

LUCAS SOARES BRAGA

**CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE TRÊS ESPÉCIES PRAGAS DO  
GÊNERO *Sitophilus* (Coleoptera: Curculionidae)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

B813c  
2015  
Braga, Lucas Soares, 1987-  
Caracterização citogenética de três espécies pragas do  
gênero *Sitophilus* (Coleoptera Curculionidae) / Lucas Soares  
Braga. – Viçosa, MG, 2015.  
vi, 29f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Raul Narciso Carvalho Guedes.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f.23-29.

1. *Sitophilus* - Citogenética. 2. Cromossomos.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Entomologia. Programa de Pós-graduação em Entomologia.  
II. Título.

CDD 22. ed. 595.768

LUCAS SOARES BRAGA

**CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE TRÊS ESPÉCIES PRAGAS DO  
GÊNERO *Sitophilus* (Coleoptera: Curculionidae)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do curso de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 24 de Fevereiro de 2015.

---

Alberto Soares Corrêa  
(Coorientador)

---

Mara Garcia Tavares  
(Coorientadora)

---

Mateus Chediak

---

Raul Narciso Carvalho Guedes  
(Orientador)

A Deus, acima de tudo,

Agradeço

Aos meus queridos pais, Kátia e Dirceu,  
e às minhas irmãs, Camila e Natália, pelo carinho,  
amor e dedicação,

Dedico

Ao Jhonathan pelo companheirismo, amor e incentivo  
nestes últimos três anos,

Ofereço.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, queria agradecer a Deus pela oportunidade de cursar a minha pós-graduação em uma das melhores instituições do país. Agradeço também aos meus pais, Kátia e Dirceu, que sempre priorizaram o estudo acima de tudo. À minha irmã Camila, que sempre esteve ao meu lado todas as vezes que precisei de um empurrãozinho, tanto na vida acadêmica, quanto na vida pessoal. À minha avó Nelly, que nos amparou nos nossos momentos mais difíceis. A todos os meus tios e tias, principalmente aos mais estudiosos, que também me serviram de exemplo.

Faço também agradecimentos especiais aos meus dois grandes pais acadêmicos destes últimos sete anos, Prof. Raul Guedes e Prof. Alberto Corrêa, que desempenharam os seus papéis como orientadores de forma brilhante.

À Mara, minha co-orientadora, que me ajudou a desbravar uma área que eu nunca havia antes explorado. Muito obrigado!

Aos estudantes de iniciação científica, principalmente à Alexandra, ao Arthur e à Eduarda sem os quais este trabalho não seria possível.

A todos os meus colegas do Laboratório de Ecofisiologia e Ecotoxicologia, principalmente à Gislaine, que também me orientou em grande parte dos meus experimentos, e a Vinícius, Alice e Roberta, que sempre me deixavam muito feliz simplesmente por estarem ao meu lado.

A todos os meus amigos da enfermagem, principalmente Gabi, Fernanda, Íbera, Júlia e Iohana, que me abraçaram desde o primeiro dia em que os conheci. A toda a equipe dos Laboratórios de Biologia Molecular e Filogeografia, de Citogenética de Insetos e de Biologia Molecular de Insetos, que me cederam muito espaço e conhecimento.

Por fim, agradeço ao Jhonathan, meu amor e grande incentivador destes últimos anos. Sem você essa jornada teria sido muito mais difícil.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	v
ABSTRACT .....	vi
1. Introdução .....	1
2. Material e Métodos .....	6
2.1. Coleta e manutenção das populações.....	6
2.2. Análises Citogenéticas .....	7
2.2.1. Preparação das lâminas para análise de cromossomos meióticos .....	7
2.2.2. Preparação das lâminas para análise de cromossomos mitóticos.....	7
2.2.3. Coloração Convencional com Giemsa .....	8
2.2.4. Técnica de Bandeamento C .....	8
2.2.5. Coloração Sequencial com DAPI/CMA <sub>3</sub> .....	9
2.2.6. Impregnação por Prata.....	9
2.3. Medição dos cromossomos .....	10
2.4. Extração de DNA, amplificação e sequenciamento de genes de <i>Wolbachia</i> infectantes de indivíduos de <i>Sitophilus zeamais</i> .....	10
3. Resultados .....	12
3.1. Coloração convencional.....	12
3.2. Análise de cromossomos meióticos .....	13
3.3. Quantificação e caracterização de regiões de ricas heterocromatina.....	13
3.4. Classificação das linhagens de <i>Wolbachia</i> em <i>S. zeamais</i> .....	19
4. Discussão .....	19
5. Referências .....	23

## RESUMO

BRAGA, Lucas Soares, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2015. **Caracterização citogenética de três espécies pragas do gênero *Sitophilus* (Coleoptera: Curculionidae)**. Orientador: Raul Narciso Carvalho Guedes. Coorientadores: Alberto Soares Corrêa e Mara Garcia Tavares.

O gênero *Sitophilus* é amplamente conhecido pelos danos causados em cereais armazenados. Estudos sobre a evolução destes carunchos são muito importantes, pois o processo de migração dos mesmos parece refletir a história da colonização humana pelo planeta. Neste contexto, a citogenética tem um papel fundamental, pois auxilia no entendimento dos processos de especiação que ocorreram, ao longo dos anos, com as diferentes espécies. Neste trabalho, através das técnicas de coloração convencional e Bandeamento C, Impregnação por Prata e Coloração Sequencial com DAPI/CMA<sub>3</sub>, foi possível encontrar diferenças significativas entre três espécies praga do gênero *Sitophilus*. *Sitophilus linearis* e *Sitophilus oryzae* apresentaram  $2n=22$ , enquanto que *S. granarius* apresentou  $2n=24$ . As duas últimas apresentaram também o sistema de determinação sexual do tipo Xyp, com o par sexual formando um “paraquedas” durante o pareamento. De acordo com os nossos resultados, *S. oryzae* se assemelha mais a *S. zeamais*, principal praga do gênero. *Sitophilus linearis* e *S. granarius* possuem, cada um, peculiaridades que os distanciam citogeneticamente das outras espécies do gênero estudadas. *Sitophilus granarius* apresentou um padrão de bandeamento C, marcação com prata e fluorocromos bem diferentes das demais, com poucas marcações ao 6º par autossomal. *Sitophilus linearis*, semelhantemente a *S. oryzae*, apresentou pequenas marcações centroméricas em todos os cromossomos. Além disso, em *S. linearis*, nenhum cromossomo ultrapassou 13% do set haplóide (Total Chromosome Length; TCL). Foi feito também um estudo molecular em *Sitophilus zeamais* com o endossimbionte *Wolbachia*, com o intuito de verificar se esse está relacionado com a ocorrência de cromossomo B nesta espécie. Não houve nenhuma relação entre as linhagens de *Wolbachia* e o aparecimento de cromossomo B em *S. zeamais*. Os resultados deste trabalho confirmam dados moleculares já existentes na literatura de que *S. oryzae* se aproxima mais de *S. zeamais* do que das outras duas espécies-praga do gênero. Além disso, dada a diferença que *S. granarius* apresentou, esta espécie é provavelmente a mais distante dentro grupo estudado.

## ABSTRACT

BRAGA, Lucas Soares, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2015. **Cytogenetic characterization of three pest species of genus *Sitophilus* (Coleoptera: Curculionidae)**. Adviser: Raul Narciso Carvalho Guedes. Co-Advisers: Alberto Soares Corrêa and Mara Garcia Tavares.

The genus *Sitophilus* is widely known for the damage caused in stored cereals. Studies on the evolution of these beetles are very important, because its migration process seems to reflect the history of human colonization around the planet. In this context, cytogenetics plays a key role because it helps in the understanding of speciation processes that have occurred over the years with different species. In this work, using the conventional staining, C banding, Silver staining and fluorochrome staining with DAPI / CMA3, we found significant differences between the three pest species of the *Sitophilus* genus. *Sitophilus linearis* and *Sitophilus oryzae* presented  $2n = 22$ , while *S. granarius* presented  $2n = 24$ . The last two also presented the system of sex determination Xyp type, with the sexual pair forming a "parachute". According to our results, *S. oryzae* is closer to *S. zeamais*, major pest of the genre. *Sitophilus linearis* and *S. granarius* have, each one, cytogenetically peculiarities that distinguish them from the other species of the genus studied. *Sitophilus granarius* showed a pattern of C banding, silver impregnation and fluorochromes quite different, with a few stainings restricted to 6 autosomal pair. *Sitophilus linearis*, similarly to *S. oryzae*, presented a small centromeric stainings on all of the chromosomes. Furthermore, in *S. linearis*, no chromosome exceeded 13% of haploid set (Total Chromosome Length; TCL). It was also made a DNA analysis of *Sitophilus zeamais* with the endosymbiont *Wolbachia* in order to verify whether it is related to the occurrence of B chromosome in this species. There was no relationship between *Wolbachia* strains and the appearance of chromosome B in *Sitophilus zeamais*. These results confirmed molecular data from the literature that *S. oryzae* is closer to *S. zeamais* than the other two pests of the genus. Moreover, given the difference that *S. granarius* presented, this species is probably the farthest within the study group.

## 1. Introdução

O gênero *Sitophilus* é amplamente conhecido, principalmente como praga de grãos armazenados. Ao todo, segundo Delobel e Grenier (1993) e de acordo com revisões realizadas por Csiki (1936) e Marshall (1940), o gênero compreende 14 espécies descritas, mas apenas quatro (*Sitophilus zeamais*, *S.oryzae*, *S.granarius* e *S. linearis*) são verdadeiramente preocupantes por infestações causadas em cereais. No Brasil, *Sitophilus zeamais* é a principal praga de grãos armazenados (Corrêa et al., 2013). Essa espécie é muitas vezes confundida com *Sitophilus oryzae*, devido às grandes semelhanças morfológicas e por ocorrerem em regiões de climas geograficamente vizinhos. Na região sul do Brasil, onde clima é temperado, é predominante a ocorrência de *S. oryzae*, enquanto que no restante do país, em clima tropical, há maior predominância de *S. zeamais*. *Sitophilus linearis* é a principal causadora de injúrias em frutos de tamarindo, sendo restrita a esta cultura (Delobel e Grenier, 1993), e *S. granarius*, assim como *S. zeamais* e *S. oryzae*, é capaz de atacar um número amplo de hospedeiros, como por exemplo, trigo, arroz, milho, centeio e aveia (Dobie e Kilminster, 1978; Schwartz e Burkholder, 1991).

Esta forte dependência que esses carunchos possuem por produtos armazenados pode ser resultado de uma estreita associação envolvendo humanos e insetos (Plarre, 2010). Chu & Whang (1975) reportaram a presença de *S. oryzae* ao leste do Egito em uma tumba datada de 100 anos A.C.. Buckland (1980) relatou a presença de registros fósseis de *S. granarius* em cereais armazenados encontrados em Israel e datados entre os séculos 7 e 9 A.C.. Segundo esse mesmo trabalho, nessa época, essa espécie estaria altamente atrelada às culturas armazenadas e cultivadas pelo homem. Hoje, *S. granarius* já é considerada uma espécie completamente domesticada, sendo a sua sobrevivência dependente da presença permanente de depósitos de grãos armazenados (Levinson & Levinson, 1994). Levando isso em consideração e por uma questão histórica, é muito

importante o entendimento dos processos de especiação e migração dessas espécies, principalmente como forma de amparar o conhecimento que se tem hoje sobre a colonização humana no planeta.

A citogenética compreende todo e qualquer estudo relativo ao cromossomo isolado ou em conjunto, condensado ou distendido, com relação à sua morfologia, organização, função, replicação, variação e evolução. Essa é uma ferramenta muito útil, principalmente na identificação entre espécies e/ou grupos de espécies que apresentam morfologias semelhantes (Lachowska et al., 2006). Além disso, muitas famílias de besouro, como, por exemplo, Chrysomelidae e Curculionidae, já foram taxonômica e filogeneticamente estudadas e classificadas por meio desta ferramenta (Petitpierre, 1997; Rozek et al. 2004).

A família Curculionidae, à qual pertence o gênero *Sitophilus*, é a que possui o maior número de representantes descritos (cerca de 50 mil espécies) dentro da ordem Coleoptera. Dessas, cerca de 600 já foram investigadas quanto às suas características citogenéticas. Porém, a maior parte dos estudos com gorgulhos dizem respeito apenas ao número de cromossomos no macho e à designação do sistema de determinação sexual na metáfase I da meiose nestas espécies (Lachowska, 2006). Hoje, com o avanço das técnicas de marcação e caracterização de heterocromatina (Bandeamento C e Coloração Sequencial com DAPI/CMA<sub>3</sub>) e de posicionamento de regiões organizadoras de nucléolo (Impregnação por Prata), é possível obter-se uma riqueza muito maior de informações sobre as características citogenéticas deste grupo.

Curculionidae possui reconhecidamente um ancestral cariotípico comum, com 42% das espécies estudadas tendo apresentado  $2n = 22$  e meio fórmula  $n = 10+XY_p$ , sendo a maior parte dos cromossomos com arranjo meta- ou submetacêntrico (Smith & Virkki 1978; Sharma et al., 1980; Lachowska et al., 1998, 2006, 2008; Silva et al., 2015; Holecová et al., 2013).

Lachowska et al. (2006), em um estudo com *Brachysomus setiger* (Gyllenhal, 1980), *Brachyderes incanus* (Linnaeus, 1758) e *Paophilus afflatus* (Boheman, 1833), três gorgulhos da família Curculionidae, encontraram  $2n = 22$  e  $n = 10+XYp$  para as três espécies citadas, sendo a maioria dos cromossomos com arranjo metacêntrico e submetacêntrico, com exceção de dois autossomos de *B. setiger* (que se mostraram subtelocêntricos), dos cromossomos Y das três espécies (que se mostraram puntiformes) e do cromossomo X de *B. incanus* (que se mostrou acrocêntrico). Regiões heterocromáticas, quando presentes, foram localizadas apenas na região centromérica.

Holecová et al. (2013), realizando estudo com os curculídeos, *Otiorhynchus bisulcatus* (Fabricius, 1781) e *O.(Zadrehus) atroapterus* (De Geer, 1775), realizaram a caracterização molecular da heterocromatina dessas espécies, utilizando técnicas de Coloração Convencional, Bandeamento C, Impregnação por Prata e Coloração Sequencial com DAPI/CMA<sub>3</sub>. Todos os autossomos de *O. bisulcatus*, à exceção de um par e do cromossomo X, apresentaram pequenos blocos de heterocromatina pericentromérica, a qual era rica em A-T e G-C. O cromossomo Y, dessa espécie, por sua vez, apresentou-se totalmente heterocromático. *O.(Zadrehus) atroapterus* apresentou o mesmo padrão de heterocromatina, à exceção do cromossomo X, que, nesta espécie, apresentou marcação pericentromérica. Curiosamente, na heterocromatina dessa espécie, foram detectadas apenas regiões ricas em A-T. Em ambas as espécies, marcações com prata foram encontradas apenas em placas de meiose e nos cromossomos sexuais.

Barrion et al. (1988) realizaram um estudo com células espermatogênicas e descreveram  $2n=19$  e  $20$  para *S. oryzae* e *S. zeamais*, respectivamente. Estes dados destoam do valor de  $2n=22$ , que prevalece em Curculionidae. Silva et al. (2015) realizou um trabalho de caracterização citogenética de quatro populações de *S. zeamais* utilizando Bandeamento C, Coloração Sequencial com DAPI/CMA<sub>3</sub> e Coloração

Convencional com Giemsa. Neste trabalho, todas as quatro populações analisadas apresentaram  $2n = 22$ , com 10 pares autossômicos e 1 par sexual (XX para fêmeas e Xyp para machos). Além disso, à exceção do cromossomo Y, que foi identificado como puntiforme, todos os demais cromossomos apresentaram-se metacêntricos. Foram localizadas marcações de heterocromatina na região centromérica de todos autossomos, do cromossomo X e em parte ou totalidade de alguns cromossomos B. As análises de DAPI, por sua vez, evidenciaram que essas regiões heterocromáticas são ricas em pares de bases AT. O cromossomo Y foi o único que se mostrou totalmente eucromático.

Com relação às outras espécies do gênero *Sitophilus*, ainda não existem trabalhos que demonstrem a morfologia dos seus cromossomos. Além disso, não há um estudo citogenético comparativo entre as quatro principais espécies-praga deste gênero (*S. zeamais*, *S. oryzae*, *S. granarius* e *S. linearis*) que, apesar de possuírem morfologias externas semelhantes, podem ocupar habitats e/ou hospedeiros distintos e variados, como, por exemplo, *S. zeamais*, *S. oryzae* e *S. granarius* que atacam uma gama diversa de cereais. Essa semelhança morfológica, aliada aos diferentes habitats, leva muitas vezes a inexactidões na identificação destas espécies, sendo muito comum erros nesse aspecto, inclusive no meio científico.

Outra questão importante no gênero *Sitophilus* é a presença de cromossomos B. Os motivos que levam à ocorrência destes cromossomos ainda são pouco conhecidos. Sabe-se que estes não seguem herança mendeliana e que o seu número pode variar dentro de uma mesma espécie, de acordo com a população estudada. Cromossomos B podem ser importantes como forma de diferenciar populações de uma mesma espécie. Segundo Silva et al. (2015), *S. zeamais* possui populações que apresentam de 0-4 cromossomos B. Moraes et al. (2003), por meio do estudo de células gonadais, encontraram de 1-4 cromossomos B em *S. zeamais*, além de 1-2 em *S. oryzae*. No entanto, Smith & Brower (1974) relataram a presença de até 6 cromossomos B em *S.*

*zeamais* e ausência em *S. oryzae* e *S. granarius*. Para *S. linearis*, nada foi reportado até então quanto à presença desses.

Com relação à filogenia do gênero *Sitophilus*, alguns trabalhos já foram realizados, porém também persistem incongruências a serem resolvidas, por exemplo, a elucidação de parentesco entre gorgulhos de grãos e como ocorreu o processo de especiação dentro do gênero, particularmente no que se refere a estes representantes supracitados (McLaurin & Downe, 1966; Beiras & Petipierre, 1981; Nelson et al., 1984; Baker, 1987; Grenier et al., 1994; Hidayat et al., 1996; Peng et al., 2002). O'Meara (2001), em um estudo de filogenia com três fragmentos gênicos (Citocromo oxidase I, fator de alongamento 1-alpha e 28S), confirmou a monofilia entre essas espécies. Segundo esse trabalho, *S. oryzae* forma um táxon irmão de *S. zeamais* e *S. granarius*, enquanto que *S. linearis* está contido em um táxon mais distante.

Sabe-se também que *S. zeamais* é hospedeiro de *Wolbachia pipientis*, uma bactéria endossimbionte intracelular obrigatória de transmissão materna e presente em cerca de 20-70% das espécies de insetos, além de aracnídeos e crustáceos terrestres (Jeyaprakash et al., 2000; Cordaux et al., 2001; Gotoh et al., 2003; Rowley et al., 2004; Goodacre et al., 2006). Essa bactéria é conhecida por causar diversas anomalias reprodutivas, dentre essas, partenogênese, feminilização de machos, incompatibilidade citoplasmática e morte de machos. Carvalho et al. (2014) constataram a ocorrência de *Wolbachia* em *S. zeamais* e exploraram a importância desta ocorrência junto à de um endossimbionte primário presente nesta espécie de inseto. Face a este cenário de anomalias reprodutivas ocasionadas pela presença de *Wolbachia*, nós objetivamos, neste trabalho, verificar se diferentes linhagens deste endossimbionte podem estar relacionadas com a presença de cromossomos B em *S. zeamais*. Além disso, objetivamos também determinar a características citogenéticas de *S. granarius*,

*S.linearis* e *S. oryzae* e, juntamente com os dados de Silva et al. (2015) para *Sitophilus zeamais*, contribuir para o entendimento da história evolutiva do gênero.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Coleta e manutenção das populações**

As populações das três espécies foram coletadas no campo, a fim de garantir uma amostragem coerente com os locais onde há o cultivo de cada uma das culturas hospedeiras. A população de *Sitophilus granarius* foi originária de Manhattan (Kansas) nos EUA, as de *S. oryzae* foram obtidas das cidades de Cascavel (PR) e São Borja (RS) no Brasil (Corrêa et al., 2013), enquanto que a população de *S. linearis* foi coletada na região de Viçosa (MG), localizada na zona da mata mineira (Brasil). Utilizaram-se duas populações de *S. oryzae* como forma de verificar a ocorrência, ou não, de cromossomo B nesta espécie. As populações de *S. zeamais*, utilizadas nos experimentos com *Wolbachia*, foram escolhidas com base na presença/ausência de cromossomo B, sendo provenientes das localidades brasileiras de Cruzeiro do Sul (AC) (sem presença de cromossomos B) e Unaí (MG) (0-4 cromossomos B).

Todas as espécies foram acondicionadas em frascos de vidro de 0,5 L vedados com organza, o que permite a troca de ar com o ambiente. Estes frascos foram mantidos com substrato, temperatura e umidade o mais próximo possível da realidade para cada uma das espécies. *Sitophilus zeamais* (acondicionado com grãos de milho) e *S. linearis* (acondicionado com frutos íntegros de tamarindo) foram colocados em sala de criação climatizada a  $\pm 70\%$  de umidade relativa (UR) e  $\pm 25^{\circ}\text{C}$ ; *S. granarius* (acondicionado em grãos de trigo) e *S. oryzae* (acondicionado em grãos de milho) foram colocados em sala climatizada a  $\pm 70\%$  UR e  $\pm 18^{\circ}\text{C}$ .

## **2.2. Análises Citogenéticas**

### **2.2.1. Preparação das lâminas para análise de cromossomos meióticos**

O objetivo da análise de cromossomos meióticos foi de observar o comportamento dos cromossomos homólogos pareados e, com isso, confirmar o sistema de determinação sexual das três espécies. Machos, previamente sexados, foram dissecados para remoção dos testículos e esses utilizados na preparação das lâminas. A sexagem foi feita segundo metodologia proposta por Khan et al. (1968). Para *S. linearis*, não foi possível utilizar esse método, pois essa espécie possui um encurtamento no rostro, quando comparada às outras, o que inviabilizou a diferenciação entre machos e fêmeas através da morfologia externa. Com isso, os indivíduos de *S. linearis* foram dissecados aleatoriamente até que fossem encontrados os machos. Imediatamente após a remoção dos testículos, esses foram colocados em solução de orceína acética por 20 min. Após esse período, os testículos foram removidos da solução, colocados em uma lâmina com uma pequena gota de orceína acética e esmagados com uma lamínula, de forma que ocorresse o espalhamento dos cromossomos. Utilizou-se uma lâmina por testículo e um total de 5 indivíduos por espécie. Por fim, foram selecionadas as imagens onde fosse possível visualizar o pareamento dos cromossomos sexuais e essas foram fotografadas utilizando-se um microscópio Olympus BX60 acoplado a uma câmera Q color 3 Olympus®, no Laboratório de Citogenética de Insetos da Universidade Federal de Viçosa.

### **2.2.2. Preparação das lâminas para análise de cromossomos mitóticos**

A preparação das lâminas para visualização dos cromossomos mitóticos foi feita segundo metodologia detalhada em Imai et al. (1998). Larvas de último ínstar (em fase de pré-pupa) de cada uma das espécies foram dissecadas para remoção do gânglio cerebral. Esta fase foi escolhida após ensaios preliminares confirmarem que este é o

estágio com maior número de células em divisão no gânglio cerebral. Esse foi colocado em solução hipotônica de colchicina por 1h e 45min (com exceção de *S. granarius*, que permaneceu na solução hipotônica por apenas 1h). Posteriormente, os gânglios foram dissociados com a ajuda de fixadores na superfície de uma lâmina (previamente lavada) da seguinte forma: 1º) Pipetaram-se na lâmina oito gotas de solução contendo fixador I (40% água destilada, 30% de ácido acético glacial e 30% de etanol absoluto). Com essa solução, fez-se a dissociação do gânglio até que a superfície da lâmina começasse a secar; 2º) Imediatamente após a dissociação, pingaram-se três gotas de contendo fixador II (50% de ácido acético glacial e 50% de etanol absoluto); 3º) Por fim, antes que o fixador II secasse, pipetaram-se 3 gotas de solução contendo fixador III (100% de ácido acético glacial). Após a série de soluções fixadoras, as lâminas foram colocadas rapidamente em frente a um aquecedor, para que houvesse rápida secagem.

### **2.2.3. Coloração Convencional com Giemsa**

Após 24h, as lâminas foram coradas com solução de Giemsa a 5% e tampão Sörensen (0,06M pH 6,8) na proporção de 1:30 (v/v) por de 7 min. Após esse período, as mesmas foram lavadas em água corrente deionizada para remoção do excesso de corante. Por fim, as lâminas foram analisadas e as melhores metáfases foram fotografadas em microscópio Olympus BX60 acoplado a uma câmera Q color 3 Olympus®, no Laboratório de Citogenética de Insetos da Universidade Federal de Viçosa.

### **2.2.4. Técnica de Bandeamento C**

Utilizou-se a metodologia descrita por Sumner (1972) e adaptada de Lachowska et al. (2006). Após a preparação das lâminas, com dissociação dos gânglios e fixação, essas foram tratadas com solução de HCl 0,3N a 20°C por 7 minutos, seguido de tratamento com solução de hidróxido de bário a 5% e 20°C por 6 minutos e, por fim,

incubação em SSC 2x por 1h. Posteriormente, as lâminas foram coradas durante 3 minutos com solução de Giemsa a 5% e tampão Sörensen (0,06M pH 6,8) e fotografadas como descrito anteriormente para coloração convencional.

### **2.2.5. Coloração Sequencial com DAPI/CMA<sub>3</sub>**

Para a coloração sequencial com fluorocromo, foi utilizado o protocolo proposto por Schweizer et al. (1980) com algumas modificações. Primeiramente, as lâminas foram colocadas em uma cubeta contendo solução de DAPI (0,6mg/mL) por 30 minutos. Após esse período, as mesmas foram lavadas em tampão McIlvaine e deixadas para secar ao ar. Após essa etapa, pipetou-se com 150µL de CMA<sub>3</sub> (0,5mg/mL), sobre cada lâmina. Essas foram cobertas com lamínula e deixadas no escuro por 45minutos. Na sequência, as lâminas foram novamente lavadas com tampão McIlvane e, após secarem, foram cobertas com 30µL de sacarose. As lâminas receberam então uma lamínula e foram colocadas em estufa, a 40°C, por 7 dias. Posteriormente, as melhores metáfases foram fotografadas em microscópio de epi-fluorescência utilizando filtros os filtros WB ( $\lambda = 330\text{--}385\text{ nm}$ ) e WU ( $\lambda = 450\text{--}480\text{ nm}$ ), sob óleo de imersão e com 100x de aumento.

### **2.2.6. Impregnação por Prata**

Utilizou o protocolo proposto por Howel & Black (1980), conforme descrito a seguir. Em cada lâmina, foram pipetadas duas gotas da solução 1 (50% nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>) diluída em água) em cada extremidade. Em cima de cada uma dessas gotas, pipetou-se uma gota da solução 2 (2g de gelatina incolor diluída em 100mL de água destilada + 1 mL de ácido fórmico). Logo em seguida, as lâminas foram cobertas com lamínula e colocadas em uma estufa a 60-70°C por 10min. Após esse período, as

mesmas foram lavadas em água deionizada para remoção da lamínula, secas e observadas ao microscópio.

### **2.3. Medição dos cromossomos**

Os cromossomos foram ordenados de acordo com o seu comprimento e sua respectiva porcentagem do tamanho total do conjunto haploide (%TCL). Essa metodologia ordena os cromossomos em ordem decrescente, de acordo com o seu tamanho. Posteriormente, esses foram medidos e classificados de acordo com Levan et al. (1964). As medições foram feitas utilizando o software Image-Pro Plus (MediaCybernetics, Bethesda, MD).

### **2.4. Extração de DNA, amplificação e sequenciamento de genes de *Wolbachia* infectantes de indivíduos de *Sitophilus zeamais***

A extração do DNA total do simbioccosmo *Sitophilus zeamais* + *Wolbachia* foi feita utilizando-se metodologia proposta por Clark et al. (2001) com algumas adaptações, conforme descrito na sequência abaixo:

- 1) Macerar pernas e abdome em N líquido, acrescentar 500 µL de tampão CTAB (100mM de Tris HCl; 1,4M de NaCl; 0,02M de EDTA pH 8; 2% de CTAB e 0,02% de β-mercaptoetanol) e macerar novamente;
- 2) Homogeneizar no vórtex e incubar as amostras em banho maria a 65°C por 30min;
- 3) Deixar esfriar à temperatura ambiente, acrescentar 16µL de Proteinase K (25mg/mL) em cada amostra, homogeneizar no vórtex e incubar em banho maria a 37°C por 1:30h homogeneizando a cada 20min;
- 4) Incubar a 65°C por 30 min;
- 5) Deixar esfriar à temperatura ambiente e acrescentar 65µL de RNase A a 10mg/mL. Homogeneizar no vórtex e incubar a 37°C por 3h, homogeneizando a cada 30 min;

- 6) Após as incubações, centrifugar a 10000xg (aproximadamente 13500 rpm) por 5 min a temperatura ambiente;
- 7) Transferir o sobrenadante para um novo tubo, adicionar 500µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), homogeneizar no vórtex e centrifugar por 15 min a 10000xg;
- 8) Transferir o sobrenadante, precipitar com 500µL de isopropanol gelado e verter e incubar a 4°C por, no mínimo 2h.
- 9) Após a incubação, centrifugar por 12min a 10000xg à temperatura ambiente ou por 30 min a 4°C.
- 10) Descartar o sobrenadante e lavar o pellet 2 vezes com 600µL de etanol 95% gelado.
- 11) Deixar o pellet secar à temperatura ambiente, adicionar 50µL de tampão TE (10mM de Tris HCl, 1mM de EDTA pH 7,6) e deixar ressuspender “overnight”.
- 12) Manter as amostras a -20°C

Após a extração, fez-se a caracterização das linhagens de *Wolbachia* através do sistema de MLST (Multilocus Sequence Typing System), que, para isso, utiliza os resultados do sequenciamento de 6 genes: citocromo oxidase subunidade I (coxA), frutose-bifosfato aldolase (fbpA), proteína de divisão celular ftsZ (ftsZ), aspartil/glutamil-tRNA amidotransferase subunidade B (gatB) e fragmentos da proteína hipotética conservada (hcpA), além do gene *wsp*, que codifica para uma proteína de membrana utilizada para outra classificação além dos genes Multilocus (Baldo et al., 2006). O sequenciamento foi realizado pela empresa MacroGen Inc., South Korea ([www.macrogen.com](http://www.macrogen.com)). Tudo isso foi feito para duas populações de *Sitophilus zeamais*, uma reconhecida pela alta variabilidade de cromossomo B (Unai (MG), Brasil) e outra reconhecida pela ausência destes cromossomos (Cruzeiro do Sul (AC), Brasil).

### 3. Resultados

#### 3.1. Coloração convencional

Com relação ao número cromossômico, a análise das lâminas de coloração convencional mostrou que *Sitophilus granarius* apresentou 11 pares de cromossomos autossômicos e um par de cromossomos sexuais. *Sitophilus granarius* e *S. linearis* apresentaram, cada um, 10 pares autossômicos e um par sexual. *Sitophilus linearis* apresentou ainda até dois cromossomos B com posicionamento submetacêntrico (Figura 1).

No que diz respeito ao posicionamento do centrômero, as três espécies apresentaram, em sua maioria, cromossomos metacêntricos e alguns pares com posicionamento submetacêntrico. A figura 1 mostra o cariótipo das três espécies, juntamente com a classificação de cada par, com base nas posições de seus centrômeros. *Sitophilus oryzae* foi a única espécie que apresentou apenas um par de cromossomos submetacêntrico (7º par). *Sitophilus granarius* e *S. linearis* apresentaram, cada um, cinco e quatro pares de cromossômicos autossômicos submetacêntricos, respectivamente. *Sitophilus granarius* foi também a única espécie que apresentou o cromossomo X com morfologia submetacêntrica; nas outras espécies, esse cromossomo é metacêntrico. Na comparação entre espécies, não houve relação entre a classificação centromérica e os seus respectivos pares cromossômicos. Isso quer dizer que pares diferentes tiveram classificações diferentes entre espécies.

Foram observadas também contrações secundárias nos pares autossômicos 3 e 9 dos indivíduos de *S. oryzae* submetidos à coloração convencional (Figura 3d).

As três espécies apresentaram cariótipos simétricos, com os cromossomos formando uma série decrescente em tamanho. No que diz respeito ao comprimento e porcentagem do conjunto haploide (%TCL), *S. linearis* foi a única espécie que não apresentou nenhum dos cromossomos correspondendo a mais de 13% do conjunto

haploide. Em *S. oryzae* e *S. granarius*, por sua vez, verificou-se que o 1º par cromossômico representava mais de 15%.

### **3.2. Análise de cromossomos meióticos**

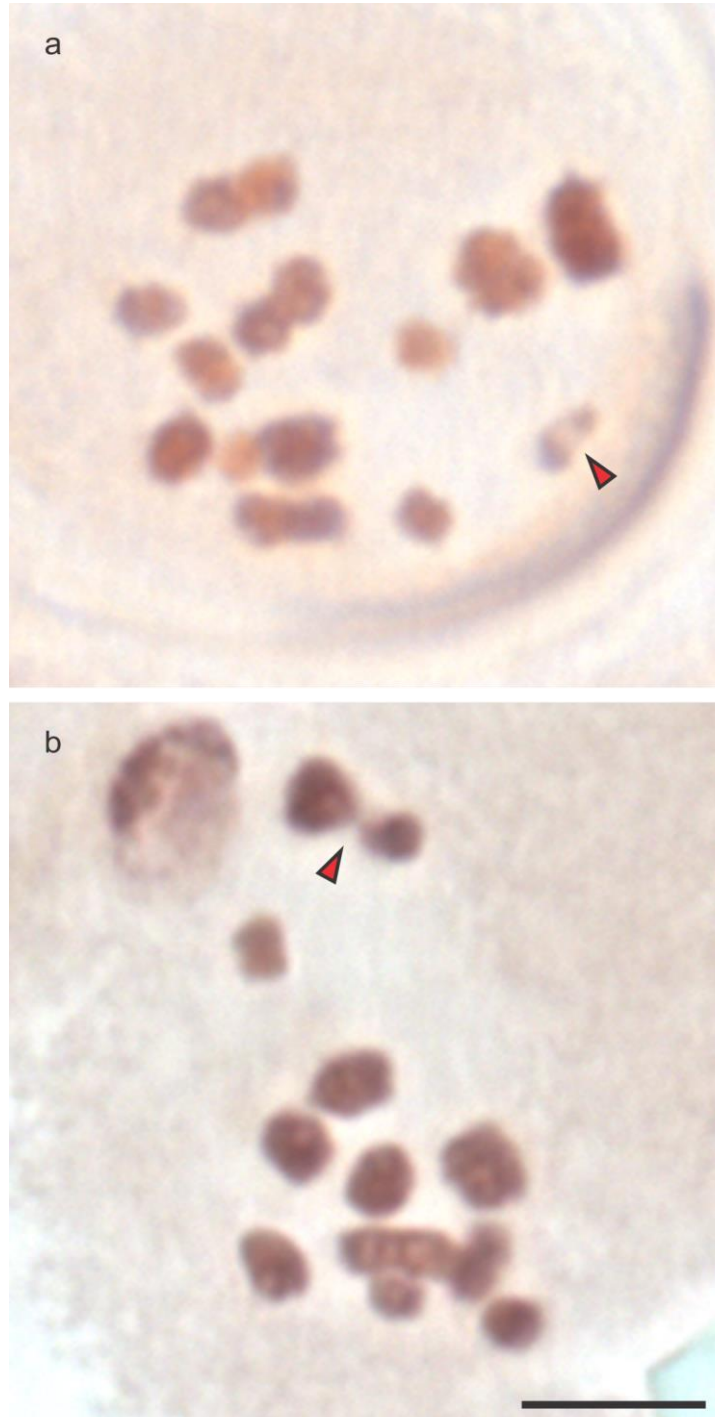
A análise das lâminas de testículo confirmaram o número cromossômico das espécies e o sistema de determinação sexual para *S. granarius* e *S. linearis*. Foi possível visualizar a formação do “paraquedas”, formado pela associação entre os cromossomos sexuais X e Y (Figura 2a e b). As imagens confirmaram a meio fórmula  $n=11+XX$  para fêmea e  $n=11+Xyp$  para macho em *S. granarius* e  $n=10+XX$  para fêmea e  $n=10+Xyp$  para macho em *S. linearis*. Em *S. oryzae*, não foi confirmada a formação do paraquedas, portanto, foi determinado  $n=10+XX$  e  $n=10+XY$  para fêmeas e machos, respectivamente.

### **3.3. Quantificação e caracterização de regiões de ricas heterocromatina**

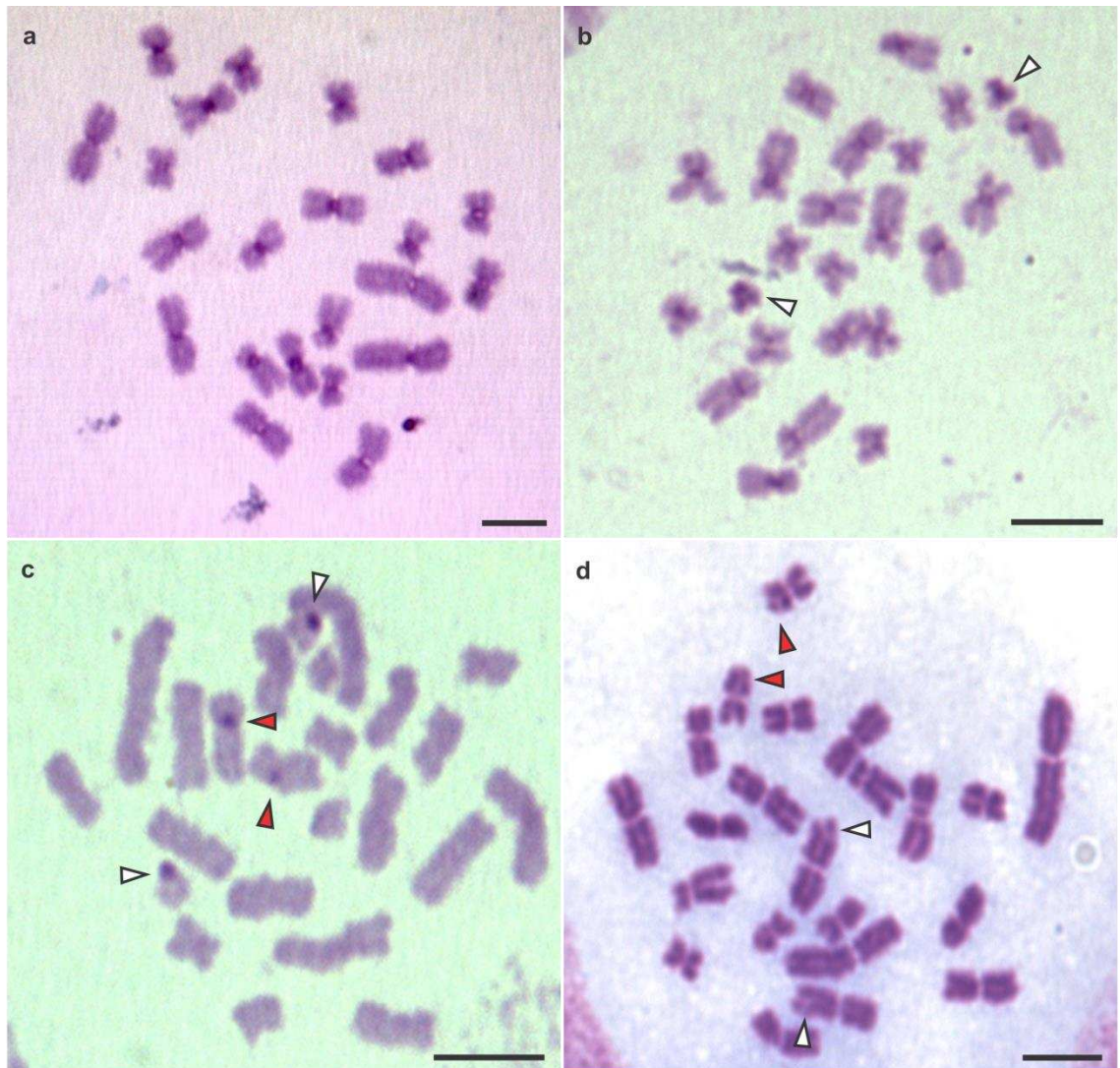
Com a técnica de bandeamento C, todos os cromossomos de *S. oryzae* apresentaram pequenas marcações centroméricas (Figura 3a). Em *S. linearis*, da mesma forma que em *S. oryzae*, todos os cromossomos também apresentaram pequenas marcações centroméricas, à exceção dos cromossomos B, que se mostraram heterocromáticos (Figura 3b). Em *S. granarius*, houve grande diferença no padrão de marcações, quando comparado às outras espécies. A maioria dos cromossomos não apresentou marcação alguma, à exceção do 6º par autossômico e do cromossomo sexual X, que apresentaram marcação bastante evidente na região centromérica (Figura 3c).

Figura 1. Machos de *S. oryzae* e *S. granarius* e fêmea de *S. linearis* submetidos a coloração covencional; classificação dos cromossomos das três espécies de acordo com Levan et al. (1964); (-) inexistente; (\*) não determinado; barra representa 10 µm.

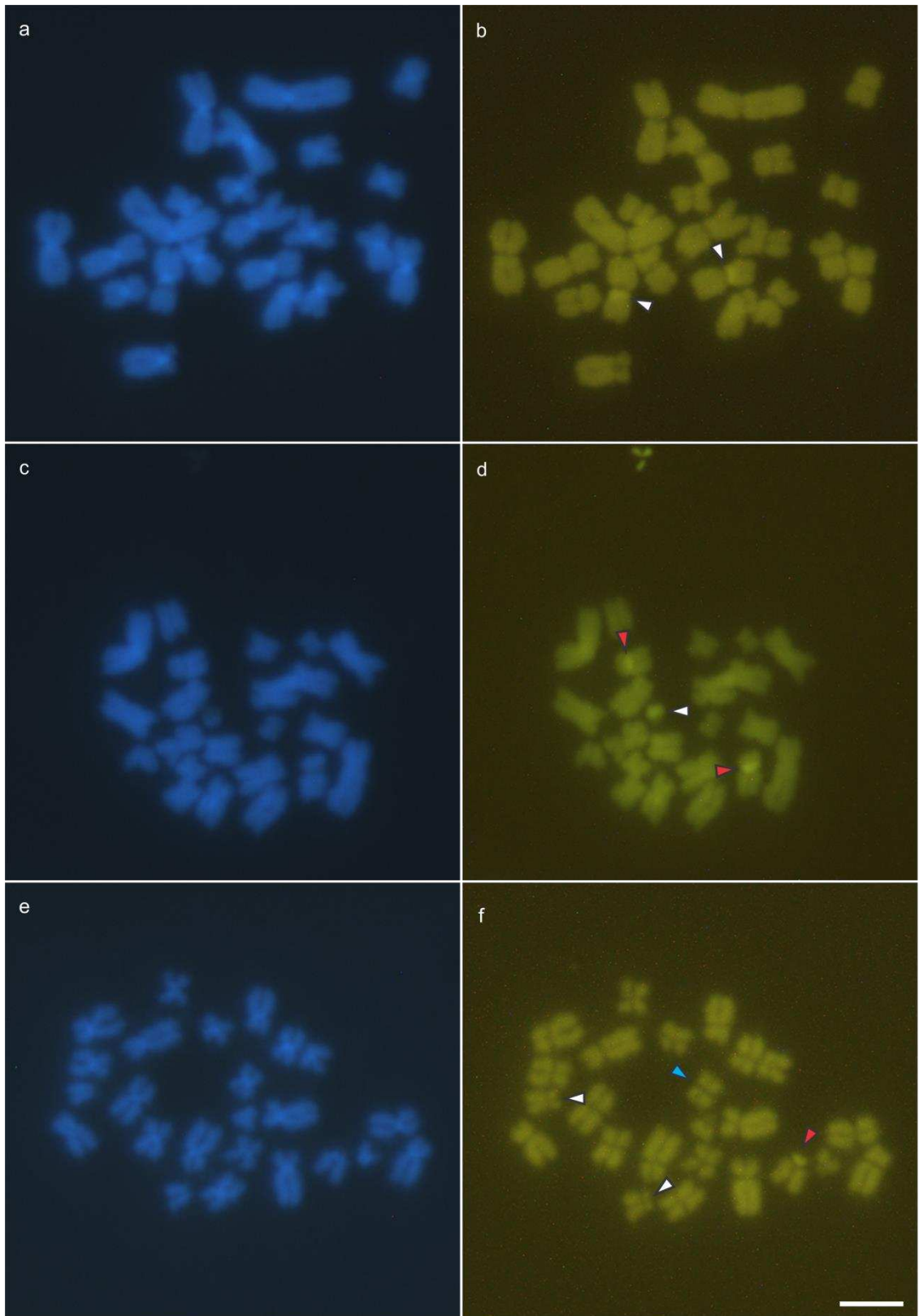
	Par Autossômico											Cromossomos Sexuais		B's
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	X	y	
<i>S. oryzae</i>														
Classificação	m	m	m	m	m	m	sm	m	m	m	-	m	m	
TCL(%)	16,64	11,25	11,05	10,41	9,82	8,07	7,75	7,18	6,64	5,73	-	2,83	2,47	
<i>S. granarius</i>														
Classificação	sm	m	sm	sm	m	sm	m	m	m	m	sm	sm	sm	
TCL(%)	15,29	11,34	10,47	10,08	9,98	8,89	8,55	6,94	5,39	5,21	3,68	2,62	1,57	
<i>S. linearis</i>														
Classificação	sm	sm	m	m	sm	m	m	m	m	sm		m	*	sm
TCL(%)	12,14	11,34	11,27	10,21	9,48	9,08	7,16	7,1	7,7	6,37		9,15	*	



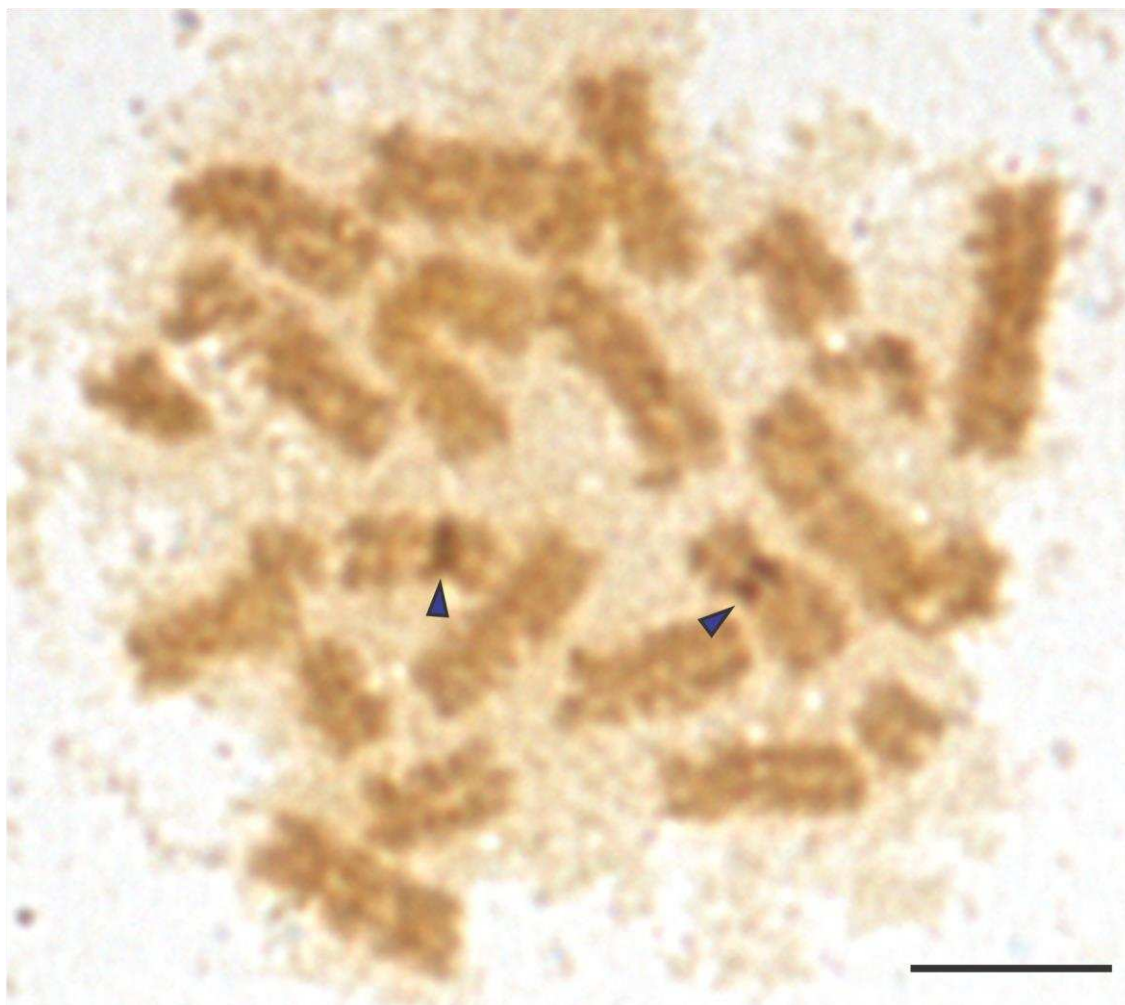
**Figura 2.** Células gonadais extraídas dos testículos de *S. granarius* (a) e *S. linearis* (b). As setas indicam o par sexual Xyp em cada espécie. Barra representa 5 $\mu$ m.



**Figura 3.** “a”, “b” e “c” representam a células mitóticas submetidas à técnica de Banda C. “a” corresponde a *Sitophilus oryzae*; “b” corresponde a *S. linearis*. Setas indicam o os cromossomos B; “c” corresponde a *S. granarius*. Setas vermelhas e brancas indicam marcação no par sexual X e no 6º par autossômico, respectivamente; “d” corresponde a constrições secundárias em dois diferentes pares de *S. oryzae* submetido à coloração convencional; barras representam 5 µm.



**Figura 4.** Coloração sequencial com fluorocromos DAPI/CMA<sub>3</sub>; “a” e “b” correspondem a *Sitophilus oryzae*. Setas indicam marcação pericentromérica com CMA<sub>3</sub> no 5º par autossômico; “c” e “d” correspondem a *S. granarius*. Setas vermelhas indicam marcação centromérica com CMA<sub>3</sub> no 6º par autossômico e seta branca indica marcação no cromossomo Y; “e” e “f” correspondem a *S. linearis*. Setas vermelha e branca indicam marcação pericentromérica nos cromossomos X e no 10º par autossômico, respectivamente. Setas azul indica cromossomo Y. Barra representa 5µm.



**Figura 5.** Células mitóticas de *S. granarius* submetidas à técnica de Impregnação por Prata. Setas indicam marcação no sexto par autossômico. Barra representa 5 $\mu$ m.

Nas imagens de coloração sequencial com DAPI/CMA<sub>3</sub>, houve também algumas diferenças entre as três espécies. *Sitophilus oryzae* apresentou marcação DAPI positiva em todos os centrômeros, evidenciando regiões ricas em pares de bases AT. Além disso, o 5<sup>o</sup> par autossômico apresentou marcação CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> na região pericentromérica, mostrando que, neste par, existe uma região rica em pares de base GC (pericentromérica) seguida de uma região rica em pares de base AT (centromérica) (Figura 4a e b). Em *S. granarius* apenas o 6<sup>o</sup> par autossômico e o cromossomo Y apresentaram marcação CMA<sub>3</sub><sup>+</sup>, na região centromérica, justaposta à marcação de banda

C (Figura 4d). Não foi houve marcação com DAPI em *S. granarius*. Em *S. linearis*, todos os cromossomos apresentaram marcação DAPI<sup>+</sup> nos centrômeros, que foram confirmadas com as marcações negativas para CMA<sub>3</sub> nas mesmas regiões. Além disso, o décimo par autossômico e o cromossomo sexual X apresentaram marcação CMA<sub>3</sub><sup>+</sup> pericentromérica (Figura 4e e f).

Por fim, com a utilização da técnica de impregnação por prata, foi possível verificar a existência de regiões organizadoras de nucléolo (NOR's) apenas em *S. granarius*. Nessa espécie, a NOR localiza-se no 6º par (sobreposta às marcações de Bandeamento C e de CMA<sub>3</sub>) (Figura 5). Também foi observada marcação no cromossomo X, mas essa não foi confirmada com a técnica de CMA<sub>3</sub>.

#### **3.4. Classificação das linhagens de *Wolbachia* em *S. zeamais*.**

Todos os indivíduos das duas populações de *S. zeamais* analisadas (Unaí, que possui cromossomos B, e Cruzeiro do Sul, que não os possui), apresentaram a mesma linhagem de *Wolbachia*. Pelo sistema MLST os indivíduos pertenciam à linhagem wSit1, e pelo fragmento WSP, que codifica para uma proteína de membrana, os indivíduos pertenciam ao perfil 678. Com isso, não foi encontrada nenhuma evidência da relação entre linhagem de *Wolbachia* e presença/ausência de cromossomos B em *Sitophilus zeamais*.

#### **4. Discussão**

Este trabalho mostrou que, apesar da grande semelhança morfológica que existe entre as espécies praga de *Sitophilus* aqui estudadas, existem diferenças marcantes nas suas características citogenéticas. Silva et al. (2015) encontraram 10 pares de autossomos e um par de cromossomos sexuais para *S. zeamais*, mesmos valores encontrado aqui para *S. oryzae* e *S. linearis*. *Sitophilus granarius*, por ter sido a única

espécie que apresentou  $2n = 24$ , tem, nesta característica, amparo para diferenciá-la das outras três espécies. Dentro do gênero *Acalles*, Lachowska et al. (2001) encontraram uma variação de  $2n=28$  a  $2n=30$ , entre as três espécies estudadas. No gênero *Barypeithes*, essa variação foi ainda mais marcante, com uma espécie endêmica possuindo  $2n=26$ , apesar da maioria das espécies terem apresentado  $2n=22$  (Lachowska et al., 2005). Portanto, variações no número cromossômico, dentro do mesmo gênero, são comuns em curculionídeos (Oberprieler et al., 2007).

O padrão de posicionamento centromérico meta- e submetacêntrico é extremamente comum dentro da família Curculionidae, sendo poucos os exemplos que fogem a este modelo (Lachowska et al., 2004, 2005, 2006a, 2006b; Holecova et al., 2005, 2008, 2013). Das três espécies estudadas aqui, *S. linearis* e *S. granarius* apresentaram um maior número de cromossomos autossômicos submetacêntricos, quatro e cinco, respectivamente, seguidas por *S. oryzae* (um par). Além disso, com relação ao cromossomo sexual X, *S. granarius* foi a única espécie onde este cromossomo foi classificado como submetacêntrico. Em *S. zeamais*, segundo Silva et al. (2015), todos os cromossomos autossômicos e o cromossomo X apresentaram morfologia metacêntrica, o que a aproxima mais de *S. oryzae* do que das outras duas espécies aqui estudadas. Essa característica (posicionamento centromérico) acentua a relação de proximidade entre as espécies, com *S. linearis* se assemelhando mais a *S. granarius*, e *S. oryzae* se aproximando mais de *S. zeamais*, sendo essas últimas, inclusive, capazes de acasalarem, apesar de não gerarem descendentes férteis (Hiayat et al., 1996; Parre et al., 2010; Corrêa et al., 2012).

Silva et al. (2015) também confirmaram o sistema Xyp para *S. zeamais*, mesmo modelo encontrado aqui para *S. granarius* e *S. linearis*. Isso já era de esperar, uma vez que, dentro da família Curculionidae, esse é o sistema de determinação sexual mais

comum (Smith & Virkki 1978; Sharma et al., 1980; Lachowska et al., 1998, 2006, 2008; Holecová et al., 2013; Silva et al., 2015).

Como forma de diferenciar espécies de *Sitophilus*, o uso de técnicas de caracterização de heterocromatina parece ser uma ferramenta bastante eficiente. Através técnica de bandeamento C, *Sitophilus oryzae* e *S. linearis* apresentaram, nos cromossomos autossômicos e no cromossomo X, o padrão de marcação típico da família Curculionidae, com pequenas regiões heterocromáticas localizadas no centrômero e ao seu redor (Juan e Petitpierre, 1987; Rozek, 1998; Holecová et al., 2002, 2008; Rozek et al., 2004; Lachowska et al., 2005, 2008; Silva et al., 2015). Das três espécies, a que mais divergiu no padrão de marcações por meio da técnica de bandeamento C foi *S. granarius*. Diferentemente de *S. oryzae*, *S. linearis* e de *S. zeamais* (Silva et al., 2015), *S. granarius* apresentou marcação evidente apenas no 6º par autossômico, na região centromérica. Além disso, quando se utilizou a técnica impregnação por prata, essa mesma região apresentou marcação, o que indica que ela representa a Região Organizadora de Nucléolo nessa espécie. Sabe-se que as NOR's são ricas em pares de bases GC e a técnica de coloração com CMA<sub>3</sub> confirmou a localização das NOR's em *S. granarius*.

Apesar de não termos encontrado marcação com prata em *S. linearis* e *S. oryzae*, pode ser que, nessas espécies, as NOR's estejam distribuídas em pequenos sítios em diferentes regiões, o que impossibilitaria a visualização das mesmas utilizando a técnica empregadas neste estudo. Outra possibilidade é a de que essas regiões não estivessem com expressiva atividade no momento do preparo das lâminas dessas espécies, haja vista que essa é uma técnica que demanda alta atividade gênica nas regiões passíveis de serem marcadas (Holecová et al., 2013).

*Sitophilus oryzae* e *S. linearis* apresentaram padrões de coloração sequencial com fluorocromos semelhantes aos encontrado por Silva et al. (2015) para *S. zeamais*, o

que atesta mais uma vez a maior proximidade entre *S. oryzae* e *S. zeamais*. Todas essas características mostram que essas técnicas juntas são eficientes na caracterização e diferenciação de espécies dentro do gênero *Sitophilus*.

No que diz respeito a cromossomos B, esses são considerados raros dentro da família Curculionidae, sendo que, das cerca de 600 espécies já estudadas, apenas sete o possuem (Ennis 1972; Smith & Brower 1974; Dey 1989; Holecová et al., 2005; Lachowska et al., 2008). Smith & Brower (1974) relataram a presença de seis cromossomos B em *S. zeamais*, não tendo sido encontrados em *S. granarius* e *S. oryzae*, o que corrobora com os nossos resultados. Com relação aos cromossomos B, Silva et al. (2015) também encontraram, entre outros, cromossomos B totalmente heterocromáticos em *S. zeamais*, porém com posicionamento centromérico metacêntrico, diferente do que encontramos aqui (submetacêntrico) para *S. linearis*.

Em *Sitophilus zeamais*, nós tentamos, sem sucesso, relacionar a presença do cromossomo B com a linhagem de *Wolbachia* em diferentes indivíduos. Mesmo na população de Unaí, que possui número variável desses cromossomos, não foi possível encontrar mais de uma linhagem diferente do endossimbionte. Nikoh et al. (2007) relataram a ocorrência de transferência horizontal de cerca de 30% de genes de *Wolbachia* para *Callosobruchus chinensis*, um de seus hospedeiros. Pode ser que os genes de *Wolbachia* responsáveis pelo surgimento de cromossomos B tenham sido horizontalmente transferidos para *Sitophilus zeamais*. Se isso for verdade, a metodologia utilizadas neste trabalho seria insuficiente para testar a hipótese inicial.

Dados de O'Meara (2011), apesar de não conclusivos, formaram a seguinte relação de parentesco entre essas espécies de *Sitophilus*: *S. linearis* + [(*S. oryzae* + (*S. granarius* + *S. zeamais*))]. No entanto, estudos sorológicos com antígenos, amylase-isosymes, atividade de esterases, marcadores moleculares mitocondriais e comparações entre hidrocarbonetos cuticulares já confirmaram uma maior similaridade entre *S.*

*oryzae* e *S. zeamais* (McLaurin & Downe, 1966; Beiras & Petitpierre, 1981; Nelson et al., 1984; Baker, 1987; Grenier et al., 1994; Hidayat et al., 1996; Peng et al., 2002), da mesma forma que foi verificado no presente trabalho. Estudos moleculares recentes realizados por Carvalho et al. (2014) confirmaram a monofilia do gênero e apontam que, para o gene nuclear ELF (fator de alongamento), *S. zeamais* e *S. oryzae* formam juntos um clado independente de *S. granarius* e *S. linearis*, o que suporta os dados citogenéticos aqui encontrados. Nossos resultados confirmam essa maior proximidade entre *S. oryzae* e *S. zeamais* e, dada a diferença apresentada por *S. granarius* não só no número cromossômico, mas também em grande parte das técnicas aqui realizadas, é provável que esta espécie seja a mais distante dentro do grupo.

## 5. Referências

- Almeida M.C.; Campaner C.; Cella D. Karyotype characterization, constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions of *Paranaita opima* (Coleoptera, Chrysomelidae, Alticinae). *Genetics and Molecular Biology*, v.29, p.475-481, 2006.
- Baker, J. E. Eletrophoretic analysis of amylase isozymes in geographical strains of *Sitophilus oryzae* (L.), *S. zeamais* Motsch., and *S. granaries* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Stored Products Research*, v. 23, p. 125-131, 1987.
- Beiras M. J. & Petitpierre E. 1981: Allozymic variability and genetic differentiation in three species of *Sitophilus* L. (Coleoptera, Curculionidae). *Egypt Journal Genetic Cytologic*, v.10, p. 95–104, 1981.
- Baldo, L., Wwren, J.H. Revisiting *Wolbachia* supergroup typing based on WSP: spurious lineages and discordance with MLST. *Current Microbiology*, v.55, p. 81-87, 2007.
- Barrion A. A.; Sazena R. C.; Jilani G. Spermatogenic cells and chromosomes of *Sitophilus oryzae* (L.) and *Sitophilus zeamais* (Mots.) (Coleoptera: Curculionidae). *Cytologia*, v.53, p.659-664, 1998.

- Baldo, L., Wwren, J.H. Revisiting *Wolbachia* supergroup typing based on WSP: spurious lineages and discordance with MLST. *Current Microbiology*, v.55, p. 81-87, 2007.
- Bione E.; Camparoto M.L.; Simoes Z.L. A study of constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions of *Isocopris inhiata* and *Diabroctis mimas* (Coleoptera: Scarabaeidae, Scarabaeinae) using C-banding, AgNOR staining and FISH techniques. *Genetics and Molecular Biology*, v.28, p.111-116, 2005.
- Carvalho, G.A., Corrêa, A.S., Oliveira, L.O. de, Guedes, R.N.C., Evidence of horizontal transmission of primary and secondary endosymbionts between maize and rice weevils (*Sitophilus zeamais* and *S. oryzae*) and the parasitoid *Theocolax elegans*. *Journal of Stored Products Research*, v. 59, p. 61-65, 2014.
- Carvalho, G.A., Vieira, J.L., Haro, M.M., Corrêa, A.S., Ribon, A.O.B., Oliveira, L.O., Guedes, R.N.C, Pleiotropic Impact of Endosymbiont Load and Co-Occurrence in the Maize Weevil *Sitophilus zeamais*. *PLoS ONE*, v.09, i.10, 2014.
- Cordaux, R., Michel-Salzat A., Bouchon D. *Wolbachia* infection in crustaceans: novel hosts and potencial routes for horizontal transmission. *Journal of Evolutionary Biology*, v.14, p.237-243.
- Corrêa, A.S., Oliveira, L.O. de, Braga, L.S., Guedes, R.N.C. Distribution of the related weevil species *Sitophilus oryzae* and *S. zeamais* in Brazil. *Insect Science*, v. 20m p.763-770.
- Csiki, E. *Sitophilus* spp. *Coleoperum Catalogus*, Pars 149. Curculionidae: Rhynchophorinae, Cassoniae, p. 71-76, 1936.
- Delobel, B.; Grenier A. M. Effect of non-cereal food on cereal weevils and tamarindo pod weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Stored Products Research*, v.29, p.7-14, 1993.
- Dey S.K. B-chromosomes in two species of Indian weevils (Coleoptera: Curculionidae). *Cytobios*, v.57, p.15-18, 1989.
- Dobie P.; Jilminster A. M. The susceptibility of triticale to post-harvest infestation by *Sitophilus zeamais* Motschulsky, *Sitophilus oryzae* (L.) and *Sitophilus granaries* (L.). *Journal of Stored Products Research*, v.14, p.87-93, 1978.

- Ennis T.J. Low chromosome number and post reductional XO in *Gelus californicus* (Lec.) (Coleoptera: Curculionidae). Canadian Journal Genetics and Cytology, v.14, p.851-857, 1972.
- Goll L.G. Análise Citogenética em *Lagria villosa* (Coleoptera, Tenebrionidae): Ênfase na Evolução Cromossômica. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa, p.13-16, 2012.
- Goodacre, S. L., Martin, C. F., Thomas, C. F., Hewitt, G. M. *Wolbachia* and other endosymbiont infections in spiders. Molecular Ecology, v. 15, p. 517-527, 2006.
- Gotoh, T., Noda, H., Hong, X. Y. *Wolbachia* distribution and cytoplasmic incompatibility based on a survey of 42 spider mite species (Acari: Tetranychidae) in Japan. Heredity, v. 91, p. 208-216, 2003.
- Grenier A.M., Pintureau B. & Nardon P. Enzymatic variability in three species of *Sitophilus* (Coleoptera: Curculionidae). Journal of Stored Products Research, v.30, p. 201–213, 1994.
- Hidayat, P.; Phillips, T.W.; French-Constant, R.H. Molecular and morphological characters discriminate *Sitophilus oryzae* and *S. zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) and confirm reproductive isolation. Annals of the Entomological Society of America, v.89, p. 645–652, 1996.
- Jeyaprakash, A., Hoy, M. A. Long OCR improves *Wolbachia* DNA amplification: *wsp* sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. Insect Molecular Biology, v. 9, p. 393-405, 2000.
- Holecová M.; Rozek M.; Lachowska D. Evidence of B-chromosomes in karyotype of *Barypeithes pellucidus* Boheman 1834 (Coleoptera, Curculionidae, Entiminae), from Central Europe. Folia Biologica (Kraków), v.53, p.65-68, 2005.
- Holecová M.; Maryanska-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 a

- protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, v.36, p.1014-1015, 1980.
- Holecová M.; Maryanska-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 a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, v.36, p.1014-1015, 1980.
- Imai, H. T.; Taylor, R.W.; Crosland, M.W. J. and Crozier, R.H. Modes of spontaneous evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis. *Japanese Journal of Genetics*, v.63, p.159-185, 1988.
- Imai, H.T. Mutability of constitutive heterochromatin (C-bands) during eukaryotic chromosomal evolution and their cytological meaning. *Japanese Journal of Genetics*, v.66, p.635-661, 1991.
- Khan N.R.; Musgrave A.J. Observations on the functional anatomy of the reproductive organs of *Sitophilus* (Coleoptera: Curculionidae). *Canadian Journal of Zoology*, v.47(4), p.665-669, 1968.
- Lachowska D.; Holecová M.; Rozek M. Karyotypic data on weevils (Coleoptera, Curculionidae). *Folia biologica (Kraków)* v.46, p.129-136, 2006.
- Lachowska D.; Rozek M.; Holecová M. Karyotypic characterization of three weevil species (Coleoptera: Curculionidae, Brachyderini)\*, *Folia biologica (Kraków)*, v.54, 2006.
- Lachowska D.; Rozek M.; Holecová 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.; Holecová M.; Rozek M. Cytotaxonomy and karyology of the tribe *Otiorhynchini* (Coleoptera: Curculionidae). *Europe Journal Entomology*, v.105, p.175-184, 2008.

- Levan, A.; Fredga K.; Sonberg A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, v.52, p.201-202, 1964.
- Levinson, H. & Levinson, A. Origin of grain stored insect species consuming desiccated food. *Anz. Schiidlingskde., Pflanzenschutz, Umweltschutz*, v. 67, p.47-59, 1994.
- Longstaff, B.C., 1981. Biology of the grain pest species of the genus *Sitophilus* (Coleoptera: Curculionidae): a critical review. *Prot. Ecol.* 2, 83–130.
- Marshall G. A. K. Calandra revision of Indian species. *Bulletin of Entomological Research*, v31, p.123-125, 1940.
- McLaurin J.R.B.F. and Downe A.E.R. Serological comparison of three species of grain infesting weevils (Curculionidae: *Sitophilus*). *Journal of the Kansas Entomological Society*, v.39, p. 500–505. 1966.
- Mendes-Neto E.O, Vicari M.R., Campener C., Noga-Roto V., Artoni R.F., Almeida M.C. 2010. Cytogenetic analysis of *Astylus antis* (Perty, 1830) (Coleoptera, Melyridae): karyotype, heterochromatin and location of ribosomal genes. *Gen. Mol. Biol.* **33**: 237-243.
- Moraes M.M.; Milléo J.; Artoni R.F.; Almeida M.C. Análise citogenética de duas espécies do gênero *Sitophilus* (Curculionidae): Cariótipo e meiose. In: 49º Congresso Brasileiro de Genética, 2003.
- 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.
- Nelson D.R., Fatland C.L. & Baker J.E. Mass spectral analysis of epicuticular nalkadienes in three *Sitophilus* weevils. *Insects Biochemistry*, v.14, p.435–444, 1984.
- Nikoh N., Tanaka K., Shibata F., et al. *Wolbachia* genome integrated in an insect chromosome: Evolution and fate of laterally transferred endosymbiont genes. *Genome Research*, v.18, p. 272-280, 2008.
- Oberprieler R.G; Marvaldi A.E.; Anderson R.S. Weevils, weevils, weevils everywhere. *Zootaxa*, v.1668, p. 491-514, 2007.

- O'Meara B. Bacterial Symbiosis and Plant Host Use Evolution in Dryophthorinae (Coleoptera, Curculionidae). A Phylogenetic Study Using Parsimony and Bayesian Analysis. Bachelor thesis. Department of Biology. Harvard University, 69 p., 2001.
- Peng, W. K., Lin, H. C., Cien, C. N., Wang, C. H. DNA identification of two laboratory colonies of the weevils *Sitophilus oryzae* (L.) and *S. zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) in Taiwan. *Journal of Stored Products Research*, v. 39, p. 225-235, 2002.
- Petitpierre E. The value of cytogenetics for the taxonomy and evolution of leaf beetles (Coleoptera, Chrysomelidae). *Miscellanea Zoologica*, v.20, p. 9-18, 1997.
- Plarre, R. An attempt to reconstruct the natural and cultural history of the granary weevil, *Sitophilus granaries* (Coleoptera: Curculionidae). *European Journal of Entomology*. v.107, p.1-11, 2010.
- Rożek M.; Lachowska D.; Petitpierre E.; Holecová 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.
- Rożek M.; Lachowska D.; Petitpierre E.; Holecová 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. Rowley, S. M., Raven, R. J., McGraw, E. A. Evidence for a global *Wolbachia* replacement in *Drosophila melanogaster*. *Current Biology*, v.15, p. 1428-1433, 2005.
- 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.
- Schwartz B. E.; Burkholder W. E. Development of the granary weevil (Coleoptera: Curculionidae) on barley, corn, oats, rice, and wheat. *Journal of Economic Entomology* v.84, p.1047-1052, 1991.

- Schweizer, D. Simultaneous fluorescent staining of R bands in a specific heterochromatin regions (DA/DAPI - bands) in human chromosomes. *Cytogenetics and Cell Genetics*, v.27, p.190-193, 1980.
- Sharma G. P.; Gill T. K.; Pal V. Chromosomes in curculionid beetles (Coleoptera, Curculionidae). *Coleoptera Bulletin*, v.34, p.361-367, 1980
- Silva, A. A.; Braga L.S.; Guedes, R.N.C.; Tavares, M.G. Cytogenetic analyses using C-banding and DAPI/CMA3 staining of four populations of the maize weevil *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1855 (Coleoptera, Curculionidae). *Comparative Cytogenetics*, v.9, p.89-102, 2015.
- Smith S.G.; Brower J.H. Chromosome numbers of stored-product Coleoptera. *Journal Kansas Entomological Society*, v.47, p.317-319, 1974.
- Smith S. G.; Virkki N. *Animal Cytogenetics*. 3. Insecta. 5. Coleoptera. Gebrüder Borntraeger, Berlin, Stuttgart. 1978.
- Sumner A. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*, v.75, p.304-306, 1972.
- Virkki N. Chromosomes in evolution of Coleoptera. In: Sharma A.K.; Sharma A. (eds.) *Chromosomes in Evolution of Eukaryotic Groups*. CRC Press, Boca Raton - Florida, p.71-76, 1984.
- Vitturi R., Colomba M.S., Barbieri R., Zunino M., Ribosomal DNA location in the scarab beetle *Thorectes in intermedius* (Costa) (Coleoptera, Geotrupidae) using banding and fluorescent *in-situ* hybridization. *Chromosome Research*, vol. 07, pág. 255-260.