

Universidade Federal de São Carlos – UFSCar
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

Danilo Trabuco do Amaral

“Evolução molecular das luciferases das lanternas da fase adulta e larval de elaterídeos luminescentes e filogenia molecular de Elateroidea”

São Carlos - SP

2014

“Evolução molecular das luciferasas das lanternas da fase adulta e larval de elaterídeos luminescentes e filogenia molecular de Elateroidea”

Universidade Federal de São Carlos – UFSCar

Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

Danilo Trabuco do Amaral

“Evolução molecular das luciferases das lanternas da fase adulta e larval de elaterídeos luminescentes e filogenia molecular de Elateroidea”

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas. Área de concentração: Bioquímica e Biologia Molecular

São Carlos - SP

2014

Universidade Federal de São Carlos – UFSCar

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

A485em Amaral, Danilo Trabuco do.
Evolução molecular das luciferases das lanternas da fase adulta e larval de elaterídeos luminescentes e filogenia molecular de Elateroidea / Danilo Trabuco do Amaral. -- São Carlos : UFSCar, 2014.
104 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2014.

1. Filogenia. 2. Bioluminescência. 3. Evolução. 4. Elateridae. 5. Ontogenia. I. Título.

CDD: 575.0012 (20ª)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR

Tese de Doutorado de
DANILO TRABUCO DO AMARAL

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Vadim Viviani



.....

Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Júnior



.....

Prof. Dr. Flavio Henrique Silva



.....

Prof. Dr. Maurício Bacci Júnior



.....

Profa. Dra. Márcia Regina Brochetto Braga



.....

Agradeço ao Prof. Dr. Vadim Viviani pela oportunidade de trabalhar em um laboratório de ponta na área de bioluminescência, pelo apoio tecnológico, intelectual, pela paciência e amizade.

Aos meus pais, Vera e Vornei, a minha irmã Natália e a minha avó Thereza, pela paciência, compreensão e carinho.

À minha namorada Isabel Bonatelli, que me auxiliou e me apoiou em todos os momentos, tendo paciência necessária nesses momentos para me suportar e me aclamar.

Aos meus amigos dos laboratórios, os que ficaram e os que se foram, pelos aprendizados, carinho e paciência.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - nro. processos 2010/02868-0 e 2013/00574-7) e ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), pelo auxílio financeiro.

À Universidade Federal de São Carlos por possibilitar a construção de meus conhecimentos.

À Universidade Federal de São Carlos – *Campus* Sorocaba, pela disponibilização de recursos técnicos e de espaço.

E a todos que tornaram possível a conclusão desse trabalho e minha graduação.

“Não existe nada de completamente errado no mundo, mesmo um relógio parado, consegue estar certo duas vezes por dia.”

(Paulo Coelho)

SUMÁRIO

	LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	8
	RESUMO	10
	ABSTRACT	11
1	Introdução	12
2	Revisão Bibliográfica	13
2.1	Bioluminescência dentro de Coleoptera	13
2.2	Evolução molecular e ontogenia em Elateroidea	16
2.3	Luciferases de Coleoptera	19
2.4	As luciferases de elaterídeos e suas cores	22
2.5	Filogenia de Elateroidea	23
2.6	Genomas mitocondriais de Elateroidea	24
3	Objetivos	26
3.1	Objetivos específicos	26
4	Material e Métodos	27
4.1	Soluções e equipamentos	27
4.2	Coleta de insetos e identificação	28
4.3	Técnicas de Biologia Molecular	28
4.3.1	Clonagem do cDNA de luciferases de Elateridae	28
4.3.1.1	Extração e quantificação de RNA total	29
4.3.1.2	Eletroforese em gel desnaturante de formaldeído	29
4.3.1.3	Isolamento do RNA mensageiro	30
4.3.1.4	Construção de bibliotecas de cDNA	30
4.3.1.5	Transformação	30
4.3.1.6	<i>Screening</i> funcional das bibliotecas	31
4.3.1.7	Preparação de DNA plasmidial	31
4.3.1.8	Clonagem por técnica de RT-PCR	31
4.3.1.9	Sequenciamento de DNA	32
4.3.1.10	Mutagênese sítio-dirigida	33
4.3.2	Técnicas de Filogenia molecular	33
4.3.3	Sequenciamento dos genomas mitocondriais	36
4.4	Análises de Bioinformática	37
4.4.1	Montagem dos genomas mitocondriais	38
4.5	Caracterização bioquímica das luciferases e seus mutantes	39
4.5.1	Expressão das luciferases recombinantes e mutantes	39
4.5.2	Medidas de bioluminescência <i>in vivo</i>	39
4.5.3	Extração das luciferases recombinantes e mutantes	40
4.5.4	Purificação de proteína por cromatografia de afinidade	40
4.5.5	Medida das atividades de luciferases	40
4.5.6	Espectros de bioluminescência	40
4.5.7	Quantificação de Proteínas Totais	41
4.5.8	Determinação dos K_M para ATP e Luciferina	41
5	Resultados	42

5.1	Clonagem e caracterização dos cDNAs das luciferases de Elateridae	42
5.1.1	<i>Fulgeochlizus bruchi</i>	42
5.1.2	<i>Pyrophorus angustus</i>	44
5.1.3	Comparação das Propriedades cinéticas das luciferases clonadas	46
5.1.4	Luciferases das lanternas dorsal e ventral de adultos de <i>Pyrearinus termitilluminans</i> e de outros elaterídeos	47
5.1.5	Alinhamento das estruturas primárias: inferências estruturais, funcionais e evolutivas	50
5.1.5.1	Comparação das isoenzimas de diferentes estágios de vida e lanternas de <i>P. termitelluminans</i>	50
5.1.6	Relação entre as luciferases de Elateridae	50
5.1.6.1	Relação entre estruturas primárias e espectros de bioluminescência em luciferases de elaterídeos	51
5.2	Efeito da mutação S247F na luciferase de <i>P. termitilluminans</i>	53
5.3	Filogenia Molecular de Elateroidea	54
5.3.1	Filogenia baseada nos genes mitocondrial NADH2, nuclear 28S e sequências primárias das luciferases	54
5.3.2	Análises filogenéticas a partir do genoma mitocondrial completo	61
5.3.3	Lampyridae	63
5.3.4	Phengodidae	64
5.3.5	Elateridae	64
5.4	Relações filogenéticas dentro do gênero <i>Pyrearinus</i>	65
5.5	Estrutura do Genoma mitocondrial em Elateroidea	66
6	Discussão	69
6.1	Origem evolutiva das luciferases das lanternas da fase adulta e larval de elaterídeos.	69
6.2	Comparação das luciferases das lanternas dorsais e ventrais de elaterídeos	71
6.3	Relação entre estrutura e espectros de bioluminescência nas luciferases de elaterídeos	72
6.4	Filogenia e evolução molecular de Elateroidea	74
6.5	Caracterização e organização dos genomas mitocondriais de Elateroidea bioluminescentes	80
6.6	Origem e evolução da bioluminescência em Elateroidea	82
7	Conclusões	84
8	Referências	86
	Anexos	96
	Tabelas com as organizações dos genomas mitocondriais	96
	Artigos em preparação, submetidos e aceitos	103
	Artigos publicados	104

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP: Trifosfato de Adenosina

BSA: Albumina de Soro Bovino

CCD: Dispositivo de carga acoplada (Charge-Coupled Device)

cDNA: DNA complementar

CHES: Ácido N-Ciclohexil-2-aminoetanosulfônico

CoA: Coenzima A

DEPC: Dietilpirocarbonato

dGR - luciferase verde dorsal

DTT: Ditioneitol

dYG - luciferase verde-amarelada dorsal

EDTA: Ácido etilondiamina tetracético

g: Gravidade

IPTG: Isopropil 2-D-tiogalactopiranosídeo

K_D: Constante de Decaimento

K_M: Constante de Michaelis-Menten

LB: Lúria Bertani (Meio de Cultura bacteriano)

LH₂: D-luciferina

mtDNA: DNA mitocondrial

OD: Densidade óptica

PcPy : Luciferase verde de *Pyrearinus termitilluminans*

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PK: Piruvato quinase

rpm: Rotações por minuto

RT-PCR: variação da técnica de PCR utilizando enzima transcriptase reversa

TAE: Tris-acetato-EDTA

TRIS: Tris-hidroximetilaminometano

tRNA: RNA transportador

UTR: região não codificante

vGR - luciferase verde ventral

vOR - luciferase ventral laranja

vYE - luciferase amarela ventral

vYG - luciferase verde-amarelada ventral

RESUMO

A origem e evolução da bioluminescência em Elateridae é incerta, especialmente a evolução das luciferases das diferentes fases e lanternas de elaterídeos, a relação entre estrutura e espectros de bioluminescência e a filogenia de espécies neotropicais. Neste trabalho os cDNA contendo os genes das luciferases de *Fulgeochlisus bruchi* e de *Pyrophorus angustus*, as quais possuem características cinéticas distintas, como elevado pH ótimo e alta afinidade com ATP e Luciferina, foram clonados. Comparando as luciferases de Elateridae sugerimos que, independentemente da fase de vida ou órgão (lanterna dorsal ou ventral), essas luciferases apresentam maior grau de identidade quanto mais próximos forem os espectros de bioluminescência, provavelmente, devido a efeitos de recombinação gênica. Os alinhamentos das sequências primárias das luciferases e de estudos de mutagênese sítio-dirigida sugerem possíveis resíduos importantes para a modulação de cor em Elateridae, como o resíduo S247. Nossas análises filogenéticas indicaram uma maior proximidade entre as famílias Elateridae e Phengodidae, porém existem divergências entre os marcadores utilizados. O sequenciamento dos genomas mitocondriais mostrou que os genomas dos Phengodidae possuem diversos rearranjos e duplicações gênicas, indicando a necessidade de mais estudos sobre essa família. Nossos dados também sugerem que a bioluminescência se originou pelo menos três vezes independentemente em Elateoridae, a partir de enzimas ancestrais similares.

ABSTRACT

The origin and evolution of Elateridae bioluminescence is uncertain, especially the evolution of the luciferases of different phases and lanterns of Elateridae, the relationship between structure and bioluminescence spectra and the phylogeny of neotropical species. In this study, the cDNA containing the genes of *Fulgeochlisus bruchi* and *Pyrophorus angustus* luciferases, which present different kinetic characteristics, such as high pH optimum and a high affinity for ATP and Luciferin, were cloned. Analyses of Elateridae luciferases suggest that, regardless of the stage of life or organ (dorsal or ventral lanterns), these luciferases displayed a higher identity degree to the luciferases that present closer bioluminescence spectra, probably, due to intergenetic recombination effects. The luciferase primary sequences alignments and site-directed mutagenesis studies suggested important residues to modulate color in Elateridae, such as S247. Our phylogenetic analyzes indicated a closer relationship between Elateridae and Phengodidae, however there are divergence between the markers used. The sequencing of mitochondrial genomes showed that the Phengodidae genomes displayed several rearrangements and gene duplication, indicating the need for further studies on this family. Our data also suggest that bioluminescence arised at least three times independently in Elateoridae from ancestors similar enzymes.

1. Introdução

A bioluminescência é um tipo específico de quimioluminescência biologicamente funcional, que resulta de reações oxidativas altamente exotérmicas catalisadas por enzimas comumente conhecidas como luciferases, nas quais a energia é liberada preferencialmente na forma de luz fria e visível com alta eficiência. Tal processo ocorre dentro de vários taxa, entre eles: bactérias, dinoflagelados, celenterados, anelídeos, moluscos, ctenóforos, crustáceos, insetos, equinodermos, urocordados e peixes (HASTINGS, 1983). Esta capacidade assume importantes papéis biológicos apresentando funções de iluminação, comunicação biológica intraespecífica (atração sexual, manutenção de cardumes, territorialidade, etc) e interespecífica (defesa, atração de presas, etc.) (HASTINGS; MORION, 1991).

As enzimas luciferases catalisam a reação de oxidação de compostos genericamente conhecidos por luciferinas (substratos), gerando intermediários peroxídicos que se clivam produzindo oxiluxiferinas no estado eletronicamente excitado, que sofrem decaimento emitindo luz visível (WILSON; HASTINGS, 1998). Embora os termos luciferina-luciferase sejam amplamente utilizados, eles não refletem a origem evolutiva destas enzimas e substratos. Estudos bioquímicos evidenciaram que tanto as enzimas, como os substratos, possuem sequências e estruturas químicas diferentes em diferentes táxons. Em alguns organismos, existem ainda proteínas acessórias no processo de emissão de luz, como as proteínas fluorescentes verdes ("green fluorescent proteins" ou GFPs). De fato, baseado na variedade de luciferinas e luciferases, foi proposto que existem pelo menos 30-50 sistemas bioluminescentes bioquimicamente distintos (HASTINGS, 1983; HADDOCK et al., 2010).

Dentro da classe Insecta, a bioluminescência é observada principalmente entre os coleópteros, colêmbolos e dípteros (HERRING, 1978; VIVIANI, 2002), entretanto a ordem Coleoptera é a mais rica em espécies luminescentes entre as três citadas. Dentro dessa ordem, a bioluminescência é encontrada principalmente dentro da superfamília Elateroidea, nas famílias Elateridae, Lampyridae e Phengodidae/Rhagophthalmidae (LAWRENCE; NEWTON, 1995). Esta famílias bioluminescentes apresentam o mesmo sistema bioquímico luciferina-luciferase, utilizando a mesma luciferina benzotiazólica, ATP, e luciferases homólogas as enzimas da superfamília das AMP-ligases, que compartilham de 44 a 99% de identidade entre si, dependendo da espécie e família. Apesar do mesmo sistema luciferina-luciferase, besouros bioluminescentes emitem diferentes cores de bioluminescência, do verde

ao vermelho, utilizando luciferases cuja estruturas primárias são responsáveis pelas diferentes cores (VIVIANI, 2002).

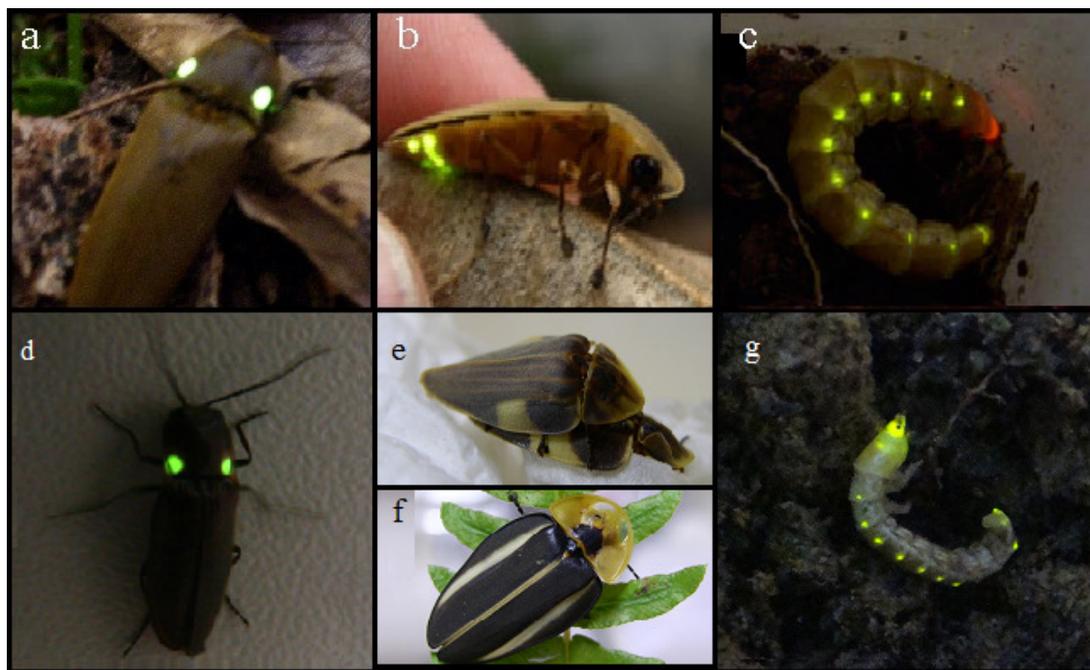
Até o momento, a evolução dos Elateroidea, assim como a origem e a base evolutiva da bioluminescência permanecem controversas. Análises moleculares e bioquímicas das luciferases e estudos filogenéticos dos grupos bioluminescentes permitirão sugerir os possíveis passos evolutivos que ocorreram e permitiram a diversificação de cores de bioluminescência.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Bioluminescência dentro de Coleoptera

A ordem Coleoptera é a mais rica em espécies luminescentes terrestres. Dentro dessa ordem, a bioluminescência é encontrada principalmente na superfamília Elateroidea, que inclui as três principais famílias luminescentes, Elateridae, Lampyridae e Phengodidae/Rhagophthalmidae (LAWRENCE; NEWTON., 1995) (Figura 1). Porém, a maioria das famílias dessa superfamília (Cantharidae, Lycidae, Eucnemidae, Throscidae, Telegeusidae, Omethidae, Omalisidae, entre outras) não apresentam bioluminescência registrada.

Figura 1 - Besouros bioluminescentes da superfamília Elateroidea: (a) *Pyrophorus divergens* (Elateridae) (b) *Cratomorphus concolor* (Lampyridae), (c) *Phrixothrix hirtus* (Phengodidae), (d) *Pyrophorus divergens* (Elateridae), (e) *Aspisoma lineatum* (Lampyridae), (f) *Cratomorphus distinctus* (Lampyridae) e (g) *Brasilocerus* sp2 (Phengodidae).



Fonte: AMARAL et al. (2014)

A família Lampyridae inclui mais de 1.800 espécies distribuídas em cerca de 80 gêneros (VIVIANI, 2001; LLOYD, 2002). Os lampirídeos emitem luz pela região ventral dos últimos segmentos abdominais, em geral por meio de lampejos, reconhecidamente para fins de atração sexual (LLOYD, 2002). Dentro da família é possível observar bioluminescência nas larvas de todas as espécies, entretanto algumas espécies perdem essa característica no estágio adulto. Entre as subfamílias e os gêneros encontrados no Brasil os principais são: (Lampyrinae) *Lamprocera*, *Lucio*, *Hyas*, *Aethra*, *Lucidota*, *Tenaspis*, *Lucernuta*, *Dadophora*, *Cratomorphus*, *Aspisoma*, *Lecontea*, *Macrolampis*, *Photinus*, *Petalacmis*, *Calotrachelum*, (Amydetinae) *Amydetes*, *Psilocladus*, *Cladodes*, *Fenestratocladodes*, (Photurinae) *Pyrogaster*, *Photuris*, *Bicellonycha*.

Stanger-Hall et al. (2007), utilizando dados moleculares e de padrão de sinalização, demonstraram existir uma grande complexidade na classificação dentro da família, por exemplo, mostrando que a tribo Cratomorphini e Photinini possuem politomia. Também foi sugerido algumas vezes que a subfamília Rhagophthalminae deveria ser reestabelecida como uma subfamília em Lampyridae (CROWNSON, 1955; McDERMOTT, 1964, 1966).

Entretanto, tal dado é refutado em diversos outros trabalhos usando dados morfológicos e moleculares (CROWNSON, 1972; ARNOLDI et al., 2007; SAGEGAMI-OBA et al., 2007a, 2007b; KUNDRATA; BOCAK, 2011). Viviani et al. (2011), clonaram a luciferase de uma espécie Neotropical do gênero *Amydetes*, e mostraram através de análises filogenéticas usando sequências primárias das luciferases, que o gênero *Amydetes* deve ser considerado como uma subfamília independente, Amydetinae, como foi proposto originalmente por McDermott (1966).

A família Elateridae inclui aproximadamente 400 gêneros e 9.000 espécies, porém a bioluminescência ocorre apenas nas subfamílias Agrypninae, Thylacosterninae e Campyloxeninae, computando aproximadamente 150 espécies bioluminescentes na fase adulta (COSTA et al., 2010). Conhecidos como vagalumes "tec-tec" ou pirilampos, as espécies bioluminescente da família possuem luminescência na fase larval, a qual é encontrada na região dorsal do protórax, existindo em algumas espécies pares de lanternas puntiformes laterais em cada segmento. Na fase adulta, as lanternas estão localizadas, em geral, na forma de duas vesículas ovaladas sobre o protórax que emitem luz contínua, e uma lanterna abdominal que é ativada somente durante o vôo, que também emite luz contínua (COLEPICOLO et al., 1986; BECHARA, 1988). O gênero *Photophorus*, que ocorre na Oceania, apresenta apenas lanternas torácicas, e em *Fulgeoshlizus* no Brasil, apresenta apenas lanterna abdominal. (AMARAL et al., 2012; MITANI et al., 2013).

A luminescência na fase adulta de elaterídeos está em geral associada a atração sexual e defesa, porém o sistema de comunicação aparenta ser mais simples do que nos Lampyridae (LLOYD, 1971). Para os lampirídeos, a única lanterna no final do abdômen teria função de atração sexual, sendo que espécies noturnas apresentam espectro de bioluminescência na região verde e em espécies vespertinas, o espectro é deslocada para o amarelo-alaranjado para contrastar com o efeito de reflectância da vegetação na região do verde (LALL et al., 1980). Para os elaterídeos, a lanterna abdominal teria função de comunicação intraespecífica (comunicação sexual), enquanto que a protóraca serviria de alerta para predadores e também para iluminação (LALL et al., 2000, 2010). Na fase larval, a luminescência pode estar relacionada a defesa, mas no caso das larvas de *Pyrearinus termitilluminans*, as quais habitam galerias superficiais de cupinzeiros na região Central do Brasil (REDFORD, 1982), a luminescência é utilizada para atração de presas.

A família Elateridae é tida como monofilética, entretanto os seus limites não estão bem estabelecidos, visto que dados moleculares agruparam membros da família Throscidae dentro de Elateridae (MUONA, 1995). Espécies bioluminescentes de Elateridae são encontrados apenas nas subfamílias Agripninae, Thylacosterninae e Campyloxininae (COSTA et al., 2010). Dados moleculares recentes também inserem dentro do grupo membros da família Drilidae (KUNDRATA; BOCAK, 2011).

A família Phengodidae apresenta cerca de 35 gêneros e 200 espécies descritas, agrupadas nas subfamílias Phengodinae, com representantes na América, e Rhagophtalminae com representantes na Ásia e Oceania (WITTMER, 1976). Dentro da subfamília Phengodinae existem três tribos Pennicilloporini, Phengodini e Mastinocerini (O'KEEFE, 2002). Na tribo Mastinocerini, de ocorrência predominantemente Neotropical, se encontram as espécies conhecidas popularmente como larvas trenzinhos e contém as únicas espécies a apresentarem luminescência naturalmente vermelha (VIVIANI, 2002).

As fêmeas da família Phengodidae são larviformes, porém a neotenia é completa apenas na tribo Mastinocerini, em Phengodini e Rhagophtalminae (WITTMER; OHBA, 1994), as fêmeas apresentaram caracteres adultos, como o aparelho bucal, antenas e pernas. Dentro da tribo Mastinocerini, os machos adultos possuem 11 pares de lanternas puntiformes laterais nos segmentos abdominais e torácicos, enquanto que as fêmeas e larvas, além de possuírem os 11 pares de lanternas puntiformes laterais ao longo do corpo inteiro, também apresentam uma ou duas lanternas cefálicas que podem emitir luz na faixa do verde-amarelado ao vermelho (VIVIANI; BECHARA, 1993, 1997).

Em Mastinocerini, a função das lanternas laterais pode estar associada a defesa do indivíduo, visto que as mesmas são ativadas quando o mesmo é perturbado, e porque emitem luz em geral na região do verde-amarelo, faixa espectral em que a maioria dos animais terrestres enxergam (VIVIANI; BECHARA, 1997). Já as lanternas cefálicas podem estar relacionadas com a iluminação durante a busca ativa por presas, pois elas mantêm-se ativadas durante o percurso (SIVINSKY, 1981; VIVIANI ; BECHARA, 1997).

2.2. Evolução molecular e ontogenia em Elateroidea

As luciferases de coleópteros são funcionalmente classificadas como oxigenases, porém estas enzimas não possuem qualquer homologia com oxigenases clássicas, indicando

que as luciferases não se originaram a partir de oxigenases (REES et al., 1998). É mais provável supor que a função oxigenásica das luciferases tenha melhor se adaptado às condições ambientais após a origem do fenótipo luminescente, portanto, a bioluminescência que direcionou a evolução de novas oxigenases (REES et al., 1998).

A comparação das sequências das luciferase de coleópteros com AMP-CoA-ligases sugerem a origem dessa a partir da duplicação gênica de uma AMP/CoA-ligase ancestral (SCHROEDER, 1989; SUZUKI et al., 1990; TOH, 1990; SCHOLTEN et al., 1991), que teria sido responsável pela ativação de ácidos orgânicos, a qual possuía função diferenciada (WOOD, 1995; VIVIANI, 2002). Estudos posteriores sugeriram que seu surgimento ocorreu a partir de uma acil-CoA sintetase (OBA, 2003, 2005), enzima responsável pela ativação de ácidos graxos.

Oba et al. (2008, 2010a), analisando o gene *AbLL* (gene homólogo de luciferase de coleóptero) de *Agrypinus binodulus*, uma espécie de elaterídeo não luminescente, e o gene PaLL de *Pyrophorus angustus*, uma espécie luminescente, identificaram atividade de Acil-CoA sintetase em enzimas com alta similaridade a luciferases, porém sem atividade luciferásica primordial. Tais resultados suportam a hipótese de um evento de duplicação do gene ancestral que divergiu em suas funções bioluminescentes e de Acil-CoA sintetases. Oba et al. (2010b) clonaram um gene homólogo a luciferase em *Luciola cruciata*, LcLuc2, que se mostrou ser uma luciferase funcional com atividade de acil-CoA sintetase. Esse gene não é a principal enzima responsável pela luminescência, entretanto, no ovo, esse gene atua paralelamente ao gene da luciferase responsável pela bioluminescência nos estágios posteriores da vida.

Enzimas tipo-luciferases com a capacidade de emitir quimioluminescência fraca na presença de luciferina e ATP foram encontradas em larvas de besouros não luminescentes de *Tenebrio molitor* (Tenebrionidae) e em outras larvas de coleópteros (VIVIANI; BECHARA, 1996). Recentemente Viviani et al. (2009), clonaram e sequenciaram o cDNA de uma destas enzimas tipo-luciferase de *Zophobas morio*, parente próximo de *Tenebrio*. Esta enzima é uma AMP/CoA-ligase distantemente relacionada às luciferases de vagalumes (cerca de 32% de identidade), sugerindo que o potencial para a bioluminescência em AMP/CoA-ligases é bem mais antigo do que a divergência das principais famílias de coleópteros bioluminescentes. Este tipo de enzima, por ser distantemente relacionada as luciferases e por produzir

luminescência na presença de luciferina de vagalume está servindo como um modelo razoável de protoluciferase, as enzimas ancestrais que deram origem as luciferases.

Embora as três famílias de coleópteros bioluminescentes utilizem o mesmo sistema bioluminescente (VIVIANI, 2002), com a mesma luciferina, ATP e luciferases homólogas, estudos moleculares recentes sugerem que a bioluminescência nestes três grupos pode ter se originado pelo menos três vezes independentemente (ARNOLDI et al., 2007; BOCAKOVA et al., 2007; SAGEGAMI-OBA et al., 2007a; SAGEGAMI-OBA et al., 2007b; STANGER-HALL et al., 2007; KUNDRATA; BOCAK., 2011; AMARAL et al., 2013).

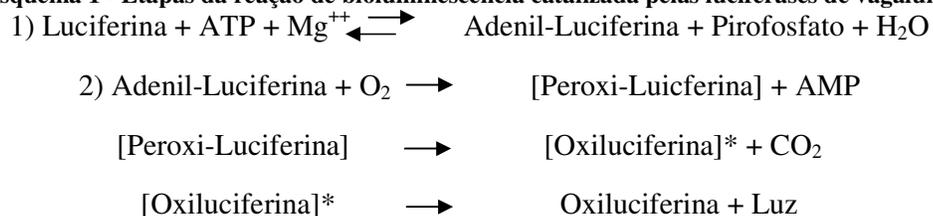
Usando caracteres morfológicos, Branham e Wenzel (2003) propuseram que a bioluminescência tenha surgido três vezes em Cantharoidea. Entretanto, um trabalho recente de Stanger-Hall et al. (2007) com dados moleculares, diverge dos resultados de Branham e Wenzel (2003), propondo mais de quatro origens independentes. Outros trabalhos apresentam outras hipóteses, mas confirmam o aparecimento independente desse caráter em vários clados. (ARNOLDI et al., 2007; BOCAKOVA et al., 2007; SAGEGAMI-OBA et al., 2007a; SAGEGAMI-OBA et al. 2007b; STANGER-HALL et al., 2007; KUNDRATA; BOCAK, 2011; AMARAL et al., 2013). Bocakova et al. (2007), apontam para quatro ou mais surgimentos independentes, enquanto Arnoldi et al. (2007) e Amaral et al. (2013) sugerem a possibilidade de três aparecimentos.

Além da discussão em aberto sobre a origem da bioluminescência, as relações filogenéticas entre as famílias bioluminescentes não é clara. Os estudos filogenéticos do grupo usando dados morfológicos mostraram uma relação de proximidade entre as famílias Phengodidae e Lampyridae (McDERMOTT, 1964; LAWRENCE; NEWTON, 1995). Esses dados foram confirmados utilizando-se caracteres morfológicos, marcadores mitocondriais e da sequência linear de luciferases clonadas (BRANHAM; WENZEL, 2003; DAY et al., 2009; ARNOLDI et al., 2010; TIMMERMANS et al., 2010; AMARAL et al., 2012; 2013). No entanto, estudos com outros marcadores moleculares, como genes mitocondriais e nucleares mostraram maior proximidade entre as famílias Elateridae e Phengodidae (ARNOLDI et al., 2007; KUNDRATA et al., 2014).

2.3. Luciferasas de Coleoptera

A bioluminescência nos coleópteros já é bem estudada e conhecida. Trata-se de um sistema luciferina/luciferase dependente de ATP (VIVIANI, 2002). As luciferasas de coleópteros catalisam a reação de oxidação do substrato luciferina, ativadas por ATP, gerando intermediários peroxídicos que se clivam produzindo oxiluciferina no estado eletronicamente excitado, que sofre decaimento emitindo luz (WILSON; HASTINGS, 1998). Essa reação ocorre em dois passos, sendo que no primeiro passo a luciferase atua como uma adenil-transferase, adenilando a luciferina a partir de ATP com a saída de pirofosfato e, no segundo a mesma luciferase atua como uma oxigenase, que remove o próton do carbono α à carbonila, permitindo que o mesmo seja atacado por oxigênio molecular, o que produzirá o intermediário dioxetanônico. Posteriormente, o intermediário peroxídico é clivado produzindo dióxido de carbono e oxiluciferina excitada, que decairá emitindo luz (Esquema 1). O primeiro passo da reação de bioluminescência é semelhante à reação de ativação de ácidos graxos e, também, de outros ácidos carboxílicos aromáticos catalizada por outras AMP/CoA-ligases (DeLUCA; McELROY, 1978). Tais enzimas compartilham elevado grau de identidade com as luciferasas, indicando a possível existência de uma enzima ancestral comum (WOOD, 1995; VIVIANI, 2002).

Esquema 1 - Etapas da reação de bioluminescência catalizada pelas luciferasas de vagalumes



Fonte: AMARAL, DT

As luciferasas são responsáveis pela variação de cores entre espécies e até mesmo entre as diferentes lanternas do corpo de um mesmo indivíduo, como o caso de espécies pertencentes à família Phengodidae e Elateridae (McELROY et al., 1967; WOOD, 1995; VIVIANI et al., 1999b). Tais avanços de conhecimento foram possíveis graças aos primeiros estudos utilizando luciferina e luciferase purificadas do lampirídeo norte-americano *Photinus pyralis* (GREEN; McELROY, 1956; BITLER; McELROY, 1957). A luciferina é um

composto benzotiazólico e de peso molecular de 280 Da, que é essencialmente idêntica nas famílias de lampirídeos, elaterídeos (COLEPICOLO et al., 1986) e fengodídeos (VIVIANI; BECHARA, 1993). A luciferase de vagalume *P. pyralis* é um monômero cataliticamente ativo de ~60 kDa (DeWET et al., 1985) com tendência à dimerização e inativação em altas concentrações. Sandalova e Ugarova (1999), sugerem que o sítio-ativo das luciferases é anfifílico, ou seja, a enzima apresenta caráter tanto hidrofóbico, quanto hidrofílico e não apenas hidrofóbico como sugerido inicialmente (DeLUCA, 1969).

A partir da clonagem da luciferase de *P. pyralis*, diversos outros cDNAs que codificam uma variedade de luciferases, já foram clonados, sendo a maioria de espécies pertencente à família Lampyridae (TATSUMI et al., 1989; KAJIYAMA; NAKANO, 1991; DEVINE et al., 1993; SALA-NEWBY et al., 1996; OHMIYA et al., 1995; VIVIANI et al., 2004, 2005, 2011; EMAMZADEH et al., 2006; OBA, 2010a, 2012), permitindo maior compreensão da estrutura, função e evolução das mesmas.

As luciferases dentro de Coleoptera são funcionalmente classificadas como pH-sensitivas (Lampyridae) e pH-insensitivas (Elateridae e Phengodidae) (VIVIANI; BECHARA, 1995). As luciferases de lampirídeos possuem espectro que se desloca para o vermelho em pH ácido, em temperaturas elevadas e/ou na presença de cátions de metais pesados, enquanto que as pH-insensitivas não sofrem tais efeitos. Comparando as sequências das enzimas pH-insensitivas e pH-sensitivas, Viviani et al. (1999b) observaram a existência de regiões de resíduos conservados que diferem entre si, os quais poderiam estar envolvidos na sensibilidade ao pH.

A variedade de cores da bioluminescência em besouros, em princípio, estão relacionadas a natureza química do sítio-ativo, incluindo efeitos não específicos como polaridade, (DeLUCA, 1969) e polarização orientada do sítio ativo, o que é determinada pela natureza dos resíduos constituintes; efeitos específicos de interação de resíduos ácido-básicos no sítio ativo com a oxiluciferina excitada (WHITE; BRANCHINI, 1975) e geometria do sítio-ativo que determinaria a rotação dos anéis tiazínicos da oxiluciferina em torno da ligação C₂-C₂' (McCAPRA et al., 1994). Branchini et al. (2004) sugeriram que o controle exercido pelo microambiente da luciferase no grau de polarização dos grupos ceto-enol e fenolato é o responsável pela determinação dos espectros de bioluminescência. Ugarova et al. (2005) indicaram a existência de três espécies emissoras, as quais contribuem nos espectros de bioluminescência em Lampyridae, o ceto-fenolato, que emitiria luz vermelha; o enol/fenolato, que emite na região do laranja e o enolato/fenolato, que emite no verde.

Recentemente, Viviani et al. (2013), realizando estudos de mutagênese sítio-dirigida nos resíduos do sítio ativo, sugeriram que a interação entre a carbonila da cadeia principal dos resíduos C/T/S311 e o fenolato da oxiluciferina estão envolvidos na modulação da bioluminescência. Estudos anteriores mostraram que mutações nos resíduos R215, H245, C314, G246 e T343 resultam em efeitos dramáticos nos espectros de luminescência (BRANCHINI et al., 1998, 2002, 2003; VIVIANI; OHMIYA, 2000).

Viviani et al. (1999b), clonaram as luciferases verde e vermelha de *Phrixothrix hirtus*, as quais possuem mais de 70% de identidade. A partir dessas luciferases foram produzidas quimeras entre elas (VIVIANI; OHMIYA, 2000). Tal estudo sugere que a conformação da região entre os resíduos 220 e 344 tem importante influência na cor da bioluminescência nessa família. Estudos realizados por Viviani et al. (2002), propuseram que Arg215 e Thr226 poderiam interagir direta ou indiretamente para manter uma conformação apropriada do sítio ativo para a emissão de luz verde, porém tais mutações não tem efeito na luciferase vermelha, indicando que estas substituições são funcionais apenas para luciferases de emissão de luz verde/amarela. Até o momento, a mutação que provocou o maior efeito de deslocamento para a região do azul na luciferase de *P. hirtus* foi a C311T (623 nm para 606 nm) (VIVIANI et al., 2013).

A mutação E354N na luciferase de *Macrolampis* sp.2, envolvida na sensibilidade ao pH, mostrou um efeito drástico na produção de espectros bimodais ou ausência dos mesmos nessas luciferases (VIVIANI et al., 2005; VIVIANI et al., 2011). Viviani et al. (2007), estudando o resíduo do *loop* 223-235, observaram que os resíduos 227-229 são críticos na determinação da cor. Nos casos das enzimas pH-sensíveis este *loop* é provavelmente estabilizado por forças hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e interações eletrostáticas, os quais podem ser enfraquecidos pela mudança de pH, ocasionando emissão no comprimento de onda no vermelho (Viviani et al., 2008). Já no caso das pH-insensíveis, o mesmo *loop* apresenta maior estabilidade, visto que possui interações hidrofóbicas mais fortes, além de um melhor empacotamento dos resíduos, o que confere menor mudanças de cor na presença de diferentes pHs.

2.4. As luciferases de elaterídeos e suas cores

Algumas luciferases de espécies pertencentes a família Elateridae já foram clonadas (WOOD et al., 1989; VIVIANI et al., 1999a; STOLZ et al., 2003, OBA et al., 2008; OBA et al., 2010a), sendo duas provenientes de espécies brasileiras, *P. termitilluminans* e *Fulgeochlizus bruchi* (VIVIANI et al., 1999a, AMARAL et al., 2012). As luciferases de elaterídeos já clonadas são polipeptídeos de 542-543 resíduos, que compartilham entre 82-99% de identidade entre si (WOOD, et al., 1989; VIVIANI et al., 1999a).

Wood et al. (1989) clonaram quatro isoenzimas da espécie *Pyrophorus plagiophthalmus*, uma espécie encontrada na Jamaica. As enzimas foram clonadas a partir da lanterna dorsal, a qual varia de verde ao verde amarelado (548-565 nm), e da lanterna abdominal, a qual varia de verde a laranja (547-594 nm). As isoenzimas foram classificadas em quatro grupos de cores (546, 560, 578 e 594 nm) e apresentavam entre elas de 95-99% de identidade. Análises das sequências primárias dessas luciferases, indicaram possíveis resíduos envolvidos com a variação de cores, principalmente no loop 223-247 (WOOD et al., 1989).

Recentemente, Oba et al. (2010a), estudando uma espécie de elaterídeo panamenho, *Pyrophorus angustus*, sugeriram que a duplicação do gene da Acil-CoA sintetase ocorreu antes da divergência entre os Elateridae luminescentes e não-luminescentes na linhagem de Pyrophorini. Com esses resultados, Oba et al. (2010a), propuseram um cenário evolutivo para a enzima luciferase dentro dos Elateridae, no qual uma das cópias do gene ancestral da Acil-CoA sintetase deu origem ao gene da luciferase, enquanto a outra manteve a função original de síntese da acil-CoA.

Dentro da família Elateridae, existe uma ampla variação de cores no espectro da bioluminescência, que vai do verde ao laranja (534 - 594 nm), dependendo do órgão emissor (lanterna dorsal ou ventral) ou estágio da vida (BIGLEY et al., 1967; COLEPICOLO et al., 1986). As primeiras observações realizadas por Biggley e colaboradores (1967), mostraram a ampla variação de espectros existentes nas lanternas dorsal e ventral de *P. plagiophthalmus*. Dos 155 espécimes analisados, observou-se uma faixa de comprimento de onda de 550-562 nm para a lanternas dorsais e de 547-594 nm para as lanternas abdominais, valores observados também por Wood et al. (1989). Colepicolo et al. (1986), usando 12 espécies

brasileiras de elaterídeos, também mostraram essa ampla gama de cores em ambas as lanternas (ventral e dorsal) de adultos e nas larvas e pupas, que variavam de 524 nm (em larvas de *Pyrophorus punctatissimus*) até 584 nm (lanterna abdominal de *Hapsodrilus ignifer*), propondo que essas cores em diferentes lanternas e fases do mesmo indivíduo seriam ocasionadas por diferentes isoenzimas (COLEPICOLO et al., 1986).

2.5. Filogenia de Elateroidea

A riqueza de espécies de coleópteros neotropicais pode estar relacionada a diversos fatores. Uma das hipóteses mais citadas para explicar o aumento significativo da biodiversidade existente na região Neotropical refere-se às oscilações climáticas do período final do Quaternário, mais especificamente ao Pleistoceno, período em que ocorreram retrações e expansões das florestas devido a alteração do clima e das temperaturas ao longo da superfície terrestre resultante dos processos de glaciação (PENNINGTON et al., 2000). As variações climáticas que ocorreram nesses períodos paleológicos podem ter influenciado a estruturação e a dinâmica populacional, a distribuição espacial de diversas espécies, vegetais e animais, o que ocasionou diferentes padrões de dispersão, colonização e fluxo gênico. Tais processos foram amplamente observados em estudos filogeográficos utilizando espécies de coleópteros (VELEZ; FEDER, 2006; RICHMOND; CATERINO, 2010).

Um estudo filogeográfico utilizando marcadores moleculares em espécies de coleópteros bioluminescentes foi realizado por Velez e Feder (2006), na espécie de elaterídeo jamaicano, *P. plagiophthalmus*. Os dados mostraram que a biogeografia e a distribuição espacial possuem papel importante na evolução das cores de bioluminescência nesta espécie. Segundo os autores, algum efeito biogeográfico intenso, provavelmente ligado a vicariância, foi responsável pela evolução de luciferases que emitiam diferentes cores de luz. Essas luciferases divergiram por mutações que foram fixadas nas diferentes populações, entretanto, o contato entre elas e, conseqüentemente, a presença de fluxo gênico resultou no atual polimorfismo de cores em *P. plagiophthalmus*. Esses dados indicam que esse processo de vicariância pode mostrar possíveis caminhos evolutivos das cores em diversas espécies de elaterídeo

O gênero *Pyrearinus* apresenta mais de 40 espécies distribuídas pela América do Sul, sendo que o Brasil abriga a grande maioria delas. Dentro do grupo, a espécie *P. termitilluminans* (COSTA, 1982) proporciona um dos mais belos fenômenos de bioluminescência. As larvas dessa espécie vivem em túneis esculpidos dentro de cupinzeiros, apresentando uma relação de inquilinismo (REDFORD, 1982). Durante as noites de primavera e verão, as larvas expõem, para fora do cupinzeiro, a lanterna do protórax, utilizada para atração de presas, iluminando todo o cupinzeiro (COSTA, 1982; COSTA; VANIN, 2010). Além da espécie *P. termitilluminans*, Costa e Vanin (2010) descreveram a existência de mais cinco espécies pertencentes ao grupo *pumilus*, as quais também habitam cupinzeiros e se distribuem por toda a América do Sul, principalmente no Brasil, entre elas *Pyrearinus fragilis*, *Pyrearinus pumilus*, *Pyrearinus flatus*, *Pyrearinus vitticollis* e *Pyrearinus scintilula*.

O crescente número de trabalhos sobre filogeografia não se reflete nos Elateroidea, que apesar de despertarem um interesse bioquímico e ecológico muito grande, ainda são pouco estudados em abordagens filogenéticas e filogeográficas (BEHEREGARAY, 2008). A maioria dos estudos de filogeografia ocorrem no hemisfério Norte e com predomínio das espécies “bandeiras” de vertebrados (BEHEREGARAY, 2008), sendo poucos trabalhos desenvolvidos na região Neotropical, a qual apresenta uma grande riqueza de espécies, principalmente da classe Insecta.

2.6. Genomas mitocondriais de Elateroidea

Estudos utilizando o genoma mitocondrial completo de coleópteros luminescentes vêm auxiliando nos conhecimentos filogenéticos, além de permitir conhecer as taxas evolutivas do genoma, diferenças estruturais decorrentes de duplicações gênicas e taxas de mutação (BAE et al., 2004; LI et al., 2007; ARNOLDI et al., 2007).

O primeiro genoma mitocondrial de besouros bioluminescentes a ser completamente sequenciado foi o da espécie *Pyrocoelia rufa*, lampirídeo asiático, o qual mostrou algumas divergências na estrutura dos tRNAs em relação a *Drosophilla yakuba* e possibilitou, por meio de análise filogenética, indicar a monofilia das ordens Coleoptera, Endopterygota, Mecoptera, Diptera e Lepidoptera (BAE et al., 2004). O sequenciamento das espécies

japonesas de ragophthalmídeos, *Rhagophthalmus lufengensis* e *Rhagophthalmus ohbai*, indicaram que a subfamília Rhagophthaminae encontrava-se dentro da família Lampyridae e conseguiram indicar a existência de relações biogeográficas entre as populações do oeste asiático (LI et al., 2007). Arnoldi et al. (2007) sequenciaram o DNA mitocondrial do elaterídeo brasileiro *Pyrophorus divergens* e o compararam com os genomas mitocondriais disponíveis. Os resultados observados indicaram que a família Elateridae é mais próxima a família Phengodidae, do que a família Lampyridae, como proposto por Crowson (1972). A única espécie não-luminescente dentro de Elateroidea a ter seu genoma mitocondrial estudado foi a espécie *Chauliognathus opacus* (SHEFFIELD et al., 2009). Contudo, os estudos filogenéticos não foram suficientes para mostrar as relações entre esta família e as demais famílias luminescentes do grupo. Portanto, ainda faltam dados sobre o genoma de espécies de Phengodidae neotropicais e de espécies de Lampyridae exclusivos do Brasil, além de espécies das demais famílias pertencentes à Elateroidea que não apresentam luminescência, como Lycidae, Eucnemidae e Throscidae e que possam mostrar com maior clareza as relações entre as famílias luminescentes e não-luminescentes.

A fauna neotropical de Elateroidea bioluminescentes, apesar de ser a mais rica do mundo, com taxa únicos, ainda é pouco estudada sob os aspectos sistemáticos, evolutivos e biológicos. Com a exceção de extensos estudos sistemáticos sobre Elateridae, conduzido por Costa e colaboradores (COSTA 1975, 1988), a maioria das descrições taxonômicas de taxa pertencentes às famílias Lampyridae e Phengodidae estão desatualizados, com base em descrições ambíguas de naturalistas do fim do século XIX e início do XX. Wittmer (1976), revisou a família Phengodidae e descreveu várias espécies do continente Sul-americano, algumas novas, tais como *Phrixothrix vivianii* (WITTMER, 1992), *Euryopa clarindae* (WITTMER, 1996) e *Euryopa laurae* (WITTMER, 1996). Alguns estudos bionômicos sobre espécies brasileiras foram realizadas para Lampyridae (COSTA et al., 1988; ROSA, 2007; VIVIANI, 1989; VIVIANI, 2001) e Phengodidae (COSTA et al., 1998; VIVIANI; BECHARA, 1997). Análises bioquímicas e moleculares foram realizadas para as luciferases dos elaterídeos *P. termitilluminans* e *F. bruchi*, para os fengodídeos *P. hirtus* e *P. vivianii* da tribo Mastinocerini e para os vaga-lumes dos gêneros *Cratomorphus*, *Macrolampis* e *Amydetes* (ARNOLDI et al. 2010; VIVIANI et al. 1999a, 1999b, 2004, 2005, 2011; AMARAL et al., 2012).

3. Objetivos

Considerando-se a questão aberta sobre a origem e evolução da bioluminescência em Elateroidea, especialmente a origem das luciferases que emitem diferentes cores em diferentes lanternas e fases de vida da família Elateridae, e as controvérsias sobre a relação filogenética de diferentes taxa desta superfamília, este projeto teve dois objetivos principais: i.) clonar e sequenciar as luciferases das lanternas protorácicas e abdominal de indivíduos adultos de espécies de elaterídeos luminescentes da fauna brasileira, incluindo *P. termitilluminans*, *F. bruchi* e *P. angustus* e, ii.) estudar as relações de filogenia entre as famílias bioluminescentes, assim como sua distribuição geográfica baseada em dados moleculares.

3. 1. Objetivos específicos

A clonagem e caracterização do cDNA das luciferases de Elateridae, teve como objetivos:

- Comparar as estruturas primárias das luciferases da fase adulta e larval da espécie *P. termitilluminans*, e demais luciferases e enzimas tipo-luciferase clonadas de besouros, para estabelecer relações evolutivas.
- Investigar os determinantes estruturais das cores de bioluminescência nas luciferases de elaterídeos, por meio de multialinhamentos e mutagênese sítio-dirigida.

Os estudos filogenéticos tiveram os seguintes objetivos:

- Entender as relações filogenéticas entre as famílias bioluminescentes de Elateroidea.
- Estudar a evolução da bioluminescência em Elateroidea.

4. Material e Métodos

4.1. Soluções e equipamentos

Tampões utilizados

- **Tampão TAE 50X:** Tris: 242g, 100 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0, 57,2 mL de Ácido Acético Glacial. Completado para 1 L com água ultrapura.
- **Meio de cultura LB (Luria Bertani):** 10g de Triptona, 5g de extrato de levedura, 10g de NaCl. Completado para 1 L com água destilada. Autoclavado.
- **Tampão MOPS:** 20,9g MOPS, 8,3 mL de acetato de sódio 3M (pH 5,2), Completado para 0,5 L com água ultrapura tratada com DEPC. Autoclavado.
- **Tampão de Extração de DNA:** 0,6057g de 250 mM de Tris, 2,34g de NaCl 5 M, 100 mM de EDTA pH 8,0, 0,5 g de 2,5% de SDS. Completado para 100 mL com água ultrapura.
- **Tampão de lavagem:** tampão Fosfato 50 mM pH 7, NaCl 300 mM, Imidazol 20 mM.
- **Tampão de eluição:** tampão Fosfato 50 mM pH 7, NaCl 300 mM, Imidazol 250 mM.
- **Tampão de diálise:** Tris-HCl 25 mM, NaCl 10 mM, EDTA pH 8 1 mM, Glicerol 10%, DTT 2 mM.

Equipamentos utilizados:

- Termociclador MJ25+ (APPLIED-BIOSYSTEM, USA)
- Centrífuga 5804 R (EPPENDORF, USA)
- Luminometro 2200R (ATTO, Japão)
- Espectrofluorímetro Hitachi F4500 (HITACHI, Japão)

- Câmara CCD refrigerada LightCaptureII (ATTO, Japão)

4.2. Coleta de insetos e identificação

As espécies em estágio adulto foram coletadas com a utilização de puçás, enquanto as larvas foram coletadas manualmente na vegetação/solo. As espécies foram armazenadas em frascos, com algodão umedecido e mel até a definição do destino do material e sua identificação.

Os exemplares utilizados para síntese de cDNA e para extração de DNA foram mantidos em meio RNAlater (AppliedBiosystems, USA), congelado a -80°C ou mantidos *in vivo*, enquanto outros exemplares foram conservados em álcool 70%, para análises taxonômicas.

A identificação das amostras foi realizada pela Dr. Cleide Costa e Dr. Simone Rosa (MZUSP) e pelo Dr. Vadim Viviani, comparando com material presente em coleções previamente identificadas.

4.3. Técnicas de Biologia Molecular

Técnicas de biologia molecular, tais como extração de DNA, reações de PCR, purificação, extração de RNA total, isolamento de mRNA e clonagem de cDNA foram usadas para as seguintes finalidades: (1) a clonagem do cDNA para luciferases; (2), expressão heteróloga de luciferases; (3) mutagênese sítio-dirigida; (4) estudo de filogenia a partir de seqüências de genes mitocondriais, nucleares e de seqüências lineares de luciferases clonadas.

4.3.1. Clonagem do cDNA de luciferases de Elateridae

A clonagem de cDNAs para luciferases teve como objetivo determinar a estrutura primária destas enzimas para elucidar os determinantes estruturais das cores de bioluminescência e estudos de evolução e filogenia molecular, além de permitir a expressão e caracterização destas enzimas.

4.3.1.1. Extração e quantificação de RNA total

A extração do RNA total foi realizada utilizando-se o reagente Trizol (LIFE TECH., CA), seguindo o protocolo sugerido pelo fornecedor (CHOMCZYNSKY; SACCHI, 1987). O material utilizado e a quantidade de tecido está discriminado na Tabela 1. Inicialmente, o material foi macerado em Trizol com a utilização de macerador. Para a separação do RNA total dos diferentes compostos como DNA, proteínas e gorduras foi adicionado clorofórmio, o que permitiu isolar a fase aquosa contendo o RNA total. O RNA foi, então, precipitado com isopropanol e lavado com etanol 75%. Após secagem parcial, o *pellet* foi dissolvido em água tratada com DEPC 0.1%. Após o isolamento, o RNA total foi quantificado por espectrofotometria, usando leitura em 260 nm em espectrômetro NanoVue (Ge Health). A pureza foi analisada pela razão 260/280 nm. A qualidade do RNA foi analisada por eletroforese desnaturante em gel de formaldeído.

Tabela 1. Espécies utilizadas para estudos de clonagem

Família	Espécie	Local de coleta	Tecido	Quantidade de tecido isolado (g)	de mRNA (µg)
Elateridae	<i>Pyrearinus termitilluminans</i>	Parque Nacional das Emas, GO	lanterna abdominal e protorácica	0,528 e 0,368	2,6 e 2,2
	<i>Pyrearinus micatus</i>	UFSCar - Sorocaba, SP	lanterna abdominal e protorácica	0,200 e 0,156	-
	<i>Ptesimopsia</i> sp.	Tapiraí, SP	lanterna abdominal	0,14	-
	<i>Fulgeochlizus bruchi</i>	Parque Nacional das Emas, GO	lanterna abdominal	0,408	3
	<i>Pyrophorus angustus</i>	Juruena, MT	lanterna abdominal	~0,110	1,1

Fonte: AMARAL, DT

4.3.1.2. Eletroforese em gel desnaturante de formaldeído

Do total do RNA total extraído, 4,5 µL foram separados e fixados com adição de 2 µL de 5x Gel Run Buffer (MOPS), 3,5 µL de formol (35%) e 10 µL de formamida e aquecidos a 65°C por 15 minutos. O gel de agarose foi preparado, também, com formol e 5x Gel Run Buffer. Foi realizada uma pré-corrída do gel por 30 minutos a 50 V. O material foi aplicado, marcado com brometo de etídeo (1 mg/ml) e submetido a uma corrida de eletroforese de 50 V por 2 horas. O material foi checado em transiluminador de luz UV e a presença das bandas ribossomais intactas foi usada como indicador da qualidade do RNA.

4.3.1.3. Isolamento do RNA mensageiro

Para isolar o RNA mensageiro foi utilizada resina de Oligo-dT látex (TAKARA, Japão) de acordo com o protocolo sugerido pelo fornecedor. Inicialmente, o RNA total foi aquecido a 65°C para desnaturar estruturas secundárias. Em seguida, foram adicionados 200 µL de resina de oligo-dT. O mRNA contendo cauda poli-A é então hibridizado com o oligotex, precipitado utilizando etanol 100% e centrifugado a 15.000 g por 10 minutos. O material foi lavado com etanol 70% e centrifugado a 15.000 g por 10 minutos. O mRNA foi então eluído em água ultrapura tratada com DEPC 0.1%. Após o isolamento, o material foi quantificado por espectrofotometria, pelo espectrômetro NanoVue (Ge Health) a 260 nm. A pureza foi analisada pela razão 260/280 nm.

4.3.1.4. Construção de bibliotecas de cDNA

Foi realizada a construção de bibliotecas de cDNAs para as lanternas do protótipo e do abdômen de *P. termitilluminans*, para a lanterna abdominal de *P. angustus* e para a lanterna abdominal de *F. bruchi* utilizando o kit “SuperScript™ Plasmid System with Gateway® Technology for cDNA Synthesis and Cloning” (LIFE TECH, CA), seguindo o protocolo do fornecedor.

Para a síntese de cDNA foi utilizado o Kit da Life Tech. (ver Tabela 1). Foi utilizado um iniciador oligo-dT (“Not I primer-adapter”) para a síntese da primeira fita. Após a síntese da segunda fita, foi inserido o adaptador SAI I. O material foi então digerido com enzima de restrição Not I. Em seguida, o *pool* de cDNA passou por coluna de cromatografia Sephacryl para remover resíduos de adaptadores e fragmentos restantes da enzima Not I. O cDNA eluído da coluna foi então ligado ao vetor pSPORT 1 e transformado em células *E.coli* XLBlue-1.

4.3.1.5. Transformação

Amostras de 50 µL de células competentes (XL-Blue-1) e 5 µL da biblioteca de cDNA foram misturadas e mantidas em gelo por 30 minutos. Em seguida, foi realizada a imersão das amostras em banho-maria previamente aquecido à 42°C. O material foi novamente inserido em gelo por 2 minutos. Foi adicionado o volume de 200 µL de meio LB

(Luria-Bertani) e colocado 1 hora em agitação de 250 rpm. Posteriormente, a amostra foi plaqueada em meio LB-agar suplementado com ampicilina e foi mantida em estufa a 37°C *overnight*.

4.3.1.6. *Screening* funcional das bibliotecas

A biblioteca na forma plasmidial (vetor mais cDNA) foi utilizada para transformar células XLBlue-1 supercompetentes (GE HEALTH, USA). As colônias resultantes da transformação, foram transferidas para placas contendo IPTG 1mM e mantidas a temperatura de 18-20°C por 12 horas. Após esse período de indução, as placas foram borrifadas com D-luciferina 1mM em tampão citrato 0,10 M pH 5.0 e submetidas a fotodeteção por 1-5 minutos em uma Camera CCD (ATTO, Japão) no nível máximo de sensibilidade para detecção de colônias luminescentes. Os clones positivos para luciferase em geral passaram por mais dois ciclos de *screening* para seu isolamento.

4.3.1.7. Preparação de DNA plasmidial

A mini preparação de DNA plasmidial foi realizada usando kit “Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System” (PROMEGA, USA), segundo protocolo do próprio fabricante. As colônias de bactérias isoladas foram inoculadas em 5 mL de meio LB líquido suplementado com ampicilina (50µg/ml) e mantidas durante a noite a 37°C e 200 rpm. Após esse período, o material foi centrifugado e as células rompidas em condições alcalinas extremas por 5 minutos. A solução foi neutralizada e ajustada para condições ótimas de adsorção do DNA a membrana de purificação. O DNA plasmidial adsorvido foi lavado com solução de lavagem para a remoção de impurezas. O DNA, agora puro, foi eluído com água livre de nucleases.

4.3.1.8. Clonagem por técnica de RT-PCR

As luciferases do protórax e abdômen de *Pyrearinus micatus* e a do abdômen de *Ptsemopsia* sp., foram parcialmente sequenciadas por meio da técnica de RT-PCR, utilizando-se do kit "GoScript Reverse Transcription System" (PROMEGA, USA). O RNA

total das amostras previamente isolado foi utilizado para a reação. A um total de 4µL de RNA total foi acrescentado 1 µL de *primer* Oligo(dT)₁₅. A reação foi aquecida por 5 minutos a 70°C e, em seguida adicionada à reação mix da transcriptase reversa, a qual continha: 4 µL de “GoScript 5x Reaction Buffer”, 2µL de MgCl₂, 1µL de “PCR nucleotide mix”, 1µL da enzima “GoScript Reverse Transcriptase” e 7 µL de água ultra pura. Para hibridação do oligo-dT manteve-se a reação a 25°C, por 5 minutos, seguido de um período de extensão de uma hora a 42°C. Para inativação do total de enzima, a amostra foi aquecida a 70°C por 15 minutos. Após a reação de transcrição reversa, foi realizada uma etapa de termociclagem da reação usando *primers* internos à sequência de luciferases de elaterídeos (Tabela 2). Inicialmente, a reação foi aquecida a 94°C por 5 minutos (Desnaturação), seguido de 30 ciclos de 30 segundos à 94°C (Desnaturação), 60 segundos a 50°C (Pareamento de *primers*), 60 segundos à 68°C (Extensão) e um estágio final de extensão de 7 minutos à 68°C. O material foi analisado em gel de agarose 1%, purificado utilizando-se o Kit de purificação “Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System” (PROMEGA, USA) e sequenciado.

Tabela 2. Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação e sequenciamento da região interna das luciferases de elaterídeos.

<i>Primer</i>	Sequencia
SSG_LucF	5' – TAT TTT ATG TTC TC AGG CAC - 3'
VDR_LucR	5' – AAT AAG TTC CTT GTA ACG GTC - 3'

Fonte: AMARAL, DT

4.3.1.9. Sequenciamento de DNA

As reações de sequenciamento foram realizadas, utilizando o kit “BigDye Terminator V3.1” (Applied Biosystems, USA), pelo método de Sanger. O material foi sequenciado na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Campus de Jaboticabal (FCAV) - Departamento de Tecnologia (UNESP - Jaboticabal), na empresa Helixxa (Campinas, SP) e no AIST-Tsukuba (Japão) em um sequenciador ABI PRISM® 3100 GeneticAnalyzer (Hitachi).

4.3.1.10. Mutagênese sítio-dirigida

A mutagênese sítio-dirigida da luciferase larval de *P. termitilluminans*, previamente clonada (VIVIANI et al., 1999a), foi realizada utilizando-se o kit “QuikChange Site-Directed Mutagenesis” da Stratagene, seguindo o protocolo do fornecedor. No procedimento foi utilizado dois oligonucleotídeos iniciadores complementares, os quais apresentavam a mutação desejada (Tabela 3). Durante a PCR com o auxílio da DNA polimerase *PfuTurbo* (Agilent Tech., USA), ocorre a incorporação da mutação e a subsequente extensão do DNA. Para a técnica foram utilizados 2,5µL de tampão *Pfu* buffer 10 x, 0,5µL do plasmídeo (50 ng), 0,5µL de dNTP (2 mM), 0,5µL de cada *primer* (125 ng; tabela 4), 0,5µL *Pfuturbo* polimerase, 20µL de água ultrapura autoclavada. A reação foi submetida a um passo de 95° C por 2 min; 25 ciclos de 95° C por 30 s, 55° C por 30 s, 72° C por 7 min e um período de extensão final a 72° C por 10 min. Após o término da reação de PCR, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose com a amostra e o controle para observar a amplificação. Finalmente, o DNA parental não-mutado foi digerido com a enzima de restrição *DpnI* que reconhece sítios do DNA metilado, e a amostra contendo o DNA mutante foi utilizada para transformação usando células competentes XL1Blue.

Tabela 3. Sequência dos iniciadores utilizados para mutagênese sítio-dirigida em luciferase de *P. termitilluminans*.

<i>Primer</i>	Sequência
Py S247F_Fow	5' - CTT CGG CTT CTT TAT CAA CCT GG- 3'
Py S247F_Rev	5' - CCA GGT TGA TAA AGA AGC CGA AG - 3'

Fonte: AMARAL, DT

4.3.2. Técnicas de Filogenia molecular

O DNA de espécimes de interesse de nossa fauna de Elateroidea foi utilizado para realizar reações de amplificação por PCR, com *primers* para genes marcadores específicos (28S, NADH2 e COI) para finalidades de estudos filogenéticos.

Extração de DNA para estudos de filogenia. Para extração do material genético (DNA) foi utilizado o protocolo de Sambrook et al. (1989), com adaptações. Pequena porção do tecido abdominal foi isolada e transferida para um microtubo de 1,5 mL, contendo 50 µL de tampão de extração autoclavado e gelado, onde foi macerada em baixas temperaturas, por meio de uma ponteira previamente fechada em chama. Após maceração, foram acrescentados 700 µL do tampão de extração e 5 µL de proteinase K* (20 mg/mL) (PROMEGA, USA). Em seguida, a reação foi mantida por três horas a 55°C, em banho-maria, para total remoção de nucleases e outras enzimas presentes.

Após o período de incubação, foi realizada a precipitação de materiais indesejados, como proteínas, entre outros presentes na solução, por meio da adição de 280 µl de NaCl 5M, autoclavado, e centrifugação por 5 minutos à 15.000g (centrifuga 5804 R, EPPENDORF, USA). O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo estéril; foram acrescentados 600 µL de isopropanol 100% e realizada nova centrifugação por 5 minutos a 15.000g. O material precipitado foi lavado com 600 µL de etanol 70 % gelado (AMRESCO, Brasil) e centrifugado por 3 minutos a 15000g. O DNA puro foi eluído em tampão TE pH 8.0. O material utilizado está descrito na Tabela 4.

Tabela 4 - Espécies utilizadas para os estudos moleculares, com os genes NADH2 e 28S.

Família	Espécies	Localidade e data de coleta
Elateridae	<i>Pyrophorus punctatissimus</i> (Blanchard, 1843)	Alto Garça - MT (21/10/2013)
	<i>Pyrophorus divergens</i> (Eschscholtz, 1829)	Campinas – SP (12/11/2008)
	<i>Conoderus</i> sp.	Parque Estadual de Intervalos – SP (19/12/2008)
	<i>Pyrearinus micatus</i> (Costa, 1978)	Sorocaba – SP (20/01/2012)
	<i>Pyrearinus fragilis</i> (Costa, 1978)	Juruena - MT (21/10/2013)
	<i>Pyrearinus candelarius</i> (Germar, 1841)	Sorocaba – SP (20/01/2012)
	<i>Pyrearinus termitilluminans</i> (Costa, 1982)	Costa Rica – MS (03/11/2008)
	<i>Hapsodrilus ignifer</i> (Germar, 1841)	Campinas – SP (12/11/2008)
	<i>Fulgeochlizus bruchi</i> (Candèze, 1896)	Costa Rica – MS (31/10/2008)
	Lampyridae	<i>Macrolampis</i> sp.2 (Motschulsky, 1853)
<i>Aspisoma lineatum</i> (Gyllenhal, 1817)		Corumbataí, SP (10/10/2007)
<i>Macrolampis omissa</i> (Motschulsky, 1853)		Parque Nacional das Emas – GO (31/10/2011)
<i>Amydetes vivianii</i> (Silveira, 2014)		Sorocaba – SP (18/03/2008)
<i>Lucidota</i> sp. (Laporte, 1833)		Corumbataí – SP (09/10/2007)
<i>Cratomorphus distinctus</i> (Olivier, 1895)		Boracéia – SP (09/10/2007)
<i>Bicellonycha lividipennis</i> (Motschulsky, 1854)		Sorocaba – SP (18/03/2008)
<i>Photuris</i> sp.7 (Dejean, 1833)		Boracéia – SP (19/03/2008)
	<i>Amydetes</i> sp.1	Corumbataí – SP (10/10/2007)

	<i>Euryopa laurae</i> (Wittmer, 1996)	Parque Nacional das Emas – GO (15/10/2010)
Phengodidae	<i>Phrixothrix hirtus</i> (Olivier, 1909)	Parque Nacional das Emas – GO (14/10/2010)
	<i>Brasilocerus</i> sp.2	Boracéia – SP (19/03/2008)
	<i>Pseudophengodes brasiliensis</i> (Wittmer,1976)	Boracéia – SP (09/10/2007)
Cantharidae	<i>Chauliognathus</i> sp.	Parque Nacional das Emas – GO (30/10/2008)

Fonte: adaptado de AMARAL et al. (2014)

Amplificação e purificação de produtos de PCR. Para os estudos filogenéticos, foram escolhidos quatro marcadores moleculares, tendo como base os artigos de Simon et al., (1994) e Arnoldi et al. (2007), para confecção de iniciadores para a região do gene NADH₂. Também foram utilizados segmentos dos genes COI (mitocondrial), 28S (nuclear) e da luciferase (Tabela 5).

Tabela 5. Sequência dos primers utilizados para amplificação e sequenciamento da região dos genes NADH₂, COXI, luciferase e 28S, respectivamente.

Primer	Sequência
ND2Fdeg60	5' - TCN TAY TCA TGA HTH GGW ATA TG - 3'
ND2Rdeg550	5' - TTC ATC YTA TRT GRT TRA TTG ATG - 3'
Bar_COI_25N	5' – AAY CAT AAA RAC ATT GGA AC - 3'
BAR_COIS_710J	5' – TTC TGG RTG ACC AAA GAA TC -3'
SSG_LucF	5' – TAT TTT ATG TTC TC AGG CAC - 3'
VDR_LucR	5' – AAT AAG TTC CTT GTA ACG GTC - 3'
TSJ28S-167	5' – CGT GAG GGA AAG TTG AAA AGA AC - 3'
TSN28S-1352	5' – AAA TGG CCC ACT TGG CAC TC - 3'

Fonte: AMARAL, DT

A reação de amplificação foi realizada utilizando o kit de reação “PCR Master Mix” (PROMEGA, USA), segundo o protocolo do fabricante: 12,5 µL da solução “PCR Master Mix”, 0,5 µL de cada iniciador na concentração inicial de 10 µM; 1µL do DNA template diluído em água ultra pura 1:10, completando-se com água ultra pura para 25 µL. A termociclagem da reação para o gene NADH₂ e COI foi inicialmente realizada a 94°C por 5

minutos (Desnaturação); 35 ciclos com 45 segundos à 94°C (Desnaturação), 45 segundos a 45°C (Pareamento de *primers*), 60 segundos à 60°C (Extensão); um estágio final de extensão com 15 minutos à 60°C. Para o gene da luciferase e 28S foram utilizados uma temperatura inicial de 94°C por 5 minutos (Desnaturação); 30 ciclos com 30 segundos à 94°C (Desnaturação), 60 segundos a 50°C (Pareamento de *primers*), 120 segundos à 68°C (Extensão); um estágio final de extensão com 15 minutos à 68°C.

O produto de PCR foi purificado utilizando-se o Kit de purificação “Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System” (PROMEGA, USA), seguindo o protocolo do próprio fabricante, com as reações sendo purificadas diretamente na coluna.

4.3.3. Sequenciamento dos genomas mitocondriais

Estudos do genoma mitocondrial permitem observar os rearranjos existentes nesse genoma, que podem ser utilizados para propor padrões evolutivos.

Amplificação e purificação do genoma mitocondrial. Os genomas mitocondriais das espécies da Tabela 6 foram amplificados em duas porções. A primeira porção, que amplifica o segmento do gene 16S até o gene COXIII, e a segunda porção, que amplifica o segmento entre os genes COXII e 16S, com sobreposição de 500 pb e 1200 pb, respectivamente. As sequências dos iniciadores estão descritas na Tabela 7.

Tabela 6 - Espécies utilizadas para o sequenciamento completo de genomas mitocondriais

Família	Espécies	Localidade e data de coleta
Elateridae	<i>Pyrearinus termitilluminans</i> (Costa, 1982)	Costa Rica – MS (03/11/2008)
	<i>Hapsodrilus iginifer</i> (German, 1841)	Campinas – SP (12/11/2008)
	Elateridae não luminescente	Costa Rica - MS (11/2012)
Lampyridae	<i>Bicellonycha lividipennis</i> (Motschulsky, 1854)	UFSCar, Sorocaba - SP (20/11/2012)
Phengodidae	<i>Brasilocerus</i> sp.2	E. E. Boracéia – SP (19/03/2008)
	<i>Phrixotrix hirtus</i> (Olivier, 1909)	E. E. Boracéia – SP (09/10/2007)

Fonte: AMARAL, DT

A reação de amplificação foi realizada utilizando o kit de reação “LA Taq” (Takara, JP) segundo o protocolo do fabricante. A termociclagem da reação foi: 95°C por 5 minutos;

35 ciclos com 30 segundos à 95°C (Desnaturação), 1 minuto à 48-55°C (Pareamento de *primers*), 16 minutos à 68°C (extensão) e um estágio final de extensão com 16 minutos à 68°C. O material foi purificado utilizando o Kit de purificação “QIAquick PCR purification”, da marca QIAGEN e sequenciado, seguindo protocolo descrito anteriormente, utilizando-se da técnica de *primer walking*.

Tabela 7. Sequência dos iniciadores utilizadas para amplificação do genoma mitocondrial

Iniciador	Sequência
H16SAmodD	5' – GCT ACC TTT GCA CAG TCA AAA TAC TGC GGC - 3'
HCOIIImodD	5' – CTT CTG ARG TAA TAA ATA RAA TTA TTC CTC A - 3'
H16SBmodD	5' – CTT ATT GAW ARA GAA GTT TGC GAC CTC GAT GTT G – 3'
HCOIImodD	5' – GGA CAT CAA TGA TAT TGA TCT TAT GAA TTY TCA G – 3'

Fonte: AMARAL, DT

4.4. Análises de Bioinformática

Análises de filogenia molecular. As sequências das luciferases, 28S rDNA e dos genes mitocondriais NADH₂ e COI foram alinhadas com uso do programa ClustalW (HIGGINS et. al, 1994).

A reconstrução das relações filogenéticas foi realizada utilizando-se o programa MrBayes 3.1. (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003) para utilização do método bayesiano (BI), PAUP 4.0 (SWOFFORD, 2002), para análises de Máxima Parcimônia (MP), e MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2013), para análises de Máxima Verossimilhança (ML) e *Neighbor-Joining* (NJ). Para as análises de ML, NJ e MP foram utilizados o *default* dos programas. Os valores foram calculados utilizando um *Bootstrap* de 1.000 repetições para os métodos ML, MP e NJ (FELSENSTEIN, 1985). Para as análises BI foram realizadas duas corridas independentes, começando com uma árvore aleatória, utilizando o modelo MTMam de substituição de aminoácidos e SYM+G para substituições nucleotídicas para as luciferases e o modelo GTR + G + I para o gene NADH₂+28S e COI, obtidos pela *Web-tool* Phylemon 2.0 (SÁNCHEZ et al., 2011). Foram geradas árvore a cada 100 gerações. As primeiras 2.500 árvores foram descartadas e as árvores remanescentes foram concatenadas para criar a árvore consenso. A Tabela 8 mostra as espécies utilizadas como grupos externos e grupos complementares à análise.

Tabela 8 - Espécies utilizadas como grupo externo ou complementares no estudo filogenético com os genes NADH2 e 28S

Ordem	Família	espécie	n° Acesso no GenBank	
			NADH2	28S
	Elateridae	<i>Agrypnus murinus</i> (Linnaeus, 1758)	-	DQ198735.1
	Lampyridae	<i>Pyrocoelia rufa</i> (Olivier, 1886)	AF452048.1	-
		<i>Luciola cruciata</i> (Laporte, 1833)	-	AB232651
	Rhagophthalmidae	<i>Rhagophthalmus lufengensis</i> (Li & Ohba, 2008)	DQ888607.1	-
		<i>Rhagophthalmus ohbai</i> (Wittmer, 1994)	AB255748.1	-
Coleoptera	Cantharidae	<i>Cantharis rufa</i>	-	DQ198767.1
	Lycidae	<i>Conderis sp.</i>	-	AB232653
	Eucnemidae	<i>Byoxilus sp</i>	-	AB232648
	Throscidae	<i>Trixagus turgidus</i> (Hisamatsu, 1985)	-	AB232655
	Mordellidae	<i>Mordella atrata</i> (Melsheimer, 1845)	FJ859904.1	-
	Gyrinidae	<i>Macrogyrus oblongus</i> (Boisduval, 1835)	-	NC013249

Fonte: AMARAL, DT

4.4.2. Montagem dos genomas mitocondriais e análises filogenéticas

As sequências obtidas no sequenciamento foram montadas e alinhadas manualmente. Os genes de tRNA foram identificados utilizando o software tRNAscan-SE (LOWE; EDDY, 1997) ou manualmente. Os alinhamentos e demais métodos de análises filogenéticas foram os mesmos descritos anteriormente. A Tabela 9 mostra as espécies utilizadas como grupos externos e grupos complementares à análise.

Tabela 9. Espécies utilizadas como grupos externos e grupos complementares nos estudos de filogenia com o genoma mitocondrial completo

Ordem	Família	Espécie	Genbank
	Elateridae	<i>Pyrophorus divergens</i>	NC_009964
	Lampyridae	<i>Pyrocoelia rufa</i> (Olivier, 1886)	NC_003970
	Rhagophthalmidae	<i>Rhagophthalmus lufengensis</i>	NC_010969
		<i>Rhagophthalmus ohbai</i>	NC_010964
Coleoptera	Cantharidae	<i>Cantharis pellucida</i>	HQ232817
	Lycidae	<i>Merolycus dentipes</i>	HQ232814
	Drilidae	<i>Drilus flavescens</i>	HQ232815

	Eucnemidae	<i>Melasis buprestoides</i>	HQ232813
	Limnichidae	<i>Limnichidae sp.</i>	JQ034416
	Chrysomelidae	<i>Crioceris duodecimpunctata</i>	NC_0033372
Lepidoptera	Bombycidae	<i>Bombyx mori</i>	AB083339
Diptera	Muscidae	<i>Haematobia irritans irritans</i>	NC_007102
	Keroplastidae	<i>Arachnocampa flava</i>	NC_016204

Fonte: AMARAL, DT

4.5. Caracterização bioquímica das luciferases e seus mutantes

As luciferases clonadas foram expressas, extraídas e caracterizadas bioquimicamente, com a determinação dos seguintes parâmetros: espectros de bioluminescência, atividade específica, pHótimo, medidas de K_M para ATP e luciferina.

4.5.1. Expressão do gene das luciferases recombinantes e mutantes

Colônias de *Escherichia coli* BL 21 foram transformadas com o vetor (vetores pSport ou pCold II) contendo a luciferase recombinante e então foram colocadas para crescer em 5 mL de meio LB líquido com 5 μ L de ampicilina 100 μ g/mL a 37°C *overnight*. A cultura foi transferida para 500 mL de meio LB líquido. O material permaneceu na incubadora a 37°C a 200 rpm até atingir absorvância a 600nm = 0,4 e então foi acrescentado 200 μ L de IPTG 1M. As culturas foram então induzidas para expressão de proteínas a 18° C a 150 rpm até atingir absorvância em 600nm = 1,7 - 1,9.

4.5.2. Medidas de bioluminescência *in vivo*

Com a intenção de determinar se a luciferase foi realmente expressa na forma ativa, foram realizadas medidas de bioluminescência *in vivo* das culturas. A luminescência *in vivo* foi medida no luminômetro 2200R (ATTO, Japão) após misturar 90 μ L de cultura de bactérias induzidas e 10 μ L de luciferina 10 mM pH 5 em tubo de luminômetro. A leitura da atividade foi feita em cps (*counts* por segundo).

4.5.3. Extração das luciferases recombinantes e mutantes

Volumes de 200 mL de culturas induzidas foram transferidos para tubos tipo Falcon, os quais foram centrifugados a 2.500g por 15 minutos a 4°C. As células coletadas foram ressuspensas em 10 mL de tampão de extração (Tris-HCl 50 mM pH 7,5) gelado e 200 µL de coquetel inibidor de proteases juntamente com 20 µL de DTT 1M. A lise celular foi realizada por ultrasonicação. A amostra lisada foi centrifugada a 15.000g a 4°C por 20 minutos. O sobrenadante (extrato bruto) foi coletado em microtubos previamente gelados. Os mutantes de *P. termitilluminans* passaram por uma fase de purificação, descrita a seguir.

4.5.4. Purificação de proteína por cromatografia de afinidade

Este método se baseia na afinidade da cauda de histidina, a qual é presente no vetor de expressão pCold, fundida a proteínas recombinantes por íons de níquel (Ni-NTA) imobilizados em uma resina de agarose. A resina de Ni-NTA-Agarose (QIAGEN) foi equilibrada com tampão de extração (Tris-HCl 50 mM pH 7,5), adicionada ao extrato bruto e submetida a agitação moderada por 45 min a 4°C para total ligação da cauda de histidina da proteína a resina. A resina+proteína foi aplicada em uma mini coluna e lavada com 10 ml de tampão de lavagem. A proteína recombinante foi eluída da resina com tampão de eluição em alíquotas de 1 mL/cada. Cada alíquota foi analisada em ensaio padrão em luminômetro e as frações com maior atividade foram dialisadas em tampão de diálise.

4.5.5. Medida das atividades de luciferases

As atividades enzimáticas das luciferases *in vitro* foram realizadas por meio da medida de luminescência em luminômetro 2200R (ATTO, Japão), misturando-se em tubo de luminômetro 85 µL de Tris-HCl 0,10 M pH 8,0; 5 µL de extrato bruto, 5 µL luciferina 10 mM e 5 µL de solução contendo MgSO₄ 80 mM e ATP 40 mM.

4.5.6. Espectros de bioluminescência

Os espectros de bioluminescência foram registrados utilizando o espectrofluorímetro Hitachi F4500, com a janela de excitação fechada, abertura da janela de emissão igual a 20

nm e velocidade de varredura de 2.400 nm/min. A enzima expressa teve seus espectros medidos em 200 μ L de tampão Tris-HCl 0,10M pH 8,0, 50 μ L luciferase, 25 μ L luciferina 10 mM e 25 μ L de ATP 40 mM e MgSO₄ 80 mM.

4.5.7. Quantificação de proteínas totais

A quantificação de proteínas totais para medidas de atividade específica foi realizada pelo método de Bradford, que apresenta como características, maior rapidez, simplicidade e menor interferência. Foram adicionados 25 μ L de amostra em 1,25 mL de reagente Bradford (corante Comassie Blue), o qual reage com a proteína e permite obter a concentração de proteína total presente na amostra a partir da absorvância de 595 nm. Inicialmente, foi construída uma curva-padrão de concentração de proteína soroalbumina bovina (BSA) e o fator de absorvância foi obtido. A concentração de proteínas totais foi dada pela expressão [Proteína] = F X Abs média, onde F é igual a $\Delta x / \Delta y$ e obtido por pontos da curva-padrão.

4.5.8. Determinação dos K_M para ATP e Luciferina

O K_M para ATP foi obtido por meio da medida da bioluminescência em diferentes concentrações de ATP (4 mM; 3 mM; 2 mM; 1 mM; 0,7 mM; 0,3 mM; 0,1 mM; 0,03 mM e 0,01 mM) junto com uma concentração saturante de luciferina (1 mM). Os valores de concentração e atividade luminescente, então, foram inseridos em gráfico para elaboração de uma curva de saturação. Os inversos destes valores foram plotados no gráfico de Lineaweaver-Burk para obtenção dos valores de K_M . Para o cálculo do K_M para luciferina, foi utilizado o mesmo procedimento com diferentes concentrações de luciferina (1 mM; 0,5 mM; 0,3 mM; 0,07 mM, 0,03 mM, 0,01 mM, 0,003 mM e 0,001 mM) na presença de ATP em concentração saturante (2 mM).

5. RESULTADOS

5.1. Clonagem e caracterização dos cDNAs das luciferases de Elateridae

5.1.1. *Fulgeochlizus bruchi*

Fulgeochlizus bruchi é uma espécie pertencente à família Elateridae, que na fase adulta, apresenta apenas a lanterna abdominal funcional, com vestígios de lanternas na região dorsal (Figura 2) (ROSA et al., 2010). A lanterna abdominal exibe uma luminescência verde (540 nm), ativa durante o vôo ou corte sexual, enquanto que as lanternas vestigiais presentes no protórax do indivíduo apresentam uma luminescência fraca apenas no início de sua fase adulta, perdendo-a logo em seguida (VIVIANI comunicação pessoal). A possível função atribuída a esta lanterna está relacionada a atração sexual na espécie, uma vez que os machos são atraídos pelas lanternas das fêmeas pousadas na vegetação, comportamento que pode ser mimetizado por *sticks* luminescentes com emissão no comprimento de onda do verde, similar a luminescência emitida pelas fêmeas. Quando os machos se aproximam do bastão luminoso expõem suas genitálias e tentam copular (VIVIANI, comunicação pessoal).

Figura 2 - *Fulgeochlizus bruchi* adulto : (A) Dorsal; (B) Ventral; (C) Ventral , com a lanterna exposta e ativa, e (D) Ventral, mostrando bioluminescência emitida pelas partes não-esclerotizadas.



Fonte: adaptado de AMARAL et al. (2012)

Sequência do cDNA e da proteína. Realizamos a construção de uma biblioteca a partir do mRNA das lanternas de cinco adultos de *F. bruchi*, resultando em uma biblioteca com aproximadamente 9.500 cfu, sendo que três clones positivos para a luciferase foram isolados, todos representando a mesma isoenzima.

O cDNA da luciferase abdominal de *F. bruchi* possui 1.845 pb, com 110 pb 5' UTR e 109 pb 3'UTR, com uma cauda poli-A contendo 15 pb e o sinal de poliadenilação. A região codificante corresponde a 1.626 pb, totalizando 542 aminoácidos.

A luciferase de *F. bruchi* apresenta elevada identidade com luciferases de diferentes espécies de elaterídeos como a luciferase verde dorsal do besouro panamenho *P. angustus* (86%); as luciferases verdes dorsais de *P. mellifluus* e *P. plagiophthalmus* (85.6%); a luciferase abdominal verde amarelada de *P. plagiophthalmus* (84,7%); as luciferases ventrais de *P. plagiophthalmus* e *P. mellifluus*, (84.5% e 84%, respectivamente); a luciferase larval de *P. termitilluminans* (83%); a luciferase verde-amarelada de *P. angustus*, clonada por Oba et al. (2010a) e com a luciferase laranja de *P. angustus* clonada pelo nosso grupo (80,8% e 81%, respectivamente). Uma menor identidade pode ser observada em relação às luciferases das outras duas famílias (Lampyridae e Phengodidae). A luciferase de *F. bruchi* apresenta 50% de identidade com as luciferases dos fengodídeos *Phrixotrix hirtus* e com a luciferase do fengodídeo asiático *Rhagophthalmus ohbai* e 48% de identidade com a luciferase do lampirídeo *Photinus pyralis* (Tabela 10).

Tabela 10 – Identidade de diversas luciferases clonadas e espectros

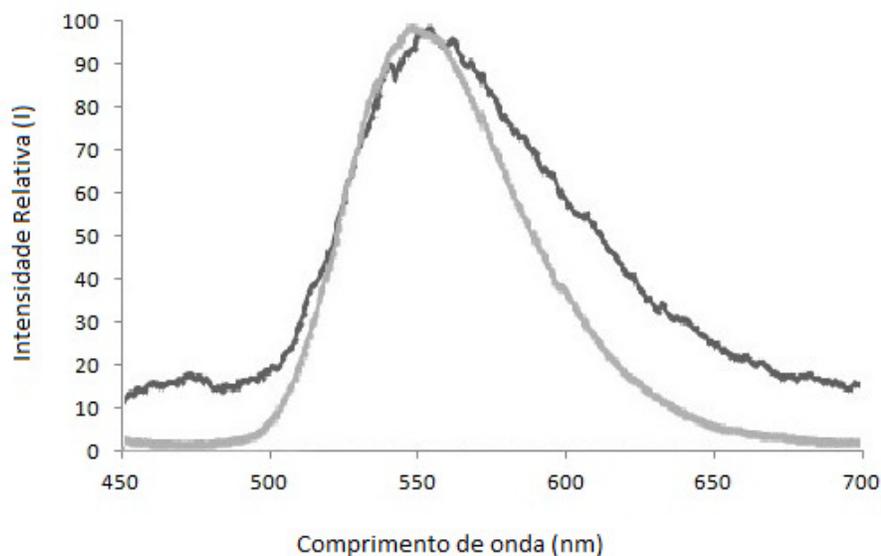
Luciferase	% identidade com <i>F. bruchi</i>	Resíduos	λ_{BL} (nm)
Elateridae			
<i>Pyrophorus plagiophthalmus dGR</i>	85	543	546
<i>Pyrophorus plagiophthalmus dYG</i>	84.8	543	560
<i>Pyrophorus plagiophthalmus vYG</i>	84.7	543	563
<i>Pyrophorus plagiophthalmus vYE</i>	84.5	543	578
<i>Pyrophorus plagiophthalmus vOR</i>	84	543	593
<i>Pyrophorus mellifluus dGR</i>	85.6	543	549
<i>Pyrophorus mellifluus vGR</i>	84	543	554
<i>Pyrophorus angustus vYG</i>	80.8	543	566
<i>Pyrophorus angustus dGR</i>	86	543	536
<i>Pyrearinus termitilluminans</i>	83	543	534
<i>Pyrophorus angustus - MT</i>	81	543	589

<i>Fulgeochlizus bruchi</i>	-	542	540
Lampyridae			
<i>Photinus pyralis</i>	47	543	542
Phengodidae			
<i>Phrixotrix hirtus</i> lanterna cabeça	50	546	623

Fonte: adaptado de AMARAL et al. (2012)

Espectro de bioluminescência. O adulto de *F. bruchi* apresenta bioluminescência na região verde do espectro, com pico em 543 nm (COLEPICOLO et al., 1986). *In vitro*, em pH 8.0, a luciferase recombinante apresenta um espectro ligeiramente deslocado para o azul, com pico em 540 nm. Em pH acima de 10.0, o espectro sofre um alargamento de banda e um pequeno deslocamento para o vermelho (Figura 3).

Figura 3. Espectro de bioluminescência *in vitro* da luciferase recombinante de *F. bruchi*, em pH 8.0 (cinza) e em pH 10.0 (preto).



Fonte: adaptado de AMARAL et al. (2012)

5.1.2. *Pyrophorus angustus*.

A luciferase da lanterna abdominal da espécie *P. angustus* (Candèze, 1889) foi primeiramente clonada por Oba et al. (2010a), apresentando emissão na região do verde-amarelo (566 nm). A mesma espécie foi observada em área de Floresta Amazônica, na região

norte do estado do Mato Grosso, porém a luciferase abdominal emitia na região do laranja. Variações das cores da mesma lanterna na mesma espécie são comumente observadas dentro da família Elateridae, como foi discutido por Feder e Velez (2009) na espécie *P. plagiophthalmus*, sendo que as diferentes isoenzimas foram clonadas por Wood et al. (1989).

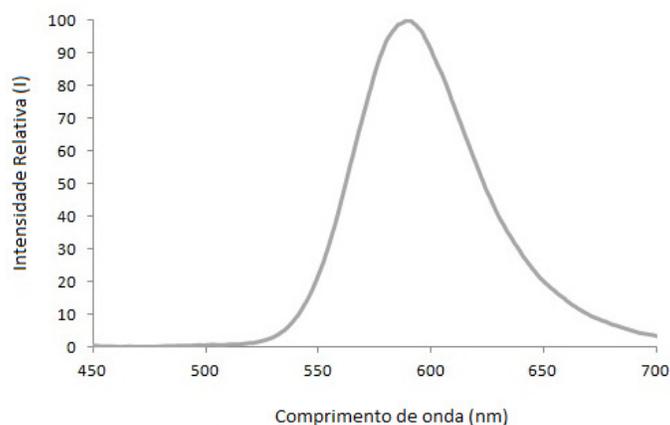
Sequência do cDNA e da proteína. Realizamos a construção de uma biblioteca de cDNA a partir das lanternas abdominais de três indivíduos adultos de *P. angustus*, resultando, em aproximadamente 8.000 cfu, das quais três clones positivos para o gene da luciferase foram isolados, todos representando a mesma isoenzima.

O cDNA da luciferase abdominal de *P. angustus* apresentou 1.710 pb, com 31 pb 5' UTR e 47 pb 3'UTR, com uma cauda poli-A contendo 16 pb e o sinal de poliadenilação. A região codificante corresponde a 1.632 pb, totalizando 543 aminoácidos.

A luciferase de *P. angustus* apresentou 91% e 87% de identidade com as luciferases abdominal e dorsal de *P. angustus* clonadas por Oba et al. (2010a). Em relação com a luciferase laranja de *P. plagiophthalmus*, a identidade foi de 83,6%.

Espectro de bioluminescência. A luciferase abdominal recombinante de *P. angustus*, apresentou espectro de bioluminescência *in vitro*, no laranja, com pico em 589 nm (Figura 4). Não foi observado alteração considerável do espectro em pH 10,0, provavelmente devido ao seu espectro estar mais deslocado para o vermelho.

Figura 4 - Espectro de bioluminescência *in vitro* da luciferase recombinante de *P. angustus*, em Tris-HCl pH 8.0



Fonte: AMARAL, DT

5.1.3. Comparação das propriedades cinéticas das luciferases clonadas

As propriedades cinéticas das luciferase recombinantes de *F. bruchi* e *P. angustus* foram comparadas com aquelas da luciferase de *P. termitilluminans* e outras clonadas. Os valores de K_M obtidos, para o extrato bruto, foram próximos: 140 μM e 160 μM para ATP e de 12 μM e 17 μM para luciferina para as luciferases de *F. bruchi* e *P. angustus*, respectivamente. A luciferase de *F. bruchi* apresentou o menor valor observado para K_M de luciferina entre as luciferases de elaterídeos (Tabela 11). Estes valores são comparáveis aos de outras luciferases de elaterídeos e lampirídeos. O valor de K_M para ATP mostrou-se próximo ao valor da luciferase vermelha de *P. hirtus* e da luciferase de *C. distinctus*, enquanto que o K_M para luciferina mostrou-se próximo ao valor da luciferase vermelha de *P. hirtus* (VIVIANI et al., 1999b; VIVIANI et al., 2004). *In vitro*, a luciferase de *F. bruchi* apresenta um baixo k_D (constante de decaimento), comparável a constante de *P. termitilluminans* (Tabela 11). Não foram realizados estudos de cinética com a luciferase de *P. angustus* clonadas por Oba et al. (2010a), assim não foi possível comparar a relação entre K_M s e espectros de bioluminescência entre estas luciferases e a nossa recentemente clonada, *P. angustus*.

A luciferase de *F. bruchi* apresentou o maior pH ótimo entre todas as luciferases clonadas até o momento, com valor próximo de 9.0 Para melhor compreender tal característica, foram analisados os K_M para a luciferase de *F. bruchi* utilizando tampão CHES pH 9.0. Os resultados obtidos indicaram um aumento dos valores de K_M tanto para a luciferina, quanto para ATP (Tabela 11).

Tabela 11 - Propriedades físico-químicas das luciferases de Elateroidea clonadas

Luciferase	pH ótimo	K_M (μM)		k_D (10^{-4}s^{-1})	λ_{BL} (nm)
		Tris-HCl pH 8.0	CHES pH 9.0		
		Luciferina	ATP	Luciferina	ATP
Elateridae					
<i>Pyrophorus plagiophthalmus dGR</i>	8.2	23	-	-	546
<i>Pyrophorus plagiophthalmus dYG</i>	8.2	20	-	-	560

<i>Pyrophorus plagiophthalmus</i> vYG	8.2	-	-	-	-	-	563
<i>Pyrophorus plagiophthalmus</i> vYE	8.2	30	-	-	-	-	578
<i>Pyrophorus plagiophthalmus</i> vOR	8.0	29	-	-	-	-	593
<i>Pyrophorus mellifluus</i> dGR	-	-	-	-	-	-	549
<i>Pyrophorus mellifluus</i> vGR	-	-	-	-	-	-	554
<i>Pyrophorus angustus</i> vYG	7.0-8.0	-	-	-	-	-	566
<i>Pyrophorus angustus</i> dGR	7.5-8.5	-	-	-	-	-	536
<i>Pyrearinus termitilluminans</i>	8.2	80	370	-	-	63	534
<i>Fulgeochlizus bruchi</i>	9.0	12	140	74	1460	46	540
<i>Pyrophorus angustus</i> MT	8.5	17	160	-	-	-	589
Lampyridae							
<i>Photinus pyralis</i>	7.9	10	130	-	-	240	542
Phengodidae							
<i>Phrixotrix hirtus</i> lanterna da cabeça	8,2	7.5	240	-	-	200	623

Fonte: adaptado de AMARAL et al. (2012)

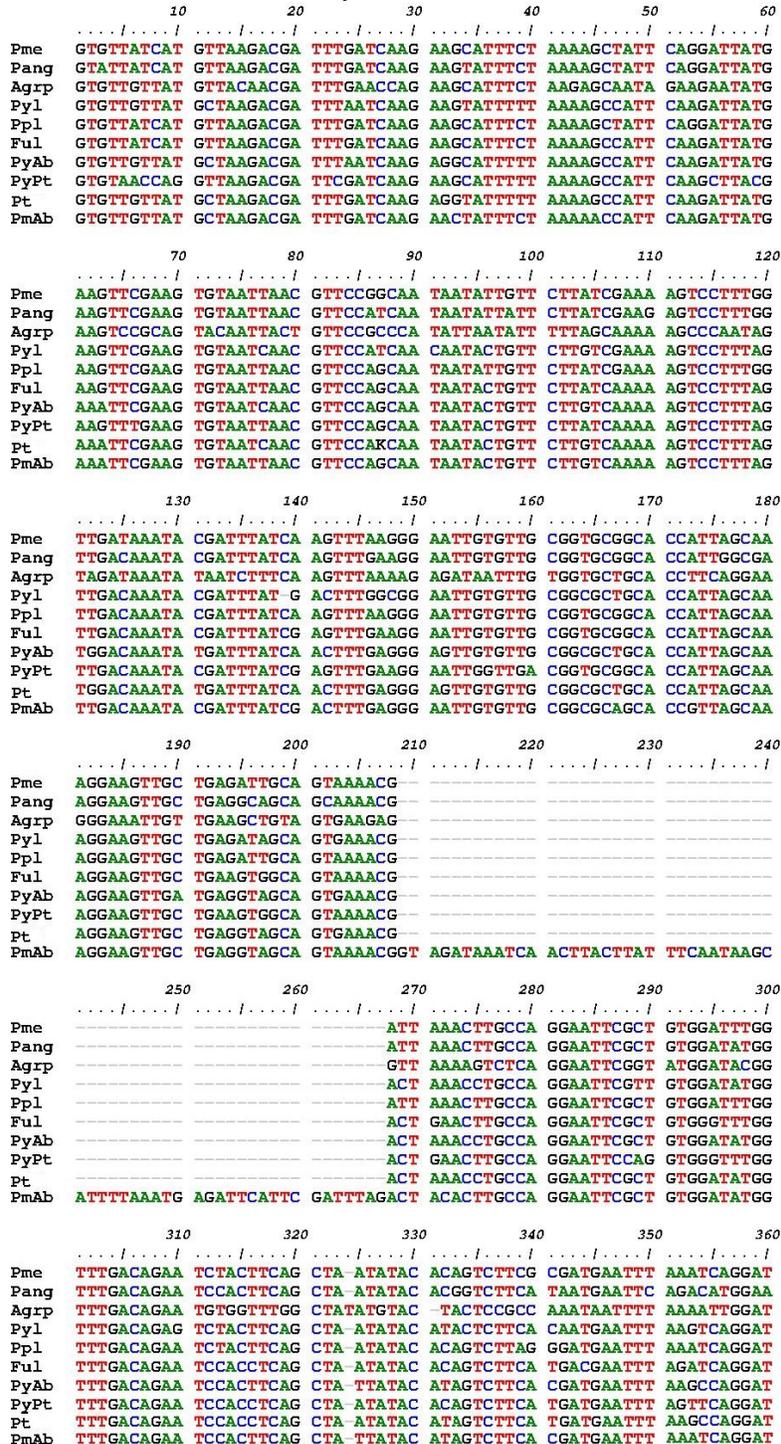
5.1.4. Luciferases das lanternas dorsal e ventral de adultos de *Pyrearinus termitilluminans* e de outros elaterídeos

Para as bibliotecas das luciferases ventral e dorsal de adultos de *P. termitilluminans* não foram obtidos clones positivos por *screening* funcional. Devido a isso, foram realizadas mini-preparações plasmidiais das colônias obtidas com intuito de possível clonagem pela técnica de PCR.

Os cDNAs das demais espécies foram sintetizados por meio do método de transcrição reversa, utilizando o kit "GoScript Reverse Transcription System", sendo amplificados por meio dos iniciadores para luciferase desenhados pelo nosso grupo (Tabela 2). Foi possível amplificar e sequenciar a região interna das luciferases abdominais de *P. micatus* e *Ptesimopsia* sp. e as luciferases do protórax e abdômen de *P. termitilluminans*, a partir das bibliotecas de cDNA previamente construídas. Foram obtidos cerca de 440 pb de cada uma das luciferases supracitadas, traduzindo um total de 144 aminoácidos, correspondentes a região entre os resíduos 262 e 401, anotados em relação a luciferase do *P. pyralis* (Figura 5).

Para a luciferase abdominal de *P. micatus*, utilizando as mesmas condições de PCR e dos mesmos iniciadores, obtivemos um fragmento com o tamanho de 490 pb, com o total de 163 aminoácidos traduzidos. Esse material foi amplificado e sequenciado mais duas vezes, porém o resultado apresentado mostrou novamente a existência de 59 pb sem homologia com as demais luciferases, no interior da sequência. A inserção desse segmento na região interna modificou os padrões de códons e causou a perda do sentido de leitura da mesma. As demais sequências mostraram-se conservadas em relação as demais luciferases de Elateridae.

Figura 5. Alinhamento das seqüências parciais de cDNA das luciferases clonadas de elaterídeos. (Pme – *Pyrophorus mellifluus*; Pang *Pyrophorus angustus*; Agrp – *Agrypnus binodulus*; Pyl – luciferase da larva de *Pyrearinus termitilluminans*; Ppl – *Pyrophorus plagiophthalmus*; Ful – *Fulgeochlizus bruchi*; PyAb – luciferase abdominal de *Pyrearinus termitilluminans*; PyPt – luciferase do protórax de *Pyrearinus termitilluminans*; Pt - *Ptsemopsia* sp.; PmAb - luciferase abdominal de *Pyrearinus micatus*).



Fonte: AMARAL, DT

5.1.5. Alinhamento das estruturas primárias: inferências estruturais, funcionais e evolutivas

Após a dedução das sequências de cDNA para as luciferases dos elaterídeos, fizemos multialinhamentos com a finalidade de obter informações filogenéticas e evolutivas, e sobre a relação entre estrutura/espectros de bioluminescência nas luciferases.

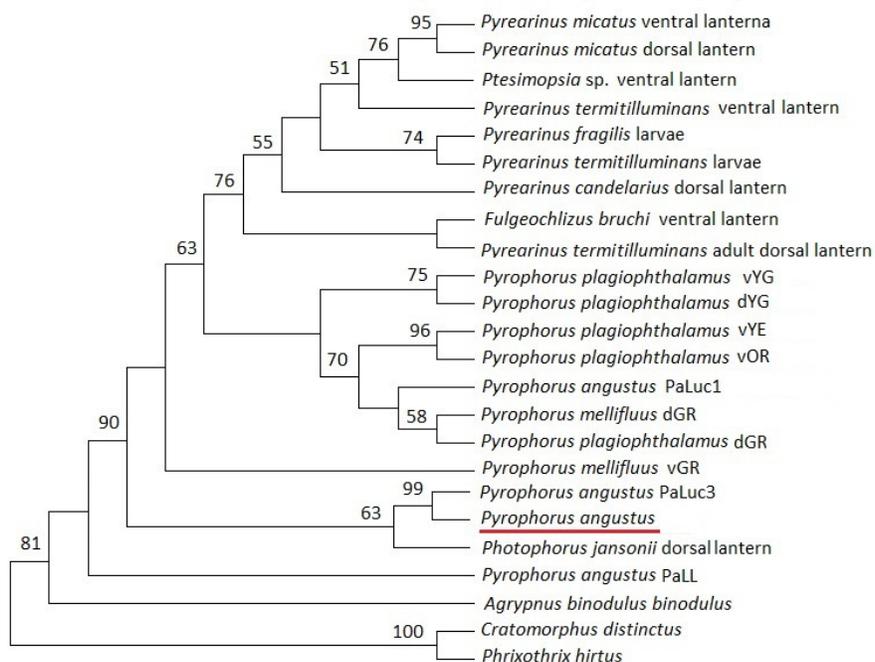
5.1.5.1. Comparação das isoenzimas de diferentes estágios de vida e lanternas de *P. termitilluminans*.

As sequências parciais das luciferases das lanternas da fase adulta de *P. termitilluminans* apresentam cerca de 95% de identidade; as luciferases da lanterna dorsal do adulto e a luciferase da larva apresentaram 88%, e a luciferase da lanterna abdominal do adulto e aquela da larva, 92%. Assim, as luciferases das lanternas do adulto mostraram maior identidade entre si, do que, por exemplo, a luciferase do protórax do adulto e do protórax da larva.

5.1.6. Relação entre as luciferases de Elateridae.

As árvores filogenéticas construídas a partir das sequências parciais das luciferases de elaterídeos, agruparam espécies diferentes no mesmo clado, assim como agrupou as luciferases ventral e dorsal juntas, não havendo distinção entre elas (Figura 8). As luciferases com espectros de bioluminescência similar, independentemente da lanterna, são agrupadas no mesmo clado. Esse efeito pode ser observado nas espécies *P. angustus*, *P. mellifluus* e *P. plagiophthalmus*, cujas luciferases apresentam um espectro de emissão entre 536 nm e 549 nm (Figura 6).

Figura 6. Árvore reconstruída usando o método BI para as sequências parciais de aminoácidos das luciferases clonadas de elaterídeos. A espécie grifada em vermelho refere-se a luciferase de *P. angustus* clonada pelo nosso grupo.



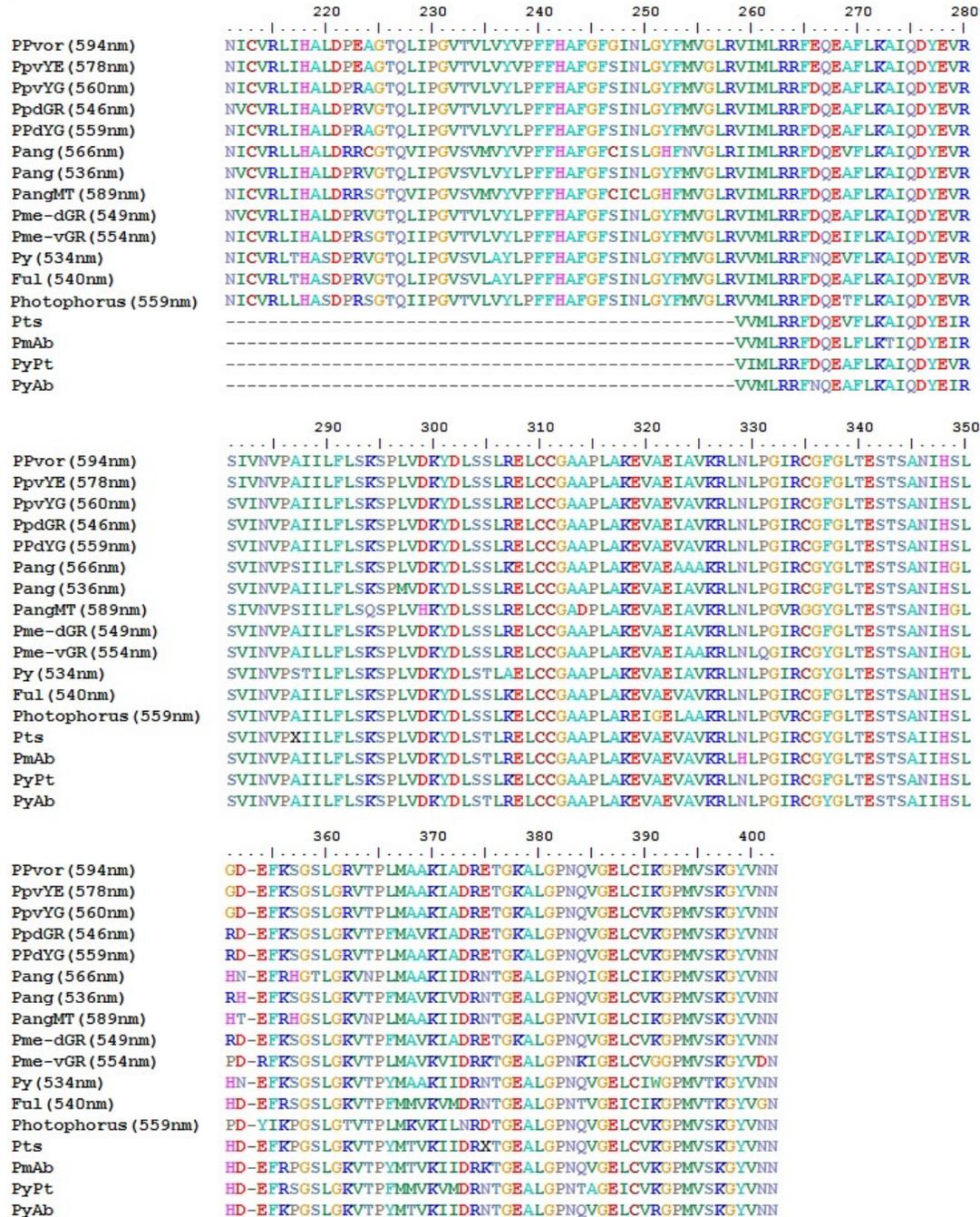
Fonte: AMARAL, DT

Apesar da luciferase larval de *P. termitilluminans* mostrar-se basal a luciferase ventral do adulto, não é possível afirmar um relação ontogenética entre elas, visto o possível efeito de recombinação intergênica, que promove o agrupamento entre luciferases que apresentam cores similares.

5.1.6.1. Relação entre estruturas primárias e espectros de bioluminescência em luciferases de elaterídeos.

O alinhamento gerado apresentou 192 aminoácidos, sendo que 144 são comuns a todas as luciferases estudadas. Esse alinhamento refere-se a região entre os resíduos 211 e 401, em relação a luciferase larval de *P. termitilluminans* (Figura 7), que corresponde a uma região bastante conservada na estrutura primária das luciferases de besouros, principalmente, quando sequências de luciferases da mesma família são comparadas (por exemplo Elateridae).

Figura 7 - Alinhamento das sequências parciais de aminoácidos das luciferases clonadas de elaterídeos. Nesse momento, foram excluídos as inserções de base na luciferase de PmAb, para correto alinhamento das luciferases (Pme-vGR- luciferase ventral de *Pyrophorus mellifluus*; Pme-dGR- luciferase dorsal de *Pyrophorus mellifluus*; Pang - *Pyrophorus angustus*; PangMT - luciferase laranja de *Pyrophorus angustus*; Pte - luciferase da larva de *Pyrearinus termitilluminans*; PpvOR - luciferase laranja de *Pyrophorus plagiophthalmus*; PpvYE - luciferase amarela de *Pyrophorus plagiophthalmus*; PpdGR - luciferase verde de *Pyrophorus plagiophthalmus*; PpvYG - luciferase verde-amarelada de *Pyrophorus plagiophthalmus*; Photophorus - *Photophorus jansonii*; Ful - *Fulgeochlizus bruchi*; PyAb - luciferase abdominal de *Pyrearinus termitilluminans*; PyPt - luciferase do protórax de *Pyrearinus termitilluminans*; Pts - *Ptemopsia* sp.; PmAb - luciferase abdominal de *Pyrearinus micatus*).



Fonte: AMARAL, DT

A partir do alinhamento acima, foi possível observar que alguns resíduos são compartilhados entre luciferases de diferentes cores, embora estes possam diferir em luciferases da mesma cor, como os resíduos I/V/A/L323. Isso sugere que essas posições podem não apresentar função importante na modulação dos espectros de emissão de luminescência. Algumas outras substituições ocorrem, como é possível observar na figura 6, apenas na luciferase larval de *P. termitilluminans*, única isoenzima larval de Elateridae clonada até o momento, como os resíduos T288, 307A e 390W.

A comparação das sequências primárias das luciferases clonadas de diferentes isoenzimas do elaterídeo Jamaicano *P. plagiophthalmus*, mostrou que a maioria das mutações responsáveis pelas variações dos espectros entre o verde e o laranja, estão na região entre os resíduos 220-247 (WOOD et al., 1990). Comparando esta luciferases com as demais do grupo (Figura 7), observamos que os resíduos 223EA224 e E266 ocorrem apenas nas luciferases laranja e amarela de *P. plagiophthalmus*. Observamos também, que a posição 247, possui uma serina nas luciferases de elaterídeos com espectros mais deslocados para o azul, uma fenilalanina nas luciferases verde-amarelas e uma glicina nas luciferases laranja. Recentemente, a comparação com a luciferase do lampirídeo *A. vivianii*, que também emite luz verde-azulada, mostrou a presença de S250 nesta posição (VIVIANI et al., 2011). Na luciferase laranja de *P. plagiophthalmus* observa-se uma glicina, porém na verde-amarelada e laranja de *P. angustus* observamos a presença de cisteína nesta posição (C247).

Nesse alinhamento, podemos observar resíduos que são exclusivos à luciferase laranja de *P. angustus*, como C249, 335, T352, entre outros, os quais estão dentro ou próximos a regiões de importância para modulação de cores, como o *loop* 223 e o *loop* 351-360.

5.2. Efeito da mutação S247F na luciferase de *P. termitilluminans*

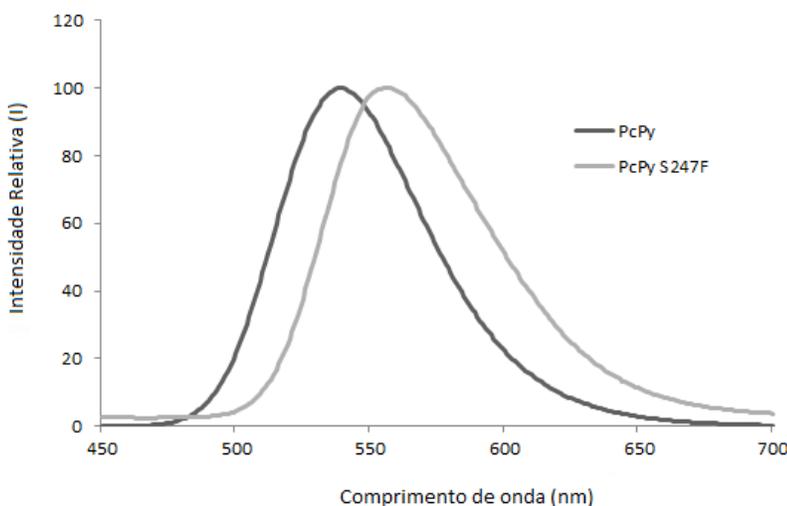
Considerando que a posição 250 apresenta uma serina nas luciferases com espectro mais deslocado para o verde, uma fenilalanina nas verde-amarelas e uma glicina na luciferase laranja (WOOD et al., 1989; VIVIANI et al., 2013), resolvemos investigar a importância desta substituição na determinação dos espectros em elaterídeos.

A mutação S250F na luciferase de *P. termitilluminans* resultou em deslocamento do espectro do verde (534 nm) para o verde-amarelo (557 nm), além de um alargamento do espectro (Figura 8). Com intuito de observar se essa luciferase teve sua sensibilidade

espectral afetada, o espectro foi medido também em tampão fosfato pH 6.0, entretanto não foi observada alteração no espectro.

Os ensaios de cinética do mutante PcPy S247F foram realizados com a luciferase purificada pelo método de cromatografia de afinidade em resina de níquel-agarose, seguido de diálise. Os valores de K_M obtidos foram 670 μM para ATP e 56 μM para luciferina. Estes valores indicam uma grande diminuição de afinidade da luciferase mutante para substrato ATP, mas pouca mudança para a luciferina.

Figura 8 - Espectro de bioluminescência *in vitro* da luciferase recombinante de *P. termitilluminans* (PcPy) e do mutante Py S247F.



Fonte: AMARAL, DT

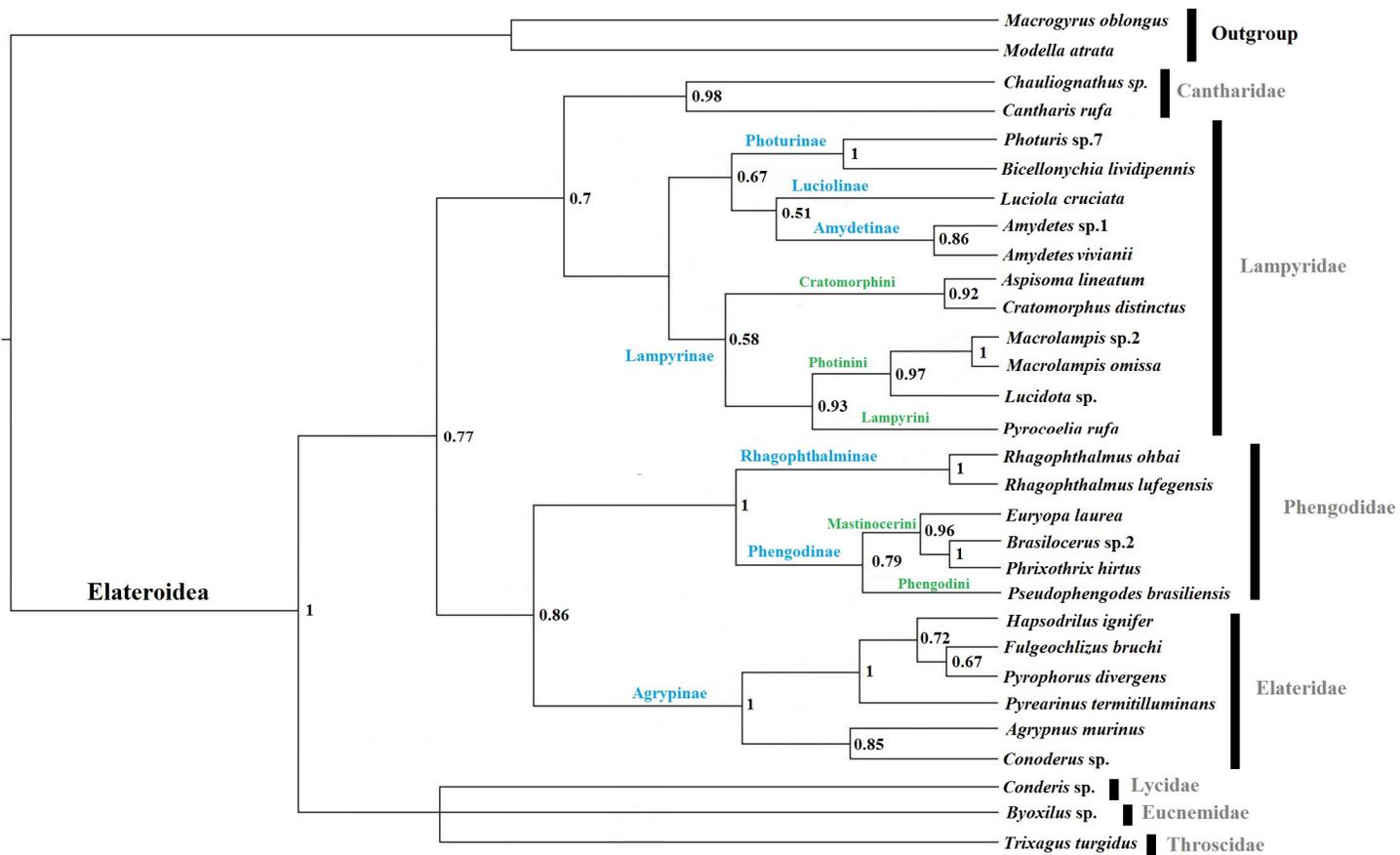
5.3. Filogenia Molecular de Elateroidea

5.3.1. Filogenia baseada nos genes mitocondrial NADH2, nuclear 28S e sequências primárias das luciferases

A análise da superfamília Elateroidea usando o gene mitocondrial NADH2 para 15 taxa e o gene nuclear 28S para 18 taxa, confirmou a monofilia de Elateroidea com alto suporte de *bootstrap* para os métodos NJ, MP e BI. O alto valor de suporte para os ramos (aproximadamente 95% para NADH2 e 100% para 28S rRNA), obtidos nessas análises (Figura 9, 10, 11), suporta a monofilia dos clados que incluem Elateridae, Phengodidae, Lampyridae, Cantharidae, Eucnemidae, Lycidae e Throscidae e a relação entre essas famílias.

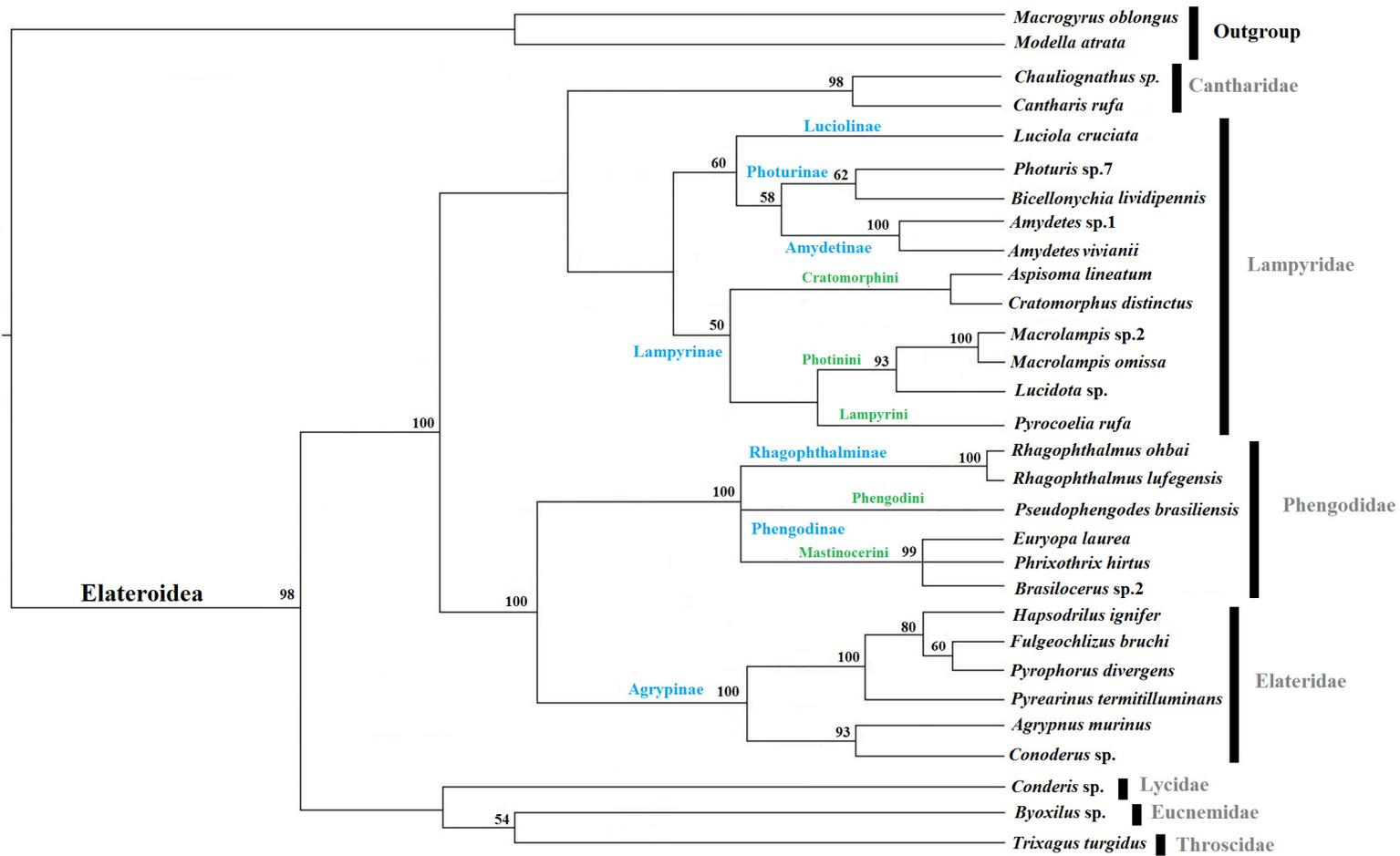
As relações entre os grupos-irmãos Elateridae e Phengodidae e entre Cantharidae e Lampyridae, apresentaram valores elevados de suporte nas análises com os genes mitocondrial e nuclear. Por outro lado, a análise filogenética baseada exclusivamente em sequências primárias de luciferases clonadas, discutida anteriormente, mostraram Phengodidae e Lampyridae como grupos-irmãos (Figura 12). Teste com sequências nucleotídicas dos genes das luciferases foram realizados mostrando uma topologia idêntica a de sequências de aminoácido (dados não mostrados). Porém dois valores de suporte tornaram-se mais robustos, o valor entre *Brasilocerus* sp.2 e *Taxinomastinocerus* sp. (de 0,76 para 0,95) e entre *Luciola parvular* e *Luciola unmunsana* (de 0.77 para 0.89).

Figura 9 - Árvore filogenética utilizando o método Bayesiano em Elateroidea, construída a partir da análise do gene 28S rRNA e gene mitocondrial NADH2. Os valores entre os ramos representam a probabilidade posterior.



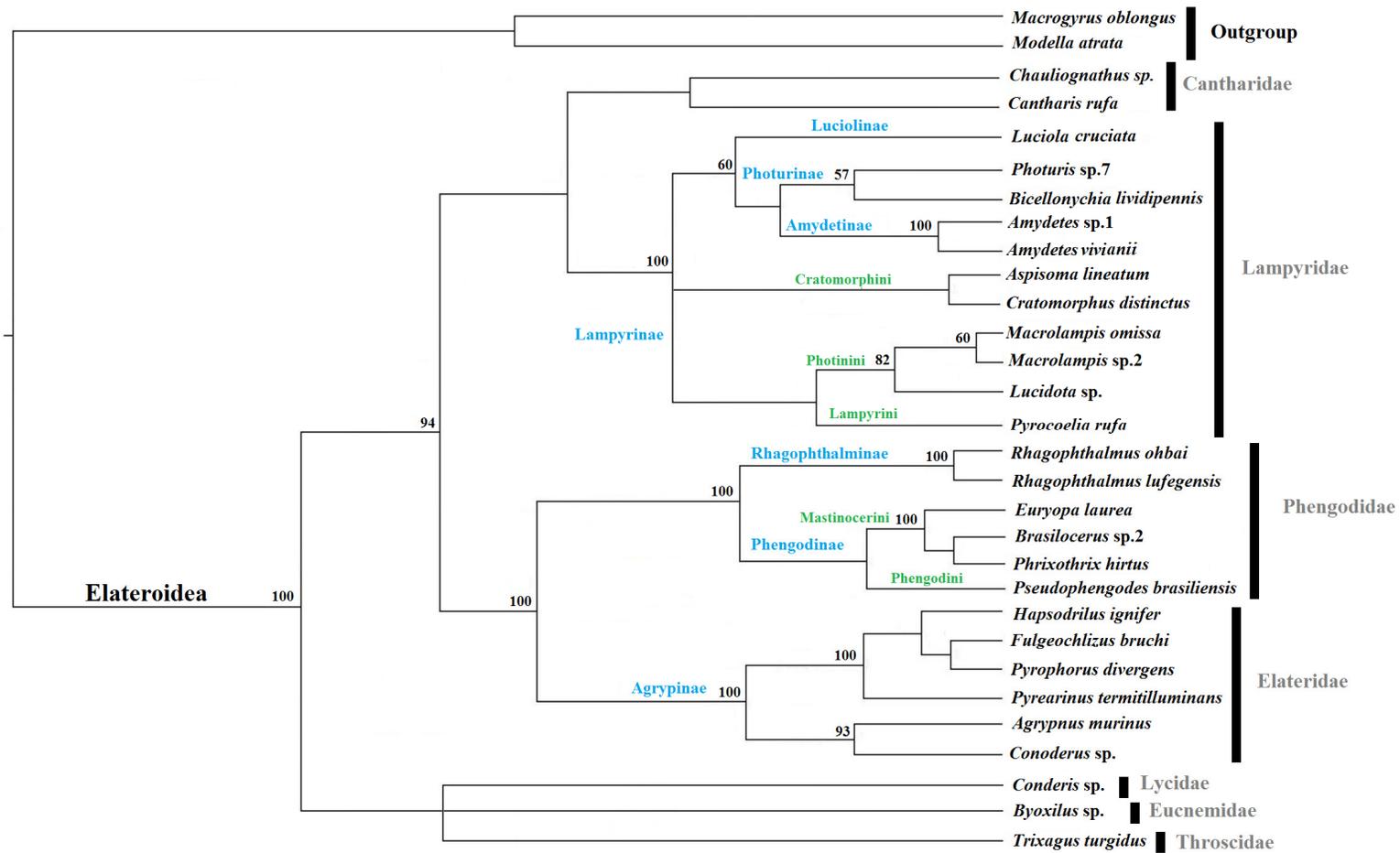
Fonte: adaptado de AMARAL et al. (2014)

Figura 10 - Árvore filogenética utilizando o método de NJ em Elateroidea, construída a partir da análise do gene 28S rRNA e gene mitocondrial NADH2. Os valores acima dos ramos são os valores de *bootstrap*.



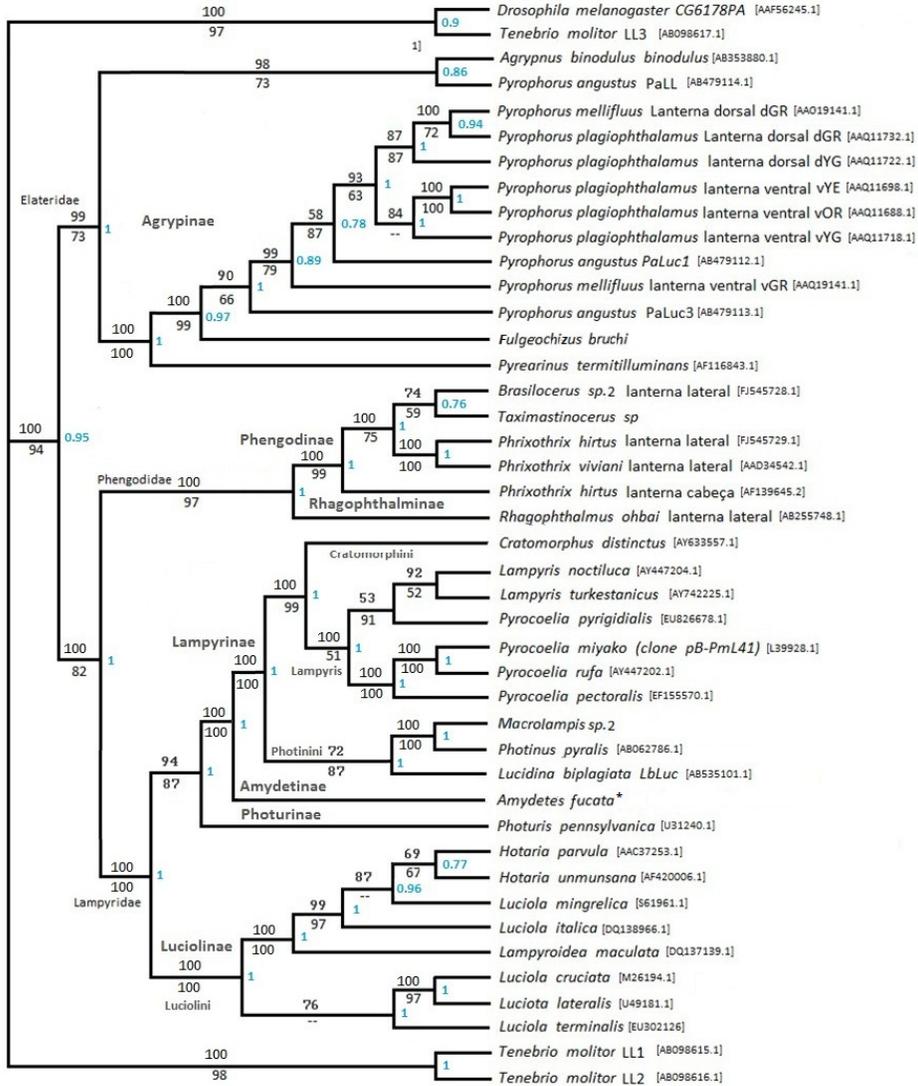
Fonte: adaptado de AMARAL et al. (2014)

Figura 11 - Árvore filogenética utilizando o método de Máxima Parcimônia em Elateroidea, construída a partir da análise do gene 28S rRNA e o gene NADH2. Os valores acima dos ramos são os valores de *bootstrap*.



Fonte: adaptado de AMARAL et al. (2014)

Figura 12 - Árvore filogenética construída a partir de sequências primárias de aminoácidos das luciferases clonadas. Os valores de *bootstrap* acima e abaixo dos ramos representam os valores obtidos pelos métodos de NJ (*Neighbor-joining*) e MP (Máxima parcimônia), respectivamente. Os valores em azul indicam a probabilidade posterior obtida pela Inferência Bayesiana.



Fonte: adaptado de AMARAL et al. (2014)

Tabela 12- Frequência das relações entre os grupos utilizando diferentes metodologias.

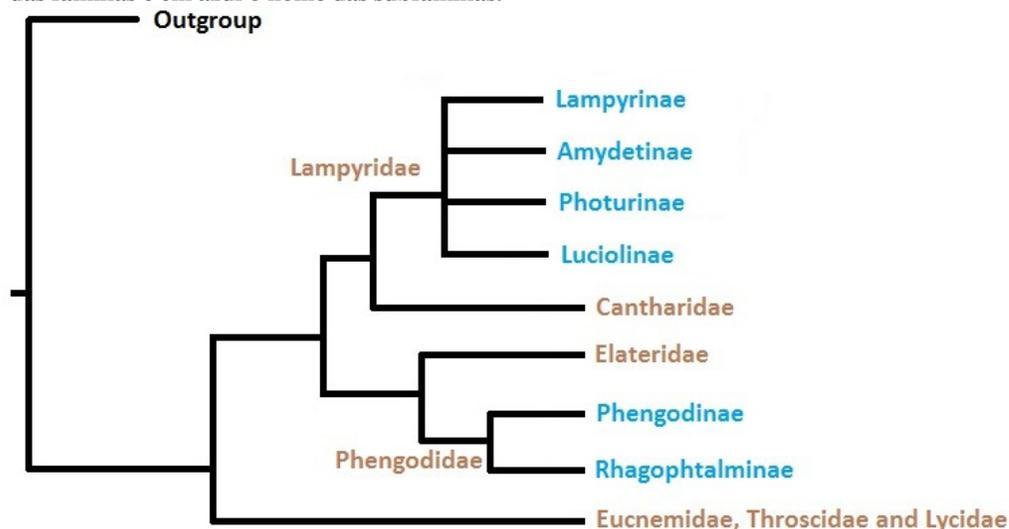
Alinhamentos Métodos/ Análises	Elateridae + Phengodidae	Lampyridae + Cantharidae	Eucnemidae + Throscidae	Amydetinae + Photurinae	Lampyrinae + Amydetinae + Photurinae (Luciolinae como grupo-irmão)	Lampyrini + Photinini	Monofilia Lampyrinae	Rhagophthalminae + Phengodinae
NADH2+28S								
MP	Y	Y	Y	Y	N	N	N	Y
NJ	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	N
BI	Y	Y	N	N	N	Y	Y	Y
NADH2								
MP	Y	Y	-	Y	Y	Y	Y	Y
NJ	Y	Y	-	Y	Y	Y	Y	N
BI	Y	Y	-	Y	Y	Y	Y	Y
28S								
MP	Y	Y	Y	Y	N	-	Y	-
NJ	Y	Y	N	Y	N	-	N	-
BI	Y	Y	N	Y	N	-	N	-
Luciferasas								
MP	N	-	-	N	Y	N	Y	Y
NJ	N	-	-	N	Y	N	Y	Y
BI	N	-	-	N	Y	N	Y	Y

Y, o método foi capaz de recuperar a relação; N, o método não foi capaz de recuperar a relação; -, dados insuficientes.

Fonte: adaptado de AMARAL et al. (2014)

A partir da tabela 12, criamos um cladograma resumindo os nossos principais resultados (figura 13).

Figura 13 - Cladograma resumindo os dados obtidos por diferentes métodos de análise e utilizando os marcadores 28S, NADH2 e sequência primária das luciferases, com suporte de 75% de todas as análises. A construção foi baseada sobre a tabela 12. Na cor vermelha o nome das famílias e em azul o nome das subfamílias.



Fonte: adaptado de AMARAL et al. (2014)

5.3.2. Análises filogenéticas a partir do genoma mitocondrial completo

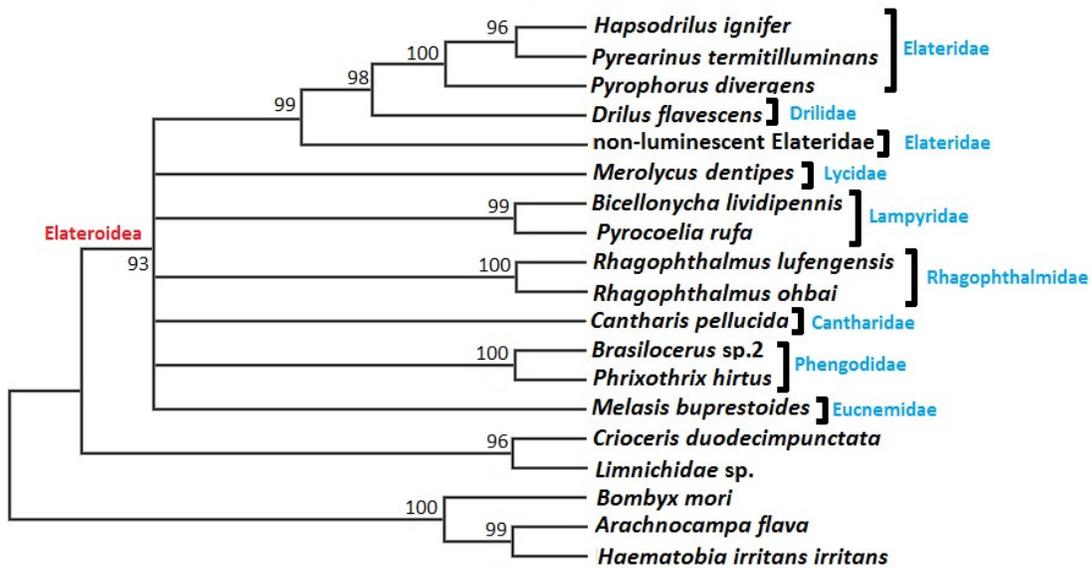
As análises filogenéticas com os genomas mitocondriais foram realizadas por meio dos métodos BI e ML utilizando os 13 genes codificantes concatenados. As análises com o método ML não foram capazes de mostrar a relação entre as famílias bioluminescentes devido aos baixos valores de suporte de ramos (Figura 14). A análise Bayesiana recuperou a monofilia da superfamília Elateroidea (Figura 15). Os resultados agruparam no mesmo grupo, ((Lampyridae, Lycidae), ((Phengodidae, Rhagophthalmidae), Cantharidae)), além disso, a árvore reconstruída demonstrou a proximidade entre as famílias Phengodidae e Lampyridae, tal como discutido por Crowson (1972), Lawrence e Newton (1995), Beutel (1995) e Timmermans e Vogler (2012), e a família Elateridae em um grupo independente.

Na família Elateridae, as espécies luminescentes foram agrupadas no mesmo clado (*Pyrearinus*, (*Hapsodrilus*, *Pyrophorus*)). O Elateridae não-luminescente formou um clado independente da subfamília Agrypninae. Porém, entre os clados da espécie não-luminescente

e luminescentes de elaterídeos, foi inserido um ramo contendo a espécie *Drilus flavescens*, um Drilidae (Figuras 14 e 15).

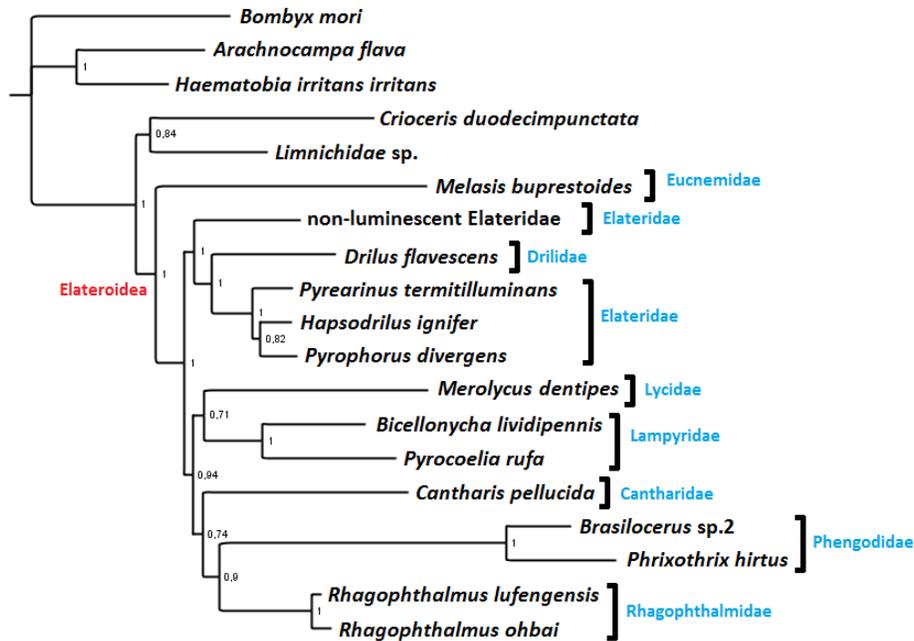
Nossos resultados também mostraram a família Eucnemidae em um clado basal de Elateroidea, mostrando-se um parente distante das famílias luminescentes, como discutido por Bocakova et al. (2007), Kundera e Bocak (2011) e Amaral et al. (2013).

Figura 14- Árvore filogenética reconstruída por meio do método de ML usando 13 genes mitocondriais codificantes concatenados. A árvore mostra as relações entre as famílias pertencentes a Elateroidea. Os valores sob os ramos são referentes aos valores de *bootstrap*.



Fonte: AMARAL, DT

Figura 15- Árvore filogenética reconstruída por meio do método Bayesiano usando 13 genes mitocondriais codificantes concatenados. A árvore mostra as relações entre as famílias pertencentes a Elateroidea. Os valores entre os nós são probabilidades posteriores.



Fonte: AMARAL, DT

5.3.3. Lampyridae

Onze espécies da família Lampyridae foram analisadas, nove delas da região Neotropical e duas da região Paleártica, disponível na literatura (*Pyrocoelia rufa* e *Luciola cruciata*) (BAE et al., 2004; SAGEGAMI-OBA et al., 2007b.). Os nossos dados a partir dos genes 28S e NADH2 e as sequências de luciferases clonadas confirmam a monofilia de Lampyridae (KUNDRATA; BOCAK, 2011; STANGER-HALL et al., 2007). A análise filogenética a partir dos genes 28S e NADH2 mostrou quatro clados, representando as subfamílias Lampyrinae, Photurinae, Amydetinae e Luciolinae (Figura 9, 10 e 11).

O primeiro clado formado por representantes da subfamília Lampyrinae, incluiu as seguintes espécies e tribos: (tribo Lampyrini), *P. rufa*; (tribo Photinini), *Lucidota* sp, *Macrolampis* sp.2 e *M. omissa*; e (tribo Cratomorphini) *C. distinctus* e *Aspisoma lineatum*. O segundo grupo foi representado pelas espécies do gênero *Amydetes* formando a subfamília Amydetinae, como inicialmente proposto por McDermott (1964); o terceiro grupo foi representado pela subfamília Photurinae, com *Photuris* sp.7 e *Bicellonycha lividipennis* e o último clado representado pela subfamília Luciolinae com *Luciola cruciata*.

De acordo com esta análise, utilizando genes mitocondrial e nuclear, a subfamília Amydetinae constitui um grupo-irmão de Photurinae quando se utiliza a MP e NJ (Figura 10 e 11), no entanto quando se utiliza o método Bayesiano, Amydetinae aparece como grupo-irmão de Luciolinae (Figura 9). A análise dos genes 28S e NADH2 e de sequências de luciferases de forma independente, mostraram a subfamília Luciolinae como grupo-irmão de Lampyrinae + Photurinae + Amydetinae (Figura 13 e tabela 12).

5.3.4. Phengodidae

A subfamília Paleártica Rhagophthalminae, representada pelas espécies asiáticas *R. ohbai* e *R. lufengensis*, e a subfamília Neotropical Phengodinae, formaram um grupo monofilético com 100% de suporte para todos os métodos (Figura 13). As sequências de genes nuclear e mitocondrial e as sequências de luciferases clonadas indicaram, na maioria dos casos, que as subfamílias e tribos Mastinocerini e Phengodini reconhecidos como Phengodidae são monofiléticos.

A subfamília Phengodinae é dividida em três tribos: Phengodini (LeCONTE, 1861), que em nossa análise foi representada pela espécie *Pseudophengodes brasiliensis*, Pennicilloporini (Wittmer, 1978), a qual nós não tivemos representates nesse trabalho, e Mastinocerini (LeCONTE, 1881) que foi representada pelas espécies *P. hirtus*, *Brasilocerus* sp.2 e *Euryopa laurae*.

5.3.5. Elateridae

Seis espécies de elaterídeos brasileiros foram examinadas neste estudo, das quais quatro são luminescentes, *P. divergens*, *F. bruchi* e *P. termitilluminans* pertencentes a subtribo Pyrophorina e *Hapsodrilus ignifer* pertencente a subtribo Hapsodrilina, e dois são não-luminescentes, *Conoderus* sp. (Oophorini) e *Agrypnus murinus* (Agrypinini). As espécies bioluminescentes foram agrupadas em um único clado, confirmando que Agrypninae é uma subfamília monofilética, com dois subgrupos: (I) tribo Pyrophorini incluindo os taxa luminescentes *P. divergens*, *F. bruchi*, *H. ignifer* e *P. termitilluminans* e tribos Oophorini e Agrypnini incluindo as espécies *Conoderus* sp. e *Agrypnus murinus*, respectivamente. Nossas análises também mostraram uma relação de maior proximidade entre as espécies *P. divergens*

e *F. bruchi*. Resultado semelhante foi observado a partir de análises das sequências de luciferases dessas espécies (AMARAL et al., 2012). No entanto, apenas poucos gêneros foram utilizados nesta análise, e outros taxa são necessários para uma análise mais detalhada.

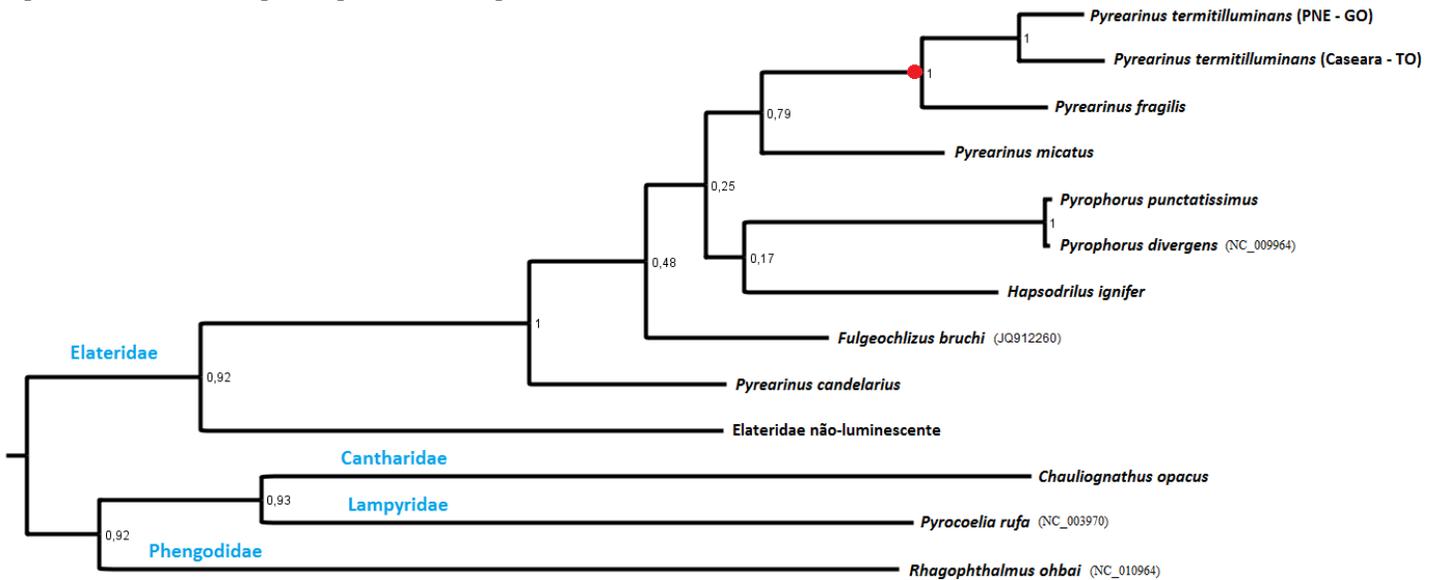
5.4. Relações filogenéticas dentro do gênero *Pyrearinus*

Nossos estudos moleculares, utilizando os genes mitocondriais COI e NADH2 para o gênero *Pyrearinus*, buscou entender as relações entre espécies do gênero, especialmente as que habitam o interior de cupinzeiros. Recentemente, observamos dois novos casos de cupinzeiros luminosos no interior da Floresta Amazônica: (I) em uma área de transição entre Cerrado e Floresta Amazônica, às margens do rio Araguaia (TO), habitados por indivíduos da espécie *P. termitilluminans*, e (II) no interior da floresta amazônica às margens do rio Juruena (MT), habitada por uma espécie diferente, *Pyrearinus fragilis*.

Os dados mostraram a proximidade entre as populações de *P. termitilluminans* de floresta em Caseara e de cerrado do Parque Nacional das Emas (GO), apesar dos diferentes habitats e distância geográfica de mais de 1.000 Km, mas ao longo da mesma bacia hidrográfica (rio Araguaia). Nossos dados também mostram que as duas espécies que habitam cupinzeiros formam um grupo monofilético, indicando que essa característica pode ter se originado de um ancestral comum a essas duas espécies e sido mantidas no grupo (Figura 16).

A árvore reconstruída pelos genes mitocondriais, agrupou os gêneros (((*Pyrearinus*), (*Pyrophorus*), (*Hapsodrilus*)), (*Fulgeochlizus*)), (*Pyrearinus*)), sugerindo que o gênero *Pyrearinus* é polifilético. Porém, os valores de suporte de ramos entre os gêneros mostraram-se baixos, indicando que os dados ainda não são suficientes e que mais estudos são necessários.

Figura 16 - Árvore filogenética obtida por meio do método de análise Bayesiano utilizando os genes mitocondriais NADH2 2 COI. Os valores presentes em cada nó representam os valores de probabilidade posterior. O ponto vermelho indica o ramo em que se encontram as espécies que habitam cupinzeiros.



Fonte: AMARAL, DT

5.5. Estrutura do Genoma mitocondrial em Elateroidea

Os genomas mitocondriais dos Elateroidea sequenciados mostraram um genoma típico da classe Insecta (ANEXO). Observou-se uma faixa de tamanho entre os genomas de 16 kb em *P. termitilluminans* a mais de 22 kb em *P. hirtus*, estimados pelos tamanhos de fragmento obtidos em gel de agarose (Tabela 13). A variação do tamanho nos genomas está associada, principalmente, à diferença de tamanho da região controle (ou região A+T). No entanto, existem várias alterações no genoma de *P. hirtus*, tal como a uma duplicação gênica e a presença de uma região não-codificante. A região controle dos elaterídeos apresenta um tamanho em torno de 1.300 pb e nos lampirídeos em torno de 1.700 pb.

Estes genomas mitocondriais mostraram ser ricos em conteúdo A+T, como geralmente é observado no genoma dos Insecta (BOORE, 1998) (Tabela 13). A composição de A+T foi mais baixa em Elateridae, com valores de 62% a 70%, e a mais elevada foi em Phengodidae, com mais de 76% em *Brasilocerus* e no gênero *Rhagophthalmus*, e cerca de 80% em *P. hirtus*. O conteúdo A+T nas famílias Lampyridae estava em torno de 77% em *Pyrocoelia rufa* e *B. lividipennis*. Nós sequenciamos completamente as regiões ricas em A+T (região controle) para *P. termitilluminans*, *H. ignifer* e *B. lividipennis*. Esta região mostrou uma diferença de tamanho de 1.313 pb (*P. termitilluminans*) a 1.781 pb (*B. lividipennis*). Para

estas três espécies, não observamos repetições de motivos, no entanto observou-se várias repetições de pequenas sequências, pelo menos duas vezes (em torno de 9-15bp).

Neste estudo, observou-se algumas sequências não-codificantes dentro da região codificadora. No genoma de *B. lividipennis* foi encontrada uma região não-codificante, com, aproximadamente 140 pb, ocorrendo entre o tRNA-Trp e o tRNA-Cys. O genoma do Elateridae não-luminescente apresentou uma região não-codificante entre tRNA-Trp e tRNA-Cys, em torno de 960 pb, no entanto esta região não foi completamente sequenciada. Para o genoma de *P. hirtus*, observou-se uma região não-codificante entre os genes NADH2 e COX1, com cerca de 1.800 pb; a região não apresenta similaridade com sequências depositadas nos banco de dados.

Os genomas dos Phengodidae mostraram alguns rearranjos em relação ao genoma ancestral dos insetos. No genoma do *Brasilocerus*, o tRNA-Cys foi encontrado imediatamente após o gene NADH2, e o tRNA-Trp não foi observado na região sequenciada. Os tRNAs Gln e Ile também não foram observados, tanto no genoma de *Brasilocerus* sp.2, quanto no genoma de *P. hirtus*. Em *P. hirtus*, o tRNA-Tyr foi rearranjado antes do tRNA-Trp. Também foi observada uma duplicação da região entre o tRNA Leu e o gene COX2, provavelmente, dentro da região controle.

Tabela 13 – Composição nucleotídica dos genomas mitocondriais de Elateroidea estudados.

Taxa	Tamanho do genoma (pb)	% A+T	% A+T na região codificante	Tamanho da região controle (pb)	% A+T na região controle
Elateridae					
<i>Pyrearinus termitilluminans</i>	16007	63.11	61.3	1313	66.11
<i>Pyrophorus divergens</i>	16120	69.44	67.51	1470	74.69
<i>Hapsodrilus ignifer</i>	16072	68.21	66.42	1367	73.66
Elateridae não luminescente	> 15331	72.47	71.39	?	Na
Lampyridae					
<i>Bicellonycha lividipennis</i>	16466	75.73	73.42	1781	83.77
<i>Pyrocoelia rufa</i>	17739	77.41	76.27	1522	87.58

Phengodidae					
<i>Brasilocerus</i> sp.2	> 14423	75.58	74.09	?	Na
<i>Phrixothrix hirtus</i>	> 17235	78.98	78.02	?	Na
Rhagophthalmidae					
<i>R. ohbai</i>	15704	79.1	77.56	1291	86.06
<i>R. lufengensis</i>	15982	79.6	78.19	1367	86.91
Cantharidae					
<i>Cantharis pellucida</i>	>12400	77.77	76.2	?	Na
Lycidae					
<i>Merolycus dentipes</i>	>12257	73.28	71.76	?	Na
Drilidae					
<i>Drilus flavescens</i>	>12519	67.86	67.09	?	Na
Chrysomelidae					
<i>Crioceris duodecimpunctata</i>	15880	76.88	75.2	1220	83.27
Eucnemidae					
<i>Melasis buprestoides</i>	>6625	71.28	71.27	?	Na
Limnichidae					
<i>Limnichidae</i> sp.	>14388	74.38	73.42	?	Na
Bombycidae					
<i>Bombyx mori</i>	15643	81.32	79.5	499	95.39
Keroplastidae					
<i>Arachnocampa flava</i>	16923	82.01	79.7	1841	93.3
Muscidae					
<i>Haematobia irritans irritans</i>	16078	79.07	78.1	1261	89.5

? região não conhecida; Na - resultado não obtido

Fonte: AMARAL, DT

6. Discussão

A origem da bioluminescência na superfamília Elateroidea permanece um mistério. Apesar das três famílias de vagalumes compartilharem o mesmo sistema bioluminescente, com uma luciferina benzotiazólica, ATP, e luciferases aparentemente homólogas, não está claro se a bioluminescência se originou uma única vez em um ancestral comum, ou diversas vezes independentemente. Também não estão claros os processos que levaram a diferenciação funcional com a evolução de luciferases que emitem diferentes cores de bioluminescência. Para entender estas questões, estudos moleculares usando diferentes luciferases e análises filogenéticas das espécies bioluminescentes são essenciais. Em especial, a família Elateridae é uma das mais ricas em espécies luminescentes, a maioria concentrando-se na região Neotropical, com espécies luminescentes em todas as fases de vida, e lanternas que emitem diferentes cores de bioluminescência no mesmo indivíduo variando de verde ao laranja. Assim existe a necessidade de clonar e comparar as luciferases de diferentes fases e lanternas de elaterídeos, e investigar a filogenia desta família e suas reações filogenéticas com outras famílias de coleópteros bioluminescentes.

6.1. Origem evolutiva das luciferases das lanternas da fase adulta e larval de elaterídeos

A maioria dos elaterídeos luminescentes possuem duas lanternas torácicas que emitem luz verde, e uma lanterna abdominal que emite luz amarela. Entretanto, algumas espécies constituem exceções. A espécie *Photophorus jansonii* das ilhas Fiji, por exemplo, apresentam apenas lanternas torácicas (MITANI et al., 2013). No Brasil, a espécie *F. bruchi* na fase adulta apresenta apenas a lanterna abdominal funcional (ROSA et al., 2010) e duas lanternas torácicas vestigiais. Entretanto, nos momentos iniciais da fase adulta, as lanternas vestigiais na região dorsal do indivíduo, podem emitir uma luminescência fraca, dando a impressão de lanternas que regrediram durante a evolução (VIVIANI, comunicação pessoal). Tal cenário sugere duas vias possíveis de evolução para as lanternas dos elaterídeos na fase adulta: (1) a lanterna dorsal tornou-se vestigial através de perda adaptativa ou (2) as lanternas dorsais em *F. bruchi* não evoluíram totalmente, uma vez que existem vestígios de lanternas no protórax, com luminescência muito fraca. No entanto, o primeiro cenário parece ser mais parcimonioso na medida em que a maioria das espécies de elaterídeos luminescentes possuem lanternas torácicas.

A lanterna abdominal presente nos Elateridae, é usada pelos machos durante o vôo e pela fêmea estacionária na vegetação, que pode usar tanto as lanternas torácicas ou a abdominal para atrair os machos (LALL et al., 2000; LALL et al., 2010). Contrariando nossas expectativas, a luciferase presente na lanterna abdominal de *F. bruchi*, que emite luz na região do verde, apresentou maior identidade com as luciferases dorsais que emitem bioluminescência verde de outras espécies de *Pyrophorus*, ao invés de apresentar maior similaridade com a lanterna abdominal de *Pyrophorus*. Comparando luciferases de espécies do gênero *Pyrophorus*, Feder e Velez (2009) e Oba et al. (2010a) também observaram uma maior identidade entre as luciferases ventral e dorsal que emitem a mesma cor, do que entre luciferases que emitem cores diferentes na mesma lanterna, sugerindo que tal semelhança entre essas luciferases pode ocorrer devido a recombinação intergênica. Este resultado é bem diferente do observado nas luciferases dos fengodídeos, em que as luciferases das lanternas laterais de larvas de espécies diferentes são mais semelhantes entre si do que as luciferases das lanternas laterais e da cabeça do mesmo indivíduo (ARNOLDI et al., 2010).

A luciferase da lanterna abdominal de *P. angustus*, uma espécie de ampla ocorrência na região Neotropical, clonadas por Oba et al. (2010a) a partir de espécimes oriundos do Panamá, e a clonada pelo nosso grupo, oriunda da região sul da Floresta Amazônica (Juruena-MT), apresentam 96% de identidade, apesar de apresentarem cores bioluminescentes bem distintas (verde-amarelado e laranja, respectivamente). Este é aparentemente o segundo caso de polimorfismo observado nas cores de bioluminescência em lanternas de elaterídeos, o primeiro caso tendo sido relatado para a espécie *P. plagiophthalmus* que possuem lanternas abdominais e torácicas exibindo diferentes espectros de bioluminescência em diferentes populações da Jamaica, variando do verde ao laranja Biggley et al. (1967). Esta variação tem sido explicada por possíveis efeitos de variação biogeográfica (FEDER; VELEZ, 2009), recombinação intergênica entre as luciferases dorsal e ventral (FEDER; VELEZ, 2009; OBA et al., 2010a; AMARAL et al., 2012) e, também, devido a seleção do ambiente fótico (tipo de vegetação, efeitos de reflectância da luz, padrões agonísticos, etc.).

No caso das cores das lanternas abdominais de *P. angustus*, algum isolamento geográfico pode ter promovido a evolução de distintas isoenzimas. Como discutido acima, fatores como tipo de ambiente/nicho, assim como nível de reflectância e encontros agonísticos podem ter provocado a adaptação e seleção de luciferases na mesma lanterna, porém com cores distintas.

As luciferases abdominais de *F. bruchi* e *P. angustus* apresentam-se nos extremos dos espectros exibidos por elaterídeos luminescentes, verde e laranja, respectivamente, exibindo propriedades cinéticas similares às demais luciferases de besouros (540 e 589 nm). O K_M aparente para luciferina observado em *F. bruchi* (12 μM) apresentou o menor valor em relação aos valores encontrados para as demais espécies da família Elateridae. Este dado sugere uma alta afinidade dessa luciferase por esse substrato.

A luciferase de *F. bruchi* também exibiu o pH ótimo mais elevado entre as luciferases de besouros clonados (Tabela 5). A fim de compreender o efeito do pH sobre a cinética da luciferase, foram avaliados os K_M para luciferina e ATP em pH 9.0. Em ambos os casos, os valores de K_M aumentaram em pH mais elevado, indicando que a afinidade com os substratos diminuiu em condições alcalinas. Resultados semelhantes foram obtidos por Kutuzova et al. (1996) estudando as luciferases da espécie *P. plagiophthalmus*. A diminuição da afinidade pode ser resultado da perda de cargas positivas no sítio ativo as quais estabilizam as cargas negativas. No entanto, o efeito sobre K_M também pode ser resultado do ganho de cargas negativas por desprotonação de determinados resíduos, como as cisteínas, que são abundantemente encontradas em luciferases de elaterídeos (KUTUZOVA et al. 1996).

6.2. Comparação das luciferases das lanternas dorsais e ventrais de elaterídeos

O fragmento de 440 bp amplificado por PCR das luciferases de lanternas abdominais e torácicas de elaterídeos, corresponde a um segmento de 160 resíduos de aminoácidos que incluem a maior parte dos resíduos do sítio-ativo. A retirada do segmento de 59 pb interno da sequência da luciferase abdominal de *P. micatus*, promoveu um melhor alinhamento entre as sequências das luciferases de Elateridae, com alto grau de identidade. Tal resultado pode indicar que durante o processo de transcrição reversa ou de amplificação dessa luciferase especificamente, pode ter ocorrido algum erro na inserção das bases, entretanto, o que parece mais provável é que se trate de alguma outra isoenzima, ou mesmo de um fenômeno de *splicing* alternativo, que não realizou a retirada completa ou parcial de um íntron, visto que foram realizadas mais duas amplificações isoladas. As demais luciferases clonadas não mostraram problemas de alinhamento que possam indicar qualquer outro tipo de efeito mutacional ou *splicing* alternativo.

Os dados de sequências mostraram maior identidade entre as luciferases ventrais e dorsais do adulto de *P. termitilluminans*, do que com a luciferase do protórax da fase larval. Estes resultados confirmam que as luciferases das lanternas abdominal e torácicas da fase adulta, e protorácica da fase larval clonada anteriormente (VIVIANI et al., 1999a), constituem isoenzimas diferentes, como evidenciado por Colepicolo et al. (1986), a partir de propriedades cinéticas e espectrais das enzimas nativas extraídas destes insetos. Nos alinhamentos realizados foi possível observar resíduos que ocorrem apenas na luciferase larval de *P. termitilluminans*, única isoenzima larval de Elateridae clonada. Os resultados também esclarecem que nenhuma das isoenzimas da fase adulta deriva da fase larval, mostrando pela primeira vez, que em elaterídeos as luciferases das lanternas torácicas e abdominal tem uma origem ontogenética distinta da isoenzima protorácica, provavelmente por recombinação gênica. Resultados similares foram observados com vagalumes da família Lampyridae, que mostram diferentes isoenzimas para as fases larval e adulta de *L. cruciata* (OBA et al., 2010b). Tais resultados, mostram a existência de isoenzimas diferentes, expressas diferentemente em cada fase de vida do indivíduo.

6.3. Relação entre estrutura e espectros de bioluminescência nas luciferases de elaterídeos

As primeiras luciferases de elaterídeos clonadas foram as quatro isoenzimas produtoras de luz verde, verde-amarela, amarela e laranja da espécie jamaicana *P. plagiophthalmus* (WOOD et al., 1989). O alinhamento dessas isoenzimas e a comparação destas sequências mostrou um conjunto de resíduos que explicariam os diferentes espectros de bioluminescência, tais como 223EA224, S247, entre outros (WOOD et al., 1989, 1990). Posteriormente, Viviani et al. (1999a), clonaram a luciferase larval de uma espécie brasileira, *P. termitilluminans*, a única enzima larval de elaterídeos clonadas até o momento. Esta luciferase emite bioluminescência com o espectro mais deslocado para o azul entre as luciferases de besouros. A comparação desta isoenzima com as isoenzimas de *P. plagiophthalmus* discutiu a importância do *loop* 223-247, reforçando alguns resíduos discutidos por Wood et al. (1989, 1990). Após isso, foram clonadas várias outras luciferases de lampirídeos e algumas de elaterídeos e, a partir dos alinhamentos dessas enzimas, estudos de mutagênese sítio-dirigida foram realizados, mostrando resíduos importantes para a modulação das cores, tais como o *loop* 223-235, E354N, I288 (VIVIANI et al., 2002;

BRANCHINI et al., 2003; VIVIANI et al., 2005; NAKATSU, et al., 2006; MORADI et al., 2009).

Mais recentemente, Viviani et al. (2011), clonaram uma luciferase naturalmente verde de *A. vivianii* (Lampyridae) e observaram que na posição 250 (correspondente ao resíduo 247 em elaterídeos) existia uma serina, resíduo observado nas luciferases que apresentam cor verde em elaterídeos. As demais luciferases que apresentam espectro deslocado para o vermelho apresentam F ou G, como é o caso da luciferase de *Macrolampis* sp.2 (amarelo-alaranjada) e de *P. plagiophthalmus* (laranja), respectivamente. Esses resultados nos fizeram revisitar os trabalhos de Wood et al., (1989, 1990), nos quais foi proposto que a região entre os resíduos 220-247 (Figura 17) podem ser responsáveis pela modulação das cores em Elateridae.

Figura 17 - Multialinhamento dos resíduos 220-247 das luciferases de elaterídeos.

	220	247
PPvor (594nm)	LDPEAGTQLIPGVTVLVYVPPFFHAFGFG	
PpvYE (578nm)	LDPEAGTQLIPGVTVLVYVPPFFHAFGFS	
PpvYG (560nm)	LDPRAGTQLIPGVTVLVYLPFFHAFGFS	
PpdGR (546nm)	LDPRVGTQLIPGVTVLVYLPFFHAFGFS	
PPdYG (559nm)	LDPRAGTQLIPGVTVLVYLPFFHAFGFS	
PangMT (589nm)	LDRRSGTQVIPGVSVMVYVPPFFHAFGFC	
Ful (540nm)	SDPRVGTQLIPGVSVLAYLPFFHAFGFS	
Pang-d (566nm)	LDRRCGTQVIPGVSVMVYVPPFFHAFGFC	
Pang-v (536nm)	LDPRVGTQLIPGVSVLVYLPFFHAFGFS	
Pme-dGR (549nm)	LDPRVGTQLIPGVTVLVYLPFFHAFGFS	
Pme-vGR (554nm)	LDPRSGTQIIPGVTVLVYLPFFHAFGFS	
Py (534nm)	SDPRVGTQLIPGVSVLAYLPFFHAFGFS	
Photophorus (559nm)	SDPRSGTQLIPGVSVLAYLPFFHAFGFS	

Fonte: AMARAL, DT

Com base nesses estudos realizamos a mutação S274F na luciferase de *P. termitilluminans*. A mutação S247F nessa luciferase, mostrou um deslocamento do espectro considerável, por volta de 23 nm para o vermelho, porém tal mutação não promoveu alterações na sensibilidade ao pH, pois não causou o deslocamento do espectro em diferentes pHs. O aumento do valor de K_M para ATP, também indica que a posição é importante para a afinidade com o ATP, o que foi mostrado também pelos estudos de Branchini et al. (2003). Os resultados obtidos por mutagênese no resíduo S247F na luciferase de *P. termitilluminans* indicaram que esse resíduo apresenta grande importância nos espectros de bioluminescência nos elaterídeos. Os resultados sugerem que a substituição de um resíduo de cadeia menor e polar (Ser) por um resíduo maior e hidrofóbico (Phe), causam importantes efeitos disruptivo no sítio de ligação da luciferina, possivelmente por quebrar uma ligação de hidrogênio com

os resíduos R218 e S347, e também por desestabilização causadas pela inserção de uma grande cadeia lateral, como é o caso do aminoácido Phe.

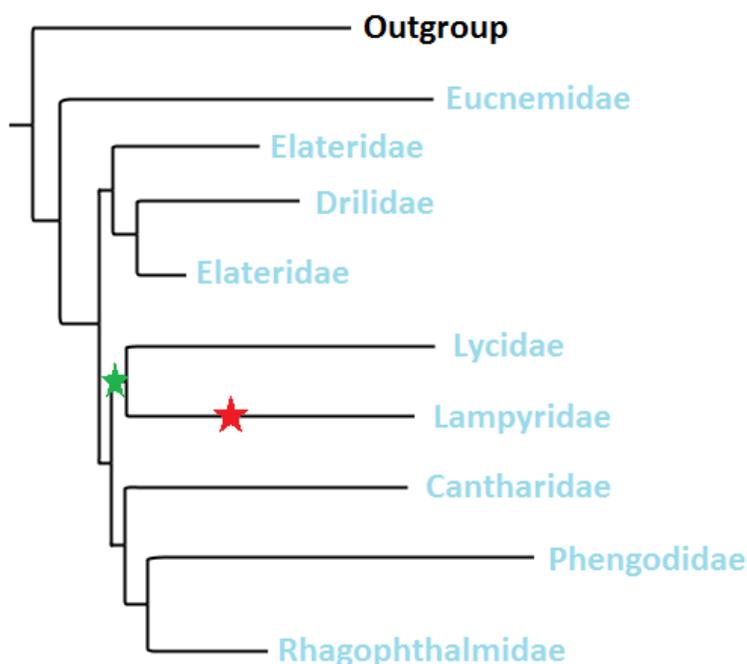
Além do resíduo S247, nossos alinhamentos também mostraram possíveis resíduos alvos envolvidos com a modulação das cores nessa família, entre eles os resíduos E223, A224, C249, E266, G335, T352, entre outros, os quais localizam-se próximos ao *loop* 223 e o *loop* 351-360.

6.4. Filogenia e evolução molecular de Elateroidea

A filogenia molecular da superfamília Elateroidea, usando os genes 28S e NADH2, confirmou a monofilia das três famílias luminescentes. Em contraste com a antiga classificação, que agrupava em Cantharoidea as famílias Lampyridae e Phengodidae (CROWSON, 1972), nossos estudos agruparam Phengodidae e Elateridae em um clado separado de Lampyridae e Cantharidae, sugerindo a proximidade dessas famílias (ARNOLDI et al., 2007; BOCAKOVA et al., 2007). A família Lycidae apareceu distantemente relacionada à família Lampyridae, como sugerido por Bocakova et al. (2007) e Sagegami-Oba et al., (2007b). As famílias Eucnemidae e Throscidae se mostraram distantemente relacionadas a Elateridae, como mostrado por Bocakova et al. (2007), Sagegami-Oba et al. (2007b) e Kunderata e Bocak (2011).

Por outro lado, nossa análise filogenética usando dados dos genomas mitocondriais completos mostraram quatro clados dentro de Elateroidea (Figura 18), i) Lampyridae e Lycidae, ii) Phengodidae, Rhagophthalmidae e Cantharidae, (Cantharoidea) iii) Elateridae (com Drilidae) e iv) Eucnemidae. Além disso, as análises apontaram que as famílias Phengodidae e Lampyridae estão intimamente relacionadas (CROWSON, 1972; LAWRENCE; NEWTON, 1995; BEUTEL, 1995; TIMMERMANS; VOGLER, 2012), diferentemente do que foi observado em estudos recentes (ARNOLDI et al., 2007; BOCAKOVA et al., 2007; SAGEGAMI-OBA et al., 2007a; KUNDRATA; BOCAK, 2011; AMARAL et al. 2013).

Figura 18 - Árvore filogenética resumindo os dados obtidos pelo método Bayesiano utilizando a sequência dos 13 genes mitocondriais. As estrelas vermelha e verde indicam os possíveis pontos, nos quais poderiam ter se originado as luciferases pH-sensíveis.



Fonte: AMARAL, DT

A história evolutiva envolvendo as famílias Lampyridae, Lycidae e Cantharidae não é totalmente conclusiva. Vários estudos indicaram que Cantharidae está intimamente relacionada a Lampyridae (SAGEGAMI-OBA et al., 2007a; SAGEGAMI-OBA et al., 2007b; BOCAKOVA et al., 2007; KUNDRATA; BOCAK, 2011; AMARAL et al., 2013). Outras análises mostraram também o agrupamento de Lycidae+Lampyridae no mesmo ramo e Phengodidae+Cantharidae em outro (BRAHAM; WENZEL, 2001; KAZANTESEV, 2003). Todos esses estudos citados anteriormente, utilizaram os genes 28S ou 18S, ou ambos. Bocakova (2008), discute que os genes 18S e 28S apresentam longas regiões hipervariáveis, causando o efeito de atração de ramos longos, o que poderia ser responsável por agrupar as famílias Cantharidae e Lampyridae. Maddison et al. (1999), também observaram tal fenômeno em Carabidae, quando utilizaram o marcador nuclear 18S.

Nesse trabalho podemos observar a presença de um ramo longo nas análises de genes concatenados, o que ocorre no ramo dos Phengodidae, e também nos estudos com genes isolados, tais como ATP6, COI, ND4 e ND4L, o que poderia justificar a possível proximidade entre as famílias Phengodidae e Lampyridae, pelo efeito de atração de ramos

longos. Entretanto, buscamos evitar esse efeito utilizando diferentes metodologias de análises, como ML e Bayesiano, sendo a primeira, segundo Swofford et al. (1996), menos sensível a este efeito. Além disso, excluímos a terceira posição de cada códon, visto tratar-se de uma região com alta taxa de evolução, saturação ou randomização, e também do ramo longo, o que não interferiu no resultado.

Phengodidae, Rhagophthalmidae e Cantharidae foram agrupados no mesmo clado, como é possível observar na figura 18. Estes resultados também foram observados por Kazantsev (2003), quando foi estudada a morfologia interna e externa da família Lycidae. Braham e Wenzel (2001), utilizando dados morfológicos, mostraram uma árvore em que a família Phengodidae estava intimamente relacionada com Cantharidae, porém a família Rhagophthalmidae foi agrupada em um clado distante de Phengodidae. As árvores reconstruídas pelas análises com genes independentes indicaram, em sua maioria, a proximidade entre as espécies neárticas (Rhagophthalmidae) e espécies neotropicais (Phengodidae), no entanto, alguns genes analisados separadamente mostram que os gêneros *Phrixotrix* + *Brasilocerus* são separados do gênero *Rhagophthalmus*, como observado por Braham e Wenzel (2001). O que seria esperado pela longa distância temporal e geográfica que separa estes subgrupos.

Lampyridae. A família Lampyridae é a família mais rica em espécies bioluminescentes e a mais bem estudada sob os aspectos biológicos. No entanto, o status taxonômico de alguns táxons neotropicais ainda não está bem resolvido. Nesse trabalho propusemos algumas resoluções. O gênero *Macrolampis* que originalmente havia sido alocado próximo ao gênero *Photinus* na tribo Photinini (McDERMOTT, 1964) foi em nossa análise agrupado perto do gênero *Lucidota*, que foi previamente classificado como tribo Lucidotini (LLOYD et al., 2002). Entretanto, de acordo com McDermott (1964), o gênero *Lucidota* está incluído na subtribo Lucidotina dentro da tribo Photinini.

Nosso trabalho com a sequência primária das luciferases corrobora com a mudança de status de Lucidotini, de tribo para subtribo - Lucidotina -, dentro da tribo Photinini, como proposto por McDermott (1964). Nossos dados também apoiaram a separação de *Amydetes* em uma subfamília independente, Amydetinae, como originalmente proposto por McDermott (1964), uma vez que esse gênero foi agrupado fora da subfamília Lampyrinae, que inclui as tribos Cratomorphini, Lampyrini, Photinini e Lucidotini. Resultado semelhante foi

observado em uma análise molecular com base na recém-clonada luciferase de *A. vivianii* (VIVIANI et al. 2011).

Phengodidae. Entre as três famílias de besouros luminescentes estudadas, Phengodidae é a menos conhecida. Além disso, são raros os estudos baseados em marcadores moleculares para a subfamília Phengodinae. Dentre eles, estão estudos de luciferases clonadas das tribos Mastinocerini e subfamília Rhagophthalminae (ARNOLDI et al., 2010; OHMIYA et al., 2000; VIVIANI et al., 1999a, 1999b), e de DNA mitocondrial no gênero *Rhagophthalmus* (LI et al., 2007). Dessa forma, nosso estudo é o primeiro a abordar a filogenia molecular baseado em genes mitocondriais e nucleares em Phengodidae.

A análise da sequência do gene nuclear 28S confirma a inclusão de *Euryopa* spp dentro da tribo Mastinocerini (Phengodidae), como proposto por Wittmer (1976). O gênero *Euryopa* já foi classificado como pertencente à família Telegeusidae (LENG, 1920), uma família parafilética que apresenta alguns caracteres morfológicos similares aos Phengodidae (CROWSON, 1972). Kundera e Bocak (2011), utilizando dados moleculares, sugeriram que Telegeusidae constitui um grupo-irmão de Elateroidea. Os nossos dados também suportam a inclusão do gênero *Rhagophthalmus*, e, conseqüentemente, outros gêneros próximos da região Asiática, como grupo-irmão de Phengodidae. A monofilia de Phengodidae + Rhagophthalmidae foi apoiada por valores elevados de suporte dos ramos, mostrando que a família asiática Rhagophthalmidae e a família americana Phengodidae, têm um longo período evolutivo as separando do ancestral comum.

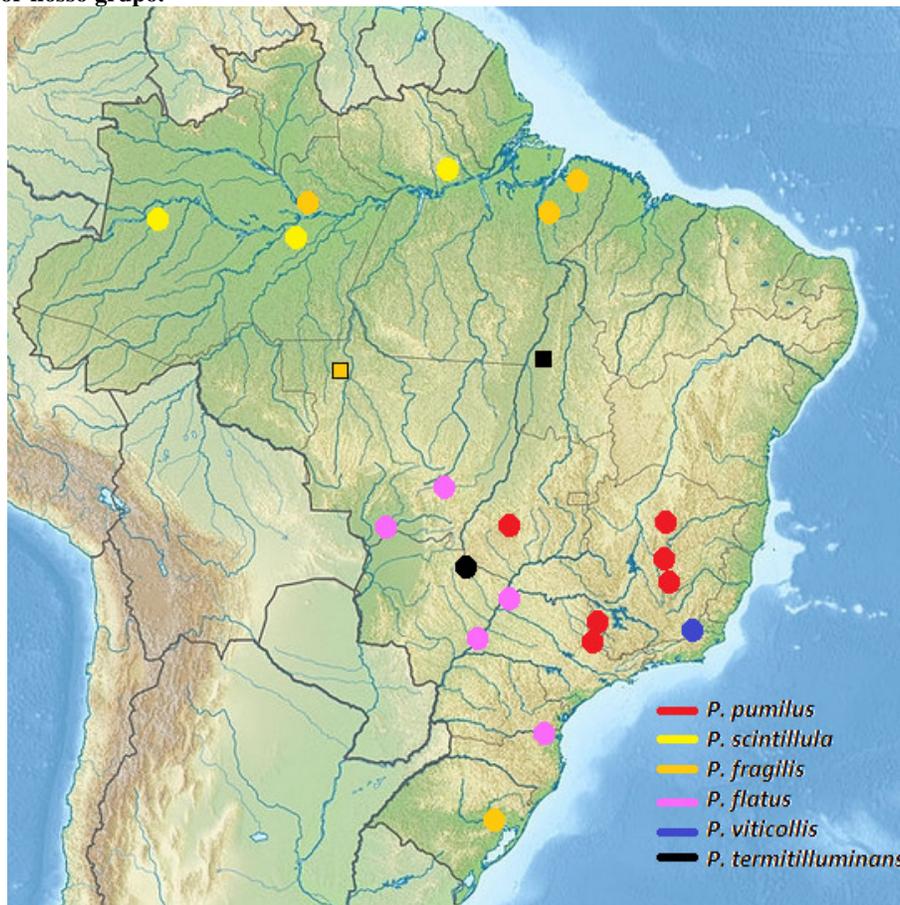
Elateridae. Em Elateridae, espécies luminescentes são encontradas nas subfamílias Agrypninae e Campyloxeninae (COSTA et al., 2010). A monofilia de Agrypninae foi fortemente apoiada pelo presente estudo, confirmando os resultados descritos por Sagegami-Oba et al. (2007b). Os nossos dados mostraram dois grupos distintos, correspondentes aos grupos luminescentes e não-luminescentes no interior do subfamília Agrypninae, como sugerido por Rosa (2007). O primeiro, representado por espécies luminescentes da tribo *Pyrophorini*, parece ser mais derivado do que o segundo grupo, representado por um grupo não-luminescente. Sagegami-Oba et al. (2007b) sugeriram que o possível ancestral deste grupo era não-luminescente, e nossos dados atuais também suportam esta conclusão.

Como discutido por Rosa (2007) e Amaral et al. (2013), o clado luminescente da família Elateridae agrupa o gênero *Pyrearinus*, como um grupo externo de *Fulgeochlizus+Hapsodrillus+Pyrophorus*. Porém, entre os grupos luminescente e não-

luminescente, foi inserido em nossa análise dos genomas mitocondriais completos, a espécie *Drilus flavescens*, pertencente a família Drilidae. Este resultado pode indicar que Elateridae é um grupo parafilético, ou, como discutido por Kundera e Bocak (2011), a família Drilidae deveria ser classificada como uma tribo - Drilini - dentro da família Elateridae. Pototskaja (1983), usando dados morfológicos, indica Drilidae como uma família distinta dentro Elateroidea, no mesmo clado em que se encontram as famílias Phengodidae e Omalisidae. Ivie e Barclay (2011) citaram que o gênero *Selasia* foi anteriormente classificado como Drilidae, entretanto, depois de estudos com seu holótipo, esta espécie foi transferida para Elateridae. Dessa maneira, novos estudos moleculares com a família Drilidae são necessários, incluindo novas espécies, para melhor entender a relação filogenética dentro das famílias Drilidae e Elateridae.

O gênero *Pyrearinus* é distribuído por todo o Brasil, agrupando mais de 40 espécies. Dentro desse grupo, o fenômeno de cupinzeiros bioluminescentes é abundantemente descrito para a espécie *P. termitilluminans*, que ocorre na região sul de Goiás, próximo ao Parque Nacional das Emas. Outras espécies do grupo que habitam cupinzeiros foram relatadas na região amazônica, entretanto não foram realizados estudos mais detalhados sobre as mesmas. Nos últimos anos, nosso grupo observou a presença de outros cupinzeiros luminescentes na região norte do país, sendo que de acordo com Dr. C. Costa (MZUSP) a espécie presente na região de Caseara (TO) refere-se a espécies *P. termitilluminans*, e a presente na região de Juruena-MT refere-se a espécie *P. fragilis* (Figura 19).

Figura 19 - Distribuição geográfica dos cupinzeiros bioluminescentes do grupo *pumilus*. Os círculos de diferentes cores indicam a localização das diferentes espécies reportadas por Costa e Vanin (2010), e os quadrados indicam os locais recentemente descobertos por nosso grupo.



Fonte: AMARAL, DT

Os estudos moleculares, utilizando os genes mitocondriais COI e NADH2, mostraram que as duas espécies que habitam os cupinzeiros, mesmo separadas geograficamente por dois grandes rios (rios Araguaia e Juruena), formam um grupo monofilético, indicando que existiu um ancestral comum a essas espécies, o qual infestava cupinzeiros.

Os dados moleculares dos dois genes mitocondriais também mostram que gênero *Pyrearinus* é polifilético, sendo que um grupo envolve as espécies *P. termitilluminans*, *P. fragilis* e *P. micatus* (COSTA, 1978), os quais se agrupam com o clado dos gêneros *Pyrophorus* e *Hapsodrilus* (ROSA, 2007; AMARAL et al., 2013), e o segundo grupo, representado pela espécie *P. candelarius* (GERMAR, 1841), agrupa-se externamente às demais espécies bioluminescentes de Elateridae. Entretanto os valores de suporte dos ramos mostrou-se muito baixo, o que não pode suportar a relação entre os gêneros. Com intuito de

melhorar a resolução das árvores, serão empregados, em estudos futuros, marcadores nucleares, tais como os genes 18S ou 28S.

6.5. Caracterização e organização dos genomas mitocondriais de Elateroidea bioluminescentes

Neste estudo, foram sequenciados os genomas mitocondriais completos das espécies *H. iginifer*, *P. termitilluminans* (Elateridae) e *B. lividipennis* (Lampyridae) e foram parcialmente sequenciados os genomas mitocondriais de um Elateridae não-luminescente, *Brasilocerus* sp.2 e *P. hirtus*. Para estas espécies, observou-se um genoma mitocondrial típico da classe Insecta, com exceções para os genomas dos Phengodidae. Estes genomas eram ricos em A+T (mais de 70% em *B. Lividipennis*), sendo que as espécies de Elateridae apresentaram os menores valores de conteúdo A+T em relação às outras famílias, como observado anteriormente por Arnoldi et al. (2007).

O mtDNA entre as famílias de Coleoptera costuma ser conservado em relação ao genoma ancestral, como discutido por Friedrich e Muquin (2003) e Sheffield et al. (2008), no entanto vários estudos mostraram o rearranjo e duplicação de genes em diferentes ordens dentro da classe Insecta (BAE et al., 2004; LI et al., 2007; BECKENBACH. 2011; TIMMERMANS; VOGLER, 2012). Devido a isso, pelo menos em Elateroidea (Coleoptera), Dryopoidea (Coleoptera) e Nematocera (Diptera), o rearranjo do mtDNA pode ser um caráter informativo para a inferência da filogenia do grupo. Neste estudo, os genomas de Elateridae e de Lampyridae não apresentaram eventos de rearranjo, apesar da presença de um evento de duplicação gênica dentro da subfamília Lampyrinae (BAE et al., 2004). Os genomas de Phengodidae e Rhagophthalmidae, por sua vez, apresentaram rearranjos gênicos, que serão melhores discutidos abaixo.

Em geral, nos genomas de Coleoptera, o tRNA-Trp ocorre imediatamente após o gene NADH2 e antes do tRNA-Cys. No entanto, no genoma do *Brasilocerus* sp.2 o tRNA-Trp não foi observado, o que sugere que o mesmo poderia ter sido rearranjado dentro da região controle (região não sequenciada) ou perdido (Figura 20). Da mesma forma, os tRNAs Gln e Ile parecem ter sido deletados em *Brasilocerus* sp.2 e em *P. hirtus*, corroborando os resultados obtidos por Li et al. (2007), em estudos com o genoma de *R. ohbai*. Neste último genoma, os dois tRNAs citados e o tRNA-Met não foram encontrados em suas análises,

indicando a deleção destes tRNAs. Timmermans e Vogler (2012), mostraram que tRNA-Ile foi perdido nos genomas de *Sphenophorus* e *Naupactus* (Curculionidae). Provavelmente, esses dois tRNA foram perdidos em algumas espécies de Phengodidae, como *P. hirtus*, no entanto o sequenciamento completo do genoma é necessário para assegurar nossa discussão.

No genoma de *P. hirtus*, o tRNA-Tyr foi rearranjado antes do tRNA-Trp (tRNA-Tyr/tRNA-Trp/tRNA-Cys), enquanto que nos outros genomas de insetos ele é observado depois do tRNA-Cys (tRNA-Trp/tRNA-Cys/tRNA-Tyr) (Figura 20). Para *P. hirtus*, pudemos descrever 13 genes e 20 tRNAs e a duplicação do tRNA-Leu "TTR" e do gene COX2, os quais mostraram aproximadamente 93% de identidade. Devido a isso são necessárias análises mais aprofundadas do genoma de outros Phengodidae para um melhor entendimento desses padrões de rearranjo do mtDNA.

Figura 20 - Ordem do genoma mitocondrial em Coleoptera. Os genes e tRNAs na fita maior são mostrados em preto; genes e tRNAs na fita menor são mostrados em cinza. + Elateridae não-luminescentes; * tRNAs perdidos; - regiões não sequenciadas.

Ancestral	ND2			COI		COII		ATP8 ATP6 COIII			ND3	ND5			ND4 ND4L		ND6 Cyb		ND1	16S	12S	
	I	Q	M	W	C	Y	L	K	D	G	A	R	N	S	E	F	H	T	P	S	L	V
<i>P. termitilluminans</i>	I	Q	M	W	C	Y	L	K	D	G	A	R	N	S	E	F	H	T	P	S	L	V
<i>H. ignifer</i>	I	Q	M	W	C	Y	L	K	D	G	A	R	N	S	E	F	H	T	P	S	L	V
Elateridae*	-	-	-	W	C	Y	L	K	D	G	A	R	N	S	E	F	H	T	P	S	L	V
<i>B. lividipennis</i>	I	Q	M	W	C	Y	L	K	D	G	A	R	N	S	E	F	H	T	P	S	L	V
<i>Brasilocerus</i> sp.2	*	*	M	*	C	Y	L	K	D	G	A	R	N	S	E	F	H	T	P	S	L	V
<i>P. hirtus</i>	*	*	M	Y	W	C	L	K	D	G	A	R	N	S	E	F	H	T	P	S	L	V

Fonte: AMARAL, DT

Em geral, o genoma mitocondrial é um DNA compacto, não apresentando regiões não codificantes (com exceção da região controle). No entanto, observou-se regiões não codificantes dentro dos genomas mitocondriais estudados. As regiões não-codificantes no Elateridae não-luminescente (~960 pb) e *P. hirtus* (~1800 pb), não apresentam semelhança com qualquer outro gene ou região presentes nos banco de dados gênicos. Regiões não codificantes entre 20-210 pb, como ocorre em *B. lividipennis*, são normalmente encontradas em genomas de Diptera e Coleoptera, no entanto, regiões extensas observadas aqui não são facilmente encontradas. Outros estudos com novas espécies são necessários para entender melhor a origem destas regiões não codificantes e sua função no genoma.

6.6. Origem e evolução da bioluminescência em Elateroidea

A origem da bioluminescência na superfamília Elateroidea não é clara. Apesar de usarem o mesmo sistema bioquímico, com luciferases aparentemente homólogas, foi sugerido que a bioluminescência pode ter se originado independentemente nas três famílias. A bioluminescência deve ter surgido pela primeira vez nos estágios imaturos e posteriormente passada para a fase adulta, uma vez que todos os taxa bioluminescentes conhecidos são luminescentes pelo menos na fase larval, enquanto que no estágio adulto nem sempre são bioluminescentes (BRAHAM, 2004; TONOLLI et al., 2011). Portanto, é provável que a bioluminescência tenha surgido em momentos diferentes em distintas fases da vida dos Elateroidea (BRAHAM; WENZEL, 2003; STANGER-HALL, et al., 2007)

No caso da família Phengodidae, estudos recentes com as luciferases das lanternas laterais e da cabeça dos gêneros *Phrixotrix*, *Brasilocerus* e *Taxinomastinocerus*, sugeriram que as luciferases das lanternas laterais e da cabeça são parálogas, e que a lanterna da cabeça e sua luciferase podem ser sinapomórficas ao grupo, tendo evoluído por um evento de duplicação gênica durante a divisão entre as tribos Mastinocerini e Phengodini (ARNOLDI et al., 2010). A presença de lanternas laterais ao longo do corpo da fase larval dos Elateridae e Phengodidae constitui um padrão anatômico plesiomórfico por ser mais comum em larvas bioluminescentes de Elateroidea (ARNOLDI et al., 2010; VIVIANI et al., 2008; TONOLLI et al., 2011).

De acordo com Viviani et al. (2008), este padrão comum de distribuição de lanternas deve ter sido precedida por uma fase onde ainda não existiam lanternas. De fato, a bioluminescência de baixa intensidade já foi relatada em outras partes do corpo das larvas de vagalumes e, estudos anatômicos recentes com larvas de lampírideos mostraram que os trofócitos do corpo gorduroso, que são amplamente distribuídos ao longo de todo o corpo da larva, são fracamente luminescentes, e podem ser a célula ancestral ontogênica que deu origem aos fotócitos das lanternas (VIVIANI et al. 2008; TONOLLI et al., 2001). Além disso, a descoberta de enzimas tipo-luciferase distantes relacionados às luciferases em espécies de besouros da família Tenebrionidae, que são não-luminescentes, sugerem que o potencial para a bioluminescência na superfamília de enzimas AMP/CoA-ligases, dada a presença de D-luciferina, pode ser muito antiga, anterior a divergência das principais famílias luminescentes de Elateroidea (VIVIANI et al. 2009). Isto sugere a possibilidade de que as

luciferases e a bioluminescência das diferentes famílias possam ter se originado independentemente diversas vezes a partir de enzimas similares ancestrais.

Oba et al., (2010b), descrevem a presença de duas isoenzimas em três estágios de vida da espécie *L. cruciata* (ovo, larva e adulto), uma das isoenzimas mostrou-se pH-sensível (LcLuc1), com alta expressão nos três estágios estudados, e a outra é pH-insensível (LcLuc2), com alta expressão somente no estágio de ovo. As análises filogenéticas das luciferases agruparam como clado basal das luciferases de Lampyridae, a isoenzima LcLuc2 e a isoenzima de *Photuris pennsylvanica* (PepLuc2), outra luciferase pH-insensível de lampírideos. Esses resultados indicam que uma possível enzima luciferase ancestral pH-insensível pode ter originado uma isoenzima pH-sensível no caso dos lampírideos.

Assim, as luciferases de Elateridae e Phengodidae/Rhagophthalmidae poderiam ter evoluído diretamente de enzimas ancestrais semelhantes pH-insensíveis. No entanto, em algum ponto entre a divergência das famílias Lampyridae e Phengodidae, uma luciferase pH-sensível pode ter se originado por duplicação gênica de um gene que traduz uma isoenzima pH-insensível, que passou a ser expressa apenas nas fases iniciais de vida como mostraram Oba et al. (2010b). Isso pode ter ocorrido dentro dos lampírideos ou dentro do clado Lampyridae/Lycidae e essa isoenzima tornou-se a principal responsável pela emissão de luz nas lanternas da larva e adulto (Figura 18). Estudos com enzimas tipo-luciferase de espécies não-luminescentes próximas, como Lycidae e Cantharidae, podem esclarecer a evolução das luciferases dentro da superfamília Elateroidea.

7. Conclusões

Esse trabalho possibilitou ampliar o conhecimento sobre as relações filogenéticas das famílias de Elateroidea, e sobre a evolução funcional das luciferases de diferentes lanternas e fases de vida dos elaterídeos, por meio da clonagem de novas luciferases e da identificação de resíduos importantes para determinação dos espectros de bioluminescência.

As conclusões que chegamos estão resumidas abaixo:

- Demonstramos, comparando as luciferases de diferentes lanternas de diversas espécies de elaterídeos, que as luciferases dessa família, em geral, possuem maior identidade com as luciferases que emitem a mesma cor, independentemente da lanterna de origem.
- As luciferases de *F. bruchi* e *P. angustus* clonadas apresentaram características bem particulares. A primeira apresentou o pH ótimo mais elevado entre as luciferases clonadas de besouros bioluminescentes, enquanto a segunda apresentou um espectro na região do laranja, sendo novas enzimas de potencial interesse biotecnológico.
- As estruturas primárias das luciferases das lanternas do adulto de *P. termitilluminans* e da larva mostraram-se relativamente distintas. Sugerimos que as luciferases do adulto e larva possuem origens ontogenéticas distintas.
- Dentre os possíveis resíduos observados nos alinhamentos das sequências primárias das luciferases, a mutação S247F na luciferase de *P. termitilluminans* resulta em grande mudança de espectro, evidenciando a importância desta substituição nas luciferases de Elateridae na modulação dos espectros.
- Além do resíduo acima destacado, o alinhamento das luciferases da lanterna abdominal de *P. angustus* com demais luciferases de diferentes cores de elaterídeos, nos indicaram outros possíveis resíduos alvos na modulação das cores no grupo, tais como os resíduos E223, A224, C249, E266, G335, T352, entre outros. Estudos futuros de mutagênese sítio-dirigida serão realizados para estudar os resíduos aqui propostos.

- As análises filogenéticas permitiram resolver o status taxonômico de alguns taxa neotropicais típicos: o gênero *Amydetes* foi confirmado como uma subfamília Amydetinae em Lampyridae. Corroboramos com a divisão da subfamília Phengodinae nas tribos Phengodini e Mastinocerini e o gênero *Euryopa* foi confirmado dentro da tribo Mastinocerini (Phengodinae/Phengodidae).
- O sequenciamento completo dos genomas mitocondriais permitiram a observação de uma grande similaridade entre os genomas das famílias Elateridae e Lampyridae com os demais Coleoptera já sequenciados. O genoma dos representantes de Phengodidae, por sua vez, mostraram-se divergentes, principalmente na espécie *P. hirtus* que apresentou um genoma com tamanho superior a 22kb, marcado por eventos de inversão de tRNAs e duplicação de regiões gênicas.
- As análises filogenéticas usando diferentes marcadores moleculares indicam que a bioluminescência se originou dentro da superfamília Elateroidea pelo menos três vezes independentemente a partir de enzimas ancestrais similares.

8. Referências

- AMARAL, D.T. et al. Molecular phylogeny of Neotropical bioluminescent beetles (Coleoptera: Elateroidea) in southern and central Brazil. **Luminescence**, v.29, p.412-422, 2014.
- AMARAL, D.T.; PRADO, R.A.; VIVIANI, V.R. Luciferase from *Fulgeochlizus bruchi* (Coleoptera: Elateridae), a Brazilian click-beetle with a single abdominal lantern: molecular evolution, biological function and comparison with other click-beetle luciferases. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v.11, n.7, p.1259-67, 2013.
- ARNOLDI F.G.; DA SILVA NETO A.J.; VIVIANI V.R. Molecular insights on the evolution of the lateral and head lantern luciferases and bioluminescence colors in Mastinocerini railroad-worms (Coleoptera: Phengodidae). **Photochem. Photobiol. Sci.** v. 9, n. 1, p.87-92, 2010.
- ARNOLDI, F.G.C. et al. Mitochondrial genome sequence of the Brazilian luminescent click beetle *Pyrophorus divergens* (Coleoptera: Elateridae): Mitochondrial genes utility to investigate the evolutionary history of Coleoptera and its bioluminescence. **Gene**, v. 405, p.1-9, 2007.
- BAE, J.S. et al. The mitochondrial genome of the firefly, *Pyrocoelia rufa*: complete DNA sequence, genome organization and phylogenetic analysis with other insects. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 32, p. 978-985, 2004.
- BECHARA, E.J.H. Luminescent elaterid beetles: biochemical, biological and ecological aspects. **Adv. Oxygenated Processes**, v. 1, p. 123-178, 1988.
- BECHARA, E.J.H.; COLEPICOLO-NETO, P. Brazilian species of luminescent Elaterids: biochemistry and biology. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 82, p. 129-131, 1987.
- BECKENBACH, A.T. Mitochondrial genome sequences of nematocera (Lower Diptera): evidence of rearrangement following a complete genome duplication in a winter crane Fly. **Genome Biol. Evol.**, v.4, n.1, p.89-101, 2011.
- BEHEREGARAY, L.B. Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. **Mol. Ecol.**, v.17, p.3754-3774, 2008.
- BEUTEL, R.G. Phylogenetic analysis of Elateriformia (Coleoptera: Polyphaga) based on larval characters. **J. Zoolog. Syst. Evol. Res.** v.33, p.145-171, 1995.
- BIGGLEY, W.H.; LLOYD, J.E.; SELIGER, H.H. The spectral distribution of firefly light. II. **J. Gen. Physiol.** v.50, p. 1681-1692, 1967.
- BITLER, B.; McELROY, W.D. The Preparation and Properties of Crystalline Firefly Luciferin. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.72, n.2, p. 358-368, 1957.
- BOCAKOVA, M. Multiple origins of bioluminescence and winglessness in elateroids, molecular evidence for paraphyletic cantharoids, and the phylogeny of Elateriformia. **Palacký University Olomuc.** 2008. p. 17. Disponível em:

<http://www.prf.upol.cz/fileadmin/user_upload/PrF-dokumenty/Vedecka_rada/Habilitace_a_profesury/ukon_hab_prof/Bocakova_Milada/hab.pra ce-Bocakova.pdf>. Acesso em: junho de 2014.

BOCAKOVA, M. et al. Molecular phylogenetics of Elateriformia (Coleoptera): evolution of bioluminescence and neoteny. **Cladistics**, v.23, p. 477–496, 2007.

BOORE, J.L.; LAVROV, D.V.; BROWN, W.M. Gene translocation links insects and crustaceans. **Nature**, v.392, p.667–668, 1998.

BRANCHINI B.R. et al. A mutagenesis study of the luciferin binding site residues of firefly luciferase. **Biochemistry**, v.42, n.35, p.10429-10436, 2003.

BRANCHINI, B. R. et al. Site-directed mutagenesis of Histidine 245 in firefly luciferase: a proposed model of the active site. **Biochemistry**, v.37, p.15311-15319, 1998.

BRANCHINI, B. R. et al. Yellow-green and red firefly bioluminescence from 5,5-dimethylxyluciferin. **JACS**, v. 124, p.2112-2113, 2002.

BRANCHINI, B.R. et al. An alternative mechanism of bioluminescence color determination in firefly luciferase. **Biochemistry**, v.43, p.7255-62, 2004.

BRANHAM, M. A.; WENZEL, J. W. The origin of photic behavior and the evolution of sexual communication in fireflies (Coleoptera: Lampyridae). **Cladistics**, v.19, p.1-22, 2003.

BRANHAM, M.A. Glow-worms, railroad-worms, Coleoptera: Phengodidae. **Univ. Fl. IFAS Extension Publ.** EENY-332. 2004. Disponível em <<http://entomology.ifas.ufl.edu/creatures/misc/beetles/glow-worms.htm>>. Acessado em 07 de outubro de 2014.

BRANHAM, M.A.; WENZEL, J.W. The evolution of bioluminescence in cantharoids (Coleoptera: Elateroidea). **Fla. Entomol.** v.84, p.565–586, 2001.

CHOMCZYNSKY, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acidic guanidine thiocyanate-phenol-chloroform extractions. **Anal. Biochem.**, v. 162, p. 156 – 159, 1987.

COLEPICOLO-NETO, P.; COSTA, C.; BECHARA, E.J.H. Brazilian species of luminescent Elateridae. **Insect Biochem.**, v.16, p. 803–810, 1986.

COSTA, C. *Pyrearinus termitilluminans*, SP.N., with description of the immature stages (Coleoptera, Elateridae, Pyrophorini). **Revta. Bras. Zool.**, v.1, n.1, p. 23-30, 1982.

COSTA, C. Speciation and geographical patterns in *Pyrophorus* Bilberg, 1820 (Coleoptera, Elateridae, Pyrophorini). **Pap. Avulsos de Zool. (São Paulo)**, v. 29, n. 18, p. 141-154, 1976.

COSTA, C. Systematics and evolution of the tribes Pyrophorini and Heligmini, with description of *Campyloxeninae*, new subfamily (Coleoptera: Elateridae). **Arq. Zool.**, v.26, p.49-190, 1975.

COSTA, C. Sistemática e bionomia de *Pyrearinus* Costa, 1975 (Coleoptera, Elateridae). **Arq. Zool.**, São Paulo, v. 29, n.4, p. 185-236, 1978.

- COSTA, C.; LAWRENCE, J.F.; ROSA, S.P. Elateridae Leach, 1815. In: LAWRENCE, J. F.; LESCHEN, R. A. B. (Ed.). **Handbook of zoology**. New York: de Gruyter, 2010. v. 2, part 38: Coleoptera, Polyphaga, p. 75–103.
- COSTA, C.; VANIN, S. A.; CASARI-CHEN, S.A. Larvas de Coleoptera do Brasil. In: _____ (Ed.). **Universidade de São Paulo**, São Paulo, Brazil. 1988. .282.
- COSTA, C.; VANIN, S.A. Coleoptera Larval Fauna Associated with Termite Nests (Isoptera) with Emphasis on the “Bioluminescent Termite Nests” from Central Brazil. **Psyche: A Journal of Entomology**, Cambridge, v. 2010, p. 1-13, 2010.
- CROWSON, R. A. A review of the classification of Cantharoidea (Coleoptera), with the definition of two new families, Cneoglossidae and Omethidae. **Revista de La Universidad de Madrid**, v.21, p. 35-77, 1972.
- CROWSON, R.A. **The Natural Classification of the Families of Coleoptera**. Nathaniel Lloyd, London, 1955.
- DAY, J. C.; GOODALL, T. I.; BAILEY, M. J. The evolution of the adenylate-forming protein family in beetles: Multiple luciferase gene paralogues in fireflies and glowworms. **Mol. Phylogenet. Evol.**, 2009.
- De WET, J.R. et al. Cloning of firefly luciferase cDNA and expression of active luciferase in *Escherichia coli*. **PNAS.**, v.82, p. 7870-7873, 1985.
- DeLUCA, M.; MCELROY, W.D. Purification and properties of firefly luciferase. **Methods Enzymol.**, v.57, p. 3–15, 1978.
- DeLUCA, M. Hydrophobic nature of the active site of firefly luciferase. **Biochemistry**, v.8, p 160-166, 1969.
- DEVINE, J.H. et al. Luciferase from the east European firefly *Luciola mingrelica*: cloning and nucleotide sequence of cDNA, overexpression in *E. coli* and purification of the enzyme. **Biochim. CBIophys. Acta**, v. 1173, p. 121-132, 1993.
- EMAMZADEH, A.R. et al. cDNA cloning, expression and homology modeling of a luciferase from the firefly *Lampyroidea maculata*. **J. Biochem. Mol. Biol.** v.39, n.5, p578-85, 2006.
- FEDER, J.L.; VELEZ, S. Intergenic exchange, geographic isolation, and the evolution of bioluminescent color for *Pyrophorus* click beetles. **Evolution**, v. 63, p.1203–1216, 2009.
- FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, v.39, p. 783–791, 1985.
- FRIEDRICH, M.; MUQIM, N. Sequence and phylogenetic analysis of the complete mitochondrial genome of the flour beetle *Tribolium castanaeum*. **Mol. Phyl. Evol.**, v.26, p.502–512, 2003.
- GREEN, A.; MCELROY, W.D. Function of adenosine triphosphate in the activation of luciferin. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.64, n.2, p.257–271. 1956.
- HADDOCK, S.H.D.; MOLINE, M.A.; CASE, J.F. Bioluminescence in the Sea. **Ann. Rev. Mar. Sci.**, v.2, p. 443-493, 2010.

- HASTINGS, J. W.; MORION, J.G. Bioluminescence. In: PROSSER, L. (Ed.). **Neural and Integrative Animal Physiology**. (L. Prosser ed.), New York, Wiley-Liss, 1991, p.131-169.
- HASTINGS, J.W. Biological diversity, chemical mechanisms and evolutionary origins of bioluminescent systems. **J. Mol. Evol.** v.19, p.309-321, 1983.
- HERRING, P.J. A Classification of luminous organisms. In: HENRRING, P.J. (Ed.). **Bioluminescence in Action**. New York, Academic Press, 1978, p. 461-476.
- HIGGINS, D. et al. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.** v.22, p. 4673-4680, 1994.
- IVIE, M.A.; BARCLAY, M.V.L. The familial placement and specific membership of *Escalerina* Bolívar Y Pieltain and *Paulusiella* Löbl (Coleoptera: Elateridae, Dascillidae, Drilidae), with new synonymies. **The Coleopterists Bulletin**, v.65, n.2, p.167-172. 2011.
- KAJIYMA, N.; NAKANO, E. Isolation and characterization of mutants of firefly luciferase which produce different colors of light. **Protein Eng.**, v. 4, p. 691-693, 1991.
- KAZANTSEV, S.V. Morphology of the family Licydae and some ideas on evolution of Coleoptera. **Elytron**, v.17, p.49-226. 2003.
- KUNDRATA, R.; BOCAK, L. The phylogeny and limits of Elateridae (Insecta, Coleoptera): is there a common tendency of click beetles to soft-bodiedness and neoteny?. **Zool Scr**, v. 40, p. 364-378, 2011.
- KUTUZOVA, G. D.; HANNAH, R. R.; WOOD, K. V. Bioluminescence color variation and kinetic behavior relationships among luciferases. **Biolum. Chemiolum.**, p. 248-252, 1996.
- LALL, A. B. et al. Vision in click beetles (Coleoptera: Elateridae): pigments and spectral correspondence between visual sensitivity and species bioluminescence emission. **J. Comp. Physiol., A**, v. 196, p. 629–638, 2010.
- LALL, A.B. et al. Ecology of colors of fireflies bioluminescence. **Science**, v. 210, p. 560-562, 1980.
- LALL, A. B. et al. Spectral correspondence between visual spectral sensitivity and bioluminescence emission spectra in the click beetle *Pyrophorus punctatissimus* (Coleoptera: Elateridae). **J.Insect Physiol.**, v. 46, p. 1137–1141, 2000.
- LAWRENCE, J.F.; NEWTON, A.F. JR. Families and subfamilies of Coleoptera (with selected genera, notes, references, and data on family-group names). In: **Bioluminescence in Action** (Ed. P. Herring). New York, Academy Press, 1995, p. 109-127. 1995.
- LI, X. et al. Mitochondrial genomes of two luminous beetles, *Rhagophthalmus lufengensis* and *R. ohbai* (Arthropoda, Insecta, Coleoptera). **Gene**, v. 392, p. 196–205, 2007.
- LLOYD, J.E. Bioluminescence communication in insects. **Annu. Rev. of Entomol.**, v. 16, p. 97-122. 1971.
- LLOYD, J.E. Lampyridae. In: ARNETT, R.A. et al.(Eds.), **American Beetles, Vol. 2**. Boca Raton, CRC Press, 2002 ,pp. 187–196.

- LOWE, T. D.; EDDY, S. R. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. **Nucleic Acids Res.**, v. 25, p.955–964, 1997.
- MADDISON, D.R.; BAKER, M.D.; OBER, K.A. Phylogeny of Carabi beetles as inferred by 18S ribosomal DNA (Coleoptera: Carabidae). **Systematic Entomology**, v. 24, p. 103-138, 1999.
- McCAPRA, F. et al. The chemical origin of color differences in the beetle bioluminescence. In: CAMPBELL, A.K.; Kricka, L.J., Stanley. P.E. (eds). **Bioluminescence and Chemoluminescence: Fundamental and Applied aspects**. Wiley, Chichester, 387-391. 1994.
- McDERMOTT, F. A. The taxonomy of Lampyridae. **Trans. Am. Entomol. Soc.** v.90, p.1-72, 1964.
- McDERMOTT, F.A. Pars. 9: Lampyridae (editio secunda). In: STEEL, W.O. [Ed.] **Coleopterorum Catalogus Supplementa**. s–Gravenhage, W. Junk, 1966, p. 149.
- McELROY, W.D.; DeLUCA, M.; TRAVIS, J. Molecular uniformity in biological catalysis. **Science**, v.157, p.150-157, 1967.
- MITANI, Y. et al. Cloning and Characterization of Luciferase from a Fijian Luminous Click Beetle. **Photchem. Photobiol.** v.89, p. 1163-1169, 2013.
- MORADI, A. et al. Effect of charge distribution in a flexible loop on the bioluminescence color of firefly luciferases. **Biochemistry**, v.48, p.575–582, 2009.
- MUONA, J. The phylogeny of Elateroidea (Coleoptera), or which tree is best today? **Cladistics**, v.11, p.317-341, 1995.
- NAKATSU, T. et al. Structural basis for the spectral difference in luciferase bioluminescence. **Nature**, v.440, p. 372–376, 2006.
- O'KEEFE, S. T. Phengodidae LeConte 1861, In: ARNETT, R.H. et al. **American Beetles: Polyphaga: Scarabaeoidea through Curculionoidea**. Boca Raton: CRC Press, 2000. v. 2, p. 181-184.
- OBA, Y. et al. Orthologous gene of beetle luciferase in non-luminous click beetle, *Agrypnus binodulus* (Elateridae), encodes a fatty acyl- CoA synthetase. **Gene**, v. 407, p.169-175, 2008.
- OBA, Y.; KUMAZAKI, M.; INOUE, S. Characterization of luciferases and its paralogue in the Panamanian luminous click beetle *Pyrophorus angustus*: a click beetle luciferase lacks the fatty acyl-CoA synthetic activity. **Gene**, v.452, p.1-6, 2010a.
- OBA, Y. et al. Identification and Characterization of a Luciferase Isotype in the Japanese Firefly, *Luciola cruciata*, Involving in the Dim Glow of Firefly Eggs. **Biochemistry**, v.49, p.10788–10795, 2010b.
- OBA, Y.; OJIKI, M.; INOUE, S. Firefly luciferase is a bifunctional enzyme: ATP-dependent monooxygenase and a long chain fatty acyl-CoA synthetase. **FEBS Letters**, v.540, p.251-254, 2003.
- OBA, Y. et al. Enzymatic and genetic characterization of firefly luciferase and *Drosophila* CG6178 as a fatty acyl- CoA synthetase. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v.69, p.819–828, 2005.

- OBA, Y. et al. Firefly luciferase genes from the subfamilies Psilocladinae and Otoretinae (Lampyridae, Coleoptera). **Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.**, v.161, n.2, p.110-116, 2012.
- OHMIYA, Y. et al.. Cloning, expression, and sequence analysis of cDNA for the Luciferase from the Japanese fireflies, *Pyrocoelia miyako* and *Hotaria parvula*. **Photchem. Photobiol.** v.62, p. 309-313. 1995.
- PENNINGTON, R. T.; PRADO, D. E.; PENDRY, C. A. Neotropical seasonally dry forest and Quaternary vegetation changes. **J. Biogeography**, v. 27, p. 2, 2000.
- POSADA, D.; CRANDALL, K.A. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics**, v.14, p.817–818, 1998.
- POTOTSKAJA V. A. Phylogenetic links and composition of the Superfamily Cantharoidea (Coleoptera) based on the study of larval characters. **Entomol. Obozrenie**, v. 62, p. 549-554, 1983.
- REDFORD, K.H. Prey attraction as a possible function of bioluminescence in the larvae of *Pyrearinus termitilluminans* (Coleoptera: Elateridae). **Revta bras. Zool.**, v.1, n.1, p.31-34. 1982.
- REES, J.F. et al. The origins of marine bioluminescence: turning oxygen defence mechanisms into deep-sea communication tools. **J. Exp. Biol.**, v.201, p.1211-1221, 1998.
- RICHMOND, M. P.; CATERINO, M.S. Population Subdivision of *Zarhipis integripennis* (Coleoptera: Phengodidae), in Southern California. **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v.105, n.2, p.241-252. 2012.
- RODA, A. et al. Biotechnological applications of bioluminescence and chemiluminescence. **Trends in Biotechnology**, v.22, n.6, p. 295-303. 2004.
- RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J.P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v.19, p.1572–1574, 2003.
- ROSA, S. P. **Análise Filogenética e Revisão Taxonômica da Tribo Pyrophorini Candèze, 1863 (Coleoptera, Elateridae, Agrypinae)**. 2007. 252p. Tese de defesa de Doutorado apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para obtenção de título de Doutor em Ciências, na área de Zoologia. 2007.
- ROSA, S. P.; COSTA, C.; HIGASHI, N. New data on the natural history and description of the immatures of *Fulgeochlizus bruchi*, a bioluminescent beetle from central Brazil (Elateridae, Pyrophorini). **Pap. Avul. Zool.**, v.50, p.635-641, 2010.
- SAGEGAMI-OBA, R.; OBA, Y.; ÔHIRA, H. Phylogenetic relationships of click beetles (Coleoptera: Elateridae) inferred from 28S ribosomal DNA: Insights into the evolution of bioluminescence in Elateridae. **Mol. Phylogenet. Evol.** v.42, n.2, p.410-421. 2007.
- SAGEGAMI-OBA, R.; TAKAHASHI, N.; OBA, Y. The evolutionary process of bioluminescence and aposematism in cantharoid beetles (Coleoptera: Elateroidea) inferred by the analysis of 18S ribosomal DNA. **Gene**, 400, p.104-113, 2007.

- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstruction of phylogenetic trees. **Mol. Biol. Evol.**, v.4, p.406–25, 1987.
- SALA-NEWBY, G.B.; THOMSON, C.M.; CAMPBELL, A.K. Sequence and biochemical similarities between the luciferases of the glow-worm *Lampyrus noctiluca* and the firefly *Photinus pyralis*. **Biochem. J.**, v.313, p. 761-767, 1996.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning, a laboratory manual**. New York: 2. ed. Cold Spring Harbor, 1989.
- SÁNCHEZ, R. et al. Phylemon 2.0: a suite of web-tools for molecular evolution, phylogenetics, phylogenomics and hypotheses testing. **Nuc. Acids Res.**, v.10, p.1093, 2011.
- SANDALOVA, T.P.; UGAROVA, N.N. Model of the active site of firefly luciferase. **Biochemistry**, Moscow, v. 64, p. 962-967, 1999.
- SCHOLTEN, J.D. et al. Novel enzymic hydrolytic dehalogenation of a chlorinated aromatic. **Science**, v.253, p.182-185, 1991.
- SCHROEDER, S. Protein sequence homology between plant 4-coumarate:CoA ligase and firefly. **Nuc. Acids Res.**, v.17, p.460, 1989.
- SHEFFIELD, N.C. et al. A comparative analysis of mitochondrial genomes in Coleoptera (Arthropoda: Insecta) and genome descriptions of six new beetles. **Mol. Biol. Evol.**, v.25, p.2499–2509, 2008.
- SHEFFIELD, N.C. et al. Nonstationary Evolution and Compositional Heterogeneity in Beetle Mitochondrial Phylogenomics. **Syst. Biol.**, v.58, n.4, p.381-394, 2009.
- SIMON, C. et al. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v.87, n.6, p.651-701, 1994.
- SIVINSKY, J. The nature and possible functions of luminescence in Coleoptera larvae. **Coleopterists Bulletin**, v. 35, p. 167-179, 1981.
- STANGER-HALL, K.F.; LLOYD, J.E.; HILLIS, D.M. Phylogeny of North American fireflies (Coleoptera:Lampyridae): Implications for the evolution of light signals. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v.45, p. 33-49, 2007.
- STEWART, J.B.; BECKENBACH, A.T. Phylogenetic and genomic analysis of the complete mitochondrial DNA sequence of the spotted asparagus beetle *Crioceris duodecimpunctata*. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v.26, p. 513–526, 2003.
- STOLZ, U. et al. Darwinian natural selection for orange bioluminescent color in a Jamaican click beetle. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.100, n.25, p.14955-14959, 2003.
- SUZUKI, H. et al. Structure and regulation of rat long chain fatty acyl-CoA synthetase. **The Journal of Biological Chemistry**, v.25, p.8681-8685, 1990.
- SWOFFORD, D.L. PAUP*. **Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods)**. Version 4. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 2002.

- SWOFFORD, D.L. et al. Phylogenetic inference. In: HILLIS, D.M., MORITZ, C., MABLE, B.K. (Ed.). **Molecular Systematics**. Sunderland, Sinauer Associates, 1996, p. 407–514.
- TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Mol. Biol. Evol.**, v.30, p.2725-2729, 2013.
- TATSUMI, H. et al. Luciferase cDNA from Japanese firefly *Luciola cruciata*: cloning, structure and expression in *E. coli*. **J. Biolumin. Chemilumin.**, v.3, p. 75-78, 1989.
- TIMMERMANS, M.J.T.N. et al. Why barcode? High-throughput multiplex sequencing of mitochondrial genomes for molecular systematics. **Nucl. Acids Res.** v.38, 2010.
- TIMMERMANS, M.J.T.N.; VOGLER, A.P. Phylogenetically informative rearrangements in mitochondrial genomes of Coleoptera, and monophyly of aquatic elateriform beetles (Dryopoidea). **Mol. Phylogenet. Evol.**, v.63, p.299–304, 2012.
- TOH, H. N-terminal halves of gramicidin S synthetase and tyrocidine synthetase 1 as novel members of firefly luciferase family. **Protein Sequences and Data Analysis**, 3, p.517-521, 1990.
- TONOLLI, P. N. et al. Bioluminescent Fat Body of Larval *Aspisoma lineatum* (Coleoptera: Lampyridae) Firefly: Ontogenic Precursor of Lantern's Photogenic Tissue. **Ann. Entomol Soc Am.**, v.104, p.761-767, 2011.
- UGAROVA, N.N.; MALOSHENOK, L.G.; UPOROV, I.V.; KOKSHAROV, M.I. Bioluminescence spectra of native and mutant firefly luciferase as a function of pH. **Biochemistry**, Moscow, v.70, p.1262-1276, 2005.
- VELEZ, S.; FEDER, J.L. Integrating biogeographic and genetic approaches to investigate the history of bioluminescence colour alleles in the Jamaican click-beetle *Pyrophorus plagiophthalmus*. **Mol. Ecol.**, v.15, n.5, p.1393-1404, 2006.
- VIVIANI, V. R. Fireflies (Coleoptera:Lampyridae) from Southeastern Brazil: habitats, life-history and bioluminescence. **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v.94, p.129-145, 2001.
- VIVIANI, V. R. The origin, diversity, and structure function relationships of insect luciferases. **Cell. Mol Life Sci.**, v.59, p. 1833– 1850, 2002.
- VIVIANI, V. R.; BECHARA, E. J. H. Bioluminescence of Brazilian fireflies (Coleoptera: Lampyridae): spectral distribution and pH-effect on luciferase-elicited colors - comparison with elaterid and phengodid luciferases. **Photochem. Photobiol.**, v. 62, p. 490-495, 1995.
- VIVIANI, V. R.; OHMIYA, Y. Bioluminescence color determinants of *Phrixothrix* railroadworm luciferases: chimeric luciferases, site-directed mutagenesis of Arg215 and guanidine effect. **Photochem. Photobiol.**, v. 72, p. 267-271, 2000.
- VIVIANI, V. R. et al. CCD imaging of basal bioluminescence in larval fireflies: clues on the anatomic origin and evolution of bioluminescence. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v.7, p.448-452, 2008.
- VIVIANI, V. R. et al. An ancestral luciferase in the Malpighi tubules of a non bioluminescent beetle! **Photochem. Photobiol.**, v.8, p. 57 – 61, 2009.

- VIVIANI, V. R. et al. A new blue-shifted luciferase from the Brazilian *Amydetes fanestratus* (Coleoptera: Lampyridae) firefly: molecular evolution and structural/functional properties. **Photoch Photobio Sci.**, v.10, p.1879-1886, 2011.
- VIVIANI, V.R. et al. Cloning and characterization of the cDNA for the Brazilian *Cratomorphus distinctus* larval firefly luciferase: similarities with European *Lampyris noctiluca* and Asiatic *Pyrocoelia* luciferases. **Comp. Biochem. Physiol., Part B Biochem. Mol. Biol.**, v.139, p. 151–156, 2004.
- VIVIANI, V.R. et al. Few substitutions affect the bioluminescence spectra of *Phrixotrix* (Coleoptera: Phengodidae) luciferases: a site-directed mutagenesis survey. **Luminescence**, v. 22, p. 362-369, 2007.
- VIVIANI, V.R.; BECHARA E.J.H.; OHMIYA, Y. Cloning, sequence analysis, and expression of active *Phrixotrix* railroad-worms Luciferases: relationship between bioluminescence spectra and primary structures. **Biochemistry**, v.38, p.8271 – 8279, 1999.
- VIVIANI, V.R.; BECHARA, E.J.H. Biophysical and biochemical aspects of phengodid bioluminescence. **Photochem. Photobiol.**, v.58, p.615-622, 1993.
- VIVIANI, V.R.; BECHARA, E.J.H. Larval *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) fat body extracts catalyze firefly D-Luciferin- and ATP-dependent chemiluminescence: a luciferase-like enzyme. **Photochem. Photobiol**, v.63, n.6, p. 713-718. 1996.
- VIVIANI, V.R.; BECHARA, J.H. Bioluminescence and biological aspects of Brazilian railroadworms (Coleoptera: Phengodidae). **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v.90, p.389-393, 1997.
- VIVIANI, V.R. et al. A new firefly luciferase with bimodal spectrum: identification of structural determinants in spectral p pH-sensitivity firefly luciferases. **Photochem. Photobiol.**, v.81, p. 843–848, 2005.
- VIVIANI, V.R. et al. Cloning and molecular characterization of the cDNA for the Brazilian Larval Click-Beetle *Pyrearinus termitilluminans* Luciferase. **Photochem. Photobiol.**, v.70, n.2, p. 254-260. 1999.
- VIVIVANI, V.R. Descrição do estágio imaturo e dados biológicos de *Aspisoma* sp.. **Revista Brasileira de Entomologia**, v.33, p.359-366, 1989.
- WHITE, E. H.; BRANCHINI, B. Modification of firefly luciferase with a luciferin analog: a red light producing enzyme. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 97, p. 1243-1245, 1975.
- WILSON, T.; HASTINGS, J. W. Bioluminescence. **Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.**, v.14, p. 197-230, 1998.
- WITTMER, W. Arbeiten zu einer revision der Familie Phengodidae (Coleoptera). **Entomologischen Arbeiten aus dem Museum G. Frey**, v. 27, p. 415-524, 1976.
- WITTMER, W.; OHBA, N. Neue Rhagophthalmidae (Coleoptera) aus China und benachbarten Landern. **Japanese Journal of Entomology**, v.62, n.2, p.341-355, 1994.
- WOOD K.V. et al. Complementary DNA coding click beetle luciferases can elicit bioluminescence of different colors. **Science**, v. 244, p. 700–702, 1989.

WOOD, K. V. *Luc* gene: introduction of color into bioluminescence assays. **J. Biolum. Chemilum.**, v.5, p.107-114, 1990.

WOOD, K.V. The chemical mechanism and evolutionary development of beetle bioluminescence. **Photochem. Photobiol.**, v. 58, p.615-622, 1995.

ANEXOS

**Tabelas com as organizações dos genomas
mitocondriais**

Hapsodrilus ignifer

Gene	Direção	início	fim	Anti Condon	Start Codon	Stop Codon
tRNA-Ile	F	1	65	GAT		
TRNA-Gln	R	131	63	TTG		
tRNA-Met	F	131	196	CAT		
NADH2	F	197	1219		ATA	TAA
tRNA-Trp	F	1239	1306	TCA		
tRNA-Cys	R	1362	1299	GCA		
tRNA-Tyr	R	1425	1363	GTA		
COX1	F	1427	2959		AAC	TAG
tRNA-Leu TTR	F	2965	3028	TAA		
COX2	F	3028	3703		ATG	T
tRNA-Lys	F	3707	3777	CTT		
tRNA-Asp	F	3777	3840	GTC		
ATP8	F	3841	3996		ATT	TAA
ATP6	F	3990	4664		ATG	TAA
COX3	F	4664	5450		ATG	T
tRNA-Gly	F	5451	5513	TCC		
NADH3	F	5514	5865		ATA	T
tRNA-Ala	F	5866	5931	TGC		
tRNA-Arg	F	5931	5995	TCG		
tRNA-Asn	F	5996	6059	GTT		
tRNA-Ser "AGN"	F	6060	6126	TCT		
tRNA-Glu	F	6127	6192	TTC		
tRNA-Phe	R	6251	6191	GAA		
NADH5	R	7971	6251		ATA	T
tRNA-His	R	8035	7968	GTG		
NADH4	R	9366	8034		ATG	T
NADH4L	R	9649	9359		ATG	TAA
tRNA-Thr	F	9651	9713	TGT		
tRNA-Pro	R	9777	9714	TGG		
NADH6	F	9779	10285		ATA	TAA
CytB	F	10285	11418		ATG	TAG
tRNA-Ser "TCN"	F	11417	11482	UCN		
NADH1	R	12451	11500		TAA	TAG
tRNA-Leu "CUN"	R	12515	12452	TAG		
lrRNA	R	13786	12516			
tRNA-Val	R	13856	13787	TAC		
sRNA	R	14705	13857			
A+T rich	-	14706	16072			

Pyrearinus termitilluminans

Gene	Direção	início	fim	Anti Condon	Start Codon	Stop Codon
tRNA-Ile	F	1	64	GAT		
TRNA-Gln	R	130	62	TTG		
tRNA-Met	F	131	197	CAT		
NADH2	F	197	1219		ATA	TAA
tRNA-Trp	F	1224	1290	TCA		
tRNA-Cys	R	1345	1283	GCA		
tRNA-Tyr	R	1409	1346	GTA		
COX1	F	1411	2961		AAC	TAG
tRNA-Leu TTR	F	2949	3012	TAA		
COX2	F	3012	3690		ATG	T
tRNA-Lys	F	3691	3761	CTT		
tRNA-Asp	F	3761	3827	GTC		
ATP8	F	3828	3983		ATT	TAA
ATP6	F	3977	4651		ATG	TAA
COX3	F	4651	5437		ATG	T
tRNA-Gly	F	5438	5501	TCC		
NADH3	F	5502	5855		ATA	TAG
tRNA-Ala	F	5854	5920	TGC		
tRNA-Arg	F	5920	5986	TCG		
tRNA-Asn	F	5987	6051	GTT		
tRNA-Ser "AGN"	F	6052	6118	TCT		
tRNA-Glu	F	6119	6183	TTC		
tRNA-Phe	R	6243	6182	GAA		
NADH5	R	7964	6244		ATA	T
tRNA-His	R	8025	7962	GTG		
NADH4	R	9355	8023		ATG	C
NADH4L	R	9639	9349		ATG	TAA
tRNA-Thr	F	9641	9704	TGT		
tRNA-Pro	R	9769	9705	TGG		
NADH6	F	9771	10277		ATA	TAG
CytB	F	10277	11410		ATG	TAG
tRNA-Ser "TCN"	F	11409	11471	TGA		
NADH1	R	12439	11489		TTG	TAG
tRNA-Leu "CUN"	R	12502	12441	TAG		
lrRNA	R	13775	12503			
tRNA-Val	R	13845	13776	TAC		
sRNA	R	14694	13846			
A+T rich	-	14695	16007			

Elateridae não luminescente

Gene	Direção	início	fim	Anti Condon	Start Codon	Stop Codon
tRNA-Ile		não sequenciado				
TRNA-Gln		não sequenciado				
tRNA-Met		não sequenciado				
NADH2	F	1	1023		ATA	TAA
tRNA-Trp	F	1022	1089	TCA		
non-coding		1090	2050			
tRNA-Cys	R	1362	2112	GCA		
tRNA-Tyr	R	2176	2113	GTA		
COX1	F	2169	3708		ACC	T
tRNA-Leu TTR	F	3709	3771	TAA		
COX2	F	3773	4451		ATG	T
tRNA-Lys	F	4452	4522	CTT		
tRNA-Asp	F	4523	4587	GTC		
ATP8	F	4588	4740		ATT	TAA
ATP6	F	4734	5408		ATG	TAA
COX3	F	5405	6191		CTA	T
tRNA-Gly	F	6192	6254	TCC		
NADH3	F	6255	6608		ATA	TAG
tRNA-Ala	F	6607	6670	TGC		
tRNA-Arg	F	6670	6735	TCG		
tRNA-Asn	F	6738	6801	GTT		
tRNA-Ser "AGN"	F	6802	6868	TCT		
tRNA-Glu	F	6869	6932	TTC		
tRNA-Phe	R	6995	6932	GAA		
NADH5	R	8713	6995		ATA	TAA
tRNA-His	R	8775	8711	GTG		
NADH4	R	10099	8762		ATG	TAA
NADH4L	R	10380	10093		ATG	TAA
tRNA-Thr	F	10383	10446	TGT		
tRNA-Pro	R	10512	10446	TGG		
NADH6	F	10513	11016		ATT	TAA
CytB	F	11016	12149		ATG	TAA
tRNA-Ser "TCN"	F	12150	12216	UCN		
NADH1	R	12235	13185		CTA	CAA
tRNA-Leu "CUN"	R	13248	13187	TAG		
lrRNA	R	14515	13249			
tRNA-Val	R	14584	14516	TAC		
sRNA	R	15331	14386			
A+T rich		não sequenciado				

Bicellonycha lividipennis

Gene	Direção	início	fim	Anti Condon	Start Codon	Stop Codon
tRNA-Ile	F	1	64	GAT		
TRNA-Gln	R	131	63	TTG		
tRNA-Met	F	131	197	CAT		
NADH2	F	198	1220		ATA	TAA
tRNA-Trp	F	1222	1293	TCA		
Non-conding	-	1294	1423			
tRNA-Cys	R	1482	1424	GCA		
tRNA-Tyr	R	1546	1484	GTA		
COX1	F	1539	3083		ATT	TAA
tRNA-Leu TTR	F	3079	3141	TAA		
COX2	F	3142	3820		ATA	T
tRNA-Lys	F	3821	3891	CTT		
tRNA-Asp	F	3891	3955	GTC		
ATP8	F	3956	4108		ATT	TAA
ATP6	F	4102	4776		ATG	TAA
COX3	F	4776	5559		ATG	T
tRNA-Gly	F	5560	5621	TCC		
NADH3	F	5625	5973		ATA	T
tRNA-Ala	F	5974	6038	TGC		
tRNA-Arg	F	6038	6105	TCG		
tRNA-Asn	F	6105	6170	GTT		
tRNA-Ser "AGN"	F	6171	6226	AGC		
tRNA-Glu	F	6227	6292	TTC		
tRNA-Phe	R	6353	6291	GAA		
NADH5	R	8055	6354		ATT	T
tRNA-His	R	8119	8056	GTG		
NADH4	R	9449	8120		ATT	T
NADH4L	R	9733	9443		ATG	TAA
tRNA-Thr	F	9735	9798	TGT		
tRNA-Pro	R	9863	9799	TGG		
NADH6	F	9864	10370		ATA	TAA
CytB	F	10370	11498		ATG	T
tRNA-Ser "TCN"	F	11499	11565	TGA		
NADH1	R	12532	11582		TTG	TAG
tRNA-Leu "CUN"	R	12594	12534	TAG		
lrRNA	R	13844	12595			
tRNA-Val	R	13913	13845	TAC		
sRNA	R	14685	13914			
A+T rich	-	14686	16466			

Brasilocerus sp.2

Gene	Direção	início	fim	Anti Condon	Start Codon	Stop Codon
tRNA-Ile	*					
TRNA-Gln	*					
tRNA-Met	F	1	71	CAT		
NADH2	F	72	1093		ATT	TT
tRNA-Trp	*					
tRNA-Cys	R	1166	1101	GCA		
tRNA-Tyr	R	1231	1167	GTA		
COX1	F	1224	2765		ATT	TAA
tRNA-Leu TTR	F	2766	2828	TAA		
COX2	F	2831	3503		ATG	T
tRNA-Lys	F	3504	3573	AAG		
tRNA-Asp	F	3573	3639	GTC		
ATP8	F	3640	3792		ATT	TAA
ATP6	F	3786	4457		ATG	TAA
COX3	F	4457	5237		ATG	T
tRNA-Gly	F	5238	5303	TCC		
NADH3	F	5301	5645		ATA	TAG
tRNA-Ala	F	5644	5703	GCA		
tRNA-Arg	F	5703	5758	CGA		
tRNA-Asn	F	5762	5829	AAC/AAT		
tRNA-Ser "AGN"	F	5830	5892			
tRNA-Glu	F	5893	5955	TTC		
tRNA-Phe	R	6019	5954	GAA		
NADH5	R	7728	6019		ATT	TAA
tRNA-His	R	7792	7726	GTG		
NADH4	R	9107	7794		ATG	TAA
NADH4L	R	9388	9101		ATT	TAA
tRNA-Thr	F	9381	9442	TGT		
tRNA-Pro	R	9509	9443	TGG		
NADH6	F	9512	10009		ATC	TAA
CytB	F	10006	11109		ATA	TAG
tRNA-Ser "TCN"	F	11108	11170	UCA		
NADH1	R	12138	11188		ATT	TAG
tRNA-Leu "CUN"	R	12203	12140	TAG		
lrRNA	R	13481	12204			
tRNA-Val	R	13547	13481			
sRNA	R	14423	13548	(partial)		
A+T rich	?					

*possíveis deleções

Phrixothrix hirtus

Gene	Direção	início	fim	Anti Condon	Start Codon	Stop Codon
tRNA-Ile		*				
TRNA-Gln		*				
tRNA-Met	F	1	67	CAT		
NADH2	F	64	1083		ATT	TAA
non-coding region		1084	2674			
tRNA-Tyr	R	2739	2675	GTA		
GAP		2740	2796			
tRNA-Trp	F	2797	2861	TCA		
tRNA-Cys	R	2925	2862	GCA		
COX1	F	2945	4486		CTG	TAA
tRNA-Leu TTR	F	4487	4548	TAA		
COX2	F	4551	5223		ATG	T
tRNA-Lys	F	5224	5293	CTT		
tRNA-Asp	F	5293	5360	GTC		
ATP8	F	5361	5513		ATT	TAA
ATP6	F	5507	6178		ATG	TAA
COX3	F	6178	6960		ATG	A
tRNA-Gly	F	6960	7026	TCC		
NADH3	F	7027	7380		ATA	TAG
tRNA-Ala	F	7379	7437	TGC		
tRNA-Arg	F	7437	7490	TCG		
tRNA-Asn	F	7494	7558	GTT		
tRNA-Ser "AGN"	F	7559	7617	TCT		
tRNA-Glu	F	7618	7680	TTC		
tRNA-Phe	R	7741	7679	GAA		
NADH5	R	9448	7760		ATG	TAA
tRNA-His	R	9446	9509	GTG		
NADH4	R	10826	9504		ATG	TAA
NADH4L	R	11110	10820		ATT	TAA
tRNA-Thr	F	11103	11165	TGT		
tRNA-Pro	R	11229	11166	TGG		
NADH6	F	11220	11722		CTA	AA
CytB	F	11692	12822		ATA	TAG
tRNA-Ser "TCN"	F	12821	12883	UCN		
NADH1	R	13851	12901		ATT	TAG
tRNA-Leu "CUN"	R	13915	13853	TAG		
lrRNA	R	13915	15173			
tRNA-Val	R	15241	15174	TAC		
sRNA	R	15240	16010			
A+T rich		16011	20180			
tRNA-LeuTTR_dupl.	F	20181	20243			
COII_dupl.	F	20246	20920		ATG	T

Artigos em preparação, submetidos e aceitos

Em preparação

Organization, phylogenetic informative rearrangements and comparative analysis of the mitochondrial genome of bioluminescent Elateroidea (COLEOPTERA: POLYPHAGA).

Danilo T. Amaral, Yasuo Mitani, Yoshihiro Ohmiya, Vadim R. Viviani*

Phylogenetic approaches and structural conservation in mitochondrial control region of bioluminescent Elateridae species (Coleoptera).

Danilo T. Amaral, Gabriela Oliveira, Yasuo Mitani, Yoshihiro Ohmiya, Vadim R. Viviani*

Influence of residues S/F250 in bioluminescence color determination in beetle luciferases

V. R. Viviani,* D. T. Amaral, G. V. M. Gabriel, A. F. Simões and Frederico C.G. Arnoldi

Submetidos

A transcriptional and proteomic survey of *Arachnocampa luminosa* (Diptera: Keroplatidae) lanterns brings insights on the origin of bioluminescence from the Malpighian tubules in Diptera. Submetido a *Luminescence*.

Silva, J. R., Amaral, D. T., Wilson, T., Hastings, W., Viviani, V. R.*

Aceito

Silva, J. R., Prado R. A., Amaral, D. T., Viviani, V. R.* First transcriptional survey of the Malpighian tubules of *Zophobas morio* (Coleoptera: Tenebrionidae) giant mealworm. Genetics and Molecular Research.

Artigos publicados

Cite this: DOI: 10.1039/c1pp05210a

www.rsc.org/pps

PAPER

A new blue-shifted luciferase from the Brazilian *Amydetes fanestratus* (Coleoptera: Lampyridae) firefly: molecular evolution and structural/functional properties

Vadim R. Viviani,^{*a,b} Danilo Amaral,^{a,b} Rogilene Prado^{a,b} and Frederico G. C. Arnoldi^c

Received 1st July 2011, Accepted 25th August 2011

DOI: 10.1039/c1pp05210a

Firefly luciferases usually produce bioluminescence in the yellow-green region, with colors in the green and yellow-orange extremes of the spectrum being less common. Several firefly luciferases have already been cloned and sequenced, and site-directed mutagenesis studies have already identified important regions and residues for bioluminescence colors. However the structural determinants and mechanisms of bioluminescence colors turned out to be elusive, mainly when comparing luciferases with a high degree of divergence. Thus comparison of more similar luciferases producing colors in the two extremes of the spectrum could be revealing. The South-American fauna of fireflies remains largely unstudied, with some unique taxa that are not found anywhere else in the world and that produce a wide range of bioluminescence colors. Among them, fireflies of the genus *Amydetes* are especially interesting because its taxonomical status as an independent subfamily or as a tribe is not yet solved, and because they usually produce a continuous bright blue-shifted bioluminescence. In this work we cloned the cDNA for the luciferase of the Atlantic rain forest *Amydetes fanestratus* firefly, which is found near Sorocaba municipality (São Paulo, Brazil). Despite showing a higher degree of identity with the South-American *Cratomorphus*, the European *Lampyrus* and the Asiatic *Pyrocoelia*, phylogenetical analysis of the luciferase sequence support the inclusion of *Amydetes* as an independent subfamily. *Amydetes* luciferase displays one of the most blue-shifted emission spectra ($\lambda_{\max} = 538$ nm) among beetle luciferases, with lower pH-sensitivity and higher affinity for ATP when compared to other luciferases, making this luciferase attractive for sensitive ATP and reporter assays.

Introduction

Beetle luciferases are famous for producing different bioluminescence colors. In fireflies, the bioluminescence color is limited in the range from green to yellow-orange,¹ constituting an important photoecological adaptation to optimize the bioluminescence signal against background environmental light.² Several fireflies from North-America and South-America had their spectra recorded, most of them emitting in the yellow-green region, with few green and yellow-orange cases.^{3–6} Several firefly luciferases have been already cloned and sequenced^{7–19} and currently the three-dimensional structures of *Photinus pyralis*²⁰ and *Luciola cruciata*²¹ luciferases are known. Site-directed mutagenesis and chimerization studies have already shown some important regions and residues that affect bioluminescence colors.^{22–30} However,

the structural determinants of bioluminescence colors as well as the mechanisms remain not fully understood.³¹ The variety of substitutions spread along the luciferase primary structures affecting bioluminescence colors makes it difficult to rationalize the mechanisms of color determination, however, it appears that long range interactions affecting active site conformation might be an important factor. To date, most cloned firefly luciferases produce light in the yellow-green region, with a few producing yellow light around 570 nm, and only *Photuris* sp2 luciferase producing greenish light below 545 nm.³² Therefore, cloning new luciferases producing light in these extremes could help to understand how luciferases modulate bioluminescence colors. Furthermore, cloning new luciferases may help to understand the molecular phylogeny and evolution of beetle luciferases and bioluminescence colors.

The Neotropical region has the largest diversity of fireflies in the world, 500 of them occurring in Brazil. Among them, there are many typical taxa that are not found anywhere else in the world, including the Cratomorphini and Amydetini tribes, the latter having been classified as a tribe within the Lampyrinae subfamily³³ or as an independent subfamily Amydetinae.³⁴ Previously, we cloned the luciferases from the Atlantic rain forest fireflies

^aLaboratory of Biochemistry and Biotechnology of Bioluminescent Systems, Federal University of São Carlos (UFSCar), Campus of Sorocaba, Sorocaba, SP, Brazil. E-mail: viviani@ufscar.br

^bDepartment of Evolutionary Genetics and Molecular Biology, Federal University of São Carlos, São Carlos, SP, Brazil

^cRibeirão Preto School of Medicine, São Paulo University, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

Luciferase from *Fulgeochlizus bruchi* (Coleoptera:Elateridae), a Brazilian click-beetle with a single abdominal lantern: molecular evolution, biological function and comparison with other click-beetle luciferases

Danilo T. Amaral,^{a,b} Rogilene A. Prado^{a,b} and Vadim R. Viviani^{*a,b}

Received 16th February 2012, Accepted 21st March 2012

DOI: 10.1039/c2pp25037c

Bioluminescent click-beetles emit a wide range of bioluminescence colors ($\lambda_{\text{Max}} = 534\text{--}594\text{ nm}$) from thoracic and abdominal lanterns, which are used for courtship. Only the luciferases from *Pyrophorus* and *Pyrearinus* species were cloned and sequenced. The Brazilian *Fulgeochlizus bruchi* click-beetle, which inhabits the Central-west Cerrado (Savannas), is noteworthy because, differently from other click-beetles, the adult stage displays only a functional abdominal lantern, which produces a bright green bioluminescence for sexual attraction purposes, and lacks functional thoracic lanterns. We cloned the cDNA for the abdominal lantern luciferase of this species. Notably, the primary sequence of this luciferase showed slightly higher identity with the green emitting dorsal lantern luciferases of the *Pyrophorus* genus instead of the abdominal lanterns luciferases. This luciferase displays a blue-shifted spectrum ($\lambda_{\text{Max}} = 540\text{ nm}$), which is pH-insensitive from pH 7.5 to 9.5 and undergoes a slight red shift and broadening above this pH; the lowest K_{M} for luciferin among studied click-beetle luciferases, and the highest optimum pH (9.0) ever reported for a beetle luciferase. At pH 9.0, the K_{M} for luciferin increases, showing a decrease of affinity for this substrate, despite the higher activity. The slow luminescence decay rate of *F. bruchi* luciferase *in vitro* reaction could be an adaptation of this luciferase for the long and sustained *in vivo* luminescence display of the click-beetle during the courtship, and could be useful for *in vivo* intracellular imaging.

Introduction

Bioluminescent beetles are found mainly in the Elateroidea superfamily, within Lampyridae (fireflies), Phengodidae (railroadworms) and Elateridae (click-beetles).^{1,2} Depending on the lantern and life stage, they emit different bioluminescence colors, ranging from green to red, as ecological adaptations to different photic environments and biological functions. Different bioluminescence colors are determined by luciferase structure differences, since the luciferin–luciferase reaction, which involves an ATP-dependent oxidation of D-luciferin, leading to excited oxyluciferin,^{3,4} is essentially identical, involving the same substrates and homologous luciferases.^{5,6} Mechanistic, structural and functional studies suggest that beetle luciferase active sites may determine bioluminescence colors through non-specific (polarity) and specific interactions (base) with the emitter (excited oxyluciferin), as well as conformational changes affecting specific and non-specific interactions and

compactness.^{7–10} Beetle luciferases emitting different bioluminescence colors have acquired a wide range of applications as bioanalytical reagents, reporter genes for biosensors and bioimaging.^{11,12}

Among bioluminescent beetles, Elateridae is the richest family with about 9000 described species in the world,¹³ however, only a small number of them (about 200 species), occurring in the Agrypinae subfamily^{2,13–16} within the Pyrophorini and Campyloxenini tribes, are luminescent. In the adult stage, bioluminescent click-beetles usually have two sets of lanterns, which are used for different purposes:^{17–19} two thoracic lanterns, which emit green to yellow bioluminescence and are believed to be used for defensive and sexual attraction purposes,^{20,21} and an abdominal lantern emitting green to orange bioluminescence, which is activated during flight for sexual communication purposes.^{5,20,22} However, the specific biological roles of these lanterns and their colors are still under scrutiny. In the larval stage, click-beetles usually emit green bioluminescence from prothoracic lanterns and from several small spots spread along the body.²³ Most studied click-beetles species do not show geographical variation of the bioluminescence color in each lantern,²⁰ however, the Jamaican *P. plagiophthalmus* displays an intriguing geographical variation of bioluminescence colors, mainly in the abdominal lanterns, indicating an ongoing natural selection process. The orange color found in the abdominal

^aLaboratory of Biochemistry and Biotechnology of Bioluminescence, Graduate Program of Biotechnology and Environmental Monitoring, Department of Physics, Chemistry and Mathematics, Federal University of São Carlos (UFSCar), Campus of Sorocaba, Sorocaba, SP, Brazil. E-mail: viviani@ufscar.br

^bDepartment of Evolutionary Genetics and Molecular Biology, Federal University of São Carlos (UFSCar), São Carlos, SP, Brazil

Molecular phylogeny of Neotropical bioluminescent beetles (Coleoptera: Elateroidea) in southern and central Brazil

DT Amaral,^{a,b} FGC Arnoldi,^c SP Rosa^d and VR Viviani^{a,b*}

ABSTRACT: Bioluminescence in beetles is found mainly in the Elateroidea superfamily (Elateridae, Lampyridae and Phengodidae). The Neotropical region accounts for the richest diversity of bioluminescent species in the world with about 500 described species, most occurring in the Amazon, Atlantic rainforest and Cerrado (savanna) ecosystems in Brazil. The origin and evolution of bioluminescence, as well as the taxonomic status of several Neotropical taxa in these families remains unclear. In order to contribute to a better understanding of the phylogeny and evolution of bioluminescent Elateroidea we sequenced and analyzed sequences of mitochondrial NADH2 and the nuclear 28S genes and of the cloned luciferase sequences of Brazilian species belonging to the following genera: (Lampyridae) *Macrolampis*, *Photuris*, *Amydetes*, *Bicellonycha*, *Aspisoma*, *Lucidota*, *Cratomorphus*; (Elateridae) *Conoderus*, *Pyrophorus*, *Hapsodrilus*, *Pyrearinus*, *Fulgeochlizus*; and (Phengodidae) *Pseudophengodes*, *Phrixothrix*, *Euryopa* and *Brasilocerus*. Our study supports a closer phylogenetic relationship between Elateridae and Phengodidae as other molecular studies, in contrast with previous morphologic and molecular studies that clustered Lampyridae/Phengodidae. Molecular data also supported division of the Phengodinae subfamily into the tribes Phengodini and Mastinocerini. The position of the genus *Amydetes* supports the status of the Amydetinae as a subfamily. The genus *Euryopa* is included in the Mastinocerini tribe within the Phengodinae/Phengodidae. Copyright © 2013 John Wiley & Sons, Ltd.

The following supporting information is available online.

Keywords: Elateridae; Lampyridae; Phengodidae; Luciferase; phylogeny

Introduction

Bioluminescence in insects occurs in Collembola, Diptera and mainly in Coleoptera. Most bioluminescent species of Coleoptera are found in the Elateroidea superfamily (Fig. 1), which includes several families of non-luminescent beetles (Rhinorhipidae, Artematopodidae, Brachypsectridae, Cerophytidae, Eucnemidae, Throscidae, Plastoceridae, Drilidae, Cantharidae, Lycidae, Omalidae, Telegeusidae and Omethidae). Bioluminescent species have been reported in Lampyridae (fireflies), Phengodidae (railroadworms and starworms) and Elateridae (click beetles). Bioluminescent species were also reported in Omalidae larvae by Bertkau (1), but since then it has not been observed, despite some authors regarding them as bioluminescent (2–5). Despite using the same bioluminescent system, involving a benzothiazolic luciferin, ATP and apparently homologous luciferases (6), it is unclear whether bioluminescence in these families has a common origin or evolved independently (7–9).

The family Lampyridae has ~ 100 genera and 2000 species, spread all over the world, all of them luminescent, at least in the larval stage. Most species are found in the Neotropical region (10,11), especially in Brazil, which accounts for 31 genera and ~ 350 described species in the subfamilies Lampyrinae (Cratomorphini, Lamprocerini, Lucidotini) and Photurinae (12,13). Elateridae is the richest family, with ~ 9000 described species around the world, however, only ~ 200 species pertaining to the Agrypninae, Thylacosterninae and Campyloxeninae subfamilies are bioluminescent (14). Phengodidae, the most poorly studied of these families, accounts for ~ 31 genera and 244 described species (15),

distributed in two main subfamilies: Phengodinae, spread all over Americas, and the Asiatic Rhagophthalminae.

Originally, phylogeny studies based on morphology clustered the soft-bodied families Phengodidae and Lampyridae in the Cantharoidea (Fig. 2) (4,5,16). The data were also apparently supported by the primary sequences of the cloned luciferases (6,17,18). The taxonomic status of the Rhagophthalmidae as an independent family or a subfamily within the Lampyridae or Phengodidae was the subject of much discussion (4,5,16) and very recently it has again been regarded as an independent family by Bouchard *et al.* (12).

Neotropical fauna of the bioluminescent Elateroidea, despite being the richest in the world with unique taxa, are still poorly studied in terms of their systematic, evolutionary and biological aspects. With the exception of extensive systematic studies on

* Correspondence to: VR Viviani, Graduate School of Biotechnology and Environmental Monitoring, Campus of Sorocaba, Sorocaba, SP, Brazil. Tel./ Fax: +55-1532295983. E-mail: viviani@ufscar.br

^a Graduate School of Biotechnology and Environmental Monitoring, Campus of Sorocaba, Sorocaba, SP, Brazil

^b Graduate School of Evolutive Genetics and Molecular Biology, Federal University of São Carlos (UFSCar), São Carlos, SP, Brazil

^c Ribeirão Preto School of Medicine, São Paulo University (USP), Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

^d Zoology Museum, São Paulo University, São Paulo, Brazil



A transcriptional survey of the cDNA library of *Macrolampis* sp2 firefly lanterns (Coleoptera: Lampyridae)

Vadim R. Viviani^{a,b,*}, Isabela A. Carmargo^c, Danilo T. Amaral^{a,b}

^a Graduate Program of Biotechnology and Environmental Monitoring, Campus of Sorocaba, Federal University of São Carlos (UFSCAR), Rodovia João Leme dos Santos, Km 110, Itinga, Sorocaba, SP, Brazil

^b Graduate Program of Evolutive Genetics and Molecular Biology, Federal University of São Carlos (UFSCAR) São Carlos, SP, Brazil

^c Center of Nuclear Energy (CENA), ESALQ, University of São Paulo, Piracicaba, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 August 2012

Received in revised form 28 November 2012

Accepted 1 December 2012

Available online 8 December 2012

Keywords:

Bioluminescence

Firefly

Lanterns

Luciferase

Macrolampis

Transcriptome

ABSTRACT

The biochemistry of firefly bioluminescence is well understood; however, the molecular physiology of the lanterns is still poorly studied, especially the biosynthesis and origin of beetle luciferin which are almost unknown. Using a cDNA library previously constructed from *Macrolampis* sp2 lanterns, we randomly selected and sequenced 572 cDNAs in order to have a first transcriptional profile of the most represented messages found in the lanterns and therefore to better understand their molecular physiology. As expected, high percentage of the gene products (~22%) displayed high similarity with Coleoptera genome products. About 7% represented mitochondrial genes, including several copies of cytochrome oxidase, which are also expected for this tissue. Luciferase genes were especially abundant, representing ca 2% of the products. Gene products involved with cysteine and sulfur metabolism such as the cystathionine β -lyase and the S-adenosylmethionine synthetase were abundant. Noteworthy, an abundance of proteins involved with hormone metabolism was found, suggesting a possible link between bioluminescence and hormone metabolism.

© 2012 Published by Elsevier Inc.

1. Introduction

Bioluminescence, the emission of visible light by living organisms, results from oxidative reactions in which organic substrates—luciferins are oxidized by molecular oxygen by enzymes called luciferases, generating light. In Coleoptera, the bioluminescence reaction involves the ATP-activated oxidation of a benzothiazolic luciferin, which occurs in lanterns located in different parts of the body depending on the family (Viviani et al., 2002). The lanterns of fireflies are constituted by a photogenic cell layer, penetrated by tracheae and nerves, and a reflector cell layer (Buck, 1948). The photocytes are the fundamental units on the photogenic layer, containing all important compounds that are necessary for bioluminescence: luciferase, D-luciferin and ATP (Buck, 1948). Inside photocytes, luciferase and, probably luciferin, are associated to peroxisomes (Hanna et al., 1976).

Many beetle luciferases were cloned and studied, and the biochemical mechanism of beetle bioluminescence is well known (Wood, 1995;

Viviani, 2002). The anatomy, ultrastructure and physiology of lanterns are also well known for fireflies and their larvae (Ghiradella, 1988). However, there are still many unanswered questions regarding bioluminescence, especially regarding the evolutionary origin of bioluminescence, the molecular physiology of the lanterns especially the molecular control of bioluminescence and the biosynthetic origin of the luciferin—a benzothiazolic compound.

It was suggested that the amino acid cysteine and benzoquinones are precursors of luciferin (Colepicolo et al., 1986). Quinones, such as benzoquinones, which are common in the defensive secretions of beetles, can react with cysteine to produce the 6-hydroxybenzothiazolic moiety of the luciferin (Day et al., 2004). However, the ability to in vivo synthesize the luciferin starting from p-benzoquinone and cysteine was not demonstrated yet (McCapra and Ravazi, 1975). There was also a discovered enzyme involved in luciferin recycling called LRE, which recycles luciferin from oxyluciferin (Gomi and Kajiyama, 2001). Furthermore, it was shown that in firefly larvae D-luciferin is originally synthesized as L-isomer from L-cysteine, undergoing enantioconversion to the D-isomer in a reaction catalyzed by luciferase in the presence of CoA and esterases (Nakamura et al., 2006). Besides the luciferase and luciferin, other proteins and enzymes could be directly or indirectly associated with the bioluminescence process and the physiology of the lanterns. Currently, several projects of the functional genome and proteome are identifying genes expressed in different tissues of different organisms. The availability of the whole genome of *Tribolium castaneum*,

Abbreviations: ATP, adenosine triphosphate; CoA, coenzyme A; XGal, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside; IPTG, isopropyl beta-D-thiogalactopyranoside; AMP, adenosine monophosphate; BCTA, 6-(2-amino-2-carboxyethyl)-2-carboxy-4-hydroxybenzothiazole.

* Corresponding author at: Graduate Program of Biotechnology and Environmental Monitoring, Campus of Sorocaba, Federal University of São Carlos (UFSCAR), Rodovia João Leme dos Santos, Km 110, Itinga, Sorocaba, SP, Brazil. Tel./fax: + 55 15 32295983.

E-mail address: viviani@ufscar.br (V.R. Viviani).

The Luciferin Binding Site Residues C/T311 (S314) Influence the Bioluminescence Color of Beetle Luciferases through Main-Chain Interaction with Oxyluciferin Phenolate

V. R. Viviani,^{*,†,‡} D. T. Amaral,^{†,‡} D. R. Neves,[†] A. Simões,[†] and F. G. C. Arnoldi[§]

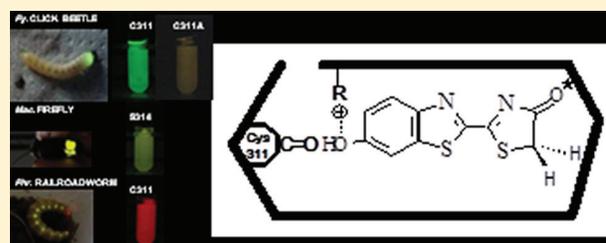
[†]Department of Physics, Chemistry and Mathematics, Graduate Program of Biotechnology and Environmental Monitoring, Federal University of São Carlos (UFSCAR), Rodovia João Leme dos Santos, km 110, Itinga, Sorocaba, SP, Brazil

[‡]Graduate Program of Evolutive Genetics and Molecular Biology, Federal University of São Carlos (UFSCAR), São Carlos, SP, Brazil

[§]Ribeirão Preto School of Medicine, São Paulo University, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

Supporting Information

ABSTRACT: Beetle luciferases emit different bioluminescence colors from green to red; however, no clear relationship between the identity of the luciferin binding site residues and bioluminescence colors was found in different luciferases, and it is unclear whether critical interactions affecting emission spectra occur on the thiazolyl or on the benzothiazolyl sides of the luciferin binding site. Through homology modeling and site-directed mutagenesis using our multicolor set of beetle luciferases (*Pyrearinus termitilluminans* larval click beetle, Pte, $\lambda_{\max} = 534$ nm; *Phrixothrix hirtus* railroad worm red emitting, PxRE, $\lambda_{\max} = 623$ nm; and *Macrolampis* sp2 firefly, Mac, $\lambda_{\max} = 564$ nm), we show that the residues C/T311 (S314) play an important role in bioluminescence color determination. Modeling studies indicate that the main-chain carbonyls of these residues are close to both oxyluciferin phenolate and AMP, whereas the side chains pack against second-shell residues. The C311(S314)A mutation considerably red shifts the spectra of the green-yellow-emitting luciferases (Pte $\lambda_{\max} = 534$ to 590 nm; Mac $\lambda_{\max} = 564$ to 583/613 nm) and affects the K_M values for luciferin and ATP, but not the spectrum of the red-emitting luciferase. On the other hand, whereas the exchange between C/T311 (S314) caused smaller effects on the emission spectra of green-yellow-emitting luciferases, the C311T substitution (naturally found in green-emitting railroad worm luciferases) resulted in the largest reported blue shift in *P. hirtus* red-emitting luciferase ($\lambda_{\max} = 623$ to 606 nm). Altogether, these results indicate that the stability of residues C/T311 (S314) and the size of the cavity around oxyluciferin phenolate affect bioluminescence colors and suggest, for the first time, the occurrence of a critical interaction between main-chain carbonyls of position 311 (314) residues and oxyluciferin phenolate.



Beetle luciferases emit a wide range of bioluminescence colors, from green to red.^{1,2} They were originally grouped into pH-sensitive (fireflies) and pH-insensitive (click beetles and railroad worms) classes, according to the sensitivity of their bioluminescence spectra to factors such as pH, temperature, and other denaturing conditions.³ However, recent studies with click beetle luciferases show that at higher pH values, click beetle luciferases may also undergo a slight red shift.^{4,5} During the past decades, beetle luciferases gained a wide variety of applications as bioanalytical reagents, as reporter genes for investigating gene expression, and as cell and tissue markers.^{6,7}

Several beetle luciferases have been cloned,^{8–18} most of them from fireflies. The three-dimensional structure has been determined for the North American firefly luciferase *Photinus pyralis* (Ppy) in the absence of substrates¹⁹ and more recently for the Japanese *Luciola cruciata* (Lcr) firefly luciferase in the presence of either the luciferyl-adenylate analogue DLSA or oxyluciferin and AMP,²⁰ showing closed and open active site conformations with the former analogue and the latter

products, respectively. Luciferin binding site residues in firefly luciferases were identified in the three-dimensional structures,^{19,20} through modeling studies,^{21,22} and via site-directed mutagenesis.^{21–24}

Three basic mechanisms were proposed to explain bioluminescence color determination by the luciferase active site:²⁵ (I) nonspecific solvent effects,^{25,27} (II) specific interactions of active site residues with excited oxyluciferin,²⁸ and (III) the geometry of the active site affecting the rotation of thiazinic rings of excited oxyluciferin.²⁹ Recent theoretical and experimental studies support both nonspecific solvent and orientation polarizability effects and specific base effects.^{25,30,31} Although the identity of the emitters in firefly luciferase bioluminescence had not yet been determined, recent studies agree that the keto form of excited oxyluciferin must be the

Received: June 5, 2012

Revised: November 20, 2012

Bioluminescence of Beetle Luciferases with 6'-Amino-D-luciferin Analogues Reveals Excited Keto-oxyluciferin as the Emitter and Phenolate/Luciferin Binding Site Interactions Modulate Bioluminescence Colors

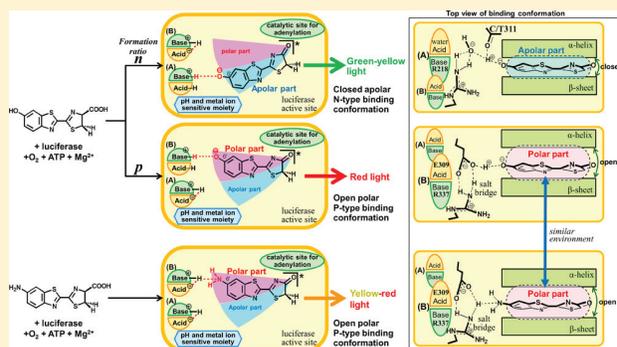
Vadim R. Viviani,^{*,†,‡} Deimison Rodrigues Neves,[†] Danilo Trabuco Amaral,^{†,‡} Rogilene A. Prado,[†] Takuto Matsuhashi,[§] and Takashi Hirano[§]

[†]Department of Physics, Chemistry and Mathematics, Graduate Program of Biotechnology and Environmental Monitoring, Federal University of São Carlos (UFSCAR), Rodovia João Leme dos Santos, km 110, Itinga, Sorocaba, SP, Brazil

[‡]Graduate Program of Evolutive Genetics and Molecular Biology, Federal University of São Carlos (UFSCAR), São Carlos, SP, Brazil

[§]Department of Engineering Science, Graduate School of Informatics and Engineering, The University of Electro-Communications, Chofu, Tokyo 182-8585, Japan

ABSTRACT: Beetle luciferases produce different bioluminescence colors from green to red using the same D-luciferin substrate. Despite many studies of the mechanisms and structural determinants of bioluminescence colors with firefly luciferases, the identity of the emitters and the specific active site interactions responsible for bioluminescence color modulation remain elusive. To address these questions, we analyzed the bioluminescence spectra with 6'-amino-D-luciferin (aminoluciferin) and its 5,5-dimethyl analogue using a set of recombinant beetle luciferases that naturally elicit different colors and different pH sensitivities (pH-sensitive, *Amydetes vivianii* $\lambda_{\max} = 538$ nm, *Macrolampis* sp₂ $\lambda_{\max} = 564$ nm; pH-insensitive, *Phrixotrix hirtus* $\lambda_{\max} = 623$ nm, *Phrixotrix vivianii* $\lambda_{\max} = 546$ nm, and *Pyrearinus termitilluminans* $\lambda_{\max} = 534$ nm), a luciferase-like enzyme (Tenebrionidae, *Zophobas morio* $\lambda_{\max} = 613$ nm), and mutants of C311 (S314). The green-yellow-emitting luciferases display red-shifted bioluminescence spectra with aminoluciferin in relation to those with D-luciferin, whereas the red-emitting luciferases displayed blue-shifted spectra. Bioluminescence spectra with 5,5-dimethylaminoluciferin, in which enolization is blocked, were almost identical to those of aminoluciferin. Fluorescence probing using 2-(4-toluidino)naphthalene-6-sulfonate and inference with aminoluciferin confirm that the luciferin binding site of the red-shifted luciferases is more polar than in the case of the green-yellow-emitting luciferases. Altogether, the results show that the keto form of excited oxyluciferin is the emitter in beetle bioluminescence and that bioluminescence colors are essentially modulated by interactions of the 6'-hydroxy group of oxyluciferin and basic moieties under the influence of the microenvironment polarity of the active site: a strong interaction between a base moiety and oxyluciferin phenol in a hydrophobic microenvironment promotes green-yellow emission, whereas a more polar environment weakens such interaction promoting red shifts. In pH-sensitive luciferases, a pH-mediated switch from a closed hydrophobic conformation to a more open polar conformation promotes the typical red shift.



Beetle luciferases naturally emit a wide range of bioluminescence colors from green (534 nm) to red (638 nm) using the same substrates, D-luciferin [D-LH₂ (Scheme 1)], ATP, and molecular oxygen.¹ Because D-LH₂ is the common substrate for the luciferases of different luminescent beetles, bioluminescence colors are determined by modulation of the properties of the emitter, oxyluciferin [OLH (Scheme 1)], in the active sites of these luciferases. Luciferases are additionally classified as pH-sensitive or pH-insensitive, according to their bioluminescence spectral sensitivity to factors such as pH, added metal ions, temperature, and other denaturing conditions.^{2,3} During the past decades, beetle luciferases were extensively applied as bioanalytical reagents and as reporter

genes to investigate gene expression and cell and tissue markers.^{4,5} Because they may emit different bioluminescence colors, beetle luciferases are currently used as versatile multicolor reporter systems.⁶

Considering that the emission spectrum is determined by the structure of the emitter and its surrounding luciferase environment, studies have focused on one side on the structure and function of luciferase enzymes^{1,7,8} and on the other side on

Received: February 6, 2014

Revised: July 7, 2014

Published: July 15, 2014