



FORMULÁRIO PARA RELATÓRIO FINAL

1. Identificação do Projeto

Título do Projeto PIBIC/PAIC

Levantamento e análise citogenética de espécies de Alticinae (Chrysomelidae, Coleoptera) da Reserva Adolpho Ducke.

Orientador

Juliana de Souza Araújo

Aluno

Maria Phamela Barbosa Coelho

2. Informações de Acesso ao Documento

2.1 Este documento é confidencial?

SIM

NÃO

2.2 Este trabalho ocasionará registro de patente?

SIM

NÃO

2.3 Este trabalho pode ser liberado para reprodução?

SIM

NÃO

**2.4 Em caso de liberação parcial, quais dados podem ser liberados?
Especifique.**

3. Introdução

Os besouros (Coleoptera) são o grupo mais rico e mais abundante representados por mais de 350.000 espécies (COSTA, 2003). Contribuem com 35% do total de insetos conhecidos (CASARI E IDE, 2012). Os coleópteros podem ser encontrados nos mais variados ambientes, terrestres, aquáticos, dentro de troncos, no solo e até espécies exclusivas para o dossel da floresta (GILLOT, 2005; RAFAEL, 2012). Os besouros possuem metamorfose completa (holometábolos) e



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

RELATÓRIO FINAL PIBIC/PAIC 2015-2016



UFAM

são característicos por possuírem o primeiro par de asas rígidas, conhecidas como élitro e o segundo par formado por asas membranosas possibilitando o voo desses animais (RAFAEL, 2012). Os élitros não são utilizados durante o voo, entretanto, essa estrutura protege contra choques mecânicos e auxiliam na manutenção da umidade, evitando a dissecação dos besouros (GRIMALDI E ENGEL, 2006).

Dentre as 112 famílias descritas para Coleoptera, Chrysomelidae está entre as maiores em número de espécie, agrupando em torno de 40.000 espécies (COSTA, 2003). Esses indivíduos são frequentemente coloridos e brilhantes na forma adulta, e se alimentam de folhagens e flores, sendo denominados besouros das folhas. Um grupo que se destaca é Alticini, com ampla distribuição, e sua alta diversidade, conta com mais de 8.000 espécies (SCHERER, 1988). Sua elevada abundância e riqueza em áreas de bordas e áreas alteradas tornam as espécies dessa subfamília importantes indicadores ambientais (LINZMEIER *et al.* 2006).

No século XIX, as observações das características morfológicas das espécies foi o ponto de partida para que os organismos começassem a ser classificados de acordo com a sua genealogia. A partir disso, os questionamentos acerca da transmissão de características fenotípicas e hereditariedade foram crescendo ainda mais. Eventos como esses foram cruciais para que surgisse um novo ramo dentro da ciência, a citogenética (FERGUSON-SMITH, 2015). Impulsionado pela melhoria na resolução das análises cromossômicas, o estudo com marcadores citogenéticos aumentou nas últimas décadas. A introdução de novas tecnologias permite análises mais refinadas a partir das técnicas usadas na área e provê dados de grande relevância como em estudos de citogenética comparada ou aberrações cromossômicas (FERGUSON-SMITH, 2015).

A análise cromossômica é uma ferramenta, que nos permite encontrar muitas informações como, as regiões de heterocromatina constitutiva são regiões cromossômicas envolvidas no controle da expressão gênica, estrutura e segregação cromossômica (GREWAL E MOAZED, 2003; WATSON *et al.* 2015). Uma das técnicas que são usadas na citogenética é a Técnica de Bandeamento C que permite localizar essas regiões. Conseguem-se visualizar essas regiões devido ao tratamento ácido-base que promove uma degradação diferencial do DNA, porém, tendo uma degradação de menor intensidade nas regiões de



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

RELATÓRIO FINAL PIBIC/PAIC 2015-2016



UFAM

heterocromatina, que são as mais condensadas por causa das proteínas associadas à essa região.

Os dados citogenéticos da ordem Coleoptera contam com um amplo intervalo do número cromossômico e sistemas de cromossomos sexuais muito variáveis. Neste aspecto, os besouros oferecem uma ampla gama de perspectivas de citogenética evolutiva e citotaxonomia. Porém as revisões realizadas até o momento demonstram que o grupo é limitado quanto ao número de espécies estudadas cromossomicamente (PETITPIERRE 1996; SMITH E VIRKKI, 1978).

Os besouros possuem um intervalo de número cromossômico, de $2n=4$ em *Chalcolepidius zonatus* (FERREIRA *et al.*, 1984) a $2n=64$ em *Ditomus capito* (SERRANO, 1981). O número diploide considerado ancestral de Coleoptera é de $2n=20$, com cromossomos sexuais diferenciados e fórmula cromossômica de $2n=20=9II+Xyp$, no qual Xy é referente ao sistema cromossômico de determinação sexual heterogamético e o “p” é referente a forma desse par na meiose, que se assemelha a um paraquedas (SMITH 1950; SMITH E VIRKKI, 1978). Esse sistema de determinação sexual é o mais frequente e também considerado ancestral (SMITH E VIRKKI, 1978).

Em citogenética é comum analisar eventos, como fusão, fissão, inversão e translocação, que causam variação quanto ao número e estrutura dos cromossomos sem que haja aumento ou diminuição na quantidade de DNA. Essas mutações podem ser vantajosas, desvantajosas ou neutras. As mutações desvantajosas são eliminadas e conseqüentemente não possui um significado evolutivo, quando as mutações são vantajosas ou neutras, elas são transmitidas aos descendentes daquela população, o que contribui para a variação cariotípica natural daquela espécie (GUERRA, 1988).

Nos Coleoptera os eventos de diferenciação cariotípica mais comuns são as fissões cêntricas seguidas de inversões pericêntricas, que se dá por meio da quebra cromossômica na altura do centrômero, o que justifica o aumento do número de cromossomos metacêntricos em relação a fórmula basal (SMITH E VIRKKI, 1987; VIRKKI, 1984).

Sob ponto de vista citogenético somente 290 espécies Alticini foram estudadas (SMITH E VIRKKI, 1978; PETITPIERRE *et al.*, 1988; ALMEIDA, 2010), sendo os gêneros da subtribo Oedionychina os mais estudados.



A tribo Alticini possui uma grande diversidade de sistemas cromossômicos (SMITH E VIRKKI, 1978; VIRKKI *et al.*, 1991; VIRKKI E SANTIAGO-BLAY, 1998; ALMEIDA *et al.*, 2009). Até o presente momento os estudos em Alticini indicam algumas características cariotípicas que diferem da maioria das espécies de Coleoptera, como a variação quanto ao número de cromossomos, e o tamanho dos cromossomos sexuais, que são considerados gigantes e com comportamento atípico durante a meiose (ALMEIDA, 2010).

A subtribo Oedionychina (Chrysomelidae, Alticini) possui características particulares, como cromossomos sexuais extremamente grandes, assínapse e segregação meiótica pós-reducional (SMITH E VIRKKI, 1978; ALMEIDA *et al.*, 2009). No qual o número cromossômico predominante é $2n= 22$, $2n= 20 + XY$ (SMITH E VIRKKI, 1978; PETITPIERRE *et al.*, 1988, 1989; SEGARRA E PETITPIERRE, 1989). No gênero *Paranaita*, sendo uma das espécies estudadas *P. opima*, o número diploide predominante foi $2n= 22$, XY (ALMEIDA *et al.*, 2006). Em algumas espécies do gênero *Omophoita* (*O. magniguttis*, *O. octoguttata*, *O. personata* e *O. sexnotata*), o número diploide foi $2n= 22$, XY, o que também é o esperado para Oedionychina, sendo o bivalente sexual extremamente grande e assínaptico (ALMEIDA *et al.*, 2009). Nesse gênero foi observado que esses cromossomos sexuais possuem uma grande quantidade de DNA repetitivo (MELLO *et al.*, 2014).

Dessa forma, os estudos citogenéticos em Alticini podem se tornar uma ferramenta na obtenção de evidências para compreender processos evolutivos que ocorreram com as espécies ao longo do tempo, através dos cromossomos sexuais gigantes que são considerados um ótimo modelo comparativo entre as espécies.

4. Justificativa

A ordem Coleoptera oferece uma ampla gama de perspectivas de estudos evolutivos e apesar do grande número de espécies, os estudos citogenéticos são escassos, representando cerca de 1% do total de espécies descritas (PETITPIERRE, 1996). Até o presente momento os estudos em Alticinae indicam algumas características cariotípicas que diferem da maioria das espécies de Coleoptera, como a variação quanto ao número de cromossomos, e o tamanho dos



cromossomos sexuais, que são considerados gigantes e com comportamento atípico durante a meiose (ALMEIDA, 2010).

Dessa forma os estudos citogenéticos em Alticinae podem, além de contribuir para a elucidação taxonômica, se tornar uma ferramenta na obtenção de evidências para compreensão dos processos evolutivos que ocorreram com as espécies ao longo do tempo.

5. Objetivos

Estudar citogeneticamente espécies da Tribo Alticini que foram coletadas na Reserva Florestal Adolpho Ducke.

6. Metodologia

Coletas

As coletas foram realizadas na Reserva Florestal Adolpho Ducke, que possui uma área de 10.000 ha de floresta primária, caracterizada como terra-firme e está localizada na rodovia AM 010, km 26, na cidade de Manaus, Amazonas, Brasil (3° 05' S, 60° 00' W). A reserva já é considerada um fragmento florestal urbano por se situar na periferia de Manaus, mas não está completamente isolada da floresta contínua (Ribeiro *et al.*, 1999). É totalmente demarcada e cercada na borda adjacente à área urbana, e por isso sofre pequenos impactos antrópicos.

As coletas dos besouros ocorreram no período de agosto a dezembro de 2015, através de coleta ativa, na área de borda da vegetação com o auxílio de rede entomológica, com autorização de coleta e transporte do ICMBio, número 45611-1.

Obtenção de material

Os besouros foram levados para o Laboratório de Citogenômica Animal (LACA) da Universidade Federal do Amazonas, onde foram acondicionados e mantidos até a execução da respectiva técnica. Os animais foram anestesiados em um frasco contendo um algodão com éter, e então dissecados em solução fisiológica para insetos. O material para o estudo dos cromossomos foi obtido a partir das gônadas de machos adultos, que foi retirada e colocada em um recipiente pequeno contendo uma solução hipotônica (água de torneira) e permaneceram lá



UFAM

por 10 minutos. Em seguida, ficaram mais 30 minutos no Fixador Carnoy I (metanol e ácido acético, na proporção 3:1). Por fim, foram armazenados em um eppendorf com Fixador Carnoy I. Após a obtenção das gônadas, alguns besouros foram alfinetados e mandados para a identificação, na Universidade de São Paulo (USP) pelo especialista Carlos Campaner.

Para a obtenção das lâminas, o testículo foi macerado sobre a lâmina, juntamente com uma gota de ácido acético 45% (para 10 ml – 4,5 de ácido acético + 6,5 de água destilada). A lamina é então colocada para secar em uma placa de metal à temperatura de 35 a 40°C.

A lâmina foi corada em temperatura ambiente durante 12 minutos, em corante Giemsa (47 ml de água destilada, 1,5 ml de solução comercial de Giemsa e 1,5 ml de tampão fosfato pH 6.8), em seguida, foi lavada com água destilada e seca ao ar.

Para a montagem dos cariótipos e fases meióticas, as lâminas foram analisadas e fotografadas no microscópio óptico Zeiss, modelo Lab.A1, câmera AxioCam ERc 5s, em um aumento de 100x. A edição das imagens foi feita no programa Adobe Photoshop CS4, e os cromossomos foram dispostos em ordem decrescente e aos pares (LEVAN, 1964).

Técnica de Bandeamento C

A técnica foi de acordo com SUMNER (1972), com algumas modificações. Foram separadas algumas lâminas das quais já tinham sido coradas com Giemsa e fotografadas. As lâminas foram lavadas em uma solução de ácido clorídrico (0.2N), à temperatura ambiente; tratadas com uma solução de hidróxido de bário octahidratado a 5%, durante 40 segundos, à temperatura de 30°C; lavadas novamente com a solução de ácido clorídrico, porém, dessa vez, até as placas de bário se soltarem da lâmina, em seguida foram lavadas em água destilada e secadas ao ar. Em sequência, a lamina foi lavada em tampão 2XSSC (pH 7.3), à temperatura ambiente, e logo após foi incubada por 30 minutos, à uma temperatura de 60°C, novamente no tampão 2XSSC (pH 7.3). Após esse tempo, as lâminas foram lavadas várias vezes com água destilada e coradas novamente com Giemsa e então ficaram prontas para serem observadas no microscópio ótico.

7. Resultados e Discussão

Das espécies coletadas, até o momento, foi possível realizar as análises citogenéticas em três, *Omophoita abbreviata*, *Walterianella* sp. e *Omophoita aequinoctialis* (Figura 1). Sendo analisadas 30 machos de *O. abbreviata* 23 machos de *Walterianella* sp. e 33 machos de *O. aequinoctialis*. A partir da análise de fases meióticas e confecção dos cariótipos dessas espécies, foi possível obter o número diploide, a morfologia cromossômica, sistema de determinação sexual e a meiose.

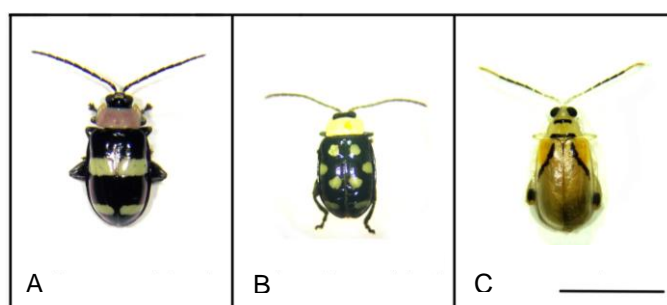


Figura 1. Coleópteros coletados da subtribo Oedionychina (Alticini). **A.** *Omophoita abbreviata* (F., 1798). **B.** *Omophoita aequinoctialis* (L., 1758). **C.** *Walterianella* sp. Escala de 0,5 cm.

O cariótipo obtido para *Omophoita abbreviata* foi $2n = 22 = 20+X+Y$ (Figura 2A), *Walterianella* sp. $2n = 22 = 20+X+Y$ (Figura 2B) e para *Omophoita aequinoctialis* foi observado dois citótipos $2n = 22 = 20+X+Y$ e $2n = 24 = 22+X+Y$ (Figura 2C e 2D). O número diplóide das espécies diferem da fórmula proposta como basal ($2n = 20 = 9II + Xyp$) para Coleoptera (SMITH E VIRKKI, 1978; FERREIRA *et al.* 1984 e SERRANO, 1981), mas está concordante com o cariótipo esperado para Alticini ($20+X+Y$) (SMITH E VIRKKI, 1978; PETITPIERRE *et al.*, 1988, 1989; SEGARRA E PETITPIERRE, 1989). Em *O. aequinoctialis*, que possui dois citótipos, foi observado um aumento do número cromossômico para um destes, que pode ser explicado por um evento de fissão.

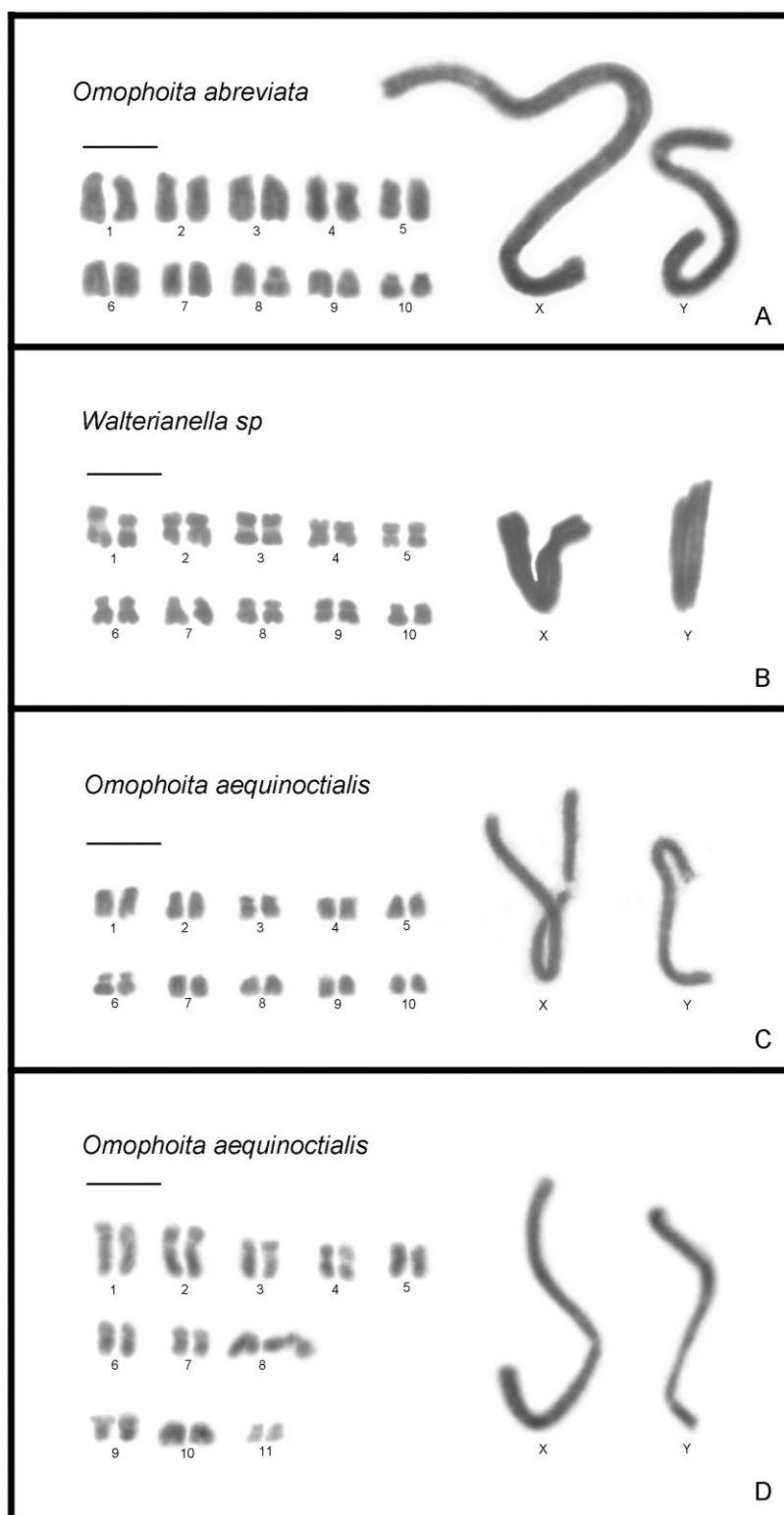


Figura 2. Cariótipos das espécies **A.** *O. abbreviata* com $2n = 22 = 20 + X + Y$, **B.** *Walterianella* sp. com $2n = 22 = 20 + X + Y$, *O. aequinoctialis* com **C.** $2n = 22 = 20 + X + Y$ e **D.** $2n = 24 = 22 + X + Y$.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

RELATÓRIO FINAL PIBIC/PAIC 2015-2016



A morfologia dos cromossomos autossômicos variou, sendo predominantemente metacêntrica para *O. abbreviata*, submetacêntrica para *Walterianella* sp. e *O. aequinoctialis*. Segundo Smith e Virkki (1978), a condição metacêntrica é considerada basal para Coleoptera, o que sugere ter acontecido rearranjos, mudando a condição metacêntrica para submetacêntrica. Quanto aos cromossomos sexuais *O. abbreviata* possui morfologia submetacêntrica para o X e Y, em *Walterianella* sp. o X é metacêntrico e o Y é submetacêntrico com uma constrição secundária no braço longo. Em *O. aequinoctialis* $2n=22$, o cromossomo X possui uma morfologia metacêntrica, e o Y acrocêntrica. Em *O. aequinoctialis* $2n=24$, o cromossomo sexual X possui uma morfologia metacêntrica com uma pequena constrição no braço longo, e o Y submetacêntrica. A presença de cromossomos acrocêntricos pode ter ocorrido por rearranjos na região pericentromérica (ALMEIDA *et al.*, 2009).

Os cromossomos sexuais das espécies do presente estudo são denominados como gigantes, o que difere dos coleópteros em geral que possuem sistema cromossômico sexual Xyp, mas concorda com os resultados obtidos até agora para subtribo Oedionychina (SMITH 1950; SMITH E VIRKKI, 1978, ALMEIDA *et al.*, 2009). O sistema cromossômico de determinação sexual Xyp é caracterizado por possuir um cromossomo X metacêntrico com tamanho similar aos cromossomos autossômicos e um cromossomo y muito pequeno e de difícil identificação da morfologia, por vezes denominado de puntiforme (SMITH E VIRKKI, 1978). ALMEIDA *et al.* (2009) sugerem que o sistema X + Y da subtribo Oedionychina é o resultado de uma diferenciação gradual do sistema Xyp com possíveis alterações cromossômicas como a perda do cromossomo y, alteração na quantidade de heterocromatina constitutiva, translocações autossômicas para os cromossomos sexuais e inversões pericêntricas.

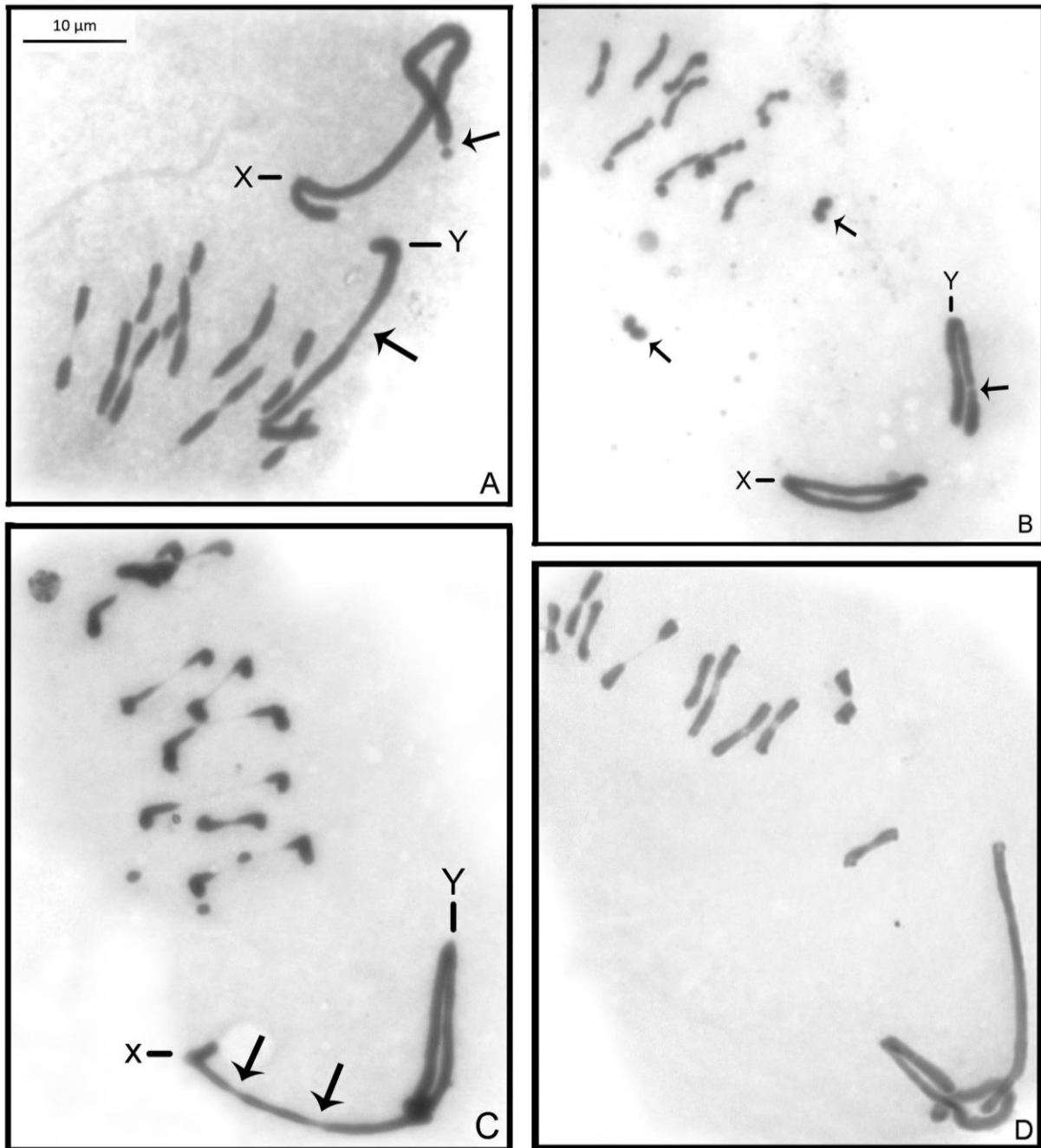


Figura 3. Metáfase I da meiose das espécies **A.** *O. abbreviata*, com fórmula meiótica de $2n=10II+XY$. A seta do cromossomo X mostra a constrição na região terminal do braço longo, e a seta do cromossomo Y, mostra a região heteropicnótica negativa no braço longo; **B.** *Walterianella* sp., com fórmula meiótica $2n=10II+X+Y$. A seta do cromossomo Y evidencia a constrição secundária no braço longo; **C.** *O. aequinoctialis*, fórmula meiótica $2n=11III+XY$. As setas indicam duas constrições no cromossomo X e **D.** fórmula meiótica $2n=10II+X+Y$.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

RELATÓRIO FINAL PIBIC/PAIC 2015-2016



A análise de células meióticas I evidenciou a fórmula cariotípica $2n=11II+XY$ para *O. abbreviata*, $2n=10II+XY$ para *Walterianella* sp. e $2n=10II+X+Y/11II+X+Y$ para *O. aequinoctialis*. A partir da análise das células meióticas I e II de *O. abbreviata*, *Walterianella* sp. e *O. aequinoctialis* foi possível observar que os cromossomos sexuais possuem um comportamento assináptico, orientação sintélica na placa equatorial, com exceção de *Walterianella* sp. que possui orientação anfitélica, e em todas as espécies a segregação cromossômica ocorre corretamente. Segundo Almeida *et al.* (2009) o sistema cromossômico sexual X+Y gigante e assináptico representa uma condição derivada, podendo ser uma característica exclusiva e compartilhada pelos gêneros da subtribo Oedionychina.

O estudo de células meióticas e mitóticas submetidas à técnica sequencial Giemsa/Banda C mostrou a presença de um bloco heterocromático nas regiões centroméricas de 5 bivalentes autossômicos de *O. abbreviata* (Figura 4A). Para *O. aequinoctialis* e *Walterianella* sp. todos os bivalentes autossômicos apresentaram marcações na região centromérica. (Figura 4 B,C,D). Em relação aos cromossomos sexuais foi possível observar pequenas marcações na região centromérica do cromossomo Y das espécies *O. abbreviata* e *O. aequinoctialis* além de marcações adicionais no braço longo do cromossomo Y de *O. aequinoctialis*. Em *Walterianella* sp. foi possível observar uma marcação na região pericentromérica do cromossomo X e Y além de 5 marcações adicionais no braço longo do cromossomo y. Esses resultados são concordantes com os dados na literatura para Coleoptera, com heterocromatina constitutiva localizada preferencialmente na região centromérica de todos os cromossomos autossômicos, podendo ocorrer também nas regiões intersticiais e telomérica. Assim como para os cromossomos sexuais, podendo estar presente somente na região pericentromérica ou ao longo do comprimento cromossômico, com ocorrência variável (ALMEIDA, 2009; ZACARO E CELLA, 2000; ROZEK *et al.*, 2004). Mello (2014) concluiu, especificamente para gênero *Omophoita*, que os cromossomos sexuais gigantes e autossomos regiões de sequências repetitivas, além da heterocromatina dessas espécies serem compostas por essas sequências de DNA repetitivo, e que essas sequências estão diretamente relacionadas à heterocromatização e evolução desses cromossomos sexuais gigantes, bem como no processo de diferenciação dos cromossomos autossômicos.

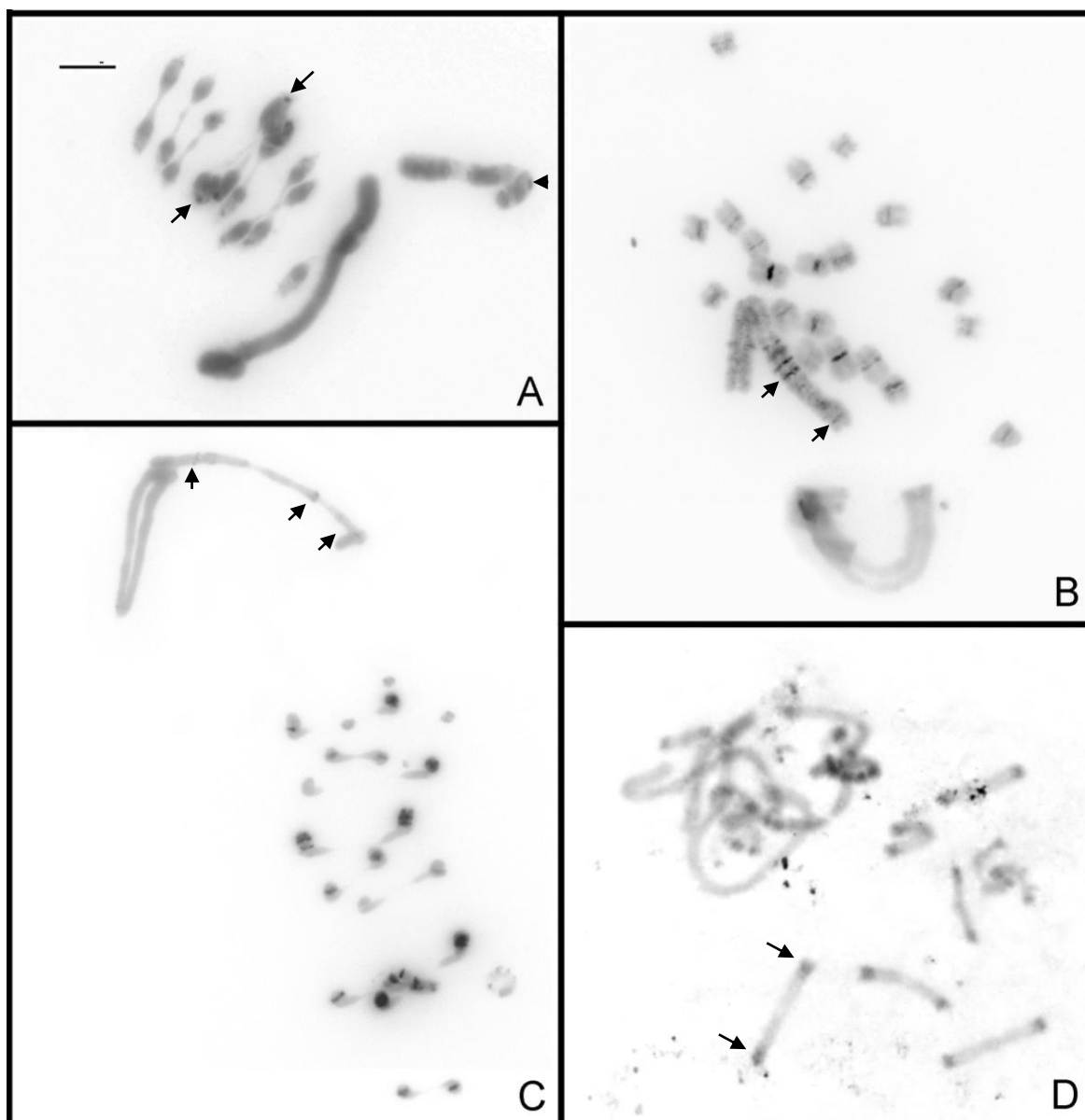


Figura 4. Banda C da metáfase I da meiose. (A) *O. abbreviata*, (B) *Walterianella* sp., (C) *O. aequinoctialis* $2n=24$, (D) *O. aequinoctialis* $2n=22$.

Diante dos resultados obtidos nessa pesquisa e da literatura, é possível sugerir mais estudos para elucidar a problemática acerca dos cromossomos em Alticini. Contribuindo também para Citotaxonomia de Alticini o qual necessita de uma revisão taxonômica (ALMEIDA, 2009; LINZMEIER *et al.* 2006), como por exemplo, *O. aequinoctialis* que precisa de mais estudos, devido os dois citótipos encontrados com diferenças significativas, que podem sugerir uma revisão



UFAM

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

RELATÓRIO FINAL PIBIC/PAIC 2015-2016



taxonômica do grupo. No mais, é necessária uma repetição nas análises de Banda C, FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) – DNAr 18S, 5S e Telômero, também um aumento dos marcadores nas espécies, sendo melhor aqueles que possibilitem mais estudos em relação aos sexuais FISH – DNAr 18S, 5S e Telômero.



8. Referências

- Almeida, M.C., Campaner, C., Cella, D.M., 2006. Karyotype characterization, constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions of *Paranaita opima* (Coleoptera, Chrysomelidae, Alticinae). *Genetics and Molecular Biology* 29 (3), 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.
- Almeida, M.C.; Goll, L.G.; Artoni, R.F.; Nogaroto, V.; Matiello, R.R.; Vicari, M.R. Physical mapping of 18S rDNA cistron in species of the *Omophoitagenus* (Coleoptera, Alticinae) using fluorescent in situ hybridization. *Micron*. v. 41 p. 729-34, 2010.
- Costa, C. Estado de conocimiento de los Coleoptera neotropicales. *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa (Versión Eletronica)*32. 2003. Disponível em: <<http://www.sea-entomologia.org/aracnet/11/01/index.htm> > acessado em: jan. 2016.
- Ferguson-Smith, M. A. History and evolution of cytogenetics, 2015.
- Ferreira, A.; Cella, D. Tardivo, J.R.; Virkki, N. Two pairs of chromosomes: A new low record for Coleoptera. *Revista Brasileira de Genética*, v.7, p.231-39, 1984.
- Grewal, S. I. S.; Moazed, D. (2003) Heterochromatin and Epigenetic Control of Gene Expression. *Science*.
- Guerra, M. S. Introdução à citogenética geral. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1988.
- Gillot, C. *Entomology*, Dordrecht: Springer. 831p. 2005.
- Grimaldi, D.; Engel, M. S. *Evolution of the Insects*. New York: Cambridge University Press, 755 p, 2006.
- Mello, L. R. A.; Tasiar, 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), *Italian Journal of Zoology*, 81:1, 16-24, DOI: 10.1080/11250003.2014.882995
- Petitpierre, E. (1996) Molecular cytogenetics and taxonomy of insects, with particular referencae to the Coleoptera. *Int J Insect Morphol Embryol* 25:115-134.
- Linzmeier, A. M.; Ribeiro-Costa, C. S.; Marinoni, R. C. 2006. Fauna de Alticipini (Newman) (Coleoptera, Chrysomelidae, Galerucinae) em diferentes estágios sucessionais na Floresta com Araucária do Paraná, Brasil: diversidade e estimativa de riqueza de espécies. *Revista Brasileira de Entomologia* 50: 101-109.
- Petitpierre, E., Segarra, C., Yadav, J.S., Virkki, N., 1988. Chromosome numbers and meioformulae of Chrysomelidae. In: Jolivet, E., Petitpierre, E., Hsiao, T.H. (Eds.), *Biology of Chrysomelidae*. Kluwer Academic Publishers, pp. 161–186.
- Rafael, J.A.; Melo, G.A.R.; Carvalho, C.J.B.; Casari, S.A. 2012. *Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia*. Editora Holos. 810 p.
- Ribeiro, J. E. L. S.; Hopkins, M. J. G.; Vicentini, A.; Sothers, C. A.; Costa, M. A. S.; Brito, J. M.; Souza, M. A. D.; Martins, L. H. P.; Lohmann, L. G.; Assunção, P. A. C. L.; Pereira, E. C.; Silva, C. F.; Mesquita, M. R.; Procópio, L. C. 1999. *Flora da Reserva Ducke: Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central*. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas. 816 pp.
- Scherer, G. 1988. The origins of the Alticinae. In: Jolivet, P.; Petitpierre, E.; Hsiao, T. *Biology of Chrysomelidae*. Kluwer Academic Publ, Dordrecht.
- Segarra, C., Petitpierre, E., 1989. Cytogenetic diversity of the European *Psylliodes* flea-beetles (Coleoptera, Chrysomelidae). *Hereditas* 110, 169–174.
- Serrano, J. Chromosome numbers and karyotype evolution of Caraboidea. *Genetica*, v.55, p.51-60, 1981.
- Smith, S.G. The cyto-taxonomy of Coleoptera. *The Canadian Entomologist*, v.82, p.58-68, 1950.
- Smith, S.G., Virkki, N., 1978. Coleoptera. In: John, B. (Ed.), *Animal Cytogenetic*. Gebrüder Borntraeger, Berlin, Stuttgart, 366pp.
- Virkki, N., Mazzella, C., Denton, A., 1991. Silver staining of the coleopteran Xyp sex bivalent. *Cytobios* 67, 45–63.
- Virkki, N., Santiago-Blay, J.A., 1993. Trends of karyotype evolution in Neotropical *Oedionychina* (Coleoptera: Chrysomelidae: Alticinae). *Hereditas* 119, 263–283.

