae, Cryptorhynchinae). *Zootaxa*, v.1985, p. 63–68, 2009.

LAWRENCE, C. Coleoptera. In: PARKER, J.A. (ed.) *Synopsis and Classification of Living Organisms*, New York: McGraw-Hill, v.2, p.482 – 553, 1982.

LAWRENCE, J.F.; BRITTON, Y.E.B. Coleoptera In: *Insects of Australia*. Ithaca: Cornell University Press, v. 2, 1137p. 1991.

LAWRENCE, J.F.; BRITTON, Y.E.B. *Australian Beetles*. Carlton, Melbourne University Press, 192p. 1994.

LAWRENCE, J.F.; NEWTON, A.F. Families and subfamilies of Coleoptera (with selected genera, notes, references and data on family-group names). In: PAKALUK, J.; SLIPINSKI, S.A. (eds), *Biology, Phylogeny, and Classification of Coleoptera*. Muzeum i Instytut Zoologii PAN, Warszawa, p.559–1092, 1995.

LEVAN, A.; FREDGA, K.; SNDBERG, A. A. Nomenclature for centromeric position of chromosomes. *Hereditas*, v.52, p.201-20, 1964.

LIRA-NETO, A.C.; SILVA, G.M.; MOURA, R.C.; SOUZA, M.J. Cytogenetics of the darkling beetles *Zophobas* aff. *confusus* and *Nyctobates gigas* (Coleoptera, Tenebrionidae). *Genetics and Molecular Research*, v. 11, p. 2432–2440, 2012.

LONG, E.O.; DAWID, I.B. Repeated genes in Eucaryotes. *Annual Review of Biochemistry*, v. 49, p. 727-764, 1980.

LUND, E.; BOSTOCK, C.; ROBERTSON, M.; CHRISTIE, S.; MITCHEN, J.L.; DAHLBERG, J.E. U1 small nuclear RNA genes are located on human chromosome 1 and are expressed in mouse-human hybrid cells. *Molecular and Cellular Biology*, v. 3, p. 2211–2220, 1983.

LUND, E.; NESBITT, M.N. The embryonic and adult mouse U1 snRNA genes map to different chromosomal loci. *Somatic Cell and Molecular Genetics*, v. 14, p. 143–148, 1988.

MACAISNE, N.; DUTRILLAUX, A.M.; DUTRILLAUX, B. Meiotic behaviour of a new complex X-Y-autosome translocation and amplified heterochromatin in *Jumnos ruckeri* (Saunders) (Coleoptera, Scarabaeidae, Cetoniinae). *Chromosome Research*, v. 14, p. 909–918, 2006.

MAFFEI, E.M.D.; FRAGOSO, D.B.; POMPOLO, S.G.; SERRÃO, J.E. Morphological and cytogenetical studies on the female and male reproductive organs of *Eriopis connexa* Mulsant (Coleoptera, Polyphaga, Coccinellidae). *Netherlands Journal of Zoology*, v. 51, p. 483–496, 2001a.

MAFFEI, E.M.D.; POMPOLO, S.G.; CAMPOS, L.A.O.; PETITPIERRE, E. Sequential FISH analysis with rDNA genes and Ag-NOR banding in the lady beetle *Olla v-nigrum* (Coleoptera: Coccinellidae). *Hereditas*, v. 135, p. 13–18, 2001b.

MAFFEI, E.M.D.; POMPOLO, S.G.; SILVA-JUNIOR, J.C.; CAIXEIRO, A.P.A.; ROCHA, M.P.; DERGAM, J.A. Silver staining of nucleolar organizer regions (NOR) in some species of Hymenoptera (bees and parasitic wasp) and Coleoptera (lady-beetle). *Cytobios*, v. 104, p. 119–125, 2001c.

MAFFEI, E.M.D.; POMPOLO, S.G.; PETITPIERRE, E. C-banding and fluorescent *in situ* hybridization with rDNA sequences in chromosomes of *Cycloneda sanguinea* Linnaeus (Coleoptera, Coccinellidae). *Genetics and Molecular Biology*, v. 27, p. 191–195, 2004.

MANCHADO, M.; ZUASTI, E.; CROSS, I.; MERLO, A.; INFANTE, C.; REBORDINOS, L. Molecular characterization and chromosomal mapping of the 5S rRNA gene in *Solea*

senegalensis: a new linkage to the U1, U2, and U5 small nuclear RNA genes. *Genome*, v. 49, p. 79–86, 2006.

MANSER, T.; GESTELAND, R.F. Human U1 Loci: Genes for Human U1 RNA Have Dramatically Similar Genomic Environments. *Cell*, v.29, p. 257-264, 1982.

MARTÍNEZ-NAVARRO, E.M.; SERRANO, J.; GALIÁN, J. Chromosome evolution in ground beetles: localization of the rDNA loci in the tribe Harpalini (Coleoptera, Carabidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, v. 42, p. 38-43, 2004.

MARTINS, C.; WASKO, A.P. Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. In: *Focus on genome research*. Edited by WILLIAMS, C.R. New York: Nova Science Publishers, p. 335–363, 2004.

MARZ, M.; KIRSTEN, T.; STADLER, P.F. Evolution of Spliceosomal snRNA Genes in Metazoan Animals. *Journal of Molecular Evolution*, v. 67, p. 594–607, 2008.

MARZLUFF, W.F.; BROWN, D.T.; LOBO, S.; WANG, S. Isolation and characterization of two mouse U1b small nuclear RNA genes. *Nucleic Acids Research*, v. 11, p. 6255-6270, 1983.

MENDES-NETO, E.O.; VICARI, M.R.; CAMPANER, C.; NOGAROTO, V.; ARTONI, R.F.; ALMEIDA, M.C. Cytogenetic analysis of *Astylus antis* (Perty, 1830) (Coleoptera, Melyridae): Karyotype, heterochromatin and location of ribosomal genes. *Genetics and Molecular Biology*, v. 33, p. 237–243, 2010.

MOUNT, S.M.; SALZ, H.K. Pre-messenger RNA processing factors in the *Drosophila* genome. *The Journal of Cell Biology*, v. 150, p. 37–44, 2000.

MOURA, R.C.; SOUZA, M.J.; MELO, N.F.; LIRA-NETO, A.C. Karyotypic characterization of representatives from Melolonthinae (Coleoptera: Scarabaeidae): karyotypic analysis, banding and fluorescent *in situ* hybridization (FISH). *Hereditas*, v. 138, p. 200-206, 2003.

MOURA, R.C.; MELO, N.F.; SOUZA, M.J. High Levels of Chromosomal Differentiation in *Euchroma gigantea* L. 1735 (Coleoptera, Buprestidae). *Genetics and Molecular Biology*, v. 31, p. 431–437, 2008.

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

NEI, M.; ROONEY, A.P. Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. *Annual Review of Genetics*, v. 39, p. 121-152, 2005.

NGUYEN, T.T.; ANISKIN, V.M.; GERBAULT-SEUREAU, M.; PLANTON, H.; RENARD, J.P.; NGUYEN, B.X.; HASSANIN, A.; VOLOBOUEV, V.T. Phylogenetic position of the saola (*Pseudoryx nghetinhensis*) inferred from cytogenetic analysis of eleven species of Bovidae. *Cytogenetic and Genome Research*, v. 122, p. 41 – 54, 2008.

NILSEN, T.W. The spliceosome: the most complex macromolecular machine in the cell? *BioEssays*, v.25, p. 1147–1149, 2003.

NIELSEN, L.; EDSTROM, J.E. Complex telomere associated repeats units in members of the genus *Chrironomus* evolve from sequences similar to simple telomeric repeats. *Molecular and Cellular Biology*, v.13, p. 1583 – 1589, 1993.

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

OLIVEIRA, S.G.; MOURA, R.C.; SILVA, A.E.B.; SOUZA, M.J. Cytogenetic analysis of two *Coprophanaeus species* (Scarabaeidae) revealing wide constitutive heterochromatin variability and the largest number of 45S rDNA sites among Coleoptera. *Micron*, v. 41, p. 960–965, 2010.

OLIVEIRA, S.G.; MOURA, R.C.; MARTINS, C. B chromosome in the beetle *Coprophanaeus cyanescens* (Scarabaeidae): emphasis in the organization of repetitive DNA sequences. *BioMed Central Genetics*, v. 13, p. 96-101, 2012a.

OLIVEIRA, S.G.; CABRAL-DE-MELLO, D.C.; ARCANJO, A.P.; XAVIER, C.; SOUZA, M.J.; MARTINS, C.; MOURA, R.C. Heterochromatin, Sex Chromosomes and rRNA Gene Clusters in *Coprophanaeus* Beetles (Coleoptera, Scarabaeidae). *Cytogenetic and Genome Research*, v. 138, p. 46–55, 2012b.

PALÁCIOS-GIMENEZ, O.M.; CASTILLO, E.R.; MARTÍ, D.A.; CABRAL-DE-MELLO, D.C. Tracking the evolution of sex chromosome systems in Melanoplinae grasshoppers through chromosomal mapping of repetitive DNA sequences. *BMC Evolutionary Biology*, v.13 p. 167, 2013.

PETITPIERRE, E. Cytotaxonomy and evolution of *Timarcha* Latr. (Coleoptera: Chrysomelidae). *Genetic Iber*, v. 22, p. 67-120, 1970.

PETITPIERRE, E. Notes on chromosomes of ten species of the genus *Chrysolina* Mots. (Coleoptera: Chrysomelidae). *Genetica*, v. 45, p. 349-354, 1975.

PETITPIERRE, E. Further cytotaxonomical and evolutionary studies on the genus *Timarcha* Latr. (Coleoptera: Chrysomelidae). *Genetic Iber*, v. 28, p. 57-81, 1976.

PETITPIERRE, E. Molecular cytogenetics and taxonomy of insects, with particular reference to the Coleoptera. *International Journal Insect Morphology & Embryology*, v. 25, n. 1/2, p. 115-134, 1996.

PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J.W. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 83, p. 2934–2938, 1986.

PISANO, E.; GHIGLIOTTI, L. Ribosomal genes in notothenioid fishes: Focus on the chromosomal organisation. *Marine Genomics*, v. 2, p. 75-80, 2009.

POSTIGLIONI, A.; BRUM-ZORRILLA, N. Non-relationship between nucleolus and sex chromosome system Xy_p in *Chelymorpha variabilis* Boheman (Coleoptera: Chrysomelidae). *Genetica*, v. 77, p. 137-141, 1988.

POSTIGLIONI, A.; MAZZELLA, M.C.; PANZERA, F.; DA SILVA, A.; PONCE DE LEÓN, R.; VASINA, L.K.; SCVORTZOFF, E. Sex chromosomes of Neotropical Coleoptera from Uruguay. *The Nucleus*, v.33, p.25 - 30, 1990.

POSTIGLIONI, A.; STOLL, M.; BRUM-ZORRILA, N. Haploid karyotype analysis of *Chelymorpha variabilis* Boheman (Coleoptera, Chrysomelidae) with microspreading techniques. *Revista Brasileira de Genetica*, v. 14, p. 653-660, 1991.

PROENÇA, S.J.R.; GALIÁN, J. Chromosome evolution in the genus *Cicindela*: physical mapping and activity of rDNA loci in the tiger beetle species *Cicindela littoralis* and *C. flexuosa*. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, v. 41, p. 227–232, 2003.

PROENÇA, S.J.R.; SERRANO, A.R.M.; COLLARES-PEREIRA, M.J. Cytogenetic variability in genus *Odontocheila* (Coleoptera, Cicindelidae): karyotypes, C-banding, NORs and localisation of ribosomal genes of *O. confusa* and *O. nodicornis*. *Genetica*, v. 114, p. 237-245, 2002a.

PROENÇA, S.J.R.; SERRANO, A.R.M.; COLLARES-PEREIRA, M.J. An unusual karyotype with low chromosome number in Megacephalini, a basal group of tiger beetles (Coleoptera, Cicindelidae): cytogenetic characterisation by C-banding and location of rDNA genes. *Hereditas*, v. 137, p. 202–207, 2002b.

PROENÇA, S.J.R.; COLLARES-PEREIRA, M.J.; SERRANO, A.R.M. Cytogenetic variability in three species of the genus *Cicindela* (*s.l.*) (Coleoptera, Cicindelidae): Karyotypes and localization of 18S rDNA genes. *Genetics and Molecular Biology*, v. 27, p. 555–560, 2004.

PROENÇA, S.J.R.; COLLARES-PEREIRA, M.J.; SERRANO, A.R.M. Chromosome evolution in tiger beetles: karyotypes and localization of 18S rDNA loci in Neotropical Megacephalini (Coleoptera, Cicindelinae). *Genetics and Molecular Biology*, v. 28, p. 725-733, 2005.

PROENÇA, S.J.R.; SERRANO, A.R.M.; SERRANO, J.; GALIÁN, J. Patterns of rDNA chromosomal localization in Palearctic *Cephalota* and *Cylindera* (Coleoptera: Carabidae:

Cicindelini) with different numbers of X-chromosomes. *Comparative Cyto Genetic*, v. 5, p. 47–59, 2011.

PRYDE, F.E.; GORHAM, H.C.; LOUIS, E.J. Chromosome ends: all the same under their caps. *Current Opinion in Genetics & Development*, v. 7, p. 822-828, 1997.

REID, C.A.M. A cladistic analysis of subfamilial relationships in the Chrysomelidae *sensu lato* (Chrysomeloidea). In: PAKALUK, J.; SLIPINSKI, S.A., (Eds.), *Biology, Phylogeny and Classification of Coleoptera: papers celebrating the 80th birthday of Roy A. Crowson*. Muzeum i Instytut Zoologii PAN, Warszawa, p.559 – 631, 1995.

ROZEK, M. C-bands and NORs on chromosomes of *Bembidion lampros* (Herbst) and *Bembidion properans* (Steph.) (Coleoptera, Carabidae). *Cytologia*, v. 63, p. 317-321, 1998a.

ROZEK, M. C-bands and NORs on chromosomes in four species of the genus *Trechus* Clairv. (Coleoptera, Carabidae). *Caryologia*, v. 51, p. 189-194, 1998b.

ROZEK, M.; LACHOWSKA, D.; PETITPIERRE, E.; HOLECOVA, M. C-bands on chromosomes of 32 beetle species (Coleoptera: Elateridae, Cantharidae, Oedemeridae, Cerambycidae, Anthicidae, Chrysomelidae, Attelabidae and Curculionidae). *Hereditas*, v.140, p.161 – 170, 2004.

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

SÁNCHEZ-GEA, J.F.; SERRANO, J.; GALIÁN, J. Variability in rDNA loci in Iberian species of the genus *Zabrus* (Coleoptera: Carabidae) detected by fluorescence *in situ* hybridization. *Genome*, v. 43, p. 22-28, 2000.

SASHITAL, D.G.; VENDITTI, V.; ANGERS, C.G.; CORNILESCU, G.; BUTCHER, S.E. Structure and thermodynamics of a conserved U2 snRNA domain from yeast and human. *RNA*, v. 13, p. 328–338, 2007.

SCHNEIDER, M.C.; ARTONI, R.F.; ALMEIDA, M.C. Cytogenetic analysis of 3 populations of *Diabrotica speciosa* (Chrysomelidae, Galerucinae): constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions. *Cytologia*, v. 67, p. 281-287, 2002.

SCHNEIDER, M.C.; ALMEIDA, M.C.; ROSA, S.P.; COSTA, C.; CELLA, D.M. Evolutionary chromosomal differentiation among four species of *Conoderus* Eschscholtz, 1829 (Coleoptera, Elateridae, Agrypninae, Conoderini) detected by standard staining, C-banding, silver nitrate impregnation, and CMA3/DA/DAPI staining. *Genetica*, v.128, p.333 – 346, 2006.

SCHNEIDER, M.C.; ROSA, S.P.; ALMEIDA, M.C.; COSTA, C.; CELLA, D.M. Chromosomal similarities and differences among four Neotropical Elateridae (Conoderini and Pyrophorini) and other related species, with comments on the NOR patterns in Coleoptera. *J. Zool. Syst. Evol. Res.*, v.45, p.308 – 316, 2007.

SERRANO, J. *Scarites buparius*, a caraboid beetle with an X_1X_2Y sex-chromosomes system. *Experientia*, v. 36, p. 1042-1043, 1980.

SERRANO, J. Chromosome numbers and karyotypic evolution of Caraboidea. *Genetica*, v. 55, p. 51-60, 1981.

SERRANO, J. A chromosome study of *Scarites occidentalis* (Coleoptera, Caraboidea). *Experientia*, v. 40, p. 208-209, 1984.

SERRANO, J.; GALIÁN, J.; ORTIZ, A. Cicindelid beetles without multiple sex chromosomes (Coleoptera, Caraboidea). *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, v. 28, p. 235-239, 1986.

SERRANO, A.R.M.; COLLARES-PEREIRA, M.J. Further analysis of the cytotaxonomy of the tiger beetles (Coleoptera: Cicindelidae) from South Portugal. *Nucleus*, v. 35, p. 19-24, 1992.

SIERRA-MONTES, J.M.; PEREIRA-SIMON, S.; SMAIL, S.S.; HERRERA, R.J. The silk moth *Bombyx mori* U1 and U2 snRNA variants are differentially expressed. *Gene*, v. 352, p. 127– 136, 2005.

SILVA, G.M.; BIONE, E.G.; CABRAL-DE-MELLO, D.C.; MOURA, R.C.; SIMÕES, Z.L.P.; SOUZA, M.J. Comparative cytogenetics of three species of *Dichotomius* (Coleoptera, Scarabaeidae). *Genetics and Molecular Biology*, v. 32, p. 276–280, 2009.

SMITH, S.G. Chromosome numbers of Coleoptera. *Heredity*, v. 7, p. 31–48, 1953.

SMITH, S.G.; VIRKKI, N. *Animal Cytogenetic*, v.3, Insecta 5. Coleoptera. Berlin: Gebruder Borntraeger, 1978.

STEINEMANN, M.; STEINEMANN, S. Enigma of Y chromosome degeneration: Neo-Y and Neo-X chromosomes of *Drosophila miranda* a model of sex chromosome evolution. *Genetica*, v.102-103, p. 409 - 420, 1998.

STEVENS, N.M. Studies in spermatogenesis II. *Carneg. Inst. Wash*, v.36, p.33 - 74, 1906.

SUMNER, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*, v.75, p.304 - 306, 1972.

SUMNER, A.T. *Chromosome Banding*. Unwin Hyman Ltd., London, UK, 1990.

TAKAHASHI, H.; FUJIWARA, H. Transcription analysis of the telomeric repeat-specific retrotransposons TRAS1 and SART1 of the silkworm *Bombyx mori*. *Nuclei Acid Research*, v. 27, p. 2015-2021, 1999.

ÚBEDA-MANZANARO, M.; MERLO, M.A.; PALAZÓN, J.L.; CROSS, I.; SARASQUETE, C.; REBORDINOS, L. Chromosomal mapping of the major and minor ribosomal genes, (GATA)_n and U2 snRNA gene by double-colour FISH in species of the Batrachoididae family. *Genetica*, v. 38, p. 787–794, 2010.

VALADKHAN, S.; MANLEY, J.L. Splicing-related catalysis by protein-free snRNAs. *Nature*, v. 413, p. 701-707, 2001.

VALADKHAN, S.; MANLEY, J.L. Characterization of the catalytic activity of U2 and U6 snRNAs. *RNA*, v. 9, p. 892-904, 2003.

VIRKKI, N. Zur Zytologie einiger Scarabaeiden (Coleoptera). *Annales Societatis Zoolog.-Botanicae Fennicae Vanamo*, v. 14, p. 1–105, 1951.

VIRKKI, N. Weitere Spermatogenesestudien an Skarabäiden (Coleoptera). *Annales Academiae Scientiarum Fennicae A IV*, v. 25, p. 1–58, 1954a.

VIRKKI, N. Akzessorische Chromosomen bei zwei Käfern, *Epicometis hirta* Poda und *Oryctes nasicornis* L. (Scarabaeidae). *Annales Academiae Scientiarum Fennicae A IV*, v. 26, p. 1–19, 1954b.

VIRKKI, N. Banding of *Oedionychina* (Coleoptera: Alticinae) chromosomes: C- and Ag-bands. *Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico*, v. 67, p. 221–255, 1983.

VIRKKI, N.; FLORES, M.; ESCUDERO, J. Structure, orientation, and segregation of the sex trivalent in *Pyrophorus luminosus* Ill. (Coleoptera, Elateridae). *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, v. 26, p. 326–330, 1984.

VIRKKI, N.; DENTON, A. Silver staining of the elements of spermatogenesis in *Oedionychina* (Chrysomelidae: Alticinae). *Hereditas*, v. 106, p. 37–49, 1987.

VIRKKI, N.; SEPÚLVEDA, J.M. Chromosomes of the Puerto Rican “vaquita”, *Diaprepes abbreviatus* (L.) (Curculionidae: Otiorrhynchinae: Phyllobiini). *Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico*, v. 74, p. 121–132, 1990.

VÍTKOVÁ, M.; KRÁL, J.; TRAUT, W.; ZRZAVÝ, J.; MAREC, F. The evolutionary origin of insect telomeric repeats, (TTAGG)_n. *Chromosome Research*, v.13, p. 145–156, 2005.

VITTURI, R.; CATALANO, E.; SPARACIO, I.; COLOMBA, M.S.; MORELLO, A. Multiple-chromosome sex systems in the darkling beetles *Blaps gigas* and *Blaps gibba* (Coleoptera, Tenebrionidae). *Genetica*, v. 97, p. 225–233, 1996.

VITTURI, R.; COLOMBA, M.S.; BARBIERI, R.; ZUNINO, M. Ribosomal DNA location in the scarab beetle *Thorectes intermedius* (Costa) (Coleoptera: Geotrupidae) using banding and fluorescent in-situ hybridization. *Chromosome Research*, v. 7, p. 255 – 260, 1999.

VITTURI, R.; COLOMBA, M.; VOLPE, N.; LANNINO, A.; ZUNINO, M. Evidence for male X0 chromosome system in *Pentodon bidens punctatum* (Coleoptera: Scarabaeoidea: Scarabaeidae) with X-linked 18S-28S rDNA clusters. *Genes and Genetic System*, v. 78, p. 427–432, 2003.

YADAV, J.S.; PILLAI, R.K. Karyological notes on four species of Cassidinae (Coleoptera: Chrysomelidae). *Genen Phaenen*, v.18, p.55 - 63, 1975.

YADAV, J.S.; VYAS, S.; YADAV, A.S. Chromosome studies on five species of economically important beetles (Coleoptera). *Nucleus*, v. 35, p. 119-126, 1992.

ZACARO, A.A.; ALMEIDA, M.C.; CELLA, D.M. Recombination nodules in coleopteran species: *Palembus dermestoides* (Tenebrionidae) and *Epicauta atomaria* (Meloidae). *Cytogenetic and Genome Research*, v. 103, p. 185-191, 2003.

ZACARO, A.A.; PROENÇA, S.J.R.; LOPES-ANDRADE, C.; SERRANO, A.R.M. Cytogenetic analysis of Ctenostomini by C-banding and rDNA localization and its relevance to the knowledge of the evolution of tiger beetles (Coleoptera: Cicindelidae). *Genetica*, 122: 261–268, 2004.

ZAKIAN, V.A. Telomeres: beginning to understand the end. *Science*, v. 270, p. 1601 – 1607, 1995.

ZELLINGER, B.; RIHA, K. Composition of plant telomeres. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1769, p. 399-409, 2007.