

POSSÍVEL MARCADOR CITOTAXONÔMICO PARA O GÊNERO *DICHOTOMIUS* (COLEOPTERA: SCARABAEIDAE)

NASCIMENTO, J.M.^{1*}; SILVA, F.A.B.^{1,2}; MOURA, R.C.¹; ROCHA, M.F.¹

¹ Laboratório de Biodiversidade e Genética de Insetos, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco. Rua Arnóbio Marques, 310, Santo Amaro, 50110-130, Recife, Pernambuco, Brasil. *E-mail: jessicamnascimento@gmail.com

² Departamento de Entomologia, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais 37200-000, Brasil.

RESUMO

O gênero *Dichotomius* apresenta mais de 154 espécies descritas e apenas nove espécies estudadas ao nível citogenético. O objetivo deste trabalho foi analisar através de coloração convencional cromossomos meióticos e mitóticos de 20 espécimes de *Dichotomius prox. sericeus*, coletados em Aldeia, no município de Paudalho, Estado de Pernambuco. A espécie estudada apresentou o cariótipo $2n = 18 + Xy_p$ (meiofórmula $8II + Xy_p$) e cromossomos meta-submetacêntricos. Este número cromossômico é freqüente entre as espécies analisadas citogeneticamente e parece ser um marcador cromossômico para *Dichotomius*. *D. prox. sericeus* apresentou também um cromossomo diferenciado por apresentar constrições. Os dados citogenéticos obtidos neste trabalho contribuem para compreensão dos padrões citológicos e evolutivos do gênero *Dichotomius*.

Palavras Chave: besouro, citotaxonomia, marcador cromossômico.

ABSTRACT

The genus *Dichotomius* has more than 154 described species and nine species studied to the cytogenetic level. The aim of this study was to examine through conventional staining the mitotic and meiotic chromosomes of 20 specimens of *Dichotomius prox. sericeus* collected in Aldeia, municipality of Paudalho, State of Pernambuco. The species studied had the karyotype $2n = 18 + Xy_p$ (meioformula $8II + Xy_p$) and meta-submetacentric chromosomes. This chromosome number is common among the species analyzed cytogenetically and seems to be a chromosomal marker for *Dichotomius*. *D. prox. sericeus* also presented a differential chromosome by display constrictions. The cytogenetic data obtained in this study contributes to the understanding of cytological and evolutive patterns of the genus *Dichotomius*.

Key words: beetle, cytotaxonomy, chromosomal marker.

INTRODUÇÃO

O gênero *Dichotomius* Hope, 1838 possui cerca de 154 espécies distribuídas no novo mundo e reunidas em quatro subgêneros: *Dichotomius*, *Homocanthonides*, *Luederwaldtinia* e *Selenocopris* (Ratcliffe et al., 2002). No Brasil há registro de aproximadamente 83 espécies (Vaz-de-Mello, 2000). Este gênero é bastante diverso e necessita urgentemente de revisão taxonômica. A última revisão foi realizada por Luederwaldt (1929), tendo várias espécies sido descritas posteriormente (Hanski & Cambefort, 1991; Kohlmann & Solís, 1997; Vaz-de-Mello et al., 2001).

Várias características morfológicas podem ser observadas entre as espécies de *Dichotomius*, dentre estas podemos destacar: coxas médias transversais ou oblíquas localizadas nitidamente na parte ventral do corpo, tarso posterior com cinco artículos, tíbias anteriores superiormente e obliquamente truncadas no ápice, tíbias médias e posteriores bruscamente alargadas para o ápice e não carenadas, calcar tibial posterior bifurcado no ápice ou denteado subapicalmente, superfície dorsal completamente glabra, antenas com nove artículos, segundo palpômero labial triangular, processo clipeal ventral coniforme, esternitos abdominais não soldados, abdômen de tamanho normal e clava antenal alongada com lamelas longas (Ratcliffe et al., 2002).

As espécies de *Dichotomius*, em geral, possuem hábitos noturnos e são coprófagas, podendo ser observado espécies ocasionalmente necrófagas, como por exemplo, *D. ascanius* e *D. semiaeneus* (Halffter & Matthews, 1966; Louzada et al., 1996).

Os representantes de *Dichotomius* apresentam um importante papel na dinâmica de nutrientes devido a sua alta eficiência na remoção de detritos, além de serem importantes no controle biológico de pragas agrícolas, evidenciando também o interesse econômico. Algumas espécies são eficazes no controle de dípteros e nematóides, como por exemplo, *Dichotomius bos* (Flechtmann et al., 1995; Rodrigues & Marchini, 1998).

Quanto aos estudos citogenéticos, apenas nove espécies do gênero *Dichotomius* foram estudadas até o momento: *D.*

(*Selenocopris*) *bicuspis* (Germar, 1824); *D. (Dichotomius) bos* (Blanchard, 1843); *D. (Selenocopris) bosqui* (Pereira, 1941); *D. (Dichotomius) carolinus* (Linnaeus, 1767); *D. (Luederwaldtinia) germinatus* (Arrow, 1913); *D. (Luederwaldtinia) nisus* (Olivier, 1789); *D. (Dichotomius) semiaeneus* (Germar, 1824); *D. (Luederwaldtinia) semisquamosus* (Curtis, 1845) e *D. (Luederwaldtinia) sericeus* (Harold, 1867). Nestas espécies, o cariótipo $2n=18$, Xy_p é predominante, embora tenha ocorrido variação do número diplóide e do sistema de determinação sexual (Smith & Virkki, 1978; Vidal, 1984; Bione, 2004; Cabral-de-Mello et al., 2008; Silva et al., 2009).

MATERIAIS E MÉTODOS

Neste trabalho foram estudados cromossomos meióticos e mitóticos obtidos de 20 espécimes machos de *Dichotomius prox. sericeus* (Harold, 1867) (Figura 1). A espécie foi coletada em remanescentes de Mata Atlântica em Aldeia (7°53'48"S, 35°10'47"W), no município de Paudalho, Estado de Pernambuco, em junho de 2005. A coleta foi realizada através de armadilhas de solo (Pitfall) iscadas com fezes humanas e carne bovina apodrecida (Figura 2).



Figura 1. Exemplar macho de *Dichotomius prox. sericeus*.



Figura 2. Armadilha de solo (Pitfall).

O processamento dos indivíduos, bem como a preparação e análise das lâminas foram realizados no Laboratório de Biodiversidade e Genética de Insetos, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco. Os espécimes foram depositados na coleção entomológica da mesma instituição. A identificação da espécie foi feita pelo doutorando Fernando Silva, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais.

Os folículos testiculares foram retirados de exemplares machos, previamente anestesiados com éter, fixados em Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético) e, posteriormente, acondicionados no freezer. Para as preparações citológicas foi utilizada a técnica clássica de esmagamento de folículos testiculares, seguida da coloração convencional com orceína lacto-acética a 2% p/v.

Os procedimentos realizados para coleta, sacrifício e acondicionamento dos espécimes estão de acordo com os princípios éticos, determinados pelo COBEA (artigos VI e X) e com o artigo III § 3º da Lei nº 1.153, de 1995, que tratam da melhor forma de anestesiá-lo o animal e de técnicas adequadas de sacrifício e remetem para a utilização de animais silvestres em experimentos, respectivamente. A análise citogenética não necessitou de autorização de acesso segundo a resolução de n.28 de 06/11/2007 do MMA-Conselho de Gestão do Patrimônio Genético, artigo I, por se tratar de pesquisa que visou “avaliá-lo e elucidar a história evolutiva de uma espécie ou de grupo taxonômico, as relações dos seres vivos entre si ou com o meio ambiente, ou a diversidade genética de populações”.

A captura das imagens das células foi feita através do microscópio Nikon ECLIPSE E200 acoplado à câmera digital Olympus D- 535 ZOOM. As pranchas foram montadas com auxílio do programa Corel PHOTO-PAINT 12.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A espécie *Dichotomius prox. sericeus* apresentou número diplóide $2n=18$ e mecanismo de determinação sexual Xy_p (meiofórmula $8II + Xy_p$). Os autossomos desta espécie foram metacêntricos (par 1, 5, 6 e 7) e submetacêntricos (par 2, 3, 4 e 8). O cromossomo X também apresentou morfologia submetacêntrica e o y mostrou-se diminuto. O par cromossômico 1 possui o tamanho relativamente maior que os demais, o que caracteriza a assimetria cariotípica nesta espécie (Figura 3).

O cariótipo encontrado em *D. prox. sericeus* é a condição mais frequente e a redução do número diplóide para $2n=18$ parece ser um marcador cromossômico para o gênero *Dichotomius*. Dentre as nove espécies estudadas para o gênero, apenas *D. carolinus* (Smith & Virkki, 1978) e *D. bosqui* (Vidal, 1984) apresentaram o cariótipo $2n=20$. A redução do cariótipo de $2n=20$ para $2n=18$ e a presença de um bivalente autossômico grande sugere a ocorrência de duas inversões pericêntricas seguidas de uma fusão entre estes cromossomos, resultando em um par grande metacêntrico. O sistema de determinação sexual Xy_p também é o mais comum dentro do gênero, ocorrendo registro de sete espécies com este mecanismo (Vidal, 1984; Bione, 2004; Silva *et al.*, 2009; Cabral-de-Mello *et al.*, 2008). Apenas *D. sericeus* apresentou o mecanismo Xy_r (Silva *et al.*, 2009) e *D. bosqui* (Vidal, 1984) não teve seu mecanismo sexual determinado. Em relação à morfologia cromossômica, foi observada diferença entre a morfologia do par autossômico 1 de *D. sericeus* e *D. prox. sericeus*, onde na primeira espécie a morfologia é nitidamente submetacêntrica (Silva *et al.*, 2009), enquanto que na segunda é metacêntrica.

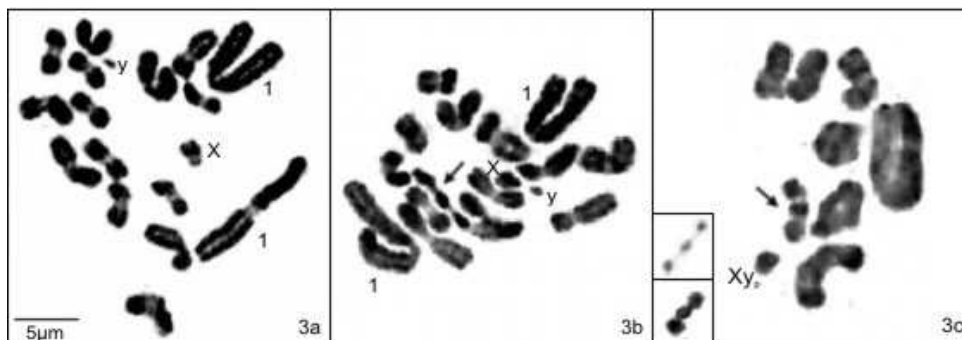


Figura 3. Coloração convencional em *Dichotomius prox. sericeus*. 3a-b) Metáfases espermatogoniais; 3c) Metáfase I. Em destaque os cromossomos 1, X e y, o bivalente sexual (Xy) e o cromossomo diferenciado (seta).

pesar do número $2n = 18$ ser a situação mais comum em *Dichotomius*, esta constituição cromossômica difere do cariótipo modal da ordem Coleoptera e da família Scarabaeidae ($2n = 20$) (Smith e Virkki, 1978, Yadav e Pillai, 1979; Vidal e Nocera, 1984; Colomba *et al.*, 1996, 2000; Moura *et al.*, 2003; Bione *et al.*, 2005a, b; Cabral-de-Mello *et al.*, 2008). No entanto, o número $2n = 18$ também tem sido observado em algumas espécies de diferentes subfamílias de escarabeídeos como, por exemplo, em *Isocopris inhiata* e *Glyphoderus sterquilinus* – Scarabaeinae (Vidal e Nocera, 1984; Bione *et al.*, 2005a), *Macraspis festiva* – Rutelinae (Bione *et al.*, 2005b); *Haplidia etrusca* – Melolonthinae (Yadav *et al.*, 1979) e *Phyllognathus silensis* – Dynastinae (Yadav *et al.*, 1979). O mecanismo sexual Xy_p apresentado em *Dichotomius prox. sericeus* é o mais frequente em Scarabaeidae, ocorrendo em cerca de 60% da subfamília Scarabaeinae (Smith & Virkki, 1978; Yadav & Pillai, 1979; Yadav *et al.*, 1979; Cabral-de-Mello *et al.*, 2008). A morfologia cromossômica meta e submetacêntrica observada na espécie aqui estudada é também a condição mais comum em Coleoptera (Smith & Virkki, 1978, Yadav & Pillai, 1979).

Dichotomius prox. sericeus apresentou ainda, em metáfases I de todos os indivíduos analisados e em metáfase espermatogonial de um único espécime, um bivalente autossômico diferenciado, o qual apresentou duas constrições (Figura 3b e 3c). A presença deste bivalente também foi observada em outras espécies de

Dichotomius, como *D. nису* (Bione, 2004; Silva *et al.*, 2009) e *D. sericeus* (Silva *et al.*, 2009), embora não tenha sido relatado, talvez devido à condensação nas fases observadas nestas espécies.

A diferenciação apresentada por este cromossomo pode ser resultante: 1 – da presença de um *gap* cromossômico causado pela amplificação de seqüências de DNA em tandem. Este *gap* poderia ocasionar futuramente a quebra cromossômica. Os fragmentos poderiam portar ou não centrômeros, desta forma haveria, respectivamente, aumento do número cromossômico com a ocorrência de cromossomo extra (ou cromossomo B) ou perda de informação genética; 2 – da ocorrência de uma constrição secundária, que pode ou não estar relacionada à RON (Região Organizadora de Nucléolo).

A presença de um cromossomo extra foi descrita para espécie *D. germinatus* por Cabral-de-Mello *et al.* (2010). Este cromossomo foi encontrado em alguns indivíduos de *D. germinatus* coletados nos municípios de Igarassu e Maracáipe, Estado de Pernambuco. Neste estudo, técnicas de bandeamento cromossômico e mapeamento das seqüências de DNA repetitivo revelaram a provável origem intraespecífica do cromossomo extra, o qual pode ter sido originado através da amplificação e acumulação de DNA repetitivo de fragmentos cromossômicos que foram gerados a partir de cromossomos do complemento padrão. Estes dados corroboram com a primeira hipótese, que considera a possível

ocorrência de quebra do cromossomo diferenciado levando a formação de cromossomo extra e, conseqüentemente, ao aumento do número cromossômico.

Contudo, com o objetivo de aprofundar a investigação, se faz necessário a aplicação de técnicas citogenéticas diferenciais e moleculares com o intuito de verificar a possível amplificação da HC (Heterocromatina Constitutiva) no cromossomo diferenciado de *D. prox. sericeus*, bem como verificar se a(s) RON(s) evidenciada(s) pelo AgNO₃ e os sítios de DNAr estão localizados neste mesmo cromossomo, ou se ocorre sítios de DNAr inativos independentes do organizador nucleolar, o que poderia vir a corroborar a segunda hipótese.

CONCLUSÕES

A ocorrência do número diplóide 2n=18 na maioria das espécies estudadas, pode indicar um marcador citotaxonomico para o gênero, enquanto que a presença de um cromossomo diferenciado em algumas espécies de *Dichotomius* pode também consistir em um marcador adicional ou o cromossomo a partir do qual pode se originar cromossomos supranumerários ou Bs. Neste caso, faz-se necessário uma observação cuidadosa dos cariótipos das espécies de *Dichotomius* que foram e que serão estudadas e o emprego de técnicas diferenciais, visando verificar a frequência de cariótipos derivados com e sem cromossomos Bs e comparar os padrões de bandeamentos entre os cromossomos autossômicos, sexuais e supranumerários.

Apesar das semelhanças morfológicas entre *D. prox. sericeus* e *D. sericeus*, essas espécies apresentam diferenças no mecanismo de determinação sexual e na morfologia do par autossômico 1. Os dados citogenéticos obtidos neste trabalho contribuem para compreensão dos padrões citológicos e evolutivos do gênero *Dichotomius*.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico (CNPq) e a

Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo suporte financeiro (Processo nº 006/2003, PPP/MTC/CNPq/CT-INFRA/FACEPE, de R. C. Moura).

REFERÊNCIAS

Bione, E.G. 2004. Citogenética em representantes da subfamília Scarabaeinae (Coleoptera-Scarabaeidae). Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, Dr tese.

Bione, E.G.; M.L. Camparoto & Z.L.P. Simões. 2005a. A study of the constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions of *Isocopris inhiata* and *Diabroctis mimas* (Coleoptera: Scarabaeidae, Scarabaeinae) using C-banding, AgNO₃ staining and FISH techniques. *Genetics and Molecular Biology* 28 (1): 111-116.

Bione, E.G.; R.C. Moura; R. Carvalho & M.J. Souza. 2005b. Karyotype, C-and fluorescence banding pattern, NOR location and FISH study of five Scarabaeidae (Coleoptera) species. *Genetics and Molecular Biology* 28 (3): 376-381.

Cabral-de-Mello, D.C.; R.C. Moura & C. Martins. 2010. 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* 104: 393-400.

Cabral-de-Mello, D.C.; S.G. Oliveira; I.C. Ramos & R.C. Moura. 2008. Karyotype differentiation patterns in species of the subfamily Scarabaeinae (Scarabaeidae, Coleoptera). *Micron* 39: 1243-1250.

Colomba, M.S.; E. Montereisino; R. Vitturi & Z. Zunino. 1996. Characterization of mitotic chromosomes of the scarab beetles *Glyphoderus sterquilinus* (Westwood) and *Bubas bison* (L.) (Coleoptera: Scarabaeidae) using conventional and banding techniques. *Biologisches Zentralblatt* 115: 58-70, 1996.

Colomba, M.S.; R. Vitturi & M. Zunino. 2000. Karyotype analyzes, banding, and fluorescent *in*

- situ* hybridization in the Scarab beetle *Gymnopleurus sturmi* McLeady (Coleoptera, Scarabaeoidea, Scarabaeidae). The Journal of Heredity 91: 260-264.
- Flechtmann, C.A.H.; S.R. Rodrigues & M.C.Z. Seno. 1995. Controle biológico da mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans irritans*) em Selvíria, Mato Grosso do Sul: 3. Levantamento de espécies fimícolas associadas à mosca. Revista Brasileira de Entomologia, Curitiba, 39 (2): 249 – 258.
- Halfpeter, G. & E.G. Matthews. 1966. The natural history of dung beetles of the Subfamily Scarabaeinae (Coleoptera, Scarabaeidae). Folia Entomologica Mexicana, Xalapa, 12 (14): 1-312.
- Hanski I. & Y. Cambefort. 1991. Dung Beetle Ecology. Princeton, Princeton University Press, 481p.
- Kohlmann B. & A. Solís. 1997. El género *Dichotomius* (Coleoptera: Scarabaeidae) en Costa Rica. Giornale Italiano di Entomologia 8: 343-382.
- Louzada, J.N.C.; G. Shiffler & F.Z. Vaz-De-Mello. 1996. Efeitos do fogo sobre a composição e estrutura da comunidade de Scarabaeidae (Insecta: Coleoptera) da restinga da ilha de Guriri, Norte do Espírito Santo. Congresso de Ecologia do Brasil: Simpósio Impacto das Queimadas sobre os Ecossistemas e Mudanças Globais. Anais. Brasília: Universidade de Brasília, pp. 161-169.
- Luederwaldt H. 1929. As espécies brasileiras do gênero *Pinotus*. Revista do Museu Paulista 16: 603-776.
- Moura, R.C.; M.J. Souza; N.F. Melo & A.C. Lira-Neto. 2003. Karyotypic characterization of representatives from Melolonthinae (Coleoptera: Scarabaeidae): Karyotypic analysis, banding and fluorescent in situ hybridization (FISH). Hereditas 138: 200-206.
- Ratcliffe, B.C.; M.L. Jameson & A.B.T. Smith. 2002. Scarabaeidae. In: ARNETT, JR. R. H; THOMAS, M. C; SKELLEY, P. E; FRANK J. H. American Beetles, Polyphaga: Scarabaeoidea through Curculionioidea. Ed.CRC Press LLC 2: 39-81.
- Rodrigues, S.R. & L.C. Marchini. 1998. Besouros coprófagos (Coleoptera: Scarabaeidae) coletados em Piracicaba, SP. Scientia Agrícola, Piracicaba, 55 (1): 2-5.
- Silva G.M.; E.G. Bione; D.C. Cabral-de-Mello; R.C. Moura; Z.L.P. Simões & M.J. Souza. 2009. Comparative cytogenetics of three species of *Dichotomius* (Coleoptera, Scarabaeidae). Genetics and Molecular Biology 32 (2): 276-280.
- Smith, S.G. & N. Virkki. 1978. Coleoptera. In: John, B. (Ed.) Animal cytogenetics. Berlin: Borntraeger, 366p.
- Vaz-de-Mello, F.Z. 2000. Estado atual de conhecimento dos Scarabaeidae s. str. (Coleoptera: Scarabaeoidea) do Brasil. In: MARTIN-PIERA, F.; MORRONE, J. J.; MELIC, A. (Eds.) *Hacia un proyecto CYTED para el inventario y estimación de la diversidad entomológica en Iberoamérica: PRIBES-2000*. Zaragoza: Sociedad Entomológica Aragonesa, Monografías Tercer Milenio 1:183-195.
- Vaz-de-Mello F.Z.; J.N.C. Louzada & M. Gavino. 2001. Nova espécie de *Dichotomius* Hope, 1938 (Coleoptera, Scarabaeidae) do Espírito Santo, Brasil. Revista Brasileira de Entomologia 45 (2): 99-102.
- Vidal, O.R. 1984. Coleoptera from Argentina. Genética, Buenos Aires, 65: 235-239.
- Vidal, O.R. & C.P. Nocera. 1984. Citogenética de la tribu *Eucranini* (Coleoptera: Scarabaeidae). Estudios convencionales y con bandeado C. Physis 42: 83-90.
- Yadav, J.S. & R.K. Pillai. 1979. Evolution of karyotypes and phylogenetic relationships in Scarabaeidae (Coleoptera). Zoologischer Anzeiger 202: 105-118.
- Yadav, J.S.; R.K. Pillai & Karamjeet. 1979. Chromosome numbers of Scarabaeidae (Polyphaga: Coleoptera). The coleopterists bulletin 33 (3): 309-318.