

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA
(Associação ampla entre a UEPG e UNICENTRO)**

JHON ALEX DZIECHCIARZ VIDAL

**DIFERENCIAÇÃO GENÔMICA E EVOLUÇÃO DOS CROMOSSOMOS SEXUAIS
EM ESPÉCIES DE *Omophoita* (ALTICINAE) POR MEIO DA ANÁLISE DO
SATELITOMA E PINTURA CROMOSSÔMICA**

**PONTA GROSSA
2022**

JHON ALEX DZIECHCIARZ VIDAL

**DIFERENCIAÇÃO GENÔMICA E EVOLUÇÃO DOS CROMOSSOMOS SEXUAIS
EM ESPÉCIES DE *Omophoita* (ALTICINAE) POR MEIO DA ANÁLISE DO
SATELITOMA E PINTURA CROMOSSÔMICA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa em associação com a Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Biologia Evolutiva).

Orientadora: Profa. Dra. Mara Cristina de Almeida

Coorientador: Prof. Dr. Marcelo de Bello Cioffi

**PONTA GROSSA
2022**

V648 Vidal, Jhon Alex Dziechciarz
Diferenciação genômica e evolução dos cromossomos sexuais em espécies de *Omophoita* (Alticinae) por meio da análise do satelitoma e pintura cromossômica / Jhon Alex Dziechciarz Vidal. Ponta Grossa, 2022.
110 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Área de Concentração: Biologia Evolutiva), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profa. Dra. Mara Cristina Almeida.

Coorientador: Prof. Dr. Marcelo de Bello Cioffi.

1. Cromossomo sexual. 2. Satelitoma. 3. Genoma mitocondrial. 4. WCP. I. Almeida, Mara Cristina. II. Cioffi, Marcelo de Bello. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Biologia Evolutiva. IV.T.

CDD: 576



Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva
Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa (Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética) e a Universidade Estadual do Centro Oeste (Departamento de Ciências Biológicas)



PPG - Biologia Evolutiva

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO N.º. 06/2022/UEPG

Ata referente à Defesa de Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, uma Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa e a Universidade Estadual do Centro-Oeste, pelo candidato Jhon Alex Dziechciarz Vidal.

Aos vinte e nove dias de agosto de dois mil e vinte e dois, sob a presidência do(a) Profa. Dra. Mara Cristina de Almeida Matiello em sessão pública, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação do aluno **Jhon Alex Dziechciarz Vidal**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Área de concentração em Biologia Evolutiva, visando o título de Mestre, constituída pelos(as): Prof. Dr. Ricardo Utsunomia (UNESP-Botucatu), Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni (UEPG) e Prof. Dr. Mateus Henrique Santos (UEPG) - Suplente. Atestada pela colenda Congregação do Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva. Iniciados os trabalhos a presidência deu conhecimento aos membros da Comissão e ao candidato das normas que regem a defesa de dissertação. A seguir a candidata passou a defesa de sua dissertação intitulada: "DIFERENCIAÇÃO GENÔMICA E EVOLUÇÃO DOS CROMOSSOMOS SEXUAIS EM ESPÉCIES DE *Omophoita* (ALTICINAE) POR MEIO DA ANÁLISE DO SATELITOMA E PINTURA CROMOSSÔMICA". Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento e a Comissão Examinadora considerou o candidato **APROVADO**. A Presidência ressaltou que a obtenção do título de Mestre está condicionada ao disposto da atual aprovação de outorga do Título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração em Biologia Evolutiva, **com validade de sessenta dias**; assim como comprovante de envio de um artigo científico proveniente de seu trabalho de dissertação a revista com Qualis igual ou superior a B1 (Biodiversidade – Capes) **até o prazo máximo de 90 dias após a defesa**; o não depósito da versão definitiva da Dissertação, bem como as cópias em CD (PDF) com todas as correções feitas e atestadas pelo orientador, assim como o comprovante de envio do artigo nestes prazos, anulará toda possibilidade de outorga definitiva do Título, recebimento de Certidão e outros documentos, bem como a solicitação do Diploma. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Observação (se necessário)

Alteração de Título: sim não

Novo título: _____

Ponta Grossa, 29 de agosto de dois mil e vinte e dois.

Profa. Dra. Mara Cristina de Almeida Matiello (UEPG) _____ 

Prof. Dr. Ricardo Utsunomia (UNESP – Botucatu) _____ 

Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni (UEPG) _____ 

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus pais, por todo o apoio financeiro, emocional e pelo incentivo para continuar a minha carreira científica. Sem o suporte deles, não poderia ter passado por esta etapa da minha vida e me tornado mestre em Biologia Evolutiva. Assim, eu dedico esta dissertação a eles, e espero que um dia consiga retribuir tudo o que me deram no decorrer de todos estes anos da minha vida, mesmo em momentos de dificuldades.

A minha orientadora Mara Cristina de Almeida, uma mulher e cientista incrível, que é uma inspiração, gostaria de agradecer imensamente, não há palavras para expressar o meu agradecimento. Foi uma das pessoas que mais tem me ajudado no decorrer dos anos e me dado ânimo a continuar na carreira científica e a descobrir o que gosto. Desde a graduação durante a iniciação científica tem me oportunizado a se descobrir cientista e a crescer academicamente. Além de orientadora, é uma amiga, que busca sempre ajudar, mesmo tendo um milhão de atividades para fazer, muito obrigado professora.

Aos meus amigos e amigas, gostaria de deixar meu imenso agradecimento, pois foram eles que me deram um suporte fora da universidade em diversos momentos de descontração. Em especial a Franciele Kerniske, que antes mesmo desta empreitada acadêmica, já havíamos nos conhecido e nos tornados amigos, o que deu oportunidade a ambos de crescermos juntos, reclamarmos e dar suporte um ao outro. Em especial também, a Juliane Gabriele Martins, que foi a minha primeira amizade dentro da universidade e permanecemos assim ainda hoje, vimos um ao outro crescer academicamente e pessoalmente, e tem me dado um enorme suporte com sua amizade. A Fernanda Toczek, uma amiga incrível, queria agradecer por todo suporte, conversas e apoio por todo este tempo, admiro demais você.

Aos meus colegas de laboratório e amigos, queria deixar um agradecimento especial, não apenas me auxiliaram no laboratório, mas também por me suportarem por todo este tempo. A Hallana Cristina, queria agradecer imensamente por todo suporte, uma das últimas pessoas a entrar no lab, mas que tem sido muito importante, me ajudando a concluir muitas etapas, e criei grande admiração como pessoa e pesquisadora. Ao Bruno Begha, que ajudou a descontração e a fazer piadas constantemente, uma pessoa que admiro imensamente e vejo um futuro brilhante. A

Raylen Pereira de Ramos, que tem sido amiga desde a graduação e me ajudado na empreitada acadêmica, uma pessoa que vejo enorme potencial. A Edna Amaral, que fez grandes descobertas e possui potencial de ir muito longe, obrigado pela disposição e ajudar sempre que lhe recorri. A Luiza Beatriz, que orientei durante o mestrado, queria agradecer, não apenas pelo suporte no laboratório, mas também pelas nossas conversas, que são essenciais sempre, seja para distração, reflexão e crescimento.

Aos professores do Laboratório, um agradecimento especial ao Roberto Ferreira Artoni, queria dizer que admiro seu empenho como pesquisador, suas ideias e agradecer, por estar sempre disposto e tirar dúvidas e discutir sobre Ciência. Ao Mateus Henrique Santos, admiro demais, não é apenas um professor, se tornou um amigo, que esteve sempre disposto e me ajudar, a fazer piadas, a discutir sobre Ciência e dar puxões de orelha, grande admiração pelo senhor. A Rafaela Lopes Falaschi, que infelizmente não é professora da universidade, mas que trabalha e auxilia tanto quanto, gostaria de deixar explícita minha admiração, como pesquisadora e pessoa, aprendi muito, observando e conversando com você, o que me fez crescer academicamente e pessoalmente, que não é apenas uma colega de laboratório, mas também uma amiga, que posso contar sempre.

Quero agradecer aos professores Marcelo de Bello Cioffi e Ricardo Utsonomia que me auxiliaram neste projeto, ajudando com as técnicas e análises dos dados.

A Universidade Estadual de Ponta Grossa e ao Laboratório de Genética e evolução, queria agradecer imensamente, pois desde a graduação me deu estrutura para crescer, profissionalmente, pessoalmente, a conhecer diversas pessoas.

Aos meus alunos (as), queria agradecer, porque boa parte das vezes, foram eles que me ajudaram a me animar, a expandir meus conhecimentos e buscar sempre melhorar. Mesmo sendo extremamente cansativo esta empreitada de dar aulas e fazer pesquisa, está sendo uma oportunidade gratificante, pois tenho feito parte da vida destes alunos, e espero um dia servir de inspiração a eles, assim como muitos me inspiraram e inspiram nos dias de hoje.

Aos demais, Francisco Sassi, Lorena Rudnik, Karine Colesel, Erica Araujo, Tiago Degrandi, e aos não citados neste trabalho, gostaria de deixar meu imenso agradecimento, pois cada um auxiliou e me ajudou a finalizar de alguma forma esta pesquisa, com vocês, esta empreitada se tornou mais prazerosa e especial.

Meu eterno agradecimento a todos.

RESUMO

Análises utilizando citogenética molecular e sequenciamento de nova geração (NGS) tem sido utilizado em poucas espécies de Coleoptera, mesmo tendo cerca de 4.800 espécies analisadas citogeneticamente. Os besouros abrangem cerca de 380.000 espécies, agrupadas em diversos níveis taxonômicos, dentre os coleópteros, um grupo que tem sido estudado são os Oedionychina (Chrysomelidae, Alticinae, Oedionychini), e com base em pesquisas anteriores tem demonstrado possuir cariótipo conservado, com poucas espécies que diferem do cariótipo basal ($2n=22=10II+X+y$), sendo os únicos da classe Insecta que possuem cromossomos sexuais gigantes. Análises realizadas em algumas espécies de Oedionychina tem demonstrado que apesar do seu cariótipo ser conservado estruturalmente e numericamente, eles possuem grande heterogeneidade em relação a padrão de bandamento e localização dos DNAs repetitivos, principalmente nos cromossomos sexuais. O objetivo deste trabalho objetivo foi entender o processo de diferenciação e evolução dos cromossomos sexuais em espécies do gênero *Omophoita*, por meio da comparação e diferenciação genômica e cromossômica. Foi realizado nesta pesquisa a primeira análise utilizando GCH e pintura cromossômica em Coleoptera e a primeira comparação do conteúdo de DNA satélite entre os sexos em besouros. A análise comparativa intraespecífica com CGH realizada em *O. octoguttata* resultou em alta similaridade genômica entre os sexos, sendo identificado apenas uma região com marcação mais forte no cromossomo Y, possivelmente está sendo a região sexo-específica do macho. A comparação com CGH entre espécies de *Omophoita* resultou em alto grau de divergência genômica entre as espécies, demonstrando poucos locais com regiões compartilhadas entre as espécies. A pintura cromossômica revelou alto grau de similaridade intra e interespecífica dos cromossomos sexuais X e Y. Assim, inferências realizadas a partir da pintura cromossômica pode indicar que os cromossomos sexuais surgiram a partir de um par autossômico, e apresentam pouca diferenciação molecular entre eles. A descrição do satelitoma em *O. octoguttata* para macho e fêmea resultou no maior satélite de insetos encontrado até o momento, na identificação de satélites enriquecidos no genoma do macho e possivelmente ausentes no genoma da fêmea, que podem estar associados aos cromossomos sexuais, e assim, ser cromossomo específico, podendo estes, estarem envolvidos na diferenciação dos cromossomos sexuais. Além disso, foi verificado a semelhança de sequência de alguns satélites com regiões de satélites maiores, podendo assim, realizar inferências evolutivas sobre a evolução do satelitoma em *O. octoguttata*. Como parte da dissertação, utilizando o sequenciamento de baixa cobertura do genoma de *O. octoguttata* para a descrição do satelitoma, foi montado o genoma mitocondrial (mitogenoma) da espécie, que resultou em um genoma circular completo. Além disso, utilizando este dado em conjunto com genomas mitocondriais depositados no Genbank/NCBI, foi montado uma árvore filogenética de Alticinae, que recuperou sua monofilia como grupo irmão de Galerucinae.

Palavras chaves: Cromossomo sexual. Satelitoma. Genoma mitocondrial. WCP.

ABSTRACT

Molecular cytogenetics analysis and next-generation sequencing (NGS) has been used on few species of Coleoptera. Despite this, there are about 4,800 species analyzed cytogenetically. The beetles include about 380,000 species, among the coleoptera, a group that has been studied are the Oedionychina (Chrysomelidae, Alticinae, Oedionychini). Based on previous research, Oedionychina has shown to have a conserved karyotype, with few species that differ from the basal karyotype ($2n=22=10II+X+y$), being the only of the class Insecta that possess giant sex chromosomes. Analyses performed in some Oedionychina species have shown that despite their karyotype is structurally and numerically conserved, they have great heterogeneity in relation to banding pattern and location of repetitive DNAs, especially on the sex chromosomes. The objective of this work was to understand the process of differentiation and evolution of sex chromosomes in species of the genus *Omophoita*, using genomic and chromosomal comparisons. This is the first analysis using GCH (Comparative genomic hybridization) and chromosome painting in Coleoptera and the first comparison of satellite DNA content between sexes in beetles. Comparative intraspecific analysis with CGH performed in *O. octoguttata* resulted in high genomic similarity between the sexes, only one region with stronger labeling on the Y chromosome was identified, probably the sex-specific region of the male. Comparison with CGH among *Omophoita* species resulted in a high degree of genomic divergence, showing few sites with shared regions between species. Chromosome painting revealed a high degree of intraspecific and interspecific similarity of the X and Y sex chromosomes. Thus, inferences from chromosome painting may indicate that the sex chromosomes arose from an autosomal pair, and show little molecular differentiation between them. The description of the satellitome in *O. octoguttata* for male and female resulted in the largest insect satellite found so far. Identification of enriched satellites in the male genome and possibly absent in the female genome, may be associated with sex chromosomes, and involved in their differentiation. In addition, the similarities of some satellites with regions of larger satellites were verified, in order to make evolutionary inferences about the evolution of the satellitome in *O. octoguttata*. Finally, using low coverage sequencing of the *O. octoguttata* genome, the mitochondrial genome of the species was assembled. Furthermore, using this data with mitochondrial genomes deposited at Genbank/NCBI, a phylogenetic tree of Alticinae was constructed, which recovered its monophyly as a sister group of Galerucinae.

Key words: Sex chromosome. Satellitoma. Mitochondrial genome. WCP.

LISTA DE IMAGENS

- Figura 1.1** - Cariótipo espermatogonial de *Omophoita personata* (A) e *Omophoita sexnotata* (B). Número diploide $2n=22=10II+X+y$ 15
- Figure 1.2** - Diagrama dos tipos de DNA repetitivos de eucariotos21
- Figura 4.1** - Árvore de relações entre algumas espécies de *Omophoita*29
- Figura 5.1** - Metáfases de A. *O. octoguttata* (metáfase mitótica); B. *O. sexnotata* (metáfase I); C. *O. personata* (metáfase I); D. *O. magniguttis* (metáfase mitótica) hibridados com sondas dos cromossomos sexuais X (vermelho) e Y (verde) de *O. octoguttata*.....42
- Figura 5.2** - Metáfase espermatogonial de *O. octoguttata* hibridada com sondas produzidas a partir dos cromossomos sexuais X e Y de *O. octoguttata*. Cromossomo Y (verde), cromossomo X (vermelho), na flecha região sexo específica do cromossomo Y42
- Figura 5.3** - Metáfases meióticas de *O. octoguttata* submetidas a Hibridação Genômica Comparativa (CGH) interespecífica. A. e E. Cromossomos corados com DAPI; B. genoma de *O. personata* (verde); C. genoma de *O. octoguttata* (vermelho); D. sobreposição da imagem com genoma de *O. personata* com *O. octoguttata*. F. genoma de *O. sexnotata* (verde); G. genoma de *O. octoguttata* (vermelho); H. sobreposição da imagem com genoma de *O. sexnotata* com *O. octoguttata*. Flechas indicam as regiões com hibridização em conjunto entre os gDNAs das espécies ..43
- Figura 5.4** - Metáfase meiótica de *O. octoguttata* submetidas a Hibridação Comparativa Genômica (CGH) entre os genomas de macho (vermelho) e fêmea (verde) de *O. octoguttata*. A e B. Células mitóticas marcadas com DAPI; B. Células mitóticas hibridadas com gDNA de fêmea; F. células mitóticas com sobreposição do DAPI e gDNA de fêmea; C. Células mitóticas hibridadas com gDNA de macho; G. Células mitóticas com sobreposição do DAPI com gDNA de macho; D e H. Células mitóticas com sobreposição do DAPI + gDNA de macho e fêmea; setas apontando região sexo-específico do macho.....43
- Figura 5.5** - Imagens geradas pelo software RepeatExplorer2 das iterações que resultaram em satDNA. Nos quadrados vermelhos em destaque, a barra de cima se refere ao genoma do macho e a barra de baixo ao genoma da fêmea. Os quadrados

coloridos (amarelo, azul, vermelho e verde) se refere aos satélites enriquecidos no genoma do macho.....58

Figura 5.6 - Comparação das sequências dos satélites curtos com regiões de satélites longos. Na caixa vermelha a porcentagem de semelhança entre o satélite curto e o satélite longo. A. Associação entre OocSat-28 com OocSat-02 e OocSat 31, no box, detalhe das regiões de homologia. B. Associação entre o OocSat-24 com OocSat-04 e OocSat-31, no box, detalhe das regiões de homologia. C. Associação entre o OocSat-20 com OocSat-25, no box, detalhe das regiões de homologia58

Figure 5.7 - Mapa do genoma mitocondrial de *Omophoita octoguttata*, A. Mapa do genoma mitocondrial do indivíduo 1, B. Mapa do genoma mitocondrial do indivíduo 271

Figure 5.8 - Estruturas secundárias putativas dos RNAs transportadores de *Omophoita octoguttata*.....74

Figure 5.9 Uso de códons sinônimos relativos (RSCU) do mitogenoma de *Omophoita octoguttata*. A. Indivíduo 1, B. Indivíduo 275

Figure 5.10 - Análise filogenética utilizando inferência Bayesiana dos 13 PCGs de Alticinae + Galerucinae, com Chrysomelinae como grupo externo. Com valores de probabilidades posteriores em cada ramo76

Figure 5.11 - Análise filogenética utilizando maximum likelihood dos 13 PCGs de Alticinae + Galerucinae, com Chrysomelinae como grupo externo. Com valores de bootstrap em cada ramo77

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 - Principais características dos 49 satDNAs encontrados em O. octoguttata.....	57
Tabela 5.2 - Composição nucleotídica e Skew AT/GC do genoma mitocondrial de Omophoita octoguttata	72
Tabela 5.3 - Resumo da anotação do genoma mitocondrial de Omophoita octoguttata	73
Tabela 5.4 - Sequências repetidas de Omophoita octoguttata, em vermelho as os pares de bases diferente entre os indivíduos.....	74

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 ANÁLISE CITOGENÉTICA	13
1.2 HETEROCROMATINA	15
1.3 DNA REPETITIVO	16
1.4 EVOLUÇÃO DOS CROMOSSOMOS SEXUAIS	22
1.5 DNA MITOCONDRIAL (MITOGENOMA)	25
2 JUSTIFICATIVA	27
3 OBJETIVOS	28
3.1 OBJETIVO GERAL	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 ANÁLISES CITOGENÉTICAS.....	29
4.1.1 Coleta, preparação citológica e hibridação <i>in situ</i> fluorescente.....	29
4.1.2 Microdissecção e amplificação.....	30
4.2 HIBRIDAÇÃO <i>IN SITU</i>	31
4.2.1 Sondas para Hibridização Comparativa de Genomas (CGH)	31
4.2.2 Sonda e FISH para Pintura Cromossômica (WCP).....	31
4.2.3 Hibridização Fluorescente <i>In Situ</i> (FISH) para CGH	32
4.3 ANÁLISE DO SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO (NGS).....	32
4.3.1 Sequenciamento	32
4.3.2 Montagem do genoma mitocondrial	33
4.3.3 Montagem do satelitoma	33
5 RESULTADOS	35
5.1 - ARTIGO 1 - DIVERGÊNCIA GENÔMICA E CROMOSSÔMICA ENTRE OS CROMOSSOMOS SEXUAIS GIGANTES DE ESPÉCIES DE <i>Omophoita</i> (COLEOPTERA, CHRYSOMELIDAE, ALTICINAE).....	35
5.2 - ARTIGO 2 - ANÁLISE DO SATELITOMA <i>in silico</i> REVELA DIFERENÇA GENÔMICA ENTRE OS SEXOS EM <i>Omophoita octoguttata</i> (CHRYSOMELIDAE, ALTICINAE)	47

5.3 - ARTIGO 3 - PRIMEIRA DESCRIÇÃO COMPLETA DO GENOMA MITOCONDRIAL DE <i>Omophoita octoguttata</i> E <i>INSIGHTS</i> SOBRE AS RELAÇÕES FILOGENÉTICAS DO GRUPO (COLEOPTERA, CHYSOMELIDAE, ALTICINAE)..	59
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	79
REFERÊNCIAS	81
APÊNDICE A - ESPÉCIES E SEUS NÚMEROS DE ACESSO DO GENOMA MITOCONDRIAL NO GENBANK/NCBI UTILIZADAS PARA AS ANÁLISES FILOGENÉTICAS	99
ANEXO A - PREPARAÇÃO DOS TESTÍCULOS SEGUINDO ALMEIDA, ZACARO E CELLA (2000), COM MODIFICAÇÕES	101
ANEXO B - PROTOCOLO PARA PREPARAÇÃO CITOLÓGICAS E COLORAÇÃO COM GIEMSA 3%	102
ANEXO C - HIBRIDAÇÃO <i>IN SITU</i> FLUORESCENTE (FISH) – PINTURA CROMOSSÔMICA DESCRITA POR YANO ET AL., 2017	103
ANEXO D - MONTAGEM DO GENOMA MITOCONDRIAL	108

1 INTRODUÇÃO

A ordem Coleoptera (besouros) possui distribuição cosmopolita e compõe o maior e mais diverso grupo dentro do reino animal (CASARI; IDA, 2012, MCKENNA et al., 2015), composta por aproximadamente 380.000 espécies (BOUCHARD et al., 2017). Esta ordem agrupa cinco subordens, uma delas extinta (Protocoleoptera) e outras quatro ainda existente, Archenostemata, Myxophaga, Adephaga e Polyphaga. Os besouros são encontrados em uma ampla variedade de habitats e se alimentam de uma gama de materiais orgânicos (TRIPLEHORN; JOHNSON, 2005), com isso, desempenham papel importante na ciclagem de nutrientes, principalmente em estágio larval (CASARI; IDA, 2012).

Dentre os Coleoptera, uma das famílias mais diversas é Chrysomelidae (RILEY et al., 2002), onde as espécies são conhecidas como besouros folha (*Leaf beetle*), contém 12 subfamílias, com aproximadamente 2.100 gêneros e cerca de 63.000 espécies, destas, aproximadamente 6.000 espécies são encontradas no Brasil (NIE et al., 2019; SEKERKA et al., 2020; SLÍPINSKI, 2011). Esta família faz parte do clado dos besouros herbívoros (Polyphaga), é a mais diversa e numerosa dentro da ordem (MCKENNA et al., 2015; SLÍPINSKI et al., 2011). Conhecidos por viverem em diversos locais, se alimentando de folhas, caules e raízes; desta forma, algumas espécies são consideradas pragas agrícolas e outras, importantes para controle biológico. A maioria das espécies pertence as subfamílias Alticinae e Galerucinae (GILLOT, 2005), possuindo grande importância econômica e ecológica (REID, 2000).

Chrysomelidae possui diversas subfamílias, sendo uma delas Alticinae (Besouro pulga (*Flea beetle*)), foco deste estudo. Esta subfamília engloba aproximadamente 570 gêneros e 10.000 espécies (SEENO; WILCOX, 1982). Aproximadamente 200 gêneros são encontrados na América do Sul e a grande maioria é endêmica dessa região (JOLIVIET et al., 1988). Há ampla discussão sobre sua posição taxonômica, diversos autores os consideram como tribo (BOUCHARD et al., 2011; GÓMEZ-ZURITA et al., 2015; HADDAD; MCKENNA, 2016; REID, 2000); entretanto, outros os consideram como subfamília (GE et al., 2012; NIE et al., 2019; SEENO; WILCOX, 1982; SUZUKI, 1985). Contudo, devido à falta de consenso entre os pesquisadores perante a posição taxonômica do grupo, neste trabalho será utilizada a nomenclatura Alticinae, como subfamília pertencente a Chrysomelidae.

1.1 ANÁLISE CITOGENÉTICA

Sob o ponto de vista citogenético, poucas espécies de Coleoptera foram analisadas, cerca de 1,2% (aproximadamente 4.800 espécies), a maioria das informações se concentra nas subordens Adephaga e Polyphaga. A subordem mais estudada sob o ponto de vista citogenético é Polyphaga, com aproximadamente 3.500 espécies analisadas (BLACKMON et al., 2015^a). Com base nos estudos realizados, o número cromossômico considerado basal para a ordem é $2n=20=9II+Xyp$, ou seja, nove pares autossômicos e o sistema Xy, no qual o cromossomo X é grande em relação ao y, e estes ficam na conformação de “paraquedas” na metáfase I da meiose (CROWSON, 1981; SMITH, 1951; VIRKKI, 1970). Considerando-se basal esta conformação cromossômica para a subordem Polyphaga (SMITH; VIRKKI, 1978; VIRKKI, 1984).

Os coleópteros apresentam grande heterogeneidade cariotípica, variando de $2n=4$ (*Chalcolepidius zonatus*) (FERREIRA et al., 1984) à $2n=72$ (*Xanthogaleruca luteola*) (LORITE et al., 2002). Esta diversidade também é vista no sistema de determinação sexual, do qual houve derivações da forma basal, ocorrendo sistemas aquiasmáticos, como: Xyp, Xnyp/nXyp, Xyc, X0, X1+X2, X+y e quiasmáticos, como: neoXy, Xy, Xyr, X1X2Y, Xy1Y2 (PETITPIERRE et al., 1988; SMITH; VIRKKI, 1978). Chrysomelidae compartilha desta variabilidade cariotípica, e as espécies que possuem o menor e maior número cromossômico ($2n=6$, *Homoschema latitarsum* e $2n=64$, *Disonycha bicarinata*) pertencem a subfamília Alticinae. Para Chrysomelidae, o cariótipo considerado basal é $2n=24=11II+Xyp$ (PETITPIERRE et al., 1988; SEGARRA; PETITPIERRE, 1982; SMITH; VIRKKI, 1978; VIDAL, 1984).

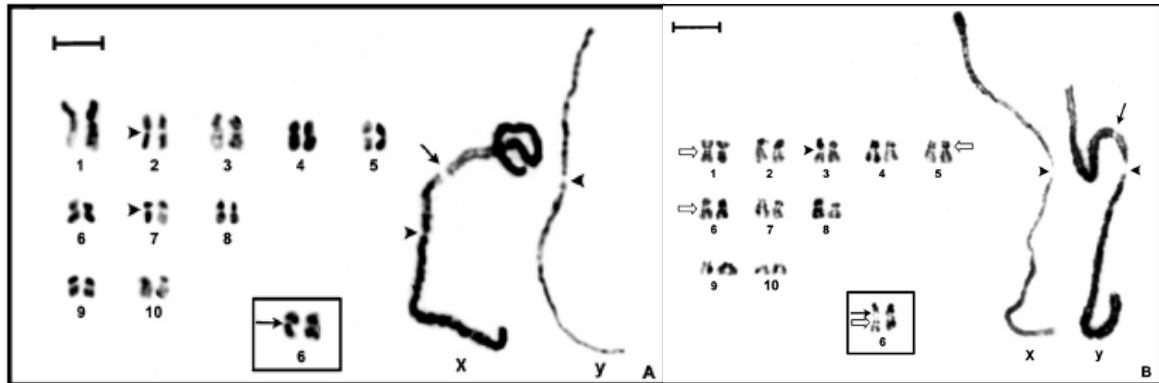
Alticinae possui aproximadamente 230 espécies descritas citogeneticamente (PETITPIERRE, 2006), representando cerca de 2% do número de espécies da subfamília (SMITH; VIRKKI, 1978). Esta subfamília é considerada derivada, por possuir cariótipo que varia quanto ao número cromossômico e sistema de determinação sexual (VIRKKI, 1968, 1988), possuindo irregularidades no comportamento, tamanho e morfologia dos cromossomos sexuais. O cariótipo considerado basal para Alticinae é o mesmo da família, $2n=24=11II+Xyp$, sendo encontrado em *Fosterita sp.*, uma espécie considerada primitiva no clado (VIRKKI, 1970, 1988).

Alticinae agrupa diversas tribos, uma delas é Oedionychini, a mais diversa da região Neotropical, formando um grande grupo com aproximadamente 16 gêneros (BEGOSI; BENSON, 1988). Diversos estudos citogenéticos foram realizados nesta tribo (ALMEIDA; CAMPANER; CELLA, 2009; ALMEIDA et al., 2010; AZAMBUJA et al., 2020; GOLL et al., 2018; MELLO; VICARI; ALMEIDA, 2014; PETITPIERRE, 2006; ROSOLEN et al., 2018; VIRKKI, 1963, 1967, 1970, 1971, 1976, 1983; VIRKKI, et al., 1991; VIRKKI; SANTIAGO-BLAY, 1993, 1996; VOLSKI et al., 2021). Entretanto, esse número é pequeno, considerado sua diversidade. Oedionychini agrupa duas subtribos, Disonychina e Oedionychina. Esta divisão foi estabelecida por meio de estruturas torácicas, do tarso e de acordo com feixes de esperma. Disonychina é considerada basal em relação a Oedionychina, possuindo 32 espermatozoides por feixe ou “bundle” (spz/b) em relação à Oedionychina com 16 spz/b, os dados citogenéticos ajudam a suportar esta subdivisão (VIRKKI, 1988; VIRKKI et al., 1991). As análises citogenéticas de 20 espécies de Disonychina, demonstraram grande variação intra e interespecífica do número diploide e tipo de determinação sexual. Por outro lado, os Oedionychina possuem cariótipos conservados, havendo pouca alteração em relação ao número diploide e sistema de determinação sexual, sendo $2n=22=10II+X+y$ (Figura 1.1) considerado o cariótipo conservado em Oedionychina (ALMEIDA; CAMPANER; CELLA, 2006; VIRKKI, 1988). Algumas espécies que diferem do cariótipo basal de Oedionychina são do gênero *Asphaera*, que possuem múltiplos cromossomos sexuais ($Xnyn$) e outras espécies como: *Alagoasa equestris* que possui menor número de autossomos ($2n=12=5II+X+y$). Além disso, outra variação é devido a presença de cromossomos B, como ocorrem em *Alagoasa oblecta*, *Alagoasa transparente* e *Omophoita aequinotialis* (GOLL et al., 2018, VIRKKI, 1988; VIRKKI; SANTIAGO-BLAY, 1993).

O número conservado em Oedionychina difere do cariótipo basal de Chrysomelidae e Alticinae. Virkki (1988) apresentou duas hipóteses para esta redução, a primeira refere-se à translocação de um par de autossomos, reduzindo de 22 autossomos para 20. A segunda, aborda a erosão de um dos pares autossômicos, devido ao fato de ser encontrado partículas pequenas de cromossomos no cariótipo da tribo Alticini, esta que é considerada basal dentro do táxon. Além do número cromossômico conservado, outra característica marcante dos Oedionychina é a presença de cromossomos sexuais muito grandes, frequentemente chamados de

gigantes, os quais são assinápticos durante a meiose (VIRKKI, 1970) e são localizados na periferia das células (VIRKKI, 1971).

Figura 1.1 - Cariótipo espermatogonial de *Omophoita*.



Legenda: Cariótipo espermatogonial de *Omophoita personata* (A) e *Omophoita sexnotata* (B). Número diploide $2n=22=10II+X+y$.

Fonte: Almeida, Campaner e Cella (2009).

1.2 HETEROCROMATINA

A heterocromatina constitutiva (HC) tem sido localizada em diversas análises citogenéticas em Coleoptera, por evidenciar melhor a diferença estrutural dos cromossomos, a arquitetura dos cariótipos e facilitar a comparação entre espécies relacionadas. A distribuição da HC nos coleópteros tem sido preferencialmente na região centromérica e pericentromérica, podendo estar associado nas regiões intersticiais e teloméricas, porém, com menor frequência. Em cromossomos sexuais, o padrão de HC tem ocorrência variável e pode ser encontrado na região pericentromérica e/ou ao longo do cromossomo, de acordo com o grau de diferenciação cromossômica. Entretanto, o cromossomo Y não apresenta bandas heterocromáticas, com exceção de algumas espécies (ALMEIDA; ZÁCARO; CELLA, 2000; ROZEK et al., 2004).

Em relação aos Oedionychina, poucos estudos foram realizados para evidenciar as regiões heterocromáticas (ALMEIDA; CAMPANER; CELLA, 2006, 2009; GOLL et al., 2018; MELLO; VICARI; ALMEIDA, 2014; VIRKKI, 1983). As espécies analisadas por Virkki (1983) e Almeida, Campaner e Cella (2006, 2009) mostraram

marcações nas regiões centroméricas em todos os cromossomos, incluindo os cromossomos sexuais, além desta marcação, foram encontradas marcações nas regiões pericentroméricas. Goll et al. (2018), analisando algumas espécies do gênero *Omophoita*, encontraram algumas diferenças, as marcações em *O. abbreviata* estavam presentes na região centromérica da maioria dos cromossomos. Em *O. aequinoctialis* os autores encontraram três citótipos, os quais variaram quanto as marcações da HC, o citótipo 1, mostrou marcações centroméricas em quase todos os cromossomos, os citótipos 2 e 3, apresentaram marcações pericentroméricas na maioria dos cromossomos, incluindo um grande bloco no par 3.

No trabalho realizado por Mello, Vicari e Almeida (2014) as espécies *O. octoguttata*, *O. personata* e *O. sexnotata* mostraram padrão de bandas C diferente entre os cromossomos sexuais. O bandamento em *O. octoguttata* revelou no cromossomo X marcações na região centromérica e intersticial de um braço, enquanto que para o Y foi obtido bandas intersticiais ao longo do braço e um bloco de heterocromatina no braço curto. Em *O. personata* foi revelado marcações na região centromérica do X, enquanto que no Y, foram localizadas marcações proeminentes na região terminal de um braço e na região intersticial do braço oposto. Em *O. sexnotata*, as marcações foram na região centromérica e terminal do X, enquanto que o Y mostrou bandas intersticiais ao longo do braço e uma banda terminal no braço curto.

Estes dados demonstram que os cromossomos de Oedionychina estudados até o presente momento com técnica de banda C mostram os padrões encontrados em Coleoptera. Porém, há algumas diferenças, principalmente nos cromossomos sexuais, estas que podem ser utilizados para entender os processos de diferenciação cariotípica dentro e entre os gêneros.

1.2 DNA REPETITIVO

As sequências de DNA repetitivos são encontradas em diversos eucariotos, compõem cerca de 30% a 40% do genoma total, podendo chegar a 85% do genoma em alguns organismos, como plantas. Os DNA repetitivos são organizados em diversas classes (Figura – 1.2). Os DNA *in tandem* são divididos em moderadamente repetitivo, estes incluem o DNA ribossomal (DNAr), famílias gênicas codificadores de

proteínas, e repetição telomérica, assim como, altamente repetitivos, como os microssatélites, 1717omogeneização e macrossatélites. Os DNA repetitivos dispersos são os elementos transponíveis (Tes – transposons e retrotransposons) (CHARLESWORTH et al., 1994; HARDMAN, 1986; LOPES-FLORES; GARRIDO-RAMOS, 2012; THAKUR, PACKIARAJ; HENIKOFF, 2021). Estes repetitivos são considerados bons marcadores citogenéticos, úteis no estudo da evolução cromossômica, cromossomos supranumerários, cromossomos sexuais, rearranjos cromossômicos (CABRAL-DE-MELLO et al., 2010) e muitas vezes para caracterização das espécies. Por serem importantes para a estruturação dos cromossomos (CHARLESWORTH et al., 1994) e mostrarem grande diversidade de tipos e das sequências entre as espécies (ROZEK et al., 2004).

Dentre os DNA repetitivos, tem crescido o interesse especialmente na coleção de DNA satélites (satDNA) dentro do genoma, estes conhecidos como satelitoma, os quais cobrem uma grande variedade de sequências dentro do genoma (RUIZ-RUANO et al., 2016) e são os principais componentes da heterocromatina (PALOMEQUE; LORITE, 2008). Os satDNA podem ser localizados em regiões centroméricas, pericentroméricas, subteloméricas e regiões intersticiais (PLOHL, MESTROVIC; MRAVINAC, 2008), e também podendo ser localizados em regiões eucromáticas (LOPES-FLORES; GARRIDO-RAMOS, 2012; THAKUR, PACKIARAJ; HENIKOFF, 2021). Ademais, é relatado que a localização de um mesmo tipo de satDNA pode ser encontrado no mesmo locus em todos os cromossomos da espécie ou serem cromossomo específico, como satDNA de cromossomo sexual (PALOMEQUE; LORITE, 2008).

Os satDNA, assim como a maioria dos DNA repetitivos, foram considerados “DNA lixo”; no entanto, cada vez mais isso tem sido demonstrado uma suposição errônea. Estas sequências satélites possuem regiões genômicas que podem possuir diversas funções (THAKUR, PACKIARAJ; HENIKOFF, 2021) como: organização cromossômica, emparelhamento cromossômico, possíveis barreiras reprodutivas (PLOHL, MESTROVIC; MRAVINAC, 2008), sequências transcritas durante diferentes estágios da vida, podendo ser sexo específico e atuar em alguns processos de eliminação de genoma (PALOMEQUE; LORITE, 2008) e modulação da cromatina e estabelecimento de centrômeros (SILVA et al., 2019). São com isso, considerados importantes para marcação citogenética, caracterização de genomas, relações

filogenéticas, correlação do genótipo-fenótipo e estudos de diversidade (VICARI et al., 2010; THAKUR, PACKIARAJ; HENIKOFF, 2021).

Os DNA que compõem o satelitoma são classificados em 3 (três) grupos: microssatélite, minissatélites e macrosatélites, referente ao seu comprimento da repetição monomérica (DNA satélite) (THAKUR, PACKIARAJ; HENIKOFF, 2021). Os microssatélites são denominados de sequência simples de repetição (SSRs) ou *short tandem repeat* (STRs), podem variar de 2 a 9 pb, com 5 a 50 repetições *in tandem*, podendo haver repetições maiores, possuindo matrizes com menos de 1 kb. São encontrados em regiões codificantes, não codificantes e em regiões regulatórias, são considerados sequências de DNA altamente polimórfico, com alta taxa de mutação, mutações estas sendo pontuais ou variações das unidades de repetição dentro da população (GARRIDO-RAMOS et al., 2017; LOPES-FLORES; GARRIDO-RAMOS, 2012; THAKUR, PACKIARAJ; HENIKOFF, 2021). Com isso, indivíduos da mesma população podem conter sequências de microssatélites diferentes. Devido a algumas características dos microssatélites, são muito utilizados como ferramenta para análises populacionais, podendo-se estimar a variabilidade genética da população, taxa de endogamia, relações genéticas entre os indivíduos, distâncias genéticas (LOPES-FLORES; GARRIDO-RAMOS, 2012) e em humanos, são utilizados para análises de parentesco e análises forenses (THAKUR, PACKIARAJ; HENIKOFF, 2021).

Os minissatélites ou *variable number of tandem repeats* (VNTRs) possuem repetições maiores do que 9 pb, em média 15 pb, com comprimento médio de 0,5-30 kb, encontrados em regiões eucromáticas de vertebrados, invertebrados, plantas e fungos. São utilizados para verificação de parentesco e identificação individual (LOPES-FLORES; GARRIDO-RAMOS, 2012; THAKUR, PACKIARAJ; HENIKOFF, 2021).

Os macrosatélites (MSRs) geralmente sobrepõem 200 nucleotídeos de comprimento, ocupando várias megabases dentro do genoma. São considerados um dos componentes principais da heterocromatina, podem haver diferentes macrosatélites no genoma de uma espécie e em espécies relacionadas. Estas sequências são encontradas principalmente em regiões centroméricas, pericentromérica e telomérica, podendo ser encontrado também em cromossomos

sexuais e intercalado nos autossomos (CHADWICK, 2009; DUMBOVIC, SONIA-V e PERUCHO, 2017; LOPES-FLORES; GARRIDO-RAMOS, 2012).

De acordo com RUIZ-RUANO et al. (2016) o surgimento de uma sequência de satDNA, é a partir de uma duplicação de alguma região do genoma de dois ou mais pares de bases, dando origem a uma repetição *in tandem* curta. Sendo propostos diversos modelos para explicar a evolução dos satDNA (THAKUR, PACKIARAJ; HENIKOFF, 2021), havendo dois modelos principais sobre a evolução do satDNA, a evolução em concerto e a biblioteca de satDNA. A evolução em concerto, é dividida em 1919 omogeneização e fixação (LORITE et al., 2017), de acordo com esta hipótese, novas variantes ocorrem por mutações, causando divergência nas sequências dentro de uma espécie (GARRIDO-RAMOS, 2017; THAKUR, PACKIARAJ; HENIKOFF, 2021), o processo de homogeneização e expansão dos satDNA no genoma é realizada a partir do *crossing-over*, transposição ou reinserção, em conjunto com o processo de conversão gênica. A fixação na população ocorreria por meio da reprodução sexuada (BRUVO et al., 2003; GARRIDO-RAMOS, 2017).

A hipótese da biblioteca se refere a predição que diferentes espécies possuem sequências espécie-específica de satDNA (PALOMEQUE; LORITE, 2008; THAKUR, PACKIARAJ; HENIKOFF, 2021). Contudo, há famílias de satDNA que permanecem sendo compartilhadas entre espécies próximas, ou até mesmo separadas por milhões de anos (MESTROVIC et al., 1998; PALOMEQUE; LORITE, 2008). Assim, de acordo com a teoria da biblioteca de satDNA, espécies relacionadas possuem famílias de satDNA originadas de um ancestral em comum, mas que é amplificada diferentemente em cada espécie (GARRIDO-RAMOS, 2017; MESTROVIC et al., 1998; THAKUR, PACKIARAJ; HENIKOFF, 2021). Assim, diferentes satDNA podem possuir número de cópias maiores ou menores dentro do genoma, havendo algumas famílias bem representadas e outras subrepresentadas (BRUVO et al., 2003). Esta hipótese já vem sendo comprovada em diversos táxons (BRUVO et al., 2003; CAMACHO et al., 2021; THAKUR, PACKIARAJ; HENIKOFF, 2021).

Devido a importância dos satDNA, desde a sua descoberta em 1961 por Kit, vem sendo implementados diversos métodos para melhor identificar e analisar estas sequências repetitivas dentro do genoma dos eucariotos. O primeiro método de análise foi de densidade, com ultracentrifugação com cloreto de céσιο (KIT, 1961, GARRIDO-RAMOS, 2017), que predominou durante um período de tempo em

conjunto com a técnica de reassociação via cinética (Cot -1 DNA) (BRITTE; WARING, 1966, GARRIDO-RAMOS, 2017). Estas técnicas foram substituídas pelo método de isolamento, com tratamento com endonuclease de restrição do DNA genômico, que popularizou e facilitou as análises de satDNA (GARRIDO-RAMOS, 2017; SINGER, 1982). Após a popularização da técnica com endonuclease, iniciou-se o uso de técnicas que ajudassem a localizar e identificar as sequências de satDNA nos cromossomos das espécies estudadas, estas técnicas iniciaram com os métodos de Southern-blot, dot-blot, partindo para hibridações com nucleotídeos marcados radioativamente e posteriormente, a técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) (GARRIDO-RAMOS, 2017). Esta última que vem sendo utilizada até os dias atuais para localizar diversas sequências no genoma das espécies.

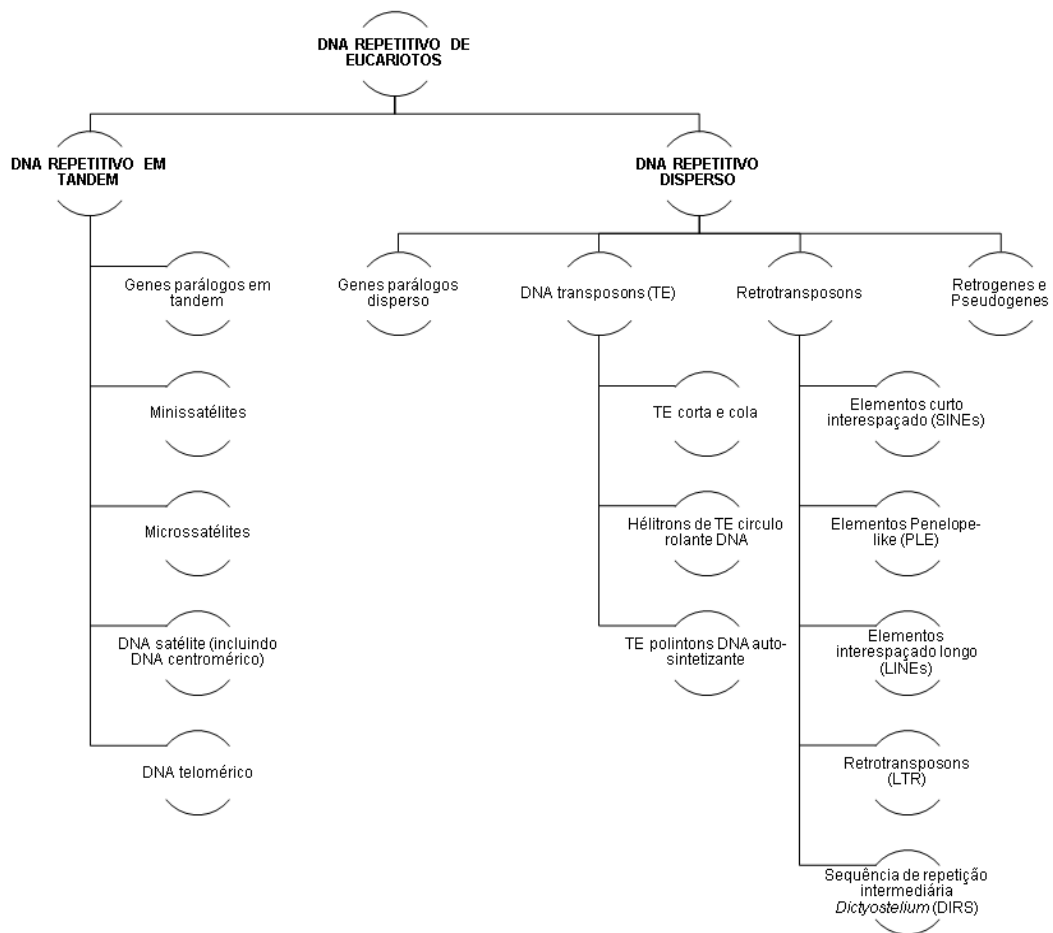
No entanto, mesmo com os métodos descritos acima, os satDNA foram pouco estudados, devido à dificuldade dos métodos tradicionais e a falta de acurácia para a descrição minuciosa e criteriosa sobre a quantidade de satDNA no genoma das espécies. Mesmo após o surgimento do sequenciamento do genoma das espécies, muitos pesquisadores não realizavam a busca por estas sequências repetitivas, devido à dificuldade de montagem (GARRIDO-RAMOS, 2017; PALOMEQUE; LORITE, 2008).

Após o surgimento do sequenciamento de nova geração (NGS), os satDNA tem sido extensivamente estudado, o NGS permitiu analisar as sequências de diversos DNA repetitivos, incluindo satDNA. As técnicas de NGS incorporadas a ferramentas de bioinformática e a montagem das sequências sem necessidade de um genoma de referência tem permitido ampla análise do satDNA (MORA et al., 2020; GARRIDO-RAMOS, 2017). Algumas ferramentas de bioinformática são RepeatExplorer e *Tandem Repeat analyzer* (TAREAN), que estão presentes na plataforma Galaxy para uso público (NOVÁK; NEUMANN; MACAS, 2010; NOVÁK; NEUMANN; PECH, 2013), que tem sido amplamente utilizada em diversas pesquisas. Outras ferramentas têm sido incorporadas para analisar e aumentar a confiabilidade das análises, como a ferramenta satMiner, desenvolvida por Ruiz-Ruano et al. (2016), o método desenvolvido por Wei et al., (2014), para verificar sequências curtas dentro do genoma (2-10 pb), e a ferramenta *Tandem Repeat Finder*, utilizada em besouro, desenvolvida para identificar satDNA em *Tribolium castaneum* (GELFAND; RODRIGUEZ; BENSON, 2007). Nesta pesquisa será utilizado o protocolo do SatMiner

de Ruiz-Ruano et al. (2016) em conjunto com RepeatExplorer e *Tandem Repeat analyzer* (TAREAN).

A análise comparando o satelitoma entre os sexos já tem sido realizado por alguns autores (CREPALDI et al., 2021; PALACIOS-GIMENEZ et al., 2017). Tem revelado sequências únicas do sexo, do cromossomo sexual e sequências com viés em relação ao macho ou a fêmea. Ademais, hibridações com DNA repetitivos têm demonstrado que *O. octoguttata* possui grande quantidade destas sequências em seu genoma (MELLO; VICARI; ALMEIDA, 2014; ROSOLEN et al. 2018). Assim, visto que *O. octoguttata* possui grande quantidade de DNA repetitivo em seu genoma, estes podendo ser DNA satélite, a busca pela composição de satDNA na espécie pode auxiliar na compreensão da evolução cromossômica no grupo, além de poder identificar satélites enriquecidos no macho ou na fêmea.

Figure 1.2 Diagrama dos tipos de DNA repetitivos de eucariotos.



Fonte: Adaptado de LOPES-FLORES; GARRIDO-RAMOS (2012).

1.4 EVOLUÇÃO DOS CROMOSSOMOS SEXUAIS

Em insetos é encontrado diversos tipos de mecanismos de determinação sexual, cromossomos sexuais diferenciados (XX, XY ou ZZ, ZW), haplodiploidia (Hymenoptera), eliminação paterna do genoma (EPG) (Hemiptera) e alguns mais raros, como: monogênia (alguns Diptera), determinação por temperatura (algumas espécies de *Sciara*) (BACHTROG et al., 2014; BLACKMON et al., 2017; SANCHEZ, 2008).

O sistema de determinação sexual cromossômico, descoberto em 1905 por Nattie Stevens (FURMAN et al., 2020), consiste em diferenças cromossômicas entre machos e fêmeas, esta diferença é dada pelos cromossomos sexuais, que correspondem a um par de cromossomos que são iguais em um sexo (homogamético) e diferentes em outro (heterogamético) (BULL, 1985; GRAVES, 2006; SUMNER, 2003). O sistema heterogamético masculino (XY), ocorre na maioria das espécies dentro da ordem Insecta, e o heterogamético feminino (ZW) é encontrado em Lepidoptera, Trichoptera e alguns Diptera. Além destes, são encontrados sistemas X0, Z0 e sistemas com múltiplos cromossomos sexuais (BLACKMON et al., 2017; BLACKMON; DEMUTH, 2015b; BULL, 1985; KAISER; BACHTROG, 2010; SUMNER, 2003).

O sistema cromossômico pode ter surgido diversas vezes durante o processo evolutivo dos animais (OHNO, 1967), podem ter originado a partir de vários outros sistemas, como hermafroditismo e sistema determinado pela temperatura (BACHTROG, 2011). A principal hipótese para a evolução destes cromossomos, consiste de um par de cromossomos homólogos, que sofreram mutação, surgindo os loci antagonistas (seleção antagonista), que ajudariam na determinação do macho ou fêmea. A partir destes antagonistas, podem ter surgido os proto-X (Z) e proto-Y (W), esta diferença entre os proto-sexuais diminuiu a taxa de recombinação, fazendo aumentar a diferenciação entre eles, aumentando também o acúmulo de genes benéficos e não benéficos para fêmeas e machos, reforçando a diferença entre eles (BLACKMON et al., 2017; BLACKMON; DEMUTH, 2015b; CHARLESWORTH, 1991; OHNO, 1967; WRITH et al., 2016). Além do surgimento dos loci antagonistas, inversões e acúmulo de DNA repetitivos podem ter tido papel fundamental para o surgimento dos cromossomos sexuais, diminuindo a recombinação, aumentando a

supressão e diferenciação dos cromossomos sexuais (OHNO, 1967; CHARLESWORTH et al., 2005; NATRI et al., 2019; FURMAN et al., 2020).

Contudo, nem todos os cromossomos sexuais presente nas espécies surgiram a partir de um homólogo, como descrito por Ohno (1967) e Charlesworth (1991). Há evidências mostrando que os cromossomos sexuais em alguns organismos podem ter se originado de formas incomuns (FURMAN et al., 2020), como por meio de cromossomos B (FRAISSE et al., 2017; NOKKALA et al., 2000, 2003), a partir de um gene feminizador inserido por uma *Wolbachia* no genoma de um organismo (LECLERCQ et al., 2016). O sistema neoXY, a partir do sistema X0, do qual após a fusão de um autossomo com o cromossomo X, o autossomo complementar é recrutado devido a homologia, assim se comportando como cromossomo Y, formando assim o sistema sexual neoXY (SMITH, 1949; WHITE, 1973). Além disso, pode também ser como a hipótese descrita por Pease e Hahn (2010), sugerindo que no grupo de insetos alados, os cromossomos sexuais em cada táxon podem ter originado de um par de homólogos diferente. Esta diversidade de origem pode evidenciar que os cromossomos sexuais podem ter surgido diversas vezes nas linhagens dos organismos, de diversas formas, formando assim um ciclo (*turnover*), do qual ocorre o surgimento de novos cromossomos sexuais a partir da perda dos cromossomos sexuais ou surgimento de novos genes determinantes do sexo (BACHTROG et al., 2019).

Blackmon et al. (2017) numa ampla análise dos cromossomos sexuais na classe Insecta, relataram que o sistema de determinação sexual com maior prevalência nos Coleoptera é o sistema XY. Este que é o sistema sexual encontrado em grupos basais da ordem, favorecendo a hipótese que o sistema sexual primitivo em Coleoptera é o Xyp (SMITH, 1951; VIRKKI, 1970, 1988). Em Coleoptera podem ser encontrado diversas derivações de tipos de cromossomos sexuais, estes podendo ser aquiasmático (XY, Xyp, Xny/nXyp, Xyc, X0 e X₁+X₂) ou quiasmático (neoXY, Xy, Xyr, X₁X₂Y, XXXY, XXY e XY₁Y₂) (ALMEIDA et al., 2009; GALIAN et al., 2002; SMITH; VIRKKI, 1978). Entretanto, dentre toda esta diversidade de cromossomos sexuais, é relacionado que Polyphaga possui prevalência de cromossomos assinápticos, e assim, os cromossomos sexuais das ordens Polyphaga e Adephaga teriam evoluído de forma independente (BLACKMON; DEMUTH, 2014).

A diversidade de sistemas cromossômicos sexuais em Coleoptera é muito bem representado nos Alticinae. São encontrados 18 tipos diferentes de sistema cromossômico nesta subfamília, sendo estes: Xyp, neoXY, Xy, XY, X+Y, X+y, X+ny, X1+X2, nXnY, XpneoXneoYp, X, Xyy, X1X2Y, XXYY, Xyr, X1Y+nX, Xy+Y e X+ny (VIRKKI 1964, 1967, 1968; VAIO; POSTIGLIONI, 1974). O conhecimento em relação aos sistemas de determinação sexual em Coleoptera é realizado predominantemente por meio da citogenética clássica, a maioria das análises realizadas sob o ponto de vista citogenético descreve apenas o tipo de determinação sexual e o número de cromossomos sexuais, necessitando estudos mais aprofundados, com dados moleculares.

Uma das técnicas que pode ser utilizada, é a pintura cromossômica (*Whole Chromosome Painting* – WCP). Esta tem sido amplamente aplicada em diversos organismos, com objetivo de identificar rearranjos e translocações cromossômicas, aberrações numéricas, identificação de cromossomos B, identificação de cromossomos sexuais e estudos evolutivos de cariótipos e cromossomos sexuais (BARCELLOS et al., 2020; CIOFFI et al., 2011^a, 2001b; DEGRANDI et al., 2017; GUAN et al., 1994; HOUBEN et al., 2001; KRETCHMER et al., 2020; MARCHAL et al., 2004; TERUEL et al., 2008). No contexto evolutivo dos cromossomos sexuais, esta técnica já foi utilizada em algumas pesquisas, com peixes (CIOFFI et al., 2011^a, 2001b), roedores (MARCHAL et al., 2004), marsupiais (GLAS et al., 1999), ornitorrinco (GRUTZNER et al., 2004), tartarugas (GRAVEZ; SHETTY, 2001) e em insetos (PITA et al., 2016). Contudo, nenhum estudo com este contexto foi realizado em Coleoptera.

A partir disso, tornam-se necessários estudos relacionado a grupos específicos, principalmente em insetos, que há pouco conhecimento em relação aos cromossomos sexuais. Um grupo interessante para realizar estes estudos é Coleoptera, pois tem diversos sistemas de cromossomos sexuais, desta forma, esta técnica poderia revelar quais processos estiveram envolvidos na evolução e diferenciação destes cromossomos no grupo. Assim, a técnica de WCP pode ser utilizada para entender a evolução dos cromossomos sexuais em Oedionychina (Alticinae, Oedionychini), os quais contém os interessantes cromossomos sexuais gigantes. Pesquisas recentes mostram que eles possuem grande acúmulo de elementos repetitivos em suas sequências, e que possivelmente estão envolvidas no aumento destes cromossomos sexuais (MELLO; VICARI; ALMEIDA, 2014;

ROSOLEN et al., 2018), tornando-os, interessante para estudos evolutivos. Visto que ainda não está muito claro como ocorreu a evolução dos cromossomos sexuais e qual o papel dos DNA repetitivos na evolução deles.

1.5 DNA MITOCONDRIAL (MITOGENOMA)

O Genoma mitocondrial (mtDNA) de insetos é a sequência mais abundante no GenBank. Este genoma em inseto foi sequenciado pela primeira vez em *Drosophila sp.*, em 1985, após isso, aumentou cada vez mais a quantidade de dados referente a este genoma (CAMERON, 2014). O mtDNA é uma molécula circular presente na mitocôndria dos eucariotos, possui algumas características particulares, como estrutura genética simples, herança materna, muitas cópias e não possuem íntrons (SONG et al., 2017). Estes dois últimos, facilitando a montagem do genoma após o sequenciamento.

O DNA mitocondrial geralmente possui 15-20 kb, contendo 37 genes, destes, 13 genes codificadores de proteínas (PCGs), 2 genes de RNAs ribossomais (rRNA), 22 RNAs transportadores (tRNA), e uma variedade de estruturas não codificantes (BOORE, 1999, CAMERON, 2014). Podendo haver espécies que diferem desta organização genômica (YANG et al., 2017), contudo, a organização dos genomas mitocondriais, são altamente conservadas nos táxons.

A montagem do mtDNA tem sido muito utilizada, visto que a obtenção de genomas mitocondriais via NGS tem sido cada vez mais possível devido ao baixo custo. Assim, sendo utilizado para realizar diversos tipos de análises, como: descrição do mtDNA de uma espécie (WANG, et al., 2019, XIE et al., 2020), que posteriormente ajuda a entender traços evolutivos e realizar inferências filogenéticas dos grupos (NIE et al., 2018, NIE et al., 2020) e estudos de biodiversidade (GÓMEZ-RODRÍGUES et al., 2015).

Com base nisso, os genomas mitocondriais podem resolver diversas problemáticas taxonômicas em diversos grupos, por serem considerados muito mais informativos em comparação com métodos convencionais e fragmentos de genes nucleares ou mitocondriais (SONG et al., 2017), principalmente em Coleoptera, onde há diversas relações filogenéticas incertas. Diversos estudos para resolver as relações filogenéticas em Chrysomelidae já foram realizadas, alguns utilizando dados

morfológicos (CHABOO 2007; LINGAFELTER; KONSTANTINOV 1998), enquanto outros utilizam dados de genes nucleares ou fragmentos do DNA mitocondrial (GOMEZ-ZURITA et al., 2005; MATSUMURA et al., 2014). Alguns autores já utilizam dados genômicos de mtDNA para realizar inferências evolutivas (GÓMEZ-RODRÍGUES et al., 2015; NIE et al., 2018, NIE et al., 2020; SONG et al., 2017). Contudo, ainda há diversas relações filogenéticas incertas em Chrysomelidae.

Apesar da utilidade dos mtDNA, ainda há poucas descrições, visto que é necessária uma gama de dados para realizar inferências evolutivas e comparações entre as espécies, assim, é necessário realizar mais descrições do mtDNA, para aumentar a quantidade desta sequência nos bancos de dados e com isso dar suporte para diversas pesquisas (SONG et al., 2017). Um dos grupos que podem se beneficiar do aumento de dados referente ao mtDNA, são os Alticinae, estes que são uma subfamília dentro de Chrysomelidar, que possui diversas relações filogenéticas incertas, sendo estes classificados em diversos níveis taxonômicos a partir de análises morfológicas e moleculares (FARRELL, 1998; FARRELL; SEQUEIRA, 2004; GE et al., 2012; GÓMEZ-ZURITA et al., 2008, NIE et al., 2018; NIE et al., 2020, SEENO; WILCOX, 1982; SUZUKI, 1985). Assim, a descrição do mtDNA de *O. octoguttata* pode auxiliar nas análises relacionadas a este grupo, visto que a partir do genoma mitocondrial pode ser realizado análises comparativas e filogenéticas.

2 JUSTIFICATIVA

Os Alticinae representam uma subfamília com grande importância econômica e ecológica, por conter espécies consideradas pragas agrícolas, ou importantes para controle biológico e para identificação de degradação ambiental. Podem ser considerados modelos para estudos evolutivos, eles contêm grande diversidade de cromossomos sexuais, sendo encontrando cerca de 18 tipos, sendo estes: Xyp , $neoXY$, Xy , XY , $X+Y$, $X+y$, $X+ny$, $X1+X2$, $nXnY$, $XpneoXneoYp$, X , Xyy , $X1X2Y$, $XXYY$, Xyr , $X1Y+nX$, $Xy+Y$ e $X+ny$ e os intrigantes cromossomos sexuais gigantes da subtribo Oedionychina.

Estudos anteriores relataram marcações distintas de heterocromatina nestes sexuais gigantes, diferenciando a posição em algumas espécies. Além disso, foi demonstrado que possuem muito DNA repetitivo. Com isso, por ainda haver discussões em relação a evolução dos cromossomos sexuais em insetos, e a maioria das análises citogenéticas de Coleoptera ter sido convencional, distinguindo apenas o tipo de determinação sexual e número de cromossomos sexuais, é importante utilizar métodos mais sofisticados para conhecer a diferenciação destes cromossomos.

Assim, utilizando a técnica de pintura cromossômica (WCP) em algumas espécies de Oedionychina, pode-se realizar inferências de como os cromossomos sexuais se distinguem, com características semelhantes e diferentes entre eles. Além disso, poder levantar hipóteses de como ocorreu a diferenciação e evolução dos cromossomos sexuais do grupo.

Visto que *O. octoguttata* possui grande quantidade de elementos repetitivos e cromossomos sexuais gigantes, a análise da composição do genoma, com enfoque nos SatDNA poderia ajudar a compreender este genoma diferenciado e com análises *in silico* da composição e tipos de SatDNA, futuras pesquisas utilizando hibridações e análise dos SatDNA, podem ser mais focados aos que serão encontrados neste trabalho. Adicionalmente, a análise entre o genoma masculino e feminino, poderá contribuir para compreender melhor a evolução dos SatDNA e poderá identificar possivelmente sequências específicas do sexo e em cromossomo sexual específico.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente projeto tem como objetivo entender o processo de diferenciação e evolução dos cromossomos sexuais em espécies do gênero *Omophoita* por meio da comparação e diferenciação genômica e cromossômica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o grau de similaridade entre os cromossomos sexuais de *Omophoita* a partir das sondas dos cromossomos sexuais (X e Y);
- Inferir sobre a homeologia, utilizando a hibridação cruzada com sonda dos cromossomos sexuais de *O. octoguttata* em outras espécies do gênero;
- Verificar o grau de semelhança genômica entre os sexos de *O. octoguttata* a partir da técnica de CGH;
- Comparar o genoma das espécies de *Omophoita* para verificar o grau de semelhança entre os genomas;
- Propor os possíveis mecanismos envolvidos no processo de diferenciação e evolução dos cromossomos sexuais em Oedionychina;
- Descrever o conjunto de DNA satélite (satelitoma) de *O. octoguttata*;
- Comparar o satelitoma entre os sexos de *O. octoguttata*;
- Montar o genoma mitocondrial de *Omophoita octoguttata*.

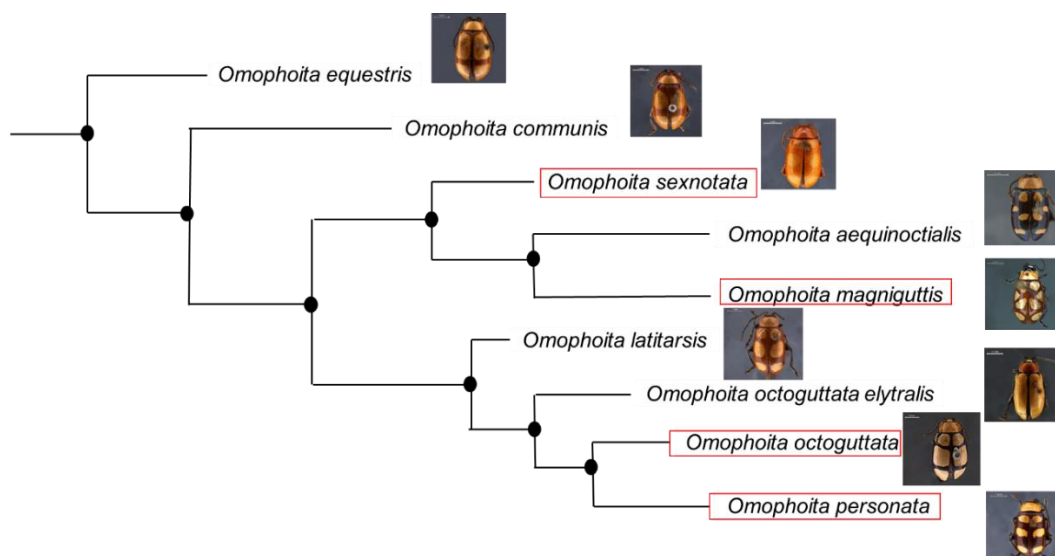
4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANÁLISES CITOGENÉTICAS

4.1.1 Coleta, preparação citológica e hibridação *in situ* fluorescente

Espécies do gênero *Omophoita* (*Omophoita octoguttata*, *Omophoita personata*, *Omophoita sexnotata* e *Omophoita magniguttis*) (Figura 4.1) foram coletadas na região de Ponta Grossa – PR (25°07'10" S e 49°56'24" W), por meio da coleta manual utilizando puça. As espécies foram coletadas com a autorização do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio MMA / IBAMA / SISBIO, número 15402 e o acesso ao patrimônio genético cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado com o código ABE8B7D, no Ministério do Meio Ambiente. Os besouros foram dissecados seguindo a metodologia descrita por Almeida, Zacaro e Cella (2000).

Figura 4.1 Árvore de relações entre algumas espécies de *Omophoita*.



Fonte: Figura retirada e modificada de Begha, 2021.

4.1.2 Microdissecção e amplificação

Os cromossomos sexuais (X e Y) de *Omophoita octoguttata* foram microdissectados em microscópio invertido (Olympus), equipado com microdissector mecânico (Narishige) com agulhas de vidro, capilar, com pontas de aproximadamente 0,5-0,7µm. Após a microdissecção, a ponta da agulha contendo o material cromossômico foi quebrada no interior de um microtubo, onde foi realizada uma primeira reação de DOP-PCR ou de amplificação do genoma.

As reações de DOP-PCR seguiram o procedimento descrito por Telenius et al. (1992), com algumas modificações. O procedimento consiste de 20 µl de reação de PCR (tampão 2X = 100 mM KCl, 20 mM Tris-HCl, 0,2% de Triton-X, 3 mM MgCl₂; 500 µM dNTP; 2,5 µM de primer 5'-CCGACTCGAGNNNNNATGTGG-3 – DOP = *degenerated oligonucleotide primer* - e 2 U de *Taq* polimerase). O programa de PCR consistiu de 10 ciclos de 94°C por 1,5 min, 30°C por 3 min, e 72°C por 4 min, seguidos por 30 ciclos de 94°C por 1,5 min, 56°C por 1,5 min, e 72°C por 1,5 min. Os produtos foram checados em gel de agarose 2%, alíquota 3µl do primeiro produto de PCR e procedeu uma nova reação de amplificação num volume final de 50µl (tampão *Taq* polimerase 1X = 2 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 3 µl DOP primer 6WM = 5'-CCGACTCGAGNNNNNATGTGG-3' (100µM) e 2 unidades de *Taq* polimerase), de acordo com as seguintes condições: 30 ciclos a 90°C por 1,5 min, 56°C por 1,5 min e 72°C por 1,5 min. Checar o produto de PCR em gel de agarose 2%.

Para a extração de DNA, foi utilizado o protocolo de Bruford et al. (1980), com algumas modificações. O DNA foi extraído por meio de maceração, utilizando-se cabeça, pronoto e fêmur do inseto. Após a extração do DNA de cada espécie analisada, foi realizada a técnica de C0T-1 DNA, pelo método de C0t-1 PCR. Esta teve como finalidade ser usada como competidor/bloqueador das sequencias altamente repetitivas do genoma para a hibridação da sonda de *O. octoguttata*.

4.2 HIBRIDAÇÃO *IN SITU*

4.2.1 Sondas para Hibridização Comparativa de Genomas (CGH)

Três experimentos foram planejados para a comparação do DNA genômico (gDNA) de espécies de *Omophoita*, utilizando como base os cromossomos meióticos de *O. octoguttata*. Para isso, o gDNA de *O. octoguttata*, *O. personata* e *O. sexnottata* foram extraídos pelo protocolo Bruford et al. (1980), com algumas modificações. O DNA foi extraído utilizando-se cabeça, pronoto e fêmur do inseto. Em todos os ensaios, o gDNA derivado de machos de *O. octoguttata* foi marcado diretamente com Atto550 (fluorescência na cor vermelho) utilizando um kit de *Nick-Translation* (Jena Bioscience, Jena, Alemanha), enquanto o gDNA de *O. personata* e *O. sexnottata* também foram marcados via *Nick-Translation* (Jena Bioscience, Jena, Alemanha), mas com Atto488 (fluorescência na cor verde). O mix final de hibridização foi composto de 500ng do gDNA de *O. octoguttata*, acrescido de 500 ng do gDNA de uma das espécies descritas acima. Para todos os experimentos, sequências repetitivas foram bloqueadas utilizando 30 µg de *Cot*-1 DNA, preparado conforme Zwick et al. (1997), correspondendo a 15 µg de cada espécie hibridizada. O conjunto dos gDNAs e do *Cot*-1 DNA foi dissolvido em 20 µL do tampão de hibridização (formamida 50%, 2× SSC, SDS 10%, sulfato dextrano 10% e tampão Denhardt pH 7.0).

4.2.2 Sonda e FISH para Pintura Cromossômica (WCP)

Os experimentos de pintura cromossômica utilizaram a sonda derivada do cromossomo X e Y de *O. octoguttata*. Dezesesseis cópias de cada cromossomo foram isoladas por microdissecção e amplificadas segundo Yang et al. (2009). A marcação do cromossomo X foi realizada com Atto550 (fluorescência vermelha) e o cromossomo Y com Atto488 (fluorescência na cor verde) em uma Reação de Polimerase em Cadeia com primer degenerado de oligonucleotídeos (DOP-PCR), utilizando 1 µl do produto primeiramente amplificado como DNA molde (Yang et al., 2009). O procedimento de hibridização e lavagem seguiu as condições de alta estrigência (Yano et al., 2017).

4.2.3 Hibridização Fluorescente *In Situ* (FISH) para CGH

Os experimentos de CGH seguiram o protocolo de Symonová et al. (2015) com pequenas modificações. As lâminas contendo cromossomos meióticos foram envelhecidas por 1h a 60 °C e tratadas com RNase A (20 µg/ml; 90 min a 37 °C), seguido do tratamento com Pepsina (Pepsina 2%, HCl 0.2 M, e H₂O MilliQ por 20 min a 37 °C). Os cromossomos foram desnaturados em formamida 75% diluída em 2× SSC a 72 °C por 3 min. As sondas foram desnaturadas em termociclador a 86 °C por 10 min, resfriadas a 4 °C por 2 min e pré-hibridizadas com DNA altamente repetitivo, provindo da técnica de C₀t-1 DNA a 37 °C por 1h. Esta etapa é essencial pois permite a hibridação do C₀t-1 DNA à sonda, realizando um bloqueio efetivo das sequências repetitivas. O mix de hibridização foi aplicado às lâminas e estas foram incubadas a 37 °C em câmara úmida por dois dias. Hibridizações não específicas foram removidas por duas lavagens a 65 °C em 1× SSC sob agitação por 5 min, uma lavagem em 4× SSC/Tween por 5 min também em agitação e, por fim, lavagem em 1× PBS por 1 min. Os cromossomos foram corados com DAPI (1.2 µg/ml) montado em solução *antifade* (Vector, Burlingame, CA, USA).

4.3. ANÁLISE DO SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO (NGS)

4.3.1 Sequenciamento

Foram utilizados dois exemplares da espécie *Omophoita octoguttata* para a realização do sequenciamento de nova geração (NGS), um indivíduo macho e uma fêmea, coletados manualmente na região de Itaiacoca – PR – Brasil (25°07'10" S e 49°56'24" W), ambos depositados no acervo do Laboratório de Genética e Evolução (LabGEv) na Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Para a extração de DNA foi utilizado o protocolo de Bruford et al. (1980), com algumas modificações. O DNA foi extraído por meio de maceração utilizando-se cabeça, pronoto e fêmur do inseto. O genoma total foi enviado para a empresa BGI Genomics para realização do sequenciamento. O genoma completo foi sequenciado utilizando baixa cobertura, com a plataforma DNBseq sob comprimento de leitura 150 pb, as sequências foram limpas e os adaptadores removidos (CHEN et al., 2018).

4.3.2 Montagem do genoma mitocondrial

O resultado do sequenciamento foi analisado utilizando a pipeline do FastQC, as amostras foram pré-processadas utilizando a pipeline do Trimmomatic (BOLGER; LOHSE e USABEL, 2014). Para montagem da sequência do genoma mitocondrial de *O. octoguttata*, foi utilizado a pipeline do *get organelle* (Jin et al., 2020), utilizando como referência o genoma mitocondrial completo das espécies: *Omophoita* sp. (MG021084), *Oedionychus cinctus* (MF979909), *Altica viridicyanea* (NC_048472), *Agasicles hygrophila* (NC_028332), *Altica cirsicola* (NC_042876), retirado do Genbank. Para a anotação do genoma foi utilizado o servidor MITOS2 (DONATH et al., 2019) seguindo os parâmetros Referência: RefSeq 63 Metazoa, código genético: 5 invertebrados. Para identificação dos tRNAs foram utilizados os servidores MITOS2 (DONATH et al., 2019), ARWEN (LASLETT; CANBACK, 2008), seguindo os parâmetros padrão e tRNAscan-SE 2.0 (CHAN; LOWE, 2019). Para verificar o valor de viés AT/GC, foi calculado de acordo com PERNA e KOCHER, 1995): Viés AT = $[A-T] / [A+T]$ e viés GC = $[G-C] / [G+C]$. As análises de composição e RSCU foram realizadas manualmente em MEGA 11 (TAMURA, STECHER e KUMAR, 2021), o mapa do genoma foi ilustrado utilizando CG *view* (GRANT; STOTHARD, 2008). Para identificar elementos repetidos em tandem foi utilizado o programa *Tandem repeat finder* (TRDB) (BENSON, 1999) utilizando os parâmetros básicos.

4.3.3 Montagem do satelitoma

Para realizar análise *in silico* dos satDNA foram utilizadas as ferramentas RepeatExplorer e Tandem Repeat analyzer (TAREAN), que estão presentes na plataforma Galaxy para uso público (NOVÁK; NEUMANN; MACAS, 2010; NOVÁK; NEUMANN; PECH, 2013) e o protocolo de bioinformática SatMiner, descrita por Ruiz-Ruano et al. (2016) (<https://gitlab.com/fjruizruano/satminer/-/blob/master/README.md>) para ambas as bibliotecas, macho e fêmea, seguindo a descrição de Utsunomia et al.(2019).

Foi realizado análise de qualidade das sequências com o Trimmomatic (BOLGER; LOHSE; USABEL, 2014) selecionando *reads* par a par com Q>20 para todos os nucleotídeos. Em seguida, foi selecionado aleatoriamente 2 x 200.000 *reads*

para macho e fêmea, adicionando sufixo nos sexos referente ao tipo cromossômico (XX para fêmea e XY para macho), após isto, as *reads* de macho foram concatenadas com as *reads* de fêmea. Em seguida foi realizada análise dos clusters com estrutura típica de satDNA utilizando o RepeatExplorer2 (NOVAK et al., 2013) e TAREAN (NOVAK et al., 2017) (<https://repeatexplorer-elixir.cerit-sc.cz/galaxy>) com 2 x 400.000 *reads*, após isto, foi realizado o *download* dos putativos satDNA de baixa e alta confiança. Os contigs identificados pelo RepeatExplorer2 foram filtrados das bibliotecas originais utilizando o software DeconSeq (SCHMIEDER; EDWARDS, 2011). O restante das sequências foram clusterizada em RepeatExplorer2, do qual foi duplicado o número de *reads* na segunda corrida (2 x 400.000 *reads* para macho e fêmea), gerando 2 x 800.000 *reads*. Foi repetido este processo de agrupamento e filtragem até que nenhuma nova sequência de satDNA fosse encontrada, mantendo o número de leituras a cada iteração.

Após a mineração dos satDNA, foi realizada uma busca de homologia entre as sequências dos putativos satDNA encontrados, agrupando como variantes, família e superfamília se a homologia for maior que 95%, 80% e 40% respectivamente. Foi realizado análise de abundância e divergência de cada variante de macho e fêmea utilizando o software RepeatMasker (SMIT; HUBLEY; GREEN, 2017), foi realizado a estimativa de abundância de cada satDNA no genoma masculino (XY) e feminino (XX) com base no número de nucleotídeos alinhados dentro do número de leituras totais. Os satDNA foram nomeados seguindo a descrição de Ruiz-Ruano et al. (2016). Foi realizado busca via BLAST no banco de dados GenBank para verificar se havia sequências de satDNA parecida depositada no banco de dados.

5 RESULTADOS

Os resultados foram divididos em capítulos, correspondentes a artigos científicos.

5.1 ARTIGO 1 - DIVERGÊNCIA GENÔMICA E CROMOSSÔMICA ENTRE OS CROMOSSOMOS SEXUAIS GIGANTES DE ESPÉCIES DE *Omophoita* (COLEOPTERA, CHRYSOMELIDAE, ALTICINAE)

RESUMO

Oedionychina é o único grupo de insetos que apresenta cromossomos sexuais gigantes. Apesar de apresentarem características conservadas em número diploide e estrutura do cariótipo, os cromossomos de Oedionychina podem ser diferenciados por técnicas citogenéticas, como bandamentos e mapeamento da distribuição de DNAs repetitivos, principalmente se comparado o padrão de marcação nos cromossomos sexuais. Este trabalho teve como objetivo de verificar a similaridade entre os cromossomos sexuais X e Y de espécies de *Omophoita* por Pintura Cromossômica Total (WCP) e evidenciar a diferenciação genômica entre essas espécies por Hibridização Genômica Comparativa (CGH). Assim, utilizando cromossomos meióticos de *Omophoita octoguttata* (X+Y) para realizar a WCP e comparamos seu genoma com o de espécies irmãs (*O. personata* e *O. sexnottata*) por meio da CGH, além de investigar a diferença genômica entre machos e fêmeas. Este é o primeiro trabalho utilizando CGH e Pintura Cromossômica realizado em Coleoptera, até o momento. Os resultados de CGH interespecífico demonstrou que as espécies possuem alto grau de divergência de sequência específicas entre as espécies. Contudo, a comparação genômica entre os sexos, mostrou que há apenas uma região no cromossomo Y apresenta sequências sexo específicas, demonstrando que os cromossomos sexuais (X+Y) apresentam alto grau de homologia em *O. octoguttata*, sendo estes resultados confirmados por pintura cromossômica intra e interespecífica.

Palavras chave: DNA repetitivo. CGH. WCP. Insetos.

ABSTRACT

Oedionychina is the only group of insects with giant sex chromosomes. Despite having conserved characteristics in diploid number and karyotype structure, the chromosomes of Oedionychina can be differentiated by cytogenetic techniques. Some of these techniques are banding and mapping of the distribution of repetitive DNAs, particularly comparisons with patterns of marks on sex chromosomes. This work aimed to verify the similarity between the X and Y sex chromosomes of *Omophoita* species by Total Chromosome Painting (WCP) and to evidence the genomic differentiation

between these species by Comparative Genomic Hybridization (CGH). Thus, using meiotic chromosomes of *Omophoita octoguttata* (X+Y) to perform WCP, we compared its genome with that of sister species (*O. personata* and *O. sexnottata*) by CGH, in addition to investigating the genomic difference between males and females. This is the first work using CGH and chromosome painting in Coleoptera to date. The interspecific CGH results demonstrated that the species have a high degree of sequence-specific divergence between species. However, the genomic comparison between the sexes showed that there is only one region on the Y chromosome with sex-specific sequences, demonstrating that the sex chromosomes (X+Y) have a high degree of homology in *O. octoguttata*, and these results were confirmed by intra- and interspecific chromosome painting.

Key words: Repetitive DNA. CGH. WCP. Insects.

INTRODUÇÃO

A ordem Coleoptera é o grupo mais diversos da classe Insecta, com aproximadamente 380.000 espécies (BOUCHARD et al., 2017), agrupadas em 5 subordens; Protocoleoptera (extinta), Archenostemata, Myxophaga, Adephaga e Polyphaga, está última possuindo a maior diversidade dentre elas (SLÍPINSKI et al., 2011). O táxon mais representativo de Polyphaga, são os Chrysomelidae, conhecidos como besouros folha (*leaf beetle*), que possuem 12 subfamílias, com 2.100 gêneros, e aproximadamente 63.000 espécies (HADDAD; MACKENNA, 2016; NIE et al., 2019; SEKERKA et al., 2020; SLÍPINSKI, 2011). Dentre as subfamílias de Chrysomelidae, Alticinae é o grupo mais diversos da região Neotropical, possuindo cerca de 200 espécies endêmicas da América do Sul (JOLIVIET et al., 1988; SEENO; WILCOX, 1982).

A diversidade de Coleoptera não está presente apenas em número de espécies, mas também em sua diversidade cariotípica. Cerca de 4.800 espécies foram analisadas citogeneticamente (BLACKMON et al., 2015a) e a variação no número diploide foi de $2n=4$ (*Chalcolepidius zonatus*) (FERREIRA et al., 1984) à $2n=72$ (*Xanthogaleruca luteola*) (LORITE et al., 2002). Com base na citogenética de Coleoptera até o momento, é considerado que dentre toda esta variabilidade, o número diploide basal seja $2n=20=9II+Xyp$ (CROWSON, 1981; SMITH, 1951; VIRKKI, 1970).

Um táxon que tem sido analisado citogeneticamente, são os Oedionychina (Alticinae, Oedionychini), que apesar da variabilidade cariotípica encontrada em Coleoptera, apresentam cariótipo conservado, na maioria das espécies, possuindo número diploide $2n=22=10II+X+y$ (ALMEIDA, CAMPANER; CELLA, 2006; 2009; ALMEIDA et al., 2010; AZAMBUJA et al., 2019; VIRKKI, 1970, 1988; WOLSKI et al., 2021). Análises citogenéticas utilizando métodos tradicionais e mapeamento dos *clusters* ribossomais rDNA 45S e rDNA 5S em Oedionychina, têm demonstrado pouca variabilidade entre as espécies (ALMEIDA; CAMPANER; CELLA, 2006, 2009; ALMEIDA et al., 2010, AZAMBUJA et al., 2019; VIRKKI, 1983; VIRKKI; DENTON, 1987;). Por outro lado, quando se compara padrão da localização da heterocromatina constitutiva (ALMEIDA; CAMPANER; CELLA, 2006, 2009; GOLL et al., 2018; MELLO; VICARI; ALMEIDA, 2014; VIRKKI, 1983), DNAs altamente repetitivos e elementos transponíveis (MELLO; VICARI; ALMEIDA, 2014, ROSOLEN et al., 2018) é evidenciado que as espécies do grupo possuem diferenças moleculares em seu cariótipo. As diferenças moleculares encontradas em Oedionychina foram demonstrados principalmente na comparação entre cromossomos sexuais, que possuem padrões de bandamento C (ALMEIDA; CAMPANER; CELLA, 2006, 2009; GOLL et al., 2018; MELLO; VICARI; ALMEIDA, 2014; VIRKKI, 1983) e de localização de DNA repetitivo (MELLO; VICARI; ALMEIDA, 2014; ROSOLEN et al., 2018) diferente entre as espécies analisadas.

O sistema de determinação sexual basal em Coleoptera, Chrysomelidae e Alticinae, é o sistema cromossômico Xyp, onde o cromossomo X é grande em relação ao y e ficam na conformação de “paraquedas” durante e meiose I (CROWSON, 1981; SMITH, 1951; VIRKKI, 1970), mas Coleoptera, apresenta outros sistemas de cromossomos sexuais, sistemas aquiasmáticos e quiasmáticos (SMITH; VIRKKI, 1978; PETITPIERRE et al., 1988). Dentre as derivações dos tipos de cromossomos sexuais encontrado em Coleoptera, Oedionychina possui cromossomos sexuais gigantes, denominados assim devido ao seu tamanho muito maior em comparação com os autossomos, característica exclusiva de Oedionychina em relação a todos os insetos, até o momento (ALMEIDA; CAMPANER; CELLA, 2006, 2009; ALMEIDA et al., 2010; VIRKKI, 1970; VIRKKI, 1983; VIRKKI; DENTON, 1987).

As informações quanto ao processo evolutivo dos cromossomos sexuais gigantes em Oedionychina é escassa. Análises prévias utilizando citogenética, tem

inferido que estes cromossomos sexuais podem ter sofrido diversos rearranjos cromossômicos e a inserção e amplificação de DNAs repetitivos, que podem ter auxiliado na perda de homologia entre os cromossomos sexuais, os tornando assinápticos e fazendo eles aumentar em tamanho (ALMEIDA; CAMPANER; CELLA., 2009; MELLO; VICARI; ALMEIDA, 2014; ROSOLEN; VICARI; ALMEIDA, 2018). Com isso, para entender melhor o processo evolutivo e surgimento destes cromossomos sexuais gigantes, o presente trabalho buscou verificar a similaridade entre os cromossomos sexuais X e Y de espécies do gênero *Omophoita* (*O. octoguttata*, *O. sexnotata*, *O. maganiguttis* e *O. personata*) por meio da Pintura Cromossômica Total (WCP). E, além disso, evidenciar a diferenciação genômica entre as espécies por Hibridização Genômica Comparativa (CGH), para posteriormente realizar inferências sobre a evolução destes cromossomos sexuais.

MATERIAL E MÉTODOS

Indivíduos das espécies *O. octoguttata*, *O. sexnotata*, *O. magniguttis* e *O. personata* foram coletados na região de Itaiacoca – PR – Brasil (25°07'10" S e 49°56'24" W) e depositados no acervo do Laboratório de Genética e Evolução (LabGEv) na Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). As espécies foram coletadas com a autorização do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio MMA / IBAMA / SISBIO, número 15402 e o acesso cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado com o código ABE8B7D, no Ministério do Meio Ambiente. Os cromossomos meióticos foram obtidos a partir dos testículos dos besouros, seguido Almeida, Zacaro e Cella (2000).

Sondas para Hibridização Comparativa de Genomas (CGH)

Três experimentos foram planejados para a comparação do DNA genômico (gDNA) de espécies de *Omophoita*, utilizando como base os cromossomos meióticos de *O. octoguttata*. Para isso, o gDNA de *O. octoguttata*, *O. personata* e *O. sexnotata*

foram extraídos pelo protocolo Bruford et al. (1980), com algumas modificações. O DNA foi extraído utilizando-se cabeça, pronoto e fêmur do inseto. Em todos os ensaios, o gDNA derivado de machos de *O. octoguttata* foi marcado diretamente com Atto550 (fluorescência na cor vermelho) utilizando um kit de *Nick-Translation* (Jena Bioscience, Jena, Alemanha), enquanto o gDNA de *O. personata* e *O. sexnotata* também foram marcados via *Nick-Translation* (Jena Bioscience, Jena, Alemanha), mas com Atto488 (fluorescência na cor verde). O mix final de hibridização foi composto de 500ng do gDNA de *O. octoguttata*, acrescido de 500 ng do gDNA de uma das espécies descritas acima. Para todos os experimentos, sequências repetitivas foram bloqueadas utilizando 30 µg de *Cot-1* DNA, preparado conforme Zwick et al. (1997), correspondendo a 15 µg de cada espécie hibridizada. O conjunto dos gDNAs e do *Cot-1* DNA foi dissolvido em 20 µL do tampão de hibridização (formamida 50%, 2x SSC, SDS 10%, sulfato dextrano 10% e tampão Denhardt pH 7.0).

Sonda e FISH para Pintura Cromossômica (WCP)

Os experimentos de pintura cromossômica utilizaram a sonda derivada do cromossomo X e Y de *O. octoguttata*. Dezesesseis cópias de cada cromossomo foram isoladas por microdissecção e amplificadas segundo Yang et al. (2009). A marcação do cromossomo X foi realizada com Atto550 (fluorescência vermelha) e o cromossomo Y com Atto488 (fluorescência na cor verde) em uma Reação de Polimerase em Cadeia com primer degenerado de oligonucleotídeos (DOP-PCR), utilizando 1 µl do produto primeiramente amplificado como DNA molde (Yang et al., 2009). O procedimento de hibridização e lavagem seguiu as condições de alta estringência (Yano et al., 2017).

Hibridização Fluorescente *In Situ* (FISH) para CGH

Os experimentos de CGH seguiram o protocolo de Symonová et al. (2015) com pequenas modificações. As lâminas contendo cromossomos meióticos foram envelhecidas por 1h a 60 °C e tratadas com RNase A (20 µg/ml; 90 min a 37 °C), seguido do tratamento com Pepsina (Pepsina 2%, HCl 0.2 M, e H₂O MiliQ por 20 min a 37 °C). Os cromossomos foram desnaturados em formamida 75% diluída em 2x

SSC a 72 °C por 3 min. As sondas foram desnaturadas em termociclador a 86 °C por 10 min, resfriadas a 4 °C por 2 min e pré-hibridizadas com DNA altamente repetitivo, provindo da técnica de C α t-1 DNA a 37 °C por 1h. Esta etapa é essencial pois permite a hibridação do C α t-1 DNA à sonda, realizando um bloqueio efetivo das sequências repetitivas. O mix de hibridização foi aplicado às lâminas e estas foram incubadas a 37 °C em câmara úmida por dois dias. Hibridizações não específicas foram removidas por duas lavagens a 65 °C em 1x SSC sob agitação por 5 min, uma lavagem em 4x SSC/Tween por 5 min também em agitação e, por fim, lavagem em 1x PBS por 1 min. Os cromossomos foram corados com DAPI (1.2 µg/ml) montado em solução *antifade* (Vector, Burlingame, CA, USA).

RESULTADOS

Pintura cromossômica dos cromossomos sexuais (WCP)

A pintura cromossômica foi realizada utilizando como sonda os cromossomos sexuais (X e Y) de *O. octoguttata*, que foram hibridados em células meióticas de *O. octoguttata*, *O. personata*, *O. sexnotata* e *O. magniguttis*. A pintura cromossômica realizada em cromossomos meióticos da própria espécie apresentou hibridação com os cromossomos sexuais e alto grau de semelhança dos cromossomos sexuais com regiões dos autossomos, principalmente marcações com a sonda do X. Além disso, o cromossomo Y mostrou uma região distal sexo-específica (Figura 5.2). A hibridação interespecífica utilizando a sonda dos cromossomos sexuais de *O. octoguttata* em *O. personata*, *O. sexnotata* e *O. magniguttis*, apresentou padrões de marcação semelhantes a hibridação intraespecífica, mostrando marcações nos autossomos e nos cromossomos sexuais (Figura 5.3 b - d). Assim, os cromossomos sexuais de *O. octoguttata* possuem sequências compartilhadas entre as espécies, nos autossomos e nos sexuais. No entanto, a região sexo-específica do Y não foi observada nessas espécies.

Hibridização Comparativa de Genomas Interespecífica

A comparação interespecífica utilizando o genoma de *O. personata* e *O. sexnotata*, mostrou alto grau de divergência entre o conteúdo genômico destas espécies com o conteúdo de *O. octoguttata*. A hibridação do gDNA de *O. personata* nos cromossomos de *O. octoguttata* evidenciou alto grau de divergência. No entanto, algumas regiões demonstram homeologia entre os genomas, em 4 pares autossômicos, em duas pequenas regiões do braço curto do cromossomo Y, uma na região distal e outra na região proximal, e outra na região intersticial do braço longo do cromossomo Y (Figura 5.1a-d). O gDNA de *O. sexnotata* em células meióticas de *O. octoguttata* evidenciou alto grau de divergência genômica entre as espécies, porém com padrão de homologia diferente daquele encontrado na hibridação entre *O. personata* e *O. octoguttata*. A região com sobreposição que demonstra homeologia ocorreu em dois pares autossômicos de *O. octoguttata* e na região que se estende do centrômero a região pericentromérica do cromossomo X (Figura 5.1e-h).

Hibridação Genômica Comparativa intraespecífica

A comparação entre o genoma de macho e fêmea por CGH, mostrou uma grande semelhança entre ambos, porém com uma pequena região sexo-específica no braço longo do cromossomo Y (Figura 5.2). Nas demais regiões do genoma, ocorreu sobreposição da hibridação, demonstrando sequências compartilhadas entre os sexos.

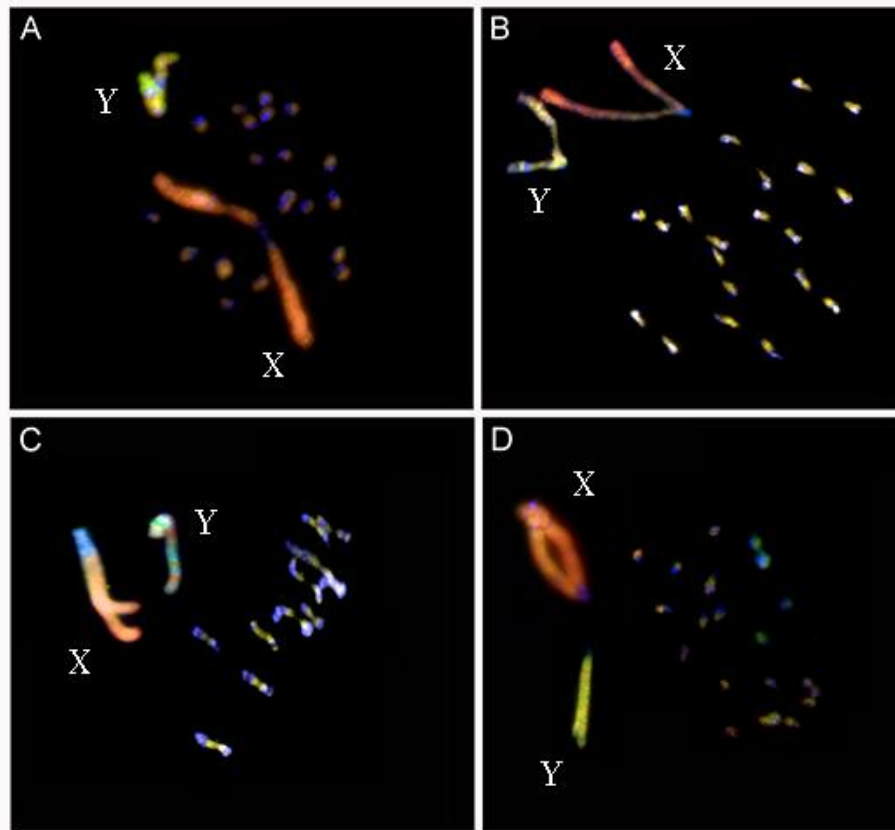


Figura 5.1 Metáfases de **A.** *O. octoguttata* (metáfase mitótica); **B.** *O. sexnotata* (metáfase I); **C.** *O. personata* (metáfase I); **D.** *O. magniguttis* (metáfase mitótica) hibridados com sondas dos cromossomos sexuais X (vermelho) e Y (verde) de *O. octoguttata*.

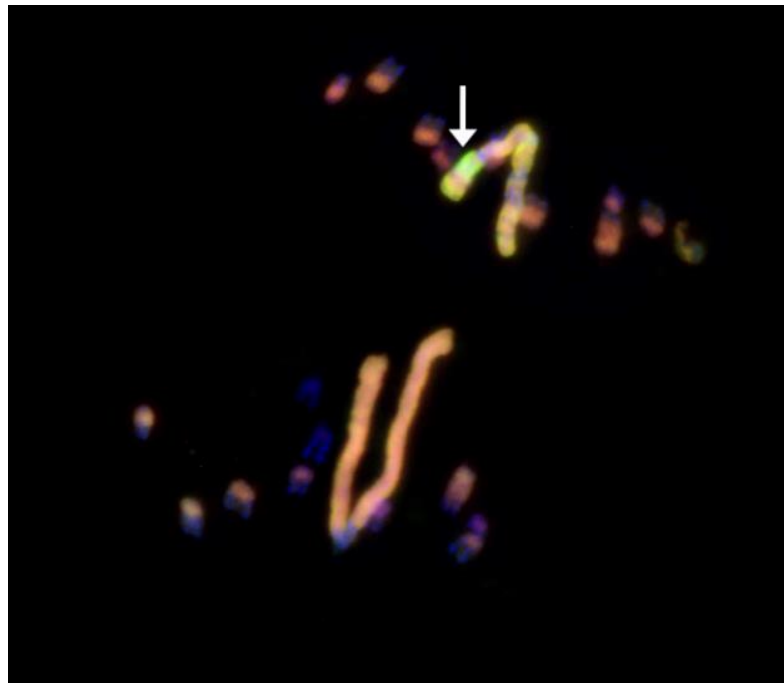


Figura 5.2 Metáfase espermatogonial de *O. octoguttata* hibridada com sondas produzidas a partir dos cromossomos sexuais X e Y de *O. octoguttata*. Cromossomo Y (verde), cromossomo X (vermelho), na flecha região sexo específica do cromossomo Y.

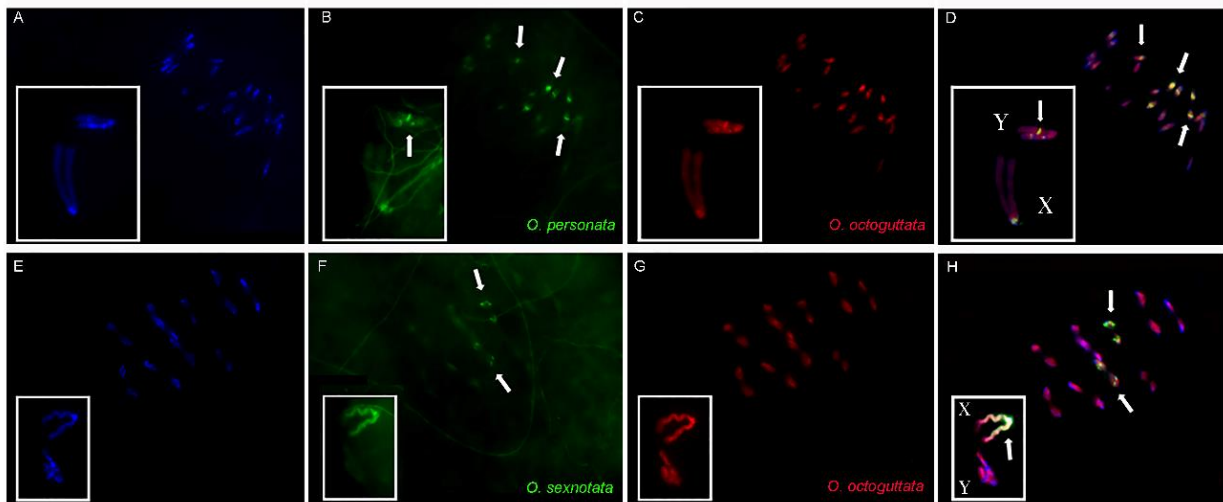


Figura 5.3 Metáfases meióticas de *O. octoguttata* submetidas a Híbridação Genômica Comparativa (CGH) interespecífica. **A.** e **E.** Cromossomos corados com DAPI; **B.** genoma de *O. personata* (verde); **C.** genoma de *O. octoguttata* (vermelho); **D.** sobreposição da imagem com genoma de *O. personata* com *O. octoguttata*. **F.** genoma de *O. sexnotata* (verde); **G.** genoma de *O. octoguttata* (vermelho); **H.** sobreposição da imagem com genoma de *O. sexnotata* com *O. octoguttata*. Flechas indicam as regiões com hibridização em conjunto entre os gDNAs das espécies.

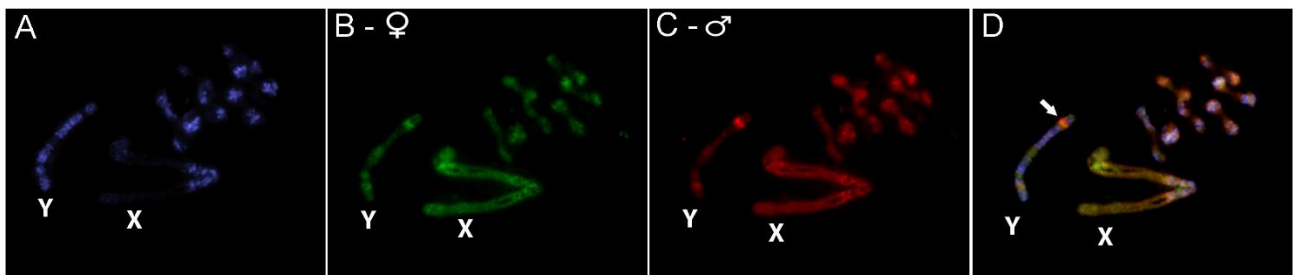


Figura 5.4 Metáfase meiótica de *O. octoguttata* submetidas a Híbridação Comparativa Genômica (CGH) entre os genomas de macho (vermelho) e fêmea (verde) de *O. octoguttata*. **A** e **B.** Células mitóticas marcadas com DAPI; **B.** Células mitóticas hibridadas com gDNA de fêmea; **F.** células mitóticas com sobreposição do DAPI e gDNA de fêmea; **C.** Células mitóticas hibridadas com gDNA de macho; **G.** Células mitóticas com sobreposição do DAPI com gDNA de macho; **D** e **H.** Células mitóticas com sobreposição do DAPI + gDNA de macho e fêmea; setas apontando região sexo-específico do macho.

DISCUSSÃO

Os dados obtidos neste trabalho apresentam as primeiras descrições citogenéticas utilizando CGH e comparação entre cromossomos sexuais utilizando WCP em Coleoptera, até o momento. A pequena região de compartilhamento de genoma entre as espécies analisadas por CGH reflete a sua relação filogenética (BEGHA, 2021). Onde *O. octoguttata* compartilha mais regiões genômicas com *O. personata* do que em relação ao genoma de *O. octoguttata* hibridado com o genoma

de *O. sexnotata*, assim, *O. octoguttata* é mais próximo filogeneticamente de *O. personata*, em relação a *O. sexnotata*.

Os dados a partir do CGH demonstraram pouca diferença entre o genoma do macho e da fêmea de *O. octoguttata* e apenas uma pequena região do cromossomo Y apresentou marcação do genoma do macho sexo-específico. Análise da pintura cromossômica utilizando sonda do cromossomo X e Y de *O. octoguttata*, hibridado na própria espécie e em espécies próximas (*O. personata*, *O. sexnotatta* e *O. magnegutis*) reforçou o resultado encontrado por CGH entre os sexos, demonstrando pouca divergência molecular entre os cromossomos sexuais. Os cromossomos sexuais de *O. octoguttata* apresentaram alta semelhança entre eles, pois ocorreu co-hibridações entre os cromossomos sexuais, na própria espécie e em espécies próximas. Este dado reforça que os cromossomos sexuais de *Omophoita* possuem grau de homeologia intra e interespecífico extremamente alto.

As análises com hibridação genômica e pintura cromossômica em outros insetos, tem demonstrado que os cromossomos sexuais possuem diferenças genômicas entre eles (CARVALHO, 2002; FRAISSE; PICARD; VICOSO, 2017; PITA et al., 2014; PITA et al., 2016; SAHARA; YOSHIDO; TRAUT, 2012; ZRZAVÁ et al., 2018). Esta diferença pode ser devido a origem independente dos cromossomos sexuais (PEASE, HAN, 2012, YOSHIDO et al., 2013; PITA et al., 2016) ou devido ao processo de degeneração dos cromossomos heteromórficos, que auxilia na sua diferenciação genômica a longo prazo (CHARLESWORTH et al., 2005; NATRI et al., 2019; OHNO, 1967; VICOSO, 2019). Assim, cromossomos sexuais que surgiram a um período de tempo mais longo, podem exibir maior diferença genômica entre eles (TRAUT et al., 1999).

No entanto, foram relatados em outros grupos, que cromossomos sexuais podem compartilhar sequências genômicas e possuir homeologia entre eles (DEON et al., 2022; HEJNICKOVA et al., 2021; SEMBER et al., 2018; YOSHIDO et al., 2020). Assim, os resultados obtidos por CGH e da pintura cromossômica intra e interespecífica não demonstraram diferenças moleculares entre os cromossomos sexuais de *Omophoita*. Portanto, estes dados podem sugerir que os cromossomos sexuais de *Omophoita* evoluíram a partir de um mesmo par autossômico em comum, pois diferentes espécies do gênero possuem o homeologia entre eles, ou seja, possivelmente origem em comum, e que ainda não ocorreu diferenciação genômica

entre os cromossomos sexuais. Porém, apesar da homeologia e semelhança molecular, pode ter ocorrido processos de inversões pericêntricas e paracêntricas, que diferiu estruturalmente os cromossomos sexuais, fazendo-os perder a homologia, e com isso serem assinápticos.

A diferenciação dos cromossomos sexuais ocorre de forma independente entre os grupos de animais, e em insetos, os inúmeros sistemas diferem no tipo de morfologia dos cromossomos sexuais dentro de cada linhagem (KAISER; BACHTROG, 2010) e Segundo Ohno (1967), sistemas de determinação sexual, podem surgir diversas vezes durante o processo evolutivo das espécies. Com base nisso, pode se presumir que Coleoptera possui um alto *turnover* de cromossomos sexuais (BLACKMON et al., 2015), pois apesar da maioria das espécies apresentarem sistema sexual Xyp, considerado basal em Coleoptera (SMITH; VIRKKI, 1978) ocorre outras derivações deste sistema sexual (PETITPIERRE et al., 1988; SMITH; VIRKKI, 1978). Este surgimento de cromossomos sexuais, pode explicar a semelhança genômica entre os cromossomos X e Y de *Omophoita*, visto que podem ser cromossomos sexuais surgidos recentemente, pois os Oedionychina são os únicos insetos que possuem este tipo de cromossomo sexual e é considerado que sua tribo (Oedionychini) surgiu recentemente (BECHYNÉ; BECHYNÉ, 1966, VIRKKI, 1970).

Uma vez que os cromossomos sexuais de *Omophoita* são assinápticos durante a meiose I (VIRKKI, 1970), o que afeta a recombinação entre eles, acreditava-se que sequências específicas do cromossomo X e Y seriam acumuladas. Contudo, não foi o que ocorreu, pois além de serem semelhantes, compartilham sequências com os autossomos. Estes resultados podem ter sido obtidos devido a quantidade de DNA repetitivo presente no genoma de *Omophoita*, pois, como demonstrado por MELLO; VICARI; ALMEIDA (2014) e Rosolen, Vicari e Almeida (2018), as espécies de *Omophoita* apresentam grande quantidade de DNA repetitivo, estes que são compartilhados entre os autossomos e entre ambos os cromossomos sexuais.

Os DNAs repetitivos têm exercido papel fundamental na evolução dos cromossomos sexuais de todos os grupos. Seu papel tem sido relacionado ao início da diferenciação entre os cromossomos sexuais e assim a diminuição da recombinação entre eles (OHNO, 1967; (CHARLESWORTH et al., 2005; NATRI et al., 2019; FURMAN et al., 2020) e também a sua diferenciação morfológica (MATSUNAGA, 2009). Assim, os DNAs repetitivos devem ter sido fundamental para

a evolução dos cromossomos sexuais gigantes de *Oedionychina*. Pois a formação dos cromossomos sexuais gigantes está relacionada a processos de rearranjos cromossômicos e acúmulo de DNAs repetitivos (MELLO; VICARI; ALMEIDA, 2014; ROSOLEN; VICARI; ALMEIDA, 2018). No entanto, o papel dos DNAs repetitivos em *Oedionychina* pode estar relacionado a diferenciação entre eles antes da diferenciação do grupo e ainda ser recente. Estas sequências repetitivas possivelmente estão relacionadas ao aumento dos cromossomos sexuais, pois segundo Chalopin et al. (2015), antes dos cromossomos sexuais apresentarem diferença entre eles e baixo grau de homologia, ocorre o acúmulo de sequências repetitivas e assim o crescimento dos cromossomos sexuais.

Com base nos resultados encontrados no presente trabalho, pode-se entender melhor o processo evolutivo dos cromossomos sexuais de *Oedionychina*, este que são considerados um alvo para estudos de evolução e diferenciação dos cromossomos sexuais. Para poder realizar melhores inferências evolutivas, será necessário realizar a comparação com outros gêneros, para verificar a homeologia dos cromossomos sexuais entre os gêneros e o tempo de divergência entre os gêneros foi suficiente para os gêneros começarem a apresentar diferenciação.

CONCLUSÃO

Esta é a primeira análise utilizando CGH intra e interespecífica e WCP em Coleoptera. A comparação genômica entre as espécies mostrou que possuem baixo grau de homologia molecularmente, exceto para DNAs repetitivos, que são compartilhados entre as espécies. A comparação entre macho e fêmea e a pintura cromossômica mostrou que os cromossomos sexuais não estão em um grau de diferenciação alto, pois compartilham muitas sequências repetitivas iguais. Isso pode estar relacionado a um sistema de determinação sexual novo, onde os genomas apresentam grande quantidade de DNA repetitivo e estes podem estar associados ao seu processo evolutivo.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq pelo financiamento deste projeto.

REFERÊNCIAS

As referências citadas neste artigo foram depositadas no final da dissertação.

5.2 ARTIGO 2 - ANÁLISE DO SATELITOMA *in silico* REVELA DIFERENÇA GENÔMICA ENTRE OS SEXOS EM *Omophoita octoguttata* (CHRYSOMELIDAE, ALTICINAE)

RESUMO

Grande parte do genoma dos eucariotos é constituída de DNA repetitivo, estes podendo ser dispersos pelo genoma ou repetidos *in tandem*. Uma classe de DNA repetido *in tandem* é o DNA satélite (satDNA), o conjunto de satDNA no genoma de uma espécie é denominada de satelitoma. Estes satDNA possuem diversas funções no genoma, contudo, ainda é pouco explorado em pesquisas, devido à dificuldade de montagem. Os dados de sequenciamento de nova geração (NGS) associados a ferramentas de bioinformática tem ajudado a resolver este problema. Com isso, o objetivo do trabalho foi descrever o conjunto de DNA satélite de *Omophoita octoguttata* e realizar a comparação entre o genoma de macho e fêmea, afim de identificar satélites enriquecidos no genoma de cada sexo por meio da análise *in silico*. Para realizar esta montagem o genoma de ambos os sexos foi sequenciado via NGS e submetidos na plataforma TAREAN, associado ao RepeatExplorer2, com a metodologia SatMiner para busca destes satDNA na espécie alvo. Após três iterações com RepeatExplorer2, foi encontrado um total de 50 famílias de satDNA, uma destas famílias foi considerada variante. A comparação destes satélites de *O. octoguttata* com sequências do GenBank/NCBI não encontrou nenhuma similaridade, com isso, os satélites obtidos são novos. A comparação do satelitoma entre os sexos, evidenciou satélites mais abundantes em macho e mais abundantes em fêmea,

podendo estar relacionado aos cromossomos sexuais. Nesse contexto, o satélite OocSat21, 114 vezes mais abundante no genoma do macho, possivelmente está relacionado ao cromossomo Y. Assim, os DNAs satélites podem ter ajudado no processo evolutivo de diferenciação dos cromossomos sexuais.

Palavras chaves: DNA satélite. DNA repetitivo. Coleoptera.

ABSTRACT

A large quantity of the eukaryotic genome consists of repetitive DNA, which can be dispersed throughout the genome or repeated in tandem. One class of DNA repeated in tandem is the satellite DNA (satDNA), the set of satDNA in the genome of a species is called satellitome. These satDNA have various functions in the genome, however, it is still poorly explored in research due to the difficulty of assembly. Next generation sequencing (NGS) data associated with bioinformatics tools has helped to solve this problem. Thus, the objective of this work was to describe the satellite DNA assembly of *Omophoita octoguttata* and to compare the genome of male and female, in order to identify enriched satellites in the genome of each sex through *in silico* analysis. To perform this assembly, the genome of both sexes was sequenced via NGS and submitted to the TAREAN platform, associated with RepeatExplorer2, with the SatMiner methodology to search for these satDNA in the target species. After three iterations with RepeatExplorer2, a total of 50 satDNA families were found, one of these families was considered variant. Comparison of these satellites from *O. octoguttata* with GenBank/NCBI sequences found no similarity, thus the satellites obtained are new. The comparison of the satellitome between the sexes showed satellites more abundant in male and female, which may be related to the sex chromosomes. In this context, the satellite OocSat21, 114 times more abundant in the male genome, is possibly related to the Y chromosome. Thus, satellite DNAs may have helped in the evolutionary process of sex chromosome differentiation.

Key words: Satellite DNA. Repetitive DNA. Coleoptera.

INTRODUÇÃO

Os DNAs repetitivos são encontrados no genoma dos eucariotos e podem representar mais da metade do genoma em algumas espécies (BISCOTTI, OLMO, HESLOP-HARRISON, 2015). Participam da estruturação dos cromossomos, sendo considerados importantes para estudos sobre rearranjos cromossômicos, cromossomos supranumerários e sexuais (CABRAL-DE-MELLO et al., 2010). Essas sequências, podem estar repetidas *in tandem* ou dispersas pelo genoma

(CHARLESWORTH et al., 1994; HARDMAN, 1986; LOPES-FLORES; GARRIDO-RAMOS, 2012).

Ruiz-Ruano et al. (2016) definiu como satelitoma todo o conjunto de satDNA de uma espécie. Esses satDNA podem variar o número de repetições dentro do genoma e possuir alta diversidade entre as espécies (CABRAL-DE-MELLO et al., 2021; THAKUR, PACKIARAJ; HENIKOFF, 2021). Estas sequências são encontradas majoritariamente na região heterocromática dos cromossomos, porém, podem ser localizados nas demais regiões (LOPES-FLORES; GARRIDO-RAMOS, 2012; PALOMEQUE; LORITE, 2008; PLOHL, MESTROVIC; MRVINAC, 2008; THAKUR, PACKIARAJ; HENIKOFF, 2021). Os satélites possuem diversas funções, como: manutenção da heterocromatina, centrômero e telômero (BISCOTTI, OLMO, HESLOP-HARRISON, 2015), no emparelhamento cromossômico e como barreira reprodutiva (LOUZADA et al., 2019; PAÇO et al., 2015; PLOHL, MESTROVIC; MRVINAC, 2008), além das funções estruturais. Trabalhos com análises de transcriptomas tem demonstrando que alguns satélites podem ser transcritos, assim podendo desempenhar diferentes papéis no genoma em diferentes estágios da vida (BISCOTTI, OLMO, HESLOP-HARRISON, 2015; MONTIEL et al., 2022). Com isso, podem ser considerados bons marcadores citogenéticos para a caracterização de genomas, relações filogenéticas, correlação do genótipo-fenótipo e estudos de diversidade (VICARI et al., 2010; THAKUR, PACKIARAJ; HENIKOFF, 2021).

A técnica de sequenciamento de nova geração (NGS), em conjunto com ferramentas de bioinformática, como: RepeatExplorer, *Tandem Repeat analyzer* (TAREAN), e a *pipeline* SatMiner, desenvolvida por Ruiz-Ruano et al. (2016), sem a necessidade de um genoma de referência, têm permitido análises comparativas e caracterização de satDNA específicos de cromossomos supranumerários e cromossomos sexuais (GARRIDO-RAMOS, 2017; MORA et al., 2020, NOVÁK; NEUMANN; MACAS, 2010; NOVÁK; NEUMANN; PECH, 2013; SILVA et al., 2017). Assim, tem sido descrito o satelitoma de diversos grupos de vertebrados (KRETSCHMER et al., 2022; UTSUNOMIA et al., 2019) e invertebrados (CABRAL-DE-MELLO et al., 2021; RUIZ-RUANO et al., 2016).

Há poucos estudos em relação aos satDNA em insetos, alguns incluem as ordens Orthoptera (FERRETTI et al., 2020; RUIZ-RUANO et al., 2016), Hemiptera (BARDELLA; MILANI; CABRAL-DE-MELLO, 2020) e Lepidoptera (CABRAL-DE-

MELLO et al., 2021). Em Coleoptera, apenas dois trabalhos realizaram análise do satelitoma utilizando ferramentas de bioinformática, demonstrando a escassez de dados de satelitoma para o grupo (MONTIEL et al., 2022; MORA et al., 2020).

Análises comparativas, entre genomas de macho e fêmea, têm revelado satDNA associado aos cromossomos sexuais, principalmente ao cromossomo heteromórfico. Algumas espécies podem possuir satélites específicos do cromossomo sexual heteromórfico e satélites que são compartilhados apenas entre os cromossomos sexuais e não com os autossomos (CABRAL-DE-MELLO et al., 2021; FERRETI et al., 2020; KRETSCHMER et al., 2022; UTSUNOMIA et al., 2019). Isto demonstra que os satDNA podem estar associados ao processo evolutivo dos cromossomos sexuais, e desta forma, poderiam estar relacionados ao processo de diferenciação dos cromossomos sexuais gigantes em *Omophoita octoguttata*.

Assim, o presente trabalho propõe realizar a análise do conjunto de satDNA da espécie *Omophoita octoguttata*, além disso, realizar a comparação entre os sexos para verificar a ocorrência de satélites enriquecidos no genoma do macho e da fêmea, visto que possuem cromossomos sexuais (XY) e considerados sexuais gigantes.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras, extração de DNA e sequenciamento

Dois indivíduos (1 macho e 1 fêmea) da espécie *Omophoita octoguttata* (Coleoptera, Chrysomelidae, Alticinae), foram coletados na região de Itaiacoca – PR – Brasil (25°07'10" S e 49°56'24" W), ambos depositados no acervo do Laboratório de Genética e Evolução (LabGEv) na Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). As espécies foram coletadas com a autorização do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio MMA / IBAMA / SISBIO, número 15402 e o acesso cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado com o código ABE8B7D, no Ministério do Meio Ambiente. Para a extração de DNA, foi utilizado o protocolo de Bruford et al. (1980), com algumas modificações. O DNA foi extraído utilizando-se cabeça, pronoto e fêmur

do inseto. O DNA foi sequenciado (3 x 150 extremidade pareada) em DNBseq na plataforma BGI (Grupo BGI, corporação de Shenzhen, Shenzhen, China).

Análises bioinformáticas

Para realizar análise *in silico* dos satDNA foram utilizadas as ferramentas RepeatExplorer e *Tandem Repeat analyzer* (TAREAN), presentes na plataforma Galaxy para uso público (NOVÁK; NEUMANN; MACAS, 2010; NOVÁK; NEUMANN; PECH, 2013) e o protocolo de bioinformática SatMiner, descrita por Ruiz-Ruano et al. (2016) (<https://gitlab.com/fjruizruano/satminer/-/blob/master/README.md>) para ambas as bibliotecas, macho e fêmea, seguindo a descrição de Utsunomia et al. (2019).

A análise de qualidade das sequências foi realizada com o Trimmomatic (BOLGER; LOHSE; USABEL, 2014), selecionando *reads* par a par com Q>20 para todos os nucleotídeos. Em seguida, foi selecionado aleatoriamente 2 x 200.000 *reads* para macho e para fêmea, adicionando sufixo nos sexos referente ao tipo cromossômico (XX para fêmea e XY para macho). E as *reads* de macho foram concatenadas com as *reads* de fêmea. Em seguida foi realizada análise dos clusters com estrutura típica de satDNA utilizando o RepeatExplorer2 (NOVAK et al., 2013) e TAREAN (NOVAK et al., 2017) (<https://repeatexplorer-elixir.cerit-sc.cz/galaxy>) com 2 x 400.000 *reads*, possibilitando o *download* dos putativos satDNA de baixa e alta confiança. Os contigs identificados pelo RepeatExplorer2 foram filtrados das bibliotecas originais utilizando o software DeconSeq (SCHMIEDER; EDWARDS, 2011). O restante das sequências foram clusterizada no RepeatExplorer2, o número de *reads* na segunda iteração foi duplicado (2 x 400.000 *reads* para macho e fêmea), gerando 2 x 800.000 *reads*. Este processo de agrupamento e filtragem foi repetido até que nenhuma nova sequência de satDNA fosse encontrada, mantendo o número de leituras a cada iteração.

Após a mineração dos satDNA, foi realizada uma busca de homologia entre as sequências dos putativos satDNA encontrados, as sequências com semelhanças com mais de 80% de semelhança foram agrupadas como variantes do mesmo satélite, as abaixo de 80% foram agrupadas como superfamílias. Foi realizada análise de abundância e divergência de cada satDNA de macho e fêmea, utilizando o software

RepeatMasker (SMIT; HUBLEY; GREEN, 2017), foi realizado a estimativa de abundância de cada satDNA no genoma masculino (XY) e feminino (XX) com base no número de nucleotídeos alinhados dentro do número de leituras totais. Os SatDNA foram nomeados seguindo a descrição de Ruiz-Ruano et al. (2016). Foi realizado busca via BLAST no banco de dados GenBank para verificar se havia sequências de satDNA parecida depositada no banco de dados.

RESULTADOS

Análise dos DNAs satélites

A investigação do satelitoma em *O. octoguttata*, encontrou 50 famílias de DNA satélite e a análise de agrupamento desses revelou que 16 poderiam ser agrupados em três (3) superfamílias, devido ao grau de similaridade, a SF – 1, agrupa 12 satélites, com mais de 2 kb e com 50% a 70% de semelhança entre eles, a SF – 2, agrupa dois satélites, com 57% de semelhanças e a SF – 3, agrupa dois satélites, com 53% de semelhanças (Tabela 5.1). O agrupamento também identificou dois satélites com 82,4% de semelhanças, considerados assim, variantes do mesmo satélite. Com isso, devido a presença de uma variante na análise dos 50 satDNA, o genoma de *O. octoguttata*, possui ao total, 49 DNA satélite em seu genoma.

No genoma de *O. octoguttata* ocorreu prevalência majoritária de satélites longos, sendo 40 satélites longos e 9 curtos, dentre os satélites longo, 22 são < 1 kb e 18 são > 1 kb. A unidade de comprimento (RUL) dos satDNA variou de 16 pb a 5.042 pb, totalizando 53.838 pb, com média de 1.098 pb. A porcentagem A+T dos satélites variou de 46% a 75%, com média de 64%, demonstrando que há viés para maior porcentagem de A+T no conteúdo nos satélites encontrados. A abundância dos satélites em *O. octoguttata* variou entre ~2,03% a ~0,01%, sendo o satélite mais abundante OocSat-01, os demais satélites tiveram valor de abundância abaixo de 1% (tabela 5.1).

A análise dos 49 satélites encontrados na espécie com aqueles depositados no banco de dados GenBank/NCBI não encontrou homologia com nenhum outro satDNA depositado no banco de dados, demonstrando que os DNA satélites encontrados na espécie são novos. A comparação das sequências mostrou

semelhança entre a sequência de alguns satélites curtos com regiões de satélites longos (Figura 5.6).

Viés dos satDNA relacionado ao sexo

A análise realizada no RepeatExplorer2 evidenciou diferenças entre o conteúdo genômico de macho e fêmea, mostrando alguns *clusters* presentes no genoma do macho e ausentes no genoma da fêmea, a maioria destes *clusters*, foram considerados satDNA pelo TAREAN (Figura 5.5).

Os 49 satélites encontrados no genoma de *O. octoguttata* estão presentes em ambos os sexos; porém, foi observada diferença na abundância de satDNA entre macho e fêmea. O genoma total de *O. octoguttata* contempla aproximadamente 9,07% de satDNA no macho e aproximadamente 8,25% de satDNA em fêmea. Dentre os 49 satélites encontrados, 7 (sete) foram mais abundantes no genoma do macho, variando de 1,7x (OocSat42) a 114x (OocSat21). No genoma da fêmea, 6 (seis) satélites foram mais representativos, variando de 1,7x (OocSat09) a 4,7x (OocSat48) (tabela 5.1). No entanto, a abundância no genoma da fêmea não é tão significativa, quando comparado com os valores de abundância do macho.

DISCUSSÃO

Os dados obtidos neste trabalho representam a primeira descrição do conjunto completo de catálogo de DNA satélite no grupo Chrysomelidae, utilizando tecnologia NGS e a primeira comparação entre macho e fêmea da ordem Coleoptera, até o momento. A aplicação de tecnologias NGS tem permitido a análise do conteúdo de DNA satélites em diversos grupos, em insetos, os grupos que possuem mais análises são os Orthoptera e os Lepidoptera. Em Coleoptera, as poucas análises realizadas, se restringiram a métodos tradicionais (MORA et al., 2019; PALOMEQUE; LORITE, 2008) e apenas *Hippodamia variegata* (Coccinellidae) e *Rhynchophorus ferrugineus* (Curculionidae) (MONTIEL et al., 2022) possuem descrição do satelitoma com análises utilizando NGS.

A quantidade de famílias de DNA satélites encontrados nas espécies analisadas é muito diversificada. Até o momento, *Megaleporinus macrocephalus*

(Teleostei) é a espécie com maior quantidade de famílias de DNA satélite, com 164 famílias (UTSUNOMIA et al., 2019). Em insetos a diversidade prevalece, porém, a quantidade de satDNA é menor que em *M. macrocephalus*, como por exemplo: 11 famílias em *Gryllus assimilis* (HASEGAWA; KASUYA, 2006), 16 famílias em *Drosophila melanogaster* (KUHNS, 2015), 27 famílias em *Eumigus monticola* (RUIZ-RUANO et al., 2017), 34 famílias em *Holhymenia histrio* (BARDELLA; MILANI; CABRAL-DE-MELLO, 2020), 45 famílias em *Eneroptera surinamensis* (PALACIOS-GIMENEZ et al., 2017), 53 famílias em *Ronderosia bergii* (FERRETTI et al., 2020), 62 famílias em *Lacustra migratoria* (RUIZ-RUANO et al., 2016) e 76 famílias em *Pyrgomorpha conica* (RUIZ-RUANO et al., 2018).

Em Coleoptera, *Tribolium castaneum* possui 9 famílias de satDNA (PAVLEK et al., 2015), *Hippodamia variegata*, possui 30 famílias de DNA satélite (MORA et al., 2020) e *Rhynchophorus ferrugineus* possui 112 satélites (MONTIEL et al., 2022), sendo este último, o maior número encontrado em insetos. Com isso, até o presente momento, *O. octoguttata* está dentro da variação da quantidade de satDNA encontrado em insetos, com 49 famílias.

A comparação das sequências satélites de *O. octoguttata* recuperou três superfamílias (SF), indicando ancestralidade comum entre alguns satélites. Isto demonstra que a expansão de satélites na espécie pode ter sido realizada a partir do processo de duplicação de repetições existentes e após isto, diversos processos de inserções, substituições e deleções (UTSUNOMIA et al., 2019). Estes processos podem ter ocorrido diversas vezes nos satélites da SF – 1, visto que há um grande número de sequências. A superfamília 2, agrupa o satélite mais abundante no genoma (OocSat1).

As unidades de comprimento dos satélites são classificadas como curta (<100 pb) ou longa (>100 pb), dependendo da quantidade de bases que possui (RUIZ-RUANO et al., 2016). Dentre o grupo dos insetos, a maioria dos DNA satélites são < 600 pb (CABRAL-DE-MELLO et al., 2021), incluindo as espécies de Coleoptera, *H. variegata* e *R. ferrugineus*. O maior satélite encontrado anteriormente era o de *Monomorium subopacum* (Hymenoptera), com 2,5 kb (LORITE et al., 2004), e em Coleoptera, o maior era o HvarSat07, de *H. variegata* com 2 kb (MORA et al., 2020). Contudo, com a montagem do satelitoma de *O. octoguttata*, o maior DNA satélite em insetos passa a ser o OocSat31, com mais de 5 kb. Os satélites longos de *O.*

octoguttata podem ter sofrido diversos processos de amplificação-degeneração, visto que este processo pode integrar repetições mais longas ou estruturas de ordem superior (CAMACHO et al., 2022).

Segundo Camacho et al. (2022), satélites curtos possuem processos de degeneração rápido no genoma, e podem surgir *de novo* diversas vezes, ao contrário de satélites longos, que são mantidos por mais tempo nos genomas. Assim, o genoma de *O. octoguttata* pode possuir diversos satélites compartilhados entre as espécies do grupo, devido aos seus satélites longos, no entanto, há indicativos que possuem satélites específicos, que surgiram *de novo*, estes sendo os satélites curtos, variando de 16 pb a 98 pb.

O processo evolutivo dos satélites de *O. octoguttata* pode estar associado também a processos de transposição e replicação pelo mecanismo de círculo rolante (CAMACHO et al., 2022). Isto explicaria a presença de pequenos fragmentos de satélites muito semelhante com outros satélites e a ocorrência de satélites curtos semelhantes com regiões de satélites longos (Figura 5.6). Estas semelhanças podem ter ocorrido devido ao processo de dispersão da região do satélite, que pode ter dispersado este fragmento do satélite longo para outra região genômica, e assim, esta região ter sofrido diversos processos de amplificação, tornando-se uma repetição *in tandem*.

Este trabalho traz os resultados da primeira comparação do conjunto de satDNA entre macho e fêmea realizada em Coleoptera. As diferenças visualizadas no RepeatExplorer2 na comparação entre macho e fêmea, estão correlacionadas majoritariamente aos satDNA. Os *clusters* presentes no genoma do macho e ausentes no genoma da fêmea são os satélites enriquecidos no genoma do macho (Figura 5.2). Assim, como demonstrado em outros grupos, como peixes (KRETSCHMER et al., 2022; UTSUNOMIA et al., 2019), Lepidoptera (CABRAL-DE-MELLO et al., 2021) e Orthoptera (FERRETI et al., 2020), possivelmente, estes satélites mais abundantes no macho, podem estar relacionados aos cromossomos sexuais, e serem específicos do cromossomo Y, da mesma maneira que, os satélites enriquecidos no genoma da fêmea, podem estar associados ao cromossomo sexual X.

A análise da composição dos DNA satélites em *O. octoguttata* é um avanço para entender a composição e a evolução dos cromossomos sexuais da subtribo Oedionychina (Alticinae, Oedionychini), visto que possuem cromossomos sexuais

gigantes, denominados assim devido ao seu tamanho ser muito maior em relação aos autossomos (ALMEIDA et al., 2010). Os DNAs repetitivos tem sido associado como componente importante da evolução dos cromossomos sexuais, principalmente os elementos transponíveis (CHARLESWORTH et al., 2005; NATRI et al., 2019, FURMAN et al., 2020), este que análises realizadas por Mello, Vicari e Almeida (2014) e Rosolen et al. (2018) demonstraram que os *Omophoita* possuem em abundância, principalmente nos cromossomos sexuais. Os dados obtidos neste trabalho, demonstram que ocorre diferença genômica entre os sexos de *O. octoguttata*, esta diferença pode estar associada aos cromossomos sexuais e aos satélites associados a eles (Figura 5.1), com isso, o satDNA podem possuir papel fundamental na evolução e crescimento destes cromossomos sexuais gigante.

No entanto, ainda é necessário realizar hibridações *in situ* em *O. octoguttata* para localização destes satDNA e correlacionar a abundancia dos satélites no genoma do macho e da fêmea, e assim entender melhor o padrão de distribuição dos satDNA e poder entender melhor o papel dos satélites na evolução do genoma da espécie e dos cromossomos sexuais gigantes.

CONCLUSÃO

A análise do conteúdo de satDNA de *O. octoguttata* mostrou quantidade expressiva de famílias de satDNA, sendo a espécie de Coleoptera que até o momento possui o maior satélite no grupo Insecta. Foi visualizado também que há viés sexual em relação a abundância de alguns satDNA, em relação ao macho e a fêmea, que pode estar relacionado ao cromossomo sexual, contudo, só poderá ser confirmado a relação da abundância do satDNA com cromossomos sexuais após a realização da hibridação *in situ*.

Tabela 5.1 - Principais características dos 49 satDNAs encontrados em *O. octoguttata*.

SF	Familia deSatDNA	RUL	A+T	Abundancia			Divergência		
				Fêmea	Macho	M/F	M	F	
2	OocSat01 - 183	+	183	66%	0,0199497625	0,0202683650	1,01597024	10,77	10,72
	OocSat02 - 392	+	392	64%	0,0052873258	0,0061943408	1,17154513	5,54	5,54
	OocSat03 - 1275	+	1275	69%	0,0048241908	0,0045242592	0,93782757	6,16	6,1
1	OocSat04 - 2658	+	2658	64%	0,0038785467	0,0042316858	1,091049354	13,24	13,12
	OocSat05 - 399	+	399	63%	0,0027258650	0,0033689242	1,23591013	7,49	8,85
3	OocSat06 - 738		738	67%	0,0028976567	0,0032259008	1,113279178	5,75	6,17
	OocSat07 - 431		431	62%	0,0029318492	0,0032014992	1,091972671	11,03	12
1	OocSat08 - 2653		2653	64%	0,0023067833	0,0026863008	1,164522387	13,65	15,16
	OocSat09 - 148	♀	148	66%	0,0045288158	0,0025634600	0,566033174	6,72	7,64
1	OocSat10 - 2714		2714	70%	0,0021103550	0,0025251592	1,196556583	4,37	4,49
	OocSat11 - 465		465	58%	0,0026128650	0,0024987917	0,956341666	17,42	17,39
1	OocSat12 - 2785		2785	70%	0,0020930867	0,0023860800	1,139981463	7,57	8,13
1	OocSat13 - 2654		2654	65%	0,0019835767	0,0023510667	1,185266345	12,07	12,34
1	OocSat14 - 2768		2768	65%	0,0014748358	0,0022871500	1,550782771	8,08	9,96
	OocSat15 - 171	♂	171	67%	0,0000861217	0,0020970808	24,35021191	9,98	35,94
	OocSat16 - 144		144	65%	0,0014993867	0,0020336150	1,356297908	3,53	3,7
1	OocSat17 - 2813		2813	71%	0,0018330633	0,0020424425	1,11422364	10,63	11,28
1	OocSat18 - 2577		2577	65%	0,0016926775	0,0019856958	1,173109369	21,91	22,38
3	OocSat19 - 826		826	66%	0,0018051125	0,0016196617	0,897263559	5	4,95
	OocSat20 - 32	♂	32	63%	0,0004304275	0,0015798350	3,670385837	9,41	20,76
	OocSat21 - 171	♂	171	66%	0,0000130342	0,0014975758	114,8961703	10,28	19,33
1	OocSat22 - 2663		2663	67%	0,0011297608	0,0014503292	1,283748847	13,25	14,04
	OocSat23 - 155		155	73%	0,0012700708	0,0014268500	1,123441278	1,37	1,43
	OocSat24 - 20	♂	20	65%	0,0007301025	0,0014165217	1,940168218	8,51	8,51
1	OocSat25 - 2693		2693	72%	0,0013574142	0,0013066125	0,962574675	3,69	3,82
1	OocSat26 - 2728		2728	75%	0,0009272883	0,0012123658	1,307431346	7,77	9,1
	OocSat27 - 156		156	60%	0,0012531333	0,0010743283	0,857313667	6,81	6,72
	OocSat28 - 38		38	61%	0,0012059875	0,0008220283	0,681622598	7,02	6,9
	OocSat29 - 302		302	63%	0,0005330808	0,0007208608	1,35225427	12,98	10,93
1	OocSat30 - 2466		2466	66%	0,0006585608	0,0007079058	1,074928537	18,54	17,88
	OocSat31 - 5042		5042	67%	0,0008653733	0,0006757908	0,780924033	6,78	7,47
	OocSat32 - 3225		3225	62%	0,0007837708	0,0006694625	0,854155924	6,19	6,13
	OocSat33 - 318		318	67%	0,0005997433	0,0006170517	1,028859568	2,84	2,77
2	OocSat34 - 160		160	66%	0,0007289808	0,0005957225	0,817199126	13,93	13,45
	OocSat35 - 28	♂	28	50%	0,0000050842	0,0004533808	89,17505327	5,35	13,52
	OocSat36 - 1325	♀	1325	63%	0,0007660408	0,0004329783	0,565215736	7,77	6,17
	OocSat37 - 1848		1848	62%	0,0004586683	0,0003089217	0,673518628	2,55	2,38
	OocSat38 - 1306		1306	63%	0,0003630583	0,0002584608	0,711898914	27,39	25,17
	OocSat39 - 203		203	58%	0,0001604517	0,0001984617	1,236893769	5,32	3,99
	OocSat40 - 126	♂	126	62%	0,0000801875	0,0001636017	2,040239023	7,61	7,22
	OocSat41 - 92		92	63%	0,0001565908	0,0001605883	1,025528314	15,35	15,54
	OocSat42 - 30	♂	30	57%	0,0000784408	0,0001390117	1,77218498	5,63	4,61
	OocSat43 - 562	♀	562	51%	0,0002492558	0,0001331925	0,534360613	13,55	12,14
	OocSat44 - 746		746	71%	0,0000968600	0,0001266250	1,307299195	2,79	2,12
	OocSat45 - 127		127	66%	0,0001064133	0,0001055742	0,992114083	5,89	6,05
	OocSat46 - 333		333	66%	0,0001619550	0,0001006850	0,621685036	6,77	6,2
	OocSat47 - 35	♀	35	46%	0,0003475092	0,0000984825	0,283395402	14,72	11,18
	OocSat48 - 98	♀	98	61%	0,0003872683	0,0000816183	0,210753956	10,25	4,99
	OocSat49 - 16	♀	16	69%	0,0001138700	0,0000639508	0,561612658	6,16	6,07

RUL – Unidade de comprimento dos satDNA, M – macho, F – fêmea, ♀ - satDNA mais abundante em fêmea, ♂ - satDNA mais abundante em macho, + - satDNA mais abundante no genoma de macho e fêmea. SF – Superfamília.

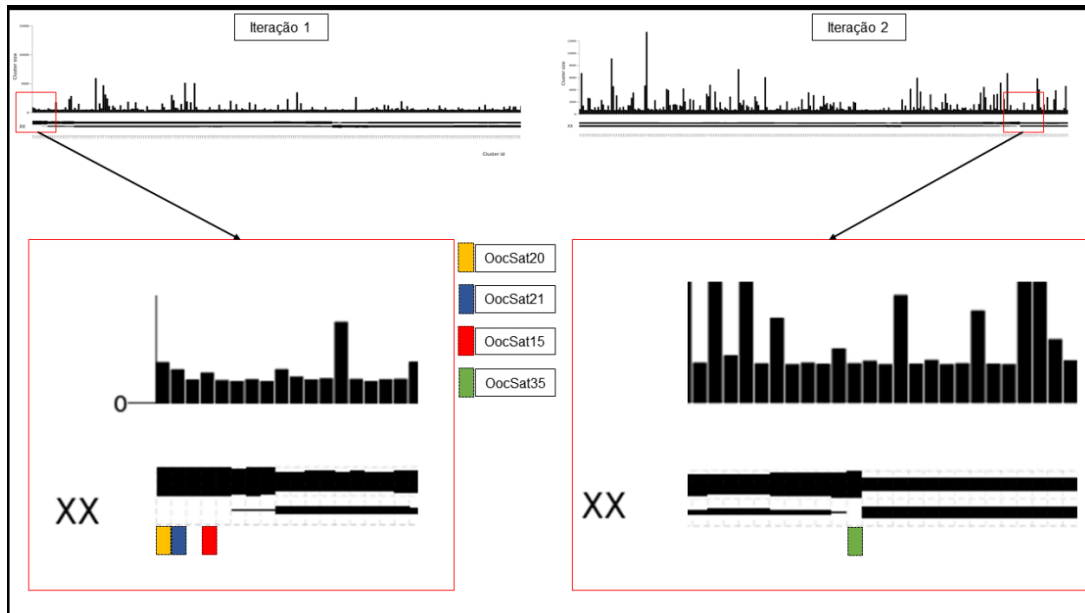


Figura 5.5 Imagens geradas pelo software RepeatExplorer2 das iterações que resultaram em satDNA. Nos quadrados vermelhos em destaque, a barra de cima se refere ao genoma do macho e a barra de baixo ao genoma da fêmea. Os quadrados coloridos (amarelo, azul, vermelho e verde) se refere aos satélites enriquecidos no genoma do macho.

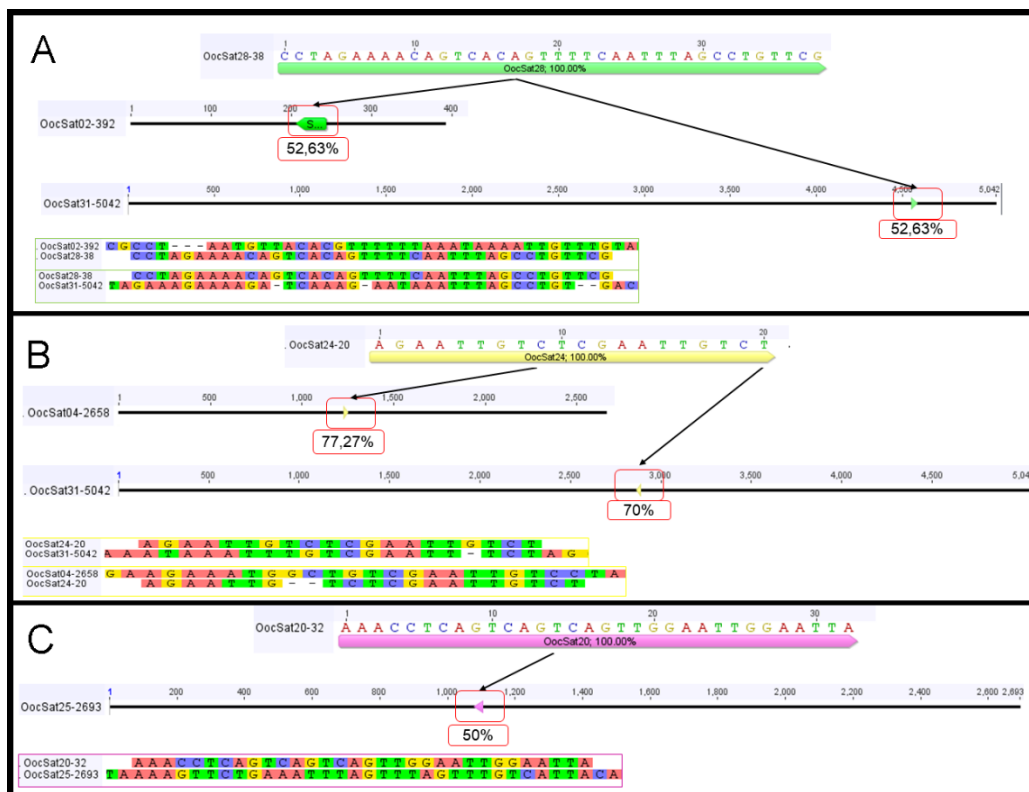


Figura 5.6 Comparação das sequências dos satélites curtos com regiões de satélites longos. Na caixa vermelha a porcentagem de semelhança entre o satélite curto e o satélite longo. **A.** Associação entre OocSat-28 com OocSat-02 e OocSat 31, no box, detalhe das regiões de homologia. **B.** Associação entre o OocSat-24 com OocSat-04 e OocSat-31, no box, detalhe das regiões de homologia. **C.** Associação entre o OocSat-20 com OocSat-25, no box, detalhe das regiões de homologia.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná – NAPI-Bioinformática (número 033/2021) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo Financiamento deste projeto.

REFERÊNCIAS

As referências deste artigo foram depositadas no final da dissertação.

5.3 ARTIGO 3 - PRIMEIRA DESCRIÇÃO COMPLETA DO GENOMA MITOCONDRIAL DE *Omophoita octoguttata* E *INSIGHTS* SOBRE AS RELAÇÕES FILOGENÉTICAS DO GRUPO (COLEOPTERA, CHYSOMELIDAE, ALTICINAE)

RESUMO

O genoma mitocondrial tem sido descrito em uma ampla gama de organismos e tem possibilitado diversas análises, como filogenias moleculares, estudos ecológicos e comparativos, ajudando a resolver diversas problemáticas filogenéticas. Um grupo que possui relações filogenéticas incertas, são os Alticinae, que foram agrupados em diversos níveis taxonômicos. Além da problemática filogenética dos Alticinae, algumas espécies são difíceis de serem identificadas, principalmente as espécies do gênero *Omophoita*, este que possui cerca de 70 espécies encontradas no Brasil. Assim, o genoma mitocondrial pode ajudar a resolver a problemática do grupo e melhorar a identificação, com isso, o objetivo do presente trabalho foi realizar a descrição completa do genoma mitocondrial de *Omophoita octoguttata*, aumentando os dados, que auxiliarão na identificação e estabelecimento das relações evolutivas. Para isso, foram realizadas coletas na região de Itaiacoca-PR-Brasil, o DNA foi extraído e sequenciado pelo método de sequenciamento de nova geração (NGS), foram realizadas análises de bioinformática para montagem, anotação e descrição do genoma mitocondrial completo e análise da relação filogenética. Foi obtido o mitogenoma completo de *O. octoguttata*, o qual consistiu em 13 PCGs, 22 tRNAs, 2

rRNAs, 2 regiões OH e a região controle, a maioria das comparações foi semelhante em relação aos dados da literatura. Contudo, houve diferença entre o mitogenoma dos indivíduos de *O. octoguttata*, a possível explicação é o tamanho da região codificadora, a análise filogenética encontrou monofilia entre Alticinae e Galerucinae, demonstrando que são grupos irmãos.

Palavras chaves: NGS. Região A+T. Chrysomelidae.

ABSTRACT

The mitochondrial genome has been described in a wide range of organisms and has enabled several analyses, such as molecular phylogenies, ecological and comparative studies, helping to solve several phylogenetic problems. One group that has uncertain phylogenetic relationships are the Alticinae, which have been grouped into several taxonomic levels. Besides the phylogenetic problem of the Alticinae, some species are difficult to identify, especially the species of the genus *Omophoita*, which has about 70 species found in Brazil. Thus, the mitochondrial genome can help to solve the problem of the group and improve the identification. Hence, the objective of the present work was to carry out the complete description of the mitochondrial genome of *Omophoita octoguttata*, which will help in the identification and establishment of evolutionary relationships. For this, collections were made in the region of Itaiacoca-PR-Brazil, DNA was extracted and sequenced by the next-generation sequencing (NGS) method, bioinformatics analyses were performed for assembly, annotation and description of the complete mitochondrial genome and phylogenetic relationship analysis. The complete mitogenome of *O. octoguttata* was obtained, which consisted of 13 PCGs, 22 tRNAs, 2 rRNAs, 2 OH regions and the control region, most of the comparisons were similar compared to literature data. However, there was difference between the mitogenome of *O. octoguttata* individuals, the possible explanation is the size of the coding regions, phylogenetic analysis found monophyly between Alticinae and Galerucinae, demonstrating that they are sister groups.

Key words: NGS. A+T region. Chrysomelidae.

INTRODUÇÃO

O genoma mitocondrial é uma molécula estruturalmente conservada, possuindo cerca de 15 a 20 kb, com 37 genes, destes, 13 genes são codificadores de proteínas (PCGs), 2 genes ribossomais (rRNA12S e rRNA16S), 22 RNAs transportadores (tRNAs) e uma região controle (BOORE, 1999, CAMERON, 2014). Com base na descrição da composição dos Mitogenomas, eles têm sido utilizados para filogenias moleculares, ecologia evolutiva, genética de populações, biogeografia (CAMERON, 2014; DAI; XU; JIANG, 2012), comparação entre os genomas (YUAN et al., 2021), comparação entre espécies simpátricas (NIE et al., 2019) e estudos ecológicos (GÓMEZ-RODRÍGUES et al., 2015). As análises filogenéticas utilizando o genoma mitocondrial, foram realizadas para ajudar a elucidar as relações filogenéticas em diferentes grupos, como Chrysomelidae (NIE et al., 2018), Melyridae (YUAN et al., 2021) e *Dactylispa* (ZHANG et al., 2021).

O genoma mitocondrial pode ajudar a resolver os problemas filogenéticos encontrados na subfamília Alticinae, estes que possuem ampla discussão acerca do seu agrupamento taxonômico, das quais diversas metodologias foram empregadas para tentar elucidar suas relações filogenéticas. Eles foram agrupados em diversos níveis taxonômicos, considerados como família (Alticidae) (BECHYNÉ; SPRINGVOLÁ DE BECHYNÉ, 1966), ramo de Galerucinae (CROWSON, 1960), como grupo parafilético, sendo monofilético apenas se incluído junto a Galerucinae (CROWSON; CROWSON, 1996), ramo derivado dentro de Galerucinae, como tribo (Alticini) (HADDAD; MCKENNA 2016; LINGAFELTER; KONSTANTINOV 1999) e como grupo irmão de Galerucinae, atribuindo o status de subfamília (FARRELL, 1998; FARRELL; SEQUEIRA, 2004; GE et al., 2012; GÓMEZ-ZURITA et al., 2008, NIE et al., 2018; NIE et al., 2020, SEENO; WILCOX, 1982; SUZUKI, 1985). Devido a indefinição do grupo, será utilizado a nomenclatura Alticinae, como subfamília.

Além da problemática filogenética dos Alticinae, algumas espécies são difíceis de serem identificadas, um grupo que é difícil realizar a identificação a nível de espécie é o gênero *Omophoita*. Eles possuem cerca de 89 espécies, e destas, mais de 70 espécies ocorrem no Brasil (BECHYNÉ, 1955a; BECHYNÉ, 1959; SEKERKA et al., 2021). É um grupo que possui grande dificuldade para descrição e identificação das espécies, por possuírem mimetismo com algumas espécies do gênero *Alagoasa*

(Coleoptera; Chrysomelidae) (BEGOSI; BENSON 1988) e do próprio gênero, *Omophoita* (WOLSKI et al., 2020).

Buscando genoma mitocondrial de *Omophoita* nos bancos de dados, foi verificado até o momento, apenas um genoma completo disponível no GenBank/NCBI, não estando identificado a nível de espécie, demonstrando assim, uma lacuna de conhecimento acerca da composição do Mitogenoma de *Omophoita*. As informações obtidas a partir do Mitogenoma, poderia auxiliar na melhor identificação das espécies do grupo e no esclarecimento das análises filogenéticas. Assim, o presente trabalho, teve como objetivo realizar a descrição do genoma mitocondrial da espécie *Omophoita octoguttata* (Fabricius, 1775), afim de contribuir com a caracterização da espécie, aumentando os dados, que auxiliarão na identificação e estabelecimento das relações evolutivas. Complementando os dados existentes da espécie, que são citogenéticos (ALMEIDA; CAMPANER e CELLA, 2009; VIRKKI, 1970, 1971), sequências nucleolares (ALMEIDA et al., 2010) e morfologia da espécie (BEGHA, SANTOS E PRADO, 2020), para a taxonomia e estudos evolutivos.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostra e extração de DNA

Os exemplares de *O. octoguttata* (dois exemplares) foram coletados manualmente na região de Itaiacoca – PR – Brasil (25°07'10" S e 49°56'24" W), fixados em álcool 95% e armazenados no Laboratório de Genética e Evolução (LabGev) da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). As espécies foram coletadas com a autorização do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio MMA / IBAMA / SISBIO, número 15402 e o acesso cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado com o código ABE8B7D, no Ministério do Meio Ambiente. O DNA foi extraído utilizando o protocolo de Bruford et al. (1980), com algumas modificações, a cabeça, pronoto e fêmur foram macerados antes de adicionar o tampão de extração.

Sequenciamento do genoma, montagem e anotação

O genoma completo foi sequenciado pela empresa BGI *genomics*, utilizando baixa cobertura, com a plataforma DNBseq sob comprimento de leitura 150 pb, as sequências foram limpas e os adaptadores removidos (CHEN et al., 2018). As sequências foram analisadas com o FastQC, pré-processadas utilizando Trimmomatic (BOLGER; LOHSE e USABEL, 2014). O genoma mitocondrial de *O. octoguttata* foi montado utilizando o *get organelle* (JIN et al., 2020) e como mitogenoma referência foram utilizadas as seguintes espécies com seus respectivos códigos de acesso: *Omophoita* sp. (MG021084), *Oedionychus cinctus* (MF979909), *Altica viridicyanea* (NC_048472), *Agasicles hygrophila* (NC_028332), *Altica cirsiicola* (NC_042876), obtidas do Genbank. O genoma foi anotado no servidor MITOS2 (DONATH et al., 2019) seguindo os parâmetros Referência: RefSeq 63 Metazoa, código genético: 5 invertebrados. Os tRNAs foram identificados nos servidores MITOS2 (DONATH et al., 2019), ARWEN (LASLETT; CANBACK, 2008) e tRNAscan-SE 2.0 (CHAN; LOWE, 2019), seguindo os parâmetros padrão.

O valor skew - AT/GC foi calculado de acordo com Perna e Kocher (1995): Viés AT = $[A-T] / [A+T]$ e viés GC = $[G-C] / [G+C]$. As análises de composição e RSCU foram realizadas manualmente no programa MEGA 11 (TAMURA, STECHER e KUMAR, 2021) e o mapa do genoma foi ilustrado utilizando CG view (GRANT; STOTHARD, 2008). Para identificar os elementos repetidos *in tandem* foi utilizado o programa *Tandem Repeats Finder* (TRDB) (BENSON, 1999), utilizando os parâmetros básicos.

Análise filogenética

A análise filogenética foi realizada com o genoma de 70 espécies pertencentes a 3 subfamílias, Alticinae (52 espécies), Galerucinae (14 espécies) e Chrysomelinae como grupo externo (4 espécies) (Dados suplementares - 1). Todos os mitogenomas, exceto os sequenciados no presente trabalho foram obtidos do GenBank. A árvore foi montada seguindo o trabalho de Yuan et al. (2021) utilizando o Phylosuit v 1.2.2 (ZHANG et al., 2020). As árvores filogenéticas foram produzidas utilizando os 13 PCGs. Para realizar o alinhamento dos PCGs, foi utilizado o MAFFT

v 7.313, otimizando com MACSE, os gaps intergênicos e sítios ambíguos foram removidos utilizando Gblocks e após isso, as sequências foram concatenadas, para encontrar o melhor esquema de partição foi utilizado ModelFinder, todas as análises foram realizadas em Phylosuit v 1.2.2 (ZHANG et al., 2020).

As árvores filogenéticas foram construídas baseadas em *Maximum Likelihood* (ML) e Inferência Bayesiana (BI). As análises ML foram realizadas utilizando o IQ-TREE v 1.6.8 (NEUYEN et al., 2015) e a BI utilizando MrBayes v 3.2.6 (RONQUIST; HUELSENBECK, 2012). A análise filogenética baseada em ML foi realizada com bootstrap ultra rápido (UFBOOT) utilizando o melhor modelo GTR+I+G com 1.000 replicatas. A análise filogenética utilizando BI foi realizada com o melhor modelo GTR+I+G com 2 milhões de geração MCMC e 2 corridas paralelas e 25% dos dados iniciais foram descartados como Burn-in, todas as análises acima foram realizadas em Phylosuit v 1.2.2 (ZHANG et al., 2020).

RESULTADOS

O sequenciamento resultou em uma biblioteca genômica de 1,2 Gb, com *reads* de 150 pb e 36% de conteúdo GC para ambos os espécimes. O comprimento do mitogenoma obtido foi 16.549 pb e 16.398 pb para os indivíduos 1 e 2, respectivamente (Figura 5.7). O mitogenoma de *O. octoguttata* consistiu em uma molécula de DNA fita dupla e circular, contendo 13 genes codificadores de proteínas (PCGs), 22 RNAs transportadores (tRNA), dois RNAs ribossômicos (rRNA), duas regiões OH e uma grande região controle (Figura 5.7) A verificação da sequência no GenBank, para confirmação da espécie, resultou em 100% de similaridade com a sequência depositada para o gênero. Contudo, esse é o primeiro mitogenoma de *Omophoita* descrito a nível de espécie depositado no GenBank.

A porcentagem AT no mitogenoma completo, alguns PCGs, rRNAs e região controle de *O. octoguttata* diferiu entre os indivíduos (Tabela 5.2). Foram encontrados 3 tipos de códons de iniciação (ATA, ATG e ATT) e três tipos de códons de parada (TAG, TAA e TA). O comprimento das regiões do mitogenoma de *O. octoguttata* foi semelhante entre os indivíduos, do qual ocorreu apenas a diferença entre o RNA ribossomal da subunidade menor (rRNA-S), com 472 e 473 pb, região OH_0, com 325

e 322 pb e a região controle, com 2.007 e 1.855 pb no indivíduo 1 e 2, respectivamente (Tabela 5.3).

A maioria dos 22 tRNAs encontrados no mitogenoma de *O. octoguttata* apresentou estruturas secundárias putativas típica de trevo. Apenas os tRNAs Phe, Gly, Asn e Thr não possuíram braços TΨC, e Ser-S1 não apresentou braço di-hidrouridina, não possuindo conformação de trevo. Alguns tRNAs apresentaram ligação incorreta entre os pares de base, sendo encontradas as seguintes ligações incorretas: Ligação U-U, no braço AC do tRNA Leu-L1, ligação U-U no braço AA de tRNA Leu-L2, ligação C-A no braço di-hidrouridina no tRNA Thr e ligação AG no braço AA do tRNA Trp (Figura 5.8).

No genoma mitocondrial foram encontrados o rRNA 12S (rRNA-S), correspondente a subunidade menor do ribossomo, com 742/743 pb, e o rRNA 16S (rRNA-L), correspondente a subunidade maior do ribossomo, com 1.220 pb, para ambos. Os rRNAs possuem composição nucleotídica e skew-AT/GC muito semelhante entre os indivíduos (tabela 5.2). O rRNA-S foi localizado entre a região controle e o tRNA Val, o rRNA-L foi localizado entre o tRNA Val e o NAD1 para ambos. Esta comparação demonstra que os rRNAs são conservados.

A região controle obtida do mitogenoma de *O. octoguttata* possui a diferença de 152 pb entre os indivíduos, sendo a região controle do indivíduo 1 com 2.007 pb e a do indivíduo 2 com 1.855 pb. O estudo dessa região no programa *Tandem Repeat Finder* (TRF), resultou 3 regiões com repetição *in tandem* (tabela 5.4), as repetições apresentaram o mesmo número de pares de bases e a mesma quantidade de repetições para as repetições 1 e 2 para ambos os indivíduos, apenas a repetição 3 que apresentou 23 repetições no indivíduo 1, e 20 repetições no indivíduo 2 (Tabela 5.4).

A análise filogenética utilizando o método de ML e BI resultaram em topologias semelhantes. Os indivíduos de *O. octoguttata* do presente trabalho foram agrupados em ambas análises em conjunto com a espécie do mesmo gênero. As árvores filogenéticas de ML e BI geraram três grandes agrupamentos, na base da filogenia o grupo externo (BP: 100 e PP: 1), e dois grandes grupos, os Alticinae e Galerucinae, os colocando como grupos irmãos (BP: 100 e PP: 1). O agrupamento no clado dos Alticinae, foco do presente trabalho, as espécies foram agrupadas em conjunto com suas respectivas tribos, com o grupo dos Alticini e a espécie *Agasicles hydrophila* na

base do ramo (BP: 82 e PP: 1), e os grupos internos com BP variando de 30 a 100 e PP variando de 0,5 a 1. As tribos Alticini (BP:100 e PP: 1), Longitarsini (BP: 100 e PP1), Psylliodini (BP: 100 e PP: 1), Chaectocnenini (BP:100 e PP: 1) e Oedionychini (BP: 61 e PP: 0,87) foram agrupadas e individualizadas, considerando como grupos monofiléticos. A tribo Aphtonini não foi recuperada monofileticamente, pois suas espécies foram separadas em dois grupos, o grupo 1 (BP: 100 e PP: 1) de Aphtonini mostrou relação como grupo irmão de Longitarsini, e grupo 2 (BP: 95 e PP: 1), agrupado como grupo irmão de Chaectocnenini. Algumas espécies foram agrupadas em um grupo que não corresponde apenas a um gênero e uma tribo, do qual foi denominado de “grupo X”, este ramo possui BP: 36 e PP: 0,5.

DISCUSSÃO

O comprimento dos mitogenomas montados de *O. octoguttata* estão de acordo com o tamanho do genoma mitocondrial para insetos de 15 kb a 20 kb (BOORE, 1999) e dentro da variação do tamanho do mitogenoma para as espécies próximas (14.561 pb (*Psylliodes chlorophana* -NC_053362) (GAO, WANG e ZU, 2020) e 17.363 (*Altica fragariae* - MH477593)).

A sequência de genes no mitogenoma obtida para os dois indivíduos de *O. octoguttata* foi semelhante a organização do genoma mitocondrial de Coleoptera (CAMERON, 2014), considerada ancestral para insetos. As exceções foram as duas regiões OH mapeadas (Figura 5.7), que diferiram do genoma predito ancestral, pois estas regiões não haviam sido descritas no mitogenoma ancestral. A variação nucleotídica de *O. octoguttata* está de acordo com a variação encontrada na ordem Coleoptera, variando de 65% (SHEFFIELD et al., 2009) a 81% (YUAN et al., 2020), possuindo viés em relação a porcentagem AT no genoma.

A composição nucleotídica entre os mitogenomas foi muito semelhante (Tabela 5.2), demonstrando que os genes são conservados na espécie. A relação AT encontrada na região com os PCGs em *O. octoguttata* está de acordo com a média para a ordem Coleoptera (75%) (SHEFFIELD et al, 2009). Os códons de início encontrados em *O. octoguttata* está de acordo para a maioria das descrições, porém, para Sheffield et al. (2008) o códon de início do gene *Citocromo oxidase I* (COXI) representa uma característica sinapomórfica para o grupo Polyphaga. O que difere do

gene COXI encontrado em *O. octoguttata*, pois possui códon de início ATN, este que já foi também encontrado em outros grupos de Polyphaga, como: *Agrilus mali* (SUN et al., 2020) e *Monolepta occfucis* (WANG et al., 2019). Os outros PCGs seguiram a descrição de SHEFFIELD et al. (2008).

Os códons de parada encontrados em *O. octoguttata* são similares aos obtidos por Sheffield et al. (2008), Nie et al. (2019) e Yang et al. (2018). O códon de parada incompleto é comum em insetos (SHEFFIELD et al, 2008; YAO; YANG e DAI, 2017), resultante do processo de poliadelinação e clivagem de transcrição policistrônica, podendo servir para diminuição da sobreposição gênica ou espaçamento gênico (OJALA, MONTOYA e ATTARDI, 1981; YUAN et al., 2020). A análise do uso de códons sinônimos relativos (RSCU) (Figura 5.9) foi semelhante entre os PCGs, havendo pouca variação. Códons com NNA/NNU possuíram maior proporção, como encontrados em outros besouros (SUN et al., 2020; YUAN et al., 2021; WEI et al., 2019), indicando a relação do conteúdo AT com a proporção dos códons, relacionado ao AT-skew, seleção ideal de tRNA e eficiência de reparo do DNA (MA et al., 2015).

Os tRNAs possuem a estrutura típica encontrada na maioria das espécies, do qual a variação do número de pb está de acordo com o encontrado por Sheffield et al. (2008). Os tRNAs demonstraram que a maioria possui viés AT e a minoria com viés GC (Tabela 5.2).

O anticódon UCU (tRNA Ser – S1) é considerado por Sheffield et al. (2008) uma característica sinapomórfica para o grupo Polyphaga. Este códon foi encontrado também em *O. octoguttata*, que demonstra que está espécie possui característica sinapomórfica da sua subordem.

A região controle do mitogenoma também conhecida como região A+T ou região D-loop é considerada importante para início da replicação e duplicação (INOHIRA; HARA; MATSUURO, 1997). Esta possui tamanho variável dentre os coleópteros, podendo chegar à 4.468 pb em *Coccinella septempunctata* (KIMA, WANG e KIM, 2012). A região controle de *O. octoguttata* corresponde a região entre o rRNA-S e o tRNA Ile, esta região teve variação entre os mitogenomas. No indivíduo 1, o comprimento foi de 2.007 pb e, no indivíduo 2, 1.855 pb. A composição nucleotídica foi semelhante entre os mitogenomas (tabela 5.3), porém, possui variação intraespecífica, como relatado para outras espécies (INOHIRA; HARA;

MATSUURO, 1997, ZHANG; HEWITT, 1997). A região controle de *O. octoguttata* teve AT% menor (69,7 e 71,3 para indivíduo 1 e 2, respectivamente), em relação a maioria dos coleópteros, que possuem até 90% AT (ZHANG; HEWITT, 1997; YUAN et al., 2021), no entanto, nem todos possuem %AT acima de 70% (SUN et al., 2020).

A repetição *in tandem* encontrada na região controle em algumas espécies, inclusive em Coleoptera, pode gerar diferenças no tamanho do genoma mitocondrial, devido a inserções, deleções e cópias (INOHIRA, HARA; MATSUURA, 1997; YAO; WANG et al., 2019; YANG e DAI, 2017, ZHANG; HEWITT, 1997). Foram encontradas no genoma mitocondrial de *O. octoguttata*, três regiões repetidas (Tabela 5.4), da qual a região com 51 pb foi analisada no *Blast* do banco de dados Genbank (plataforma NCBI) encontrou semelhança com a região A+T de *Omophoita sp* (MG021084). As regiões repetidas encontradas são idênticas, exceto a repetição três, que repete 23x e 20x no indivíduo 1 e 2 respectivamente. Ocorreu também a mudança de um nucleotídeo na repetição da região controle.

Após a análise, foram encontradas diferenças no tamanho da região controle dos indivíduos (152 pb), sendo essa diferença relacionada a repetição três do indivíduo 1, que repete três vezes a mais, suprimindo esta diferença entre os mitogenomas.

Análises filogenéticas

Os genes mitocondriais têm sido muito utilizados para construir e analisar relações filogenéticas, se mostrando marcadores poderosos para definição de grupos (NIE et al., 2020). As análises com genes mitocondriais demonstraram maior sinal filogenético para classificação a nível de família à subtribo, em relação a genes nucleares, porém, quando realizado análises com diversos dados, estes sendo sequencias nucleares, mitocondriais e morfológicos, tem demonstrado possuir maior confiabilidade (NIE et al., 2018). Muitos autores utilizam também as relações filogenéticas como meio de validação dos dados da montagem do genoma mitocondrial (CHEN et al., 2018; WANG et al., 2019), para verificar se o genoma montado é da espécie identificada e associar sua posição filogenética.

A análise utilizando o método ML e BI realizado com os 13 PCGs mostraram semelhanças no agrupamento para a maioria dos grupos (Figura 5.10 e 5.11). Os

mitogenomas de *O. octoguttata* montado no presente trabalho e o mitogenoma de *Omophoita* sp. foram agrupados em conjunto, demonstrando que o genoma montado no presente é diferente da sequência da única espécie depositada no GenBank. Foi recuperado em ambas análises (ML e BI) três grandes agrupamentos monofiléticos, o grupo externo, com espécies de Chrysomelinae, o clado dos Alticinae e o clado dos Galerucinae. A árvore filogenética demonstra que os grupos Alticinae e Galerucinae são grupos irmãos monofiléticos (BP: 100 e PP: 1), como demonstrado em estudos anteriores (FARREL, 1998; FERREL; SEQUEIRA, 2004; GOMEZ-ZURITA; HUNT e VOGLER, 2008, NIE et al., 2018, NIE et al., 2020). Trabalhos anteriores utilizando genoma mitocondrial para analisar a relação entre Alticinae e Galerucinae (NIE et al., 2018; NIE et al., 2020) utilizaram menor número amostral, com isso, este trabalho utilizando maior grupo amostral (52 espécies de Alticinae e 14 espécies de Galerucinae), reforça a monofilia entre os clados.

Os clados recuperados de Alticinae mostraram grande grau de confiança, pode-se agrupar a maioria dos clados com suas respectivas tribos, com valores de bootstrap altos (Figura 5.10 e 5.11), poucas espécies não foram agrupadas em tribos. As tribos recuperadas monofileticamente foram: Alticini, Longitarsini, Oedionychini, Chaectonenini, Psylodini. A tribo Aptonini foi recuperada sendo um grupo polifilético, do qual o gênero *Aptona* foi agrupado como grupo irmão de Longitarsini e o gênero *Phylotreta* como grupo irmão de chaectonenini. Nie et al. (2018) recuperaram o gênero *Aptona* como grupo irmão de Longitarsini, como demonstrado neste estudo, porém, o gênero *Phylotreta* foi agrupado em conjunto com o gênero *Crepdoptera*, isto demonstra que este grupo pode haver relações filogenéticas incertas.

Apenas um agrupamento de Alticinae apresentou diversos gêneros diferentes, o grupo X, que pode ter ocorrido a junção destes clados em conjunto devido ao baixo número de espécies amostrados, demonstrando pelo valor de bootstrap a baixa confiança na relação entre alguns clados. A análise filogenética utilizando o genoma mitocondrial se mostrou confiável para realizar análise a nível de gênero, pois os gêneros de Alticinae foram agrupados corretamente com altos valores de bootstrap.

Ambos os métodos de ML e BI agruparam os gêneros e tribos das espécies em conjunto, a principal diferença entre os métodos foi o clado Oedionychini, em BI ele é agrupado em dentro do enraizando o clado Longitarsini, porém em ML ele é

agrupado enraizando todos os clados de Alticinae. Esta principal diferença pode estar relacionada ao número amostral, pois este grupo possui apenas 3 indivíduos agrupados, e valor de bootstrap baixo.

O aumento do número de espécies com genoma mitocondrial sequenciado de diversos gêneros e com espécies do mesmo gênero, pode resultar em análises filogenéticas mais resolutivas, pois como mostrado neste trabalho, a análise de BI e ML utilizando os 13 PCGs são resolutivos em relação ao agrupamento a nível de gênero.

Podemos concluir que o genoma mitocondrial de *O. octoguttata* está de acordo com a ordem Coleoptera. Não possui grande variação quanto a composição nucleotídica e na organização das regiões do mitogenoma. Ocorre pequena diferença intraespecífica, que foi visualizado comparando o mitogenoma dos dois indivíduos sequenciados e descritos no presente trabalho, esta variação está principalmente na região controle, que possui repetições *in tandem*. A análise de relação filogenética utilizando o genoma mitocondrial recuperou a monofilía entre Alticinae e Galerucinae, podendo considerar como grupos irmãos, com alto bootstrap.

A descrição do genoma mitocondrial no presente trabalho poderá dar maior suporte para pesquisas futuras, visto que apenas 3 indivíduos do gênero *Omophoita* possuem agora o genoma mitocondrial sequenciado, sendo um número extremamente baixo para a diversidade do gênero. Ainda há a necessidade de mais descrições dos genomas mitocondriais para o gênero, subfamília e ordem, para que se possa realizar inferências filogenéticas, comparações entre espécie e estudos de biodiversidade com maior acurácia. O presente trabalho também poderá futuramente dar maior suporte na identificação dos indivíduos da espécie *O. octoguttata*, pois as pesquisas agora poderão usufruir de dados morfológicos, citológicos, de genes nucleolares previamente descrito na literatura e agora, com análises de genoma mitocondrial, diminuindo assim a taxa de identificação incorreta da espécie. Assim com *primers* utilizando como referência o genoma mitocondrial de *O. octoguttata* poderá ser montado, para poder realizar análises em diversas espécies do grupo sem precisar realizar a montagem do genoma mitocondrial.

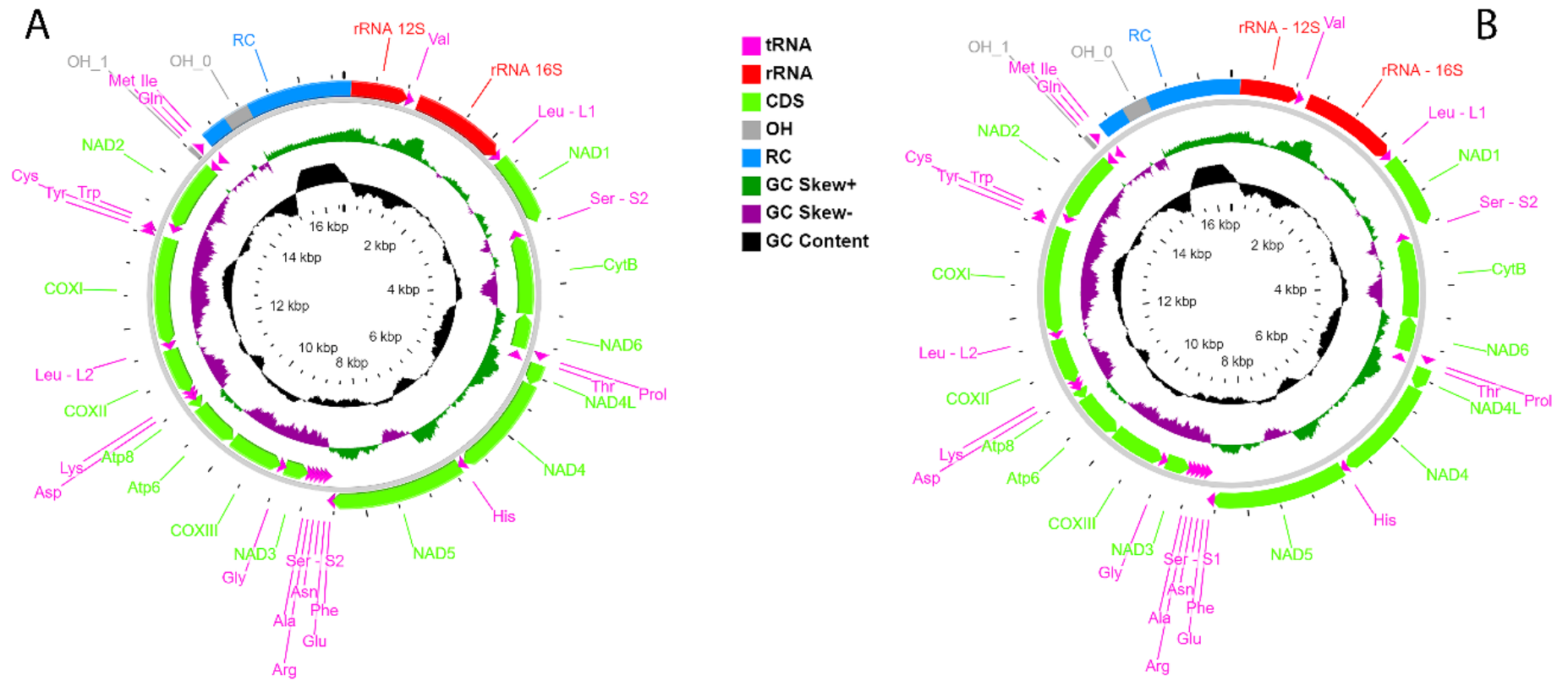


Figure 5.7 Mapa do genoma mitocondrial de *Omophoita octoguttata*, A. Mapa do genoma mitocondrial do indivíduo 1, B. Mapa do genoma mitocondrial do indivíduo 2.

Tabela 5.2 Composição nucleotídica e Skew AT/GC do genoma mitocondrial de *Omophoita octoguttata*.

Região	Indivíduo 1				Indivíduo 2			
	A+T%	G+C%	AT Skew	GC skew	A+T%	G+C%	AT Skew	GC skew
Genoma total	77,5	22,5	-0,035	0,262	77,8	22,2	-0,036	0,261
rRNA - S (12S)	84,9	15,1	-0,051	0,377	84,9	15,1	-0,053	0,377
rRNA - L (16S)	81,8	18,3	-0,073	0,377	81,7	18,3	-0,075	0,388
NAD1	78,3	21,6	-0,249	0,315	78,5	21,4	-0,251	0,318
CytB	73,9	26,1	-0,055	-0,218	73,9	26,1	-0,055	-0,218
NAD6	85	15	-0,031	-0,320	84,8	15,2	-0,028	-0,329
NAD4L	85,1	14,8	-0,250	0,527	85,1	14,8	-0,250	0,527
NAD4	79,9	20,2	-0,227	0,356	79,8	20,2	-0,226	0,356
NAD5	79,8	20,2	-0,165	0,327	79,8	20,1	-0,165	0,323
NAD3	82,8	17,2	-0,106	-0,116	82,8	17,2	-0,073	-0,074
COXIII	71,9	28	-0,076	-0,079	72,9	27,2	-0,088	-0,316
atp6	76,3	23,7	-0,088	-0,316	76,3	23,7	-0,088	-0,316
atp8	91,5	8,5	-0,071	-0,388	90,8	9,2	-0,079	-0,283
COXII	74,2	25,8	-0,038	-0,140	74,6	25,3	-0,032	-0,162
COXI	70,2	29,9	-0,077	-0,090	70,2	29,8	-0,080	-0,087
NAD2	80	20	-0,085	-0,210	80,1	19,9	-0,089	-0,196
13 PCGs	77,3	22,7	-0,125	0,004	77,4	22,6	-0,124	0,009
22 tRNAs	81,4	18,6	0,029	0,129	81,4	18,6	0,029	0,129
Região controle	69,7	30,3	0,047	0,380	71,3	28,7	0,049	0,394

Tabela 5.3. Resumo da anotação do genoma mitocondrial de *Omophoita octoguttata*.

Gene	Localização		Fita	Tamanho	Intergênica	Início/parada códon	Anticódon
	Indivíduo 1	Indivíduo 2					
rRNA - S (12S)	91 - 832	112 - 854	H	742/743	-3		
Valina (Val)	830 - 896	852 - 918	H	67	69		TAC
rRNA - L (16S)	966 - 2185	988 - 2207	H	1220	-13		
Leucina-L1 (Leu)	2173 - 2237	2195 - 2259	H	65	25		TAG
NAD1	2263 - 3189	2285 - 3211	H	927	17	ATA/TAG	
Serina-S2 (Ser)	3207 - 3273	3229 - 3295	L	67	-2		TGA
CytB	3272 - 4411	3294 - 4433	L	1140	-1	ATG/TAG	
NAD6	4411 - 4905	4433 - 4927	L	495	2	ATT/TAA	
Prolina (Prol)	4908 - 4973	4930 - 4995	H	66	0		TGG
Treonina (Thr)	4974 - 5039	4996 - 5061	L	66	2		TGT
NAD4L	5042 - 5323	5064 - 5345	H	282	-7	ATG/TAA	
NAD4	5317 - 6648	5339 - 6670	H	1332	-1	ATG/TAA	
Histidina (His)	6648 - 6711	6670 - 6733	H	64	0		GTG
NAD5	6712 - 8430	6734 - 8452	H	1719	-20	ATT/TAG	
Fenilalanina (Phe)	8411 - 8473	8433 - 8495	H	63	-2		GAA
Glutamato (Glu)	8472 - 8534	8494 - 8556	L	63	0		TTC
Serina -S1 (Ser)	8535 - 8601	8557 - 8623	L	67	0		TCT
Aspargina (Asn)	8602 - 8666	8624 - 8688	L	65	-1		GTT
Arginina (Arg)	8666 - 8728	8688 - 8750	L	63	-1		TCG
Alanina (Ala)	8728 - 8791	8750 - 8813	L	64	-2		TGC
NAD3	8790 - 9143	8812 - 9165	L	354	0	ATT/TAG	
Glicina (Gly)	9144 - 9207	9166 - 9229	L	64	-1		TCC
COXIII	9207 - 9994	9229 - 10016	L	788	-1	ATG/TA	
atp6	9994 - 10668	10016 - 10690	L	675	-7	ATG/TAA	
atp8	10662 - 10814	10684 - 10836	L	153	0	ATT-TAA	
Aspártico (Asp)	10815 - 10881	10837 - 10903	L	67	-1		GTC
Lisina (Lys)	10881 - 10951	10903 - 10973	L	71	-20		TTT
COXII	10932 - 11609	10954 - 11631	L	678	21	ATA/TAA	
Leucina-L2 (Leu)	11631 - 11695	11653 - 11717	L	65	-5		TAA
COXI	11691 - 13238	11713 - 13260	L	1548	-8	ATT/TAA	
Tirosina (Tyr)	13231 - 13294	13253 - 13316	H	64	0		GTA
Cisteína (Cys)	13295 - 13355	13317 - 13377	H	61	-8		GCA
Triptofano (Trp)	13348 - 13412	13370 - 13434	L	65	-2		TCA
NAD2	13411 - 14412	13433 - 14434	L	1002	-27	ATT/TAA	
OH_1	14386-14444	14408 - 14466	H	59	-23		
Metionina (Met)	14422 - 14490	14444 - 14512	L	69	-1		CAT
Glutamina (Gln)	14490 - 14558	14512 - 14580	H	69	9		TTG
Isoleucina (Ile)	14568 - 14632	14590 - 14654	L	65	348/347		GAT
OH_0	14981-15305	15002 - 15323	H	325/322	1334/347		
Região controle	14633 - 90	14655 - 111	H	2007/1855			

Tabela 5.4 Sequências repetidas de *Omophoita octoguttata*, em vermelho as os pares de bases diferente entre os indivíduos.

Indivíduo	Sequência	Tamanho	repetições
Indivíduo 1 - repetição - 1	TATATAATAATATA	14	3,2x
Indivíduo 1 - repetição - 2	TATTATAATAAAATAATATTA	22	2x
Indivíduo 1 - repetição - 3	GTTAAAAGTTGAGATCGATTGGGGAA TAGGTCGCTACTGTCAGAAACCGTT	51	23x
Indivíduo 2 - repetição - 1	TATATAATAATATA	14	3,2x
Indivíduo 2 - repetição - 2	TATTATAATAAAATAATATTA	22	2
Indivíduo 2 - repetição - 3	GTTAAAAGTTGAGATTGATTGGGGAA TAGGTCGCTACTGGCAGAAACCGTT	51	20

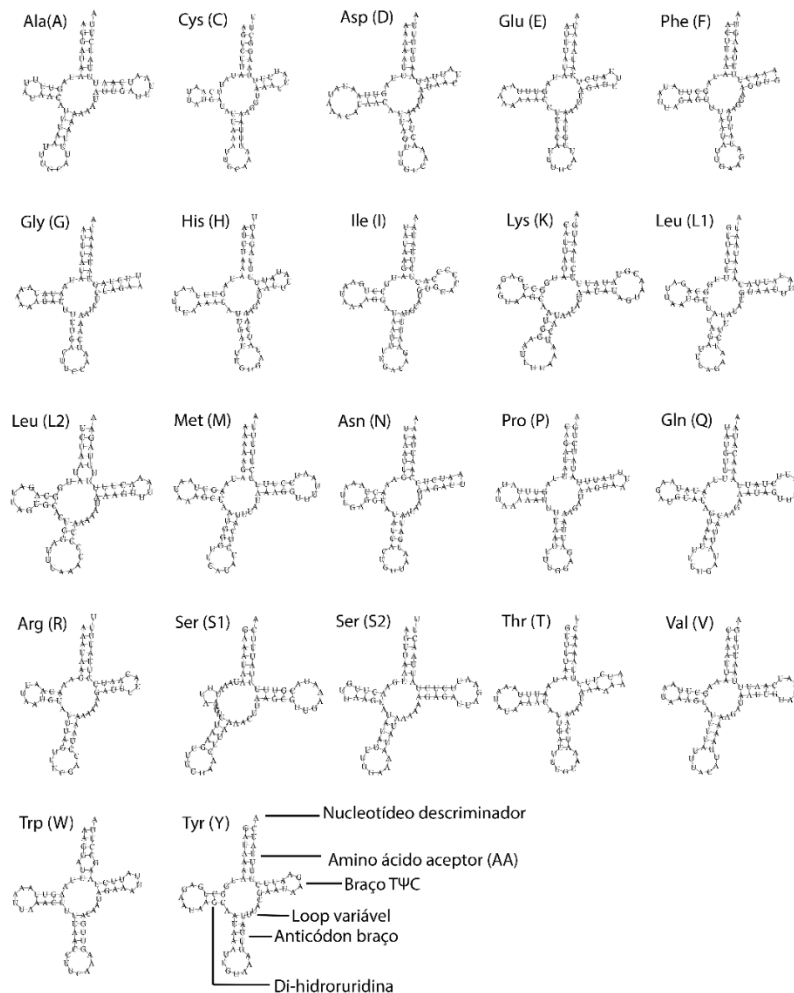


Figure 5.8 Estruturas secundárias putativas dos RNAs transportadores de *Omophoita octoguttata*.

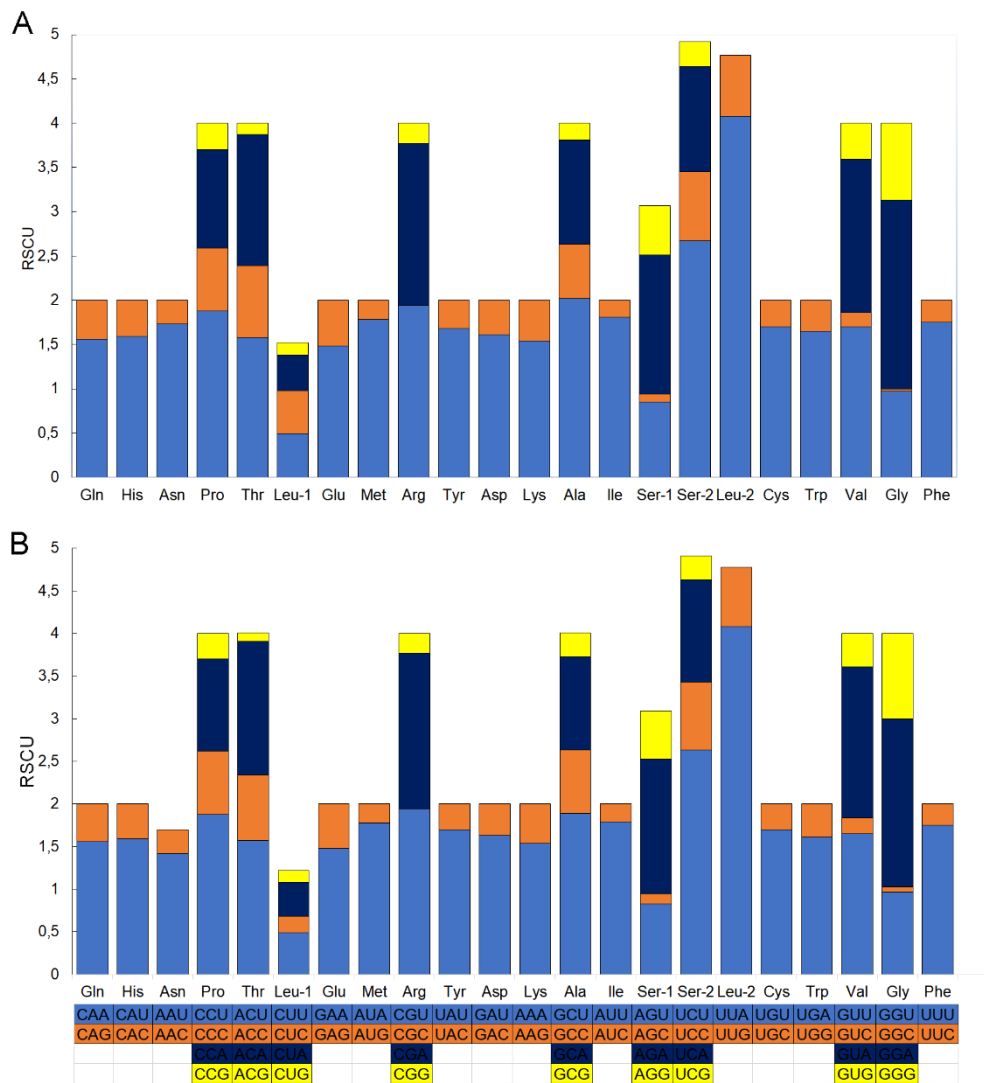


Figure 5.9 Uso de códons sinônimos relativos (RSCU) do mitogenoma de *Omophoita octoguttata*. A. Indivíduo 1, B. Indivíduo 2.

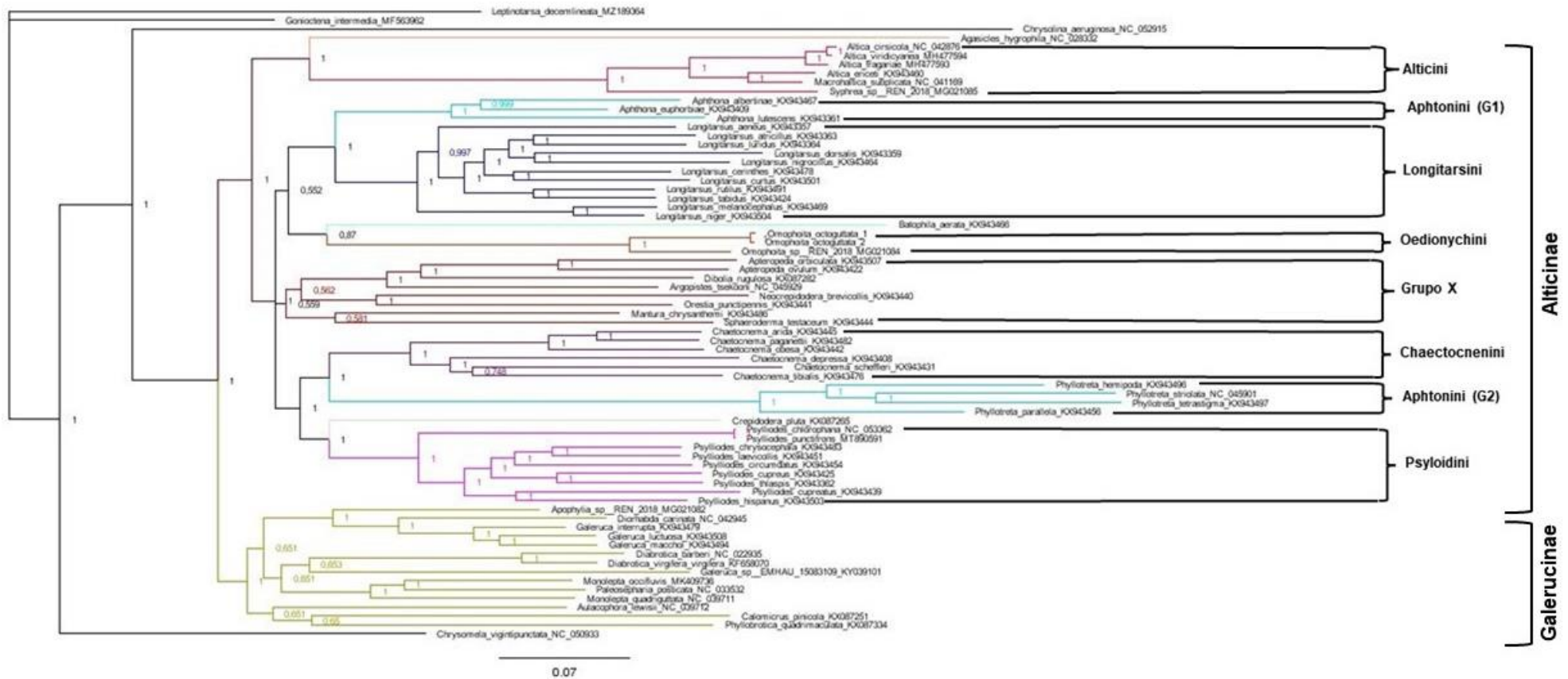


Figura 5.10 Análise filogenética utilizando inferência Bayesiana dos 13 PCGs de Alticinae + Galerucinae, com Chrysomelinae como grupo externo. Com valores de probabilidades posteriores em cada ramo.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná – NAPI-Bioinformática (número 033/2021) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo Financiamento deste projeto.

REFERÊNCIAS

As referências citadas neste artigo foram depositadas no final da dissertação.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir deste trabalho, pode-se realizar a primeira comparação entre genômas e pintura cromossômica de Coleoptera, além de ser a primeira análise comparativa entre o conjunto de satDNA entre macho e fêmea, e a primeira descrição completa do genoma mitocondrial de *Omophoita octoguttata*, realizando com estes dados inferências filogenéticas do grupo.

A partir dos dados obtidos neste trabalho no capítulo I, pode-se inferir um pouco sobre os processos evolutivos dos cromossomos sexuais de *Omophoita*. Os dados demonstraram que o grupo possui baixo grau de similaridade molecular entre as espécies, exceto para os DNAs repetitivos, que é demonstrado em estudos anteriores que possuem alta similaridade e grande quantidade destas sequências. Os resultados da pintura cromossômica e CGH entre macho e fêmea, demonstrou que os cromossomos sexuais ainda não estão diferenciados, pois compartilham muitas sequências iguais entre eles. A semelhança entre os cromossomos sexuais pode demonstrar que estes cromossomos sexuais surgiram recentemente, além do mais, estes cromossomos sexuais por serem recentes, possuem grande quantidade de DNA repetitivo compartilhado entre eles, fazendo com que estas sequências repetitivas tenham tido papel importante durante o processo evolutivo e surgimento dos mesmo.

Os resultados obtidos pela análise do conjunto de satDNA de *Omophoita octoguttata*, demonstrou que a espécie possui grande quantidade destas sequências, estas sendo compartilhadas entre o macho e fêmea. Porém, foi identificado sequências enriquecidas no genoma do macho principalmente, estas que podem ser específicas dos cromossomos sexuais, porém, as análises de especificidade poderão ser realizadas apenas após a realização da hibridação *in situ*. A partir dos dados do satelitoma, pode-se inferir também sobre a evolução dos satDNA na espécie, pois foi identificado sequências pequenas inseridas em satélites maiores.

Por ultimo, a descrição do genoma mitocondrial demonstrou que esta sequência pode ser utilizada para diversas finalidades, incluindo para análises filogenéticas como realizadas neste trabalho, onde recuperou a monofilia da subfamília Alticinae como grupo irmão de Galerucinae.

Apesar destes resultados inéditos e importantes, ainda são necessários mais estudos, quanto a evolução dos cromossomos sexuais em Oedionychina, visto que

são o único grupo de insetos que apresentam cromossomos sexuais gigantes, podendo assim serem considerados um modelo para estudar a evolução dos cromossomos sexuais. É necessário a realização da hibridação *in situ* dos DNA satélites na espécie, para identificar a localização, a dispersão e mapear satélites específicos dos cromossomos sexuais. Além de ser importante a realização da hibridação em outras espécies, para poder identificar o compartilhamento destes satélites com outros táxons e assim poder realizar mais inferências sobre a evolução dos mesmos.

É necessário também mais descrições do genoma mitocondrial, não apenas em Alticinae, mas em todos os outros grupos, pois a partir dos dados gerados pode-se realizar diversas pesquisas, estas sendo filogenéticas, ecológicas e comparativas.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M. C.; CAMPANER, C.; CELLA, D. M. Karyotype characterization, constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions of *Paranaita opima* (Coleoptera, Chrysomelidae, Alticinae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 3, p. 475–481, 2006.

ALMEIDA M.C. **Estudos citogenéticos em 14 espécies de Alticinae (Coleoptera, Pplyphaga, Chrysolmelidae): heterocromatina constitutiva e regiões organizadoras de nucléolo**. 2001. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, 2001.

ALMEIDA, M. C.; CAMPANER, C.; CELLA, D. M. Cytogenetics of four *Omophoita* species (Coleoptera, Chrysomelidae, Alticinae): A comparative analysis using mitotic and meiotic cells submitted to the standard staining and C-banding technique. **Micron**, v. 40, n. 5–6, p. 586–596, 2009.

ALMEIDA, M. C. *et al.* Physical mapping of 18S rDNA cistron in species of the *Omophoita* genus (Coleoptera, Alticinae) using fluorescent *in situ* hybridization. **Micron**, v. 41, p. 729–734, 2010.

BACHTROG, D. *et al.* Are all sex chromosomes created equal?. **Cell**, v. 27, n. 9, pág. 350-357, 2011.

BACHTROG, D. *et al.* Sex determination: Why so many ways of doing it?. **Plos biology**, v. 12, n. 7, p. 1-14, 2014.

BARCELLOS, S. A. *et al.* Comparative analyses swallow species (Aves, Passeriformes, Hirundinidae): Insights on karyotype and genomic organization. **Genetics and Molecular Biology**, n. 43, v. 1, p. 01-06, 2020.

BECHYNÉ, J. Troisième note sur les chrysomeloidea neotropicaux des collections de L'institut Royal des sciences naturelles de Belgique (Col. Phytophaga) deuxième partie. **Institut Royal des Sciences naturelles de Belgique**, v. 19, p. 1-31, 1955.

BECHYNÉ, J. Beiträge zur Kenntnis der alticidenfauna boliviens: Coleopt. Phytoph. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 1, n. 4, p. 269-381, 1959.

BEGHA, B. P.; SANTOS, M. H.; PRADO, L. R. Redescription of *Omophoita octoguttata* (Coleoptera: Chrysomelidae) and its immature stages, with notes on life history. **Iheringia. Série Zoologia**, v. 111, 2021.

BEGHA, B. P. **Espécies de *Omophoita* Chevrolat, 1836 e *Alagoasa* Bechyné, 1955 (Coleoptera, Chrysomelidae, Galerucinae, Alticini) do sul do Brasil: taxonomia e filogenia**. 2021. Dissertação (Mestrado em Biologia Evolutiva) - Universidade Estadual De Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2021.

BEGOSSI, A.; BENSON, W. W. Host plants and defense mechanisms In Oedionychina (Alticinae) *In*: JOLIVET, P.; PETITPIERRE, E.; HSIAO, T. H. **Biology of Chrysomelidae**. London: Kluwer Academic Publishers, 1988. p. 57-72.

BENSON, G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. **Nucleic acids research**, v. 27, n. 2, p. 573-580, 1999.

BLACKMON, H.; DEMUTH, J. P. Estimating Tempo and Mode of Y Chromosome Turnover: Explaining Y Chromosome Loss with the Fragile Y Hypothesis. **Genetics**, v. 197, n. 2. p. 561-572, 2014.

BLACKMON, H.; DEMUTH, J. P. Coleoptera Karyotype Database. **The Coleopterists Bulletin**, v. 69, n. 1, p. 174–175, 2015. Disponível em: <<https://evobir.shinyapps.io/ColeopteraDB/>> Acesso em: 05 de abr. de 2020. **(A)**

BLACKMON, H.; DEMUTH, J. P. Genomic origins of insect sex chromosomes. **Insect genomics**, v. 7, p. 45-50, 2015. **(B)**

BLACKMON, H.; ROSS, L.; BACHTROG, D. Sex determination, sex chromosomes, and Karyotype Evolution in insects. **Journal of Heredity**, v. 108, n. 1, p. 78-93, 2017.

BRUFORD, M. W. *et al.* Single-locus and multilocus DNA fingerprint. In: Hoelzel, A.R. (Ed.). **Molecular Genetic Analysis of Populations: A Practical Approach**. IRL Press, Oxford, UK, p. 225–270, 1992.

BOORE, J. L. Animal mitochondrial genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 27, n. 8, p. 1767-1780, 1999.

BOUCHARD, P. *et al.* Biodiversity of coleoptera. **Insect biodiversity: science and society**, p. 265-301, 2009.

BOUCHARD, P. *et al.* Family-Group Names in Coleoptera (Insecta). **ZooKeys**, v. 88, p. 1–972, 2011.

BOUCHARD, P. *et al.* Biodiversity of Coleoptera. **Insect Biodiversity: Science and Society**, v. 1, ed. 2, pag. 337 – 417, 2017.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114-2120, 2014.

BRUFORD, M. W. *et al.* Single-locus and multilocus DNA fingerprint. In: Hoelzel, A.R. (Ed.). **Molecular Genetic Analysis of Populations: A Practical Approach**. IRL Press, Oxford, UK, p. 225–270, 1992.

CABRAL-DE-MELLO, D. C. *et al.* Evolutionary dynamics of heterochromatin in the genome of *Dichotomius* beetles based on chromosomal analysis. **Genetica. Dordrecht: Springer**, v. 139, n. 3, p. 315–325, 2010.

CABRAL-DE-MELLO, D. C. *et al.* Chromosomal organization of the 18S and 5S rRNAs and histone H3 genes in Scarabaeinae coleopterans: insights into the evolutionary dynamics of multigene families and heterochromatin. **BMC Genetics**, p. 1-12, 2011.

CAMERON, S. L. Insect mitochondrial genomics: implications for evolution and phylogeny. **Annual review of entomology**, v. 59, p. 95-117, 2014.

CASARI, S. A.; IDE, S. COLEOPTERA Linnaeus, 1758. In RAFAEL, J. A. *et al.* (ORG.). **Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia**, Ribeirão Preto, Holos, 2012, pag. 453 – 535.

CHAN, P. P.; LOWE, T. M. tRNAscan-SE: searching for tRNA genes in genomic sequences. In: **Gene prediction**. Humana, New York, NY, 2019. p. 1-14.

CHARLESWORTH, B. The evolution of sex chromosomes. **Science**, v. 251, p. 1030-1033, 1991.

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

CHARLESWORTH, B. *et al.* Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes. **Nature**, v. 95, n. 2, p. 118-128, 2005.

CHEN, Y. *et al.* SOAPnuke: a MapReduce acceleration-supported software for integrated quality control and preprocessing of high-throughput sequencing data. **Gigascience**, v. 7, n. 1, p. 1-7, 2018.

CIOFFI, M. B. *et al.* Whole chromosome painting reveals independent origin of sex chromosomes in closely related forms of a fish species. **Genetica**, v. 139, n. 8, p. 1065-1072, 2011. **(A)**

CIOFFI, M. B. *et al.* Cross-species chromosome painting tracks the independent origin of multiple sex chromosomes in two cofamilial Erythrinidae fishes. **BMC evolutionary Biology**, v. 11, p. 01-07, 2011. **(B)**.

CHALOPIN, D. *et al.* Transposable elements and early evolution of sex chromosomes in fish. **Chromosome research**, v. 23, n. 3, p. 545-560, 2015.

CROWSON, R. A. **The Biology of the Coleoptera**, Orlando, Florida: Academic Press, v.2, pag. 1-808, 1981.

DAI, X.; XU, J.; JIANG, Z. Bionomics of *Dactylispa approximata* on *Lophatherum gracile*. **Northern Horticulture**, v. 22, p. 125-127, 2012.

DEGRANDI, T. M. *et al.* Chromosome painting in *Trogon s. surrucura* (Aves, Trogoniformes) reveals a karyotype derived by chromosomal fissions, fusions, and inversions. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 151, n. 4, p. 208-215, 2017.

DEON, G. A. *et al.* Chromosomal rearrangements and origin of the multiple XX/XY1Y2 sex chromosome system in *Harttia* species (Siluriformes: Loricariidae). **Frontiers in Genetics**, v. 13, p. 1-11, 2022.

DONATH, A. *et al.* Improved annotation of protein-coding genes boundaries in metazoan mitochondrial genomes. **Nucleic acids research**, v. 47, n. 20, p. 10543-10552, 2019.

DUTRILLAUX, A. M.; DUTRILLAUX, B. Sex Chromosome Rearrangements in Polyphaga Beetles. **Sexual Development**, v. 3, n. 1, p. 43–54, 2009.

DUTRILLAUX, A. M.; DUTRILLAUX, B. Evolution of the sex chromosomes in beetles. I. The loss of the Y chromosome. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 152, n. 2, p. 97-104, 2017.

DUTRILLAUX, A. M.; DUTRILLAUX, B. Loss of Y chromosome may be a synapomorphy of the tribe Lepturini (Coleoptera: Cerambycidae: Lepturinae). **European Journal of Entomology**, v. 115, 2018.

FERREIRA, A. *et al.* 2 Pairs of chromosomes: A new low record for Coleoptera. **Revista Brasileira de Genetica**, v. 7, p. 231–239, 1984.

FRAÏSSE, C.; PICARD, M. A. L.; VICOSO, B. The deep conservation of the Lepidoptera Z chromosome suggests a non-canonical origin of the W. **Nature communications**, v. 8, n. 1, p. 1-9, 2017.

FURMAN, B. L. S. *et al.* Sex chromosome evolution: so many exceptions to the rules. **Genome biology and evolution**, v. 12, n. 6, p. 750-763, 2020.

FURTH, D. G.; SAVINI, V. Checklist of the Alticinae of Central America, including Mexico (Coleoptera: Chrysomelidae). **Insecta Mundi**, v. 10, n. 1, p. 45-68, 1996.

GARRIDO-RAMOS, M. A. Satellite DNA: an evolving topic. **Genes**, v. 8, n. 9, p. 2-41, 2017.

GALIÁN, J.; HOGAN, J. E.; VOGLER, A. P. The origin of multiple sex chromosomes in tiger beetles. **Molecular Biology and Evolution**, v. 19, n. 10, p. 1792-1796, 2002.

GE, D. *et al.* Suprageneric systematics of flea beetles (Chrysomelidae: Alticinae) inferred from multilocus sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 62, n. 3, p. 793-805, 2012.

GAO, X. J.; WANG, H. L.; ZU, J. H. The complete mitochondrial genome of *Psylliodes balyi* Jacoby (Coleoptera: Chrysomelidae). **Mitochondrial DNA Part B**, v. 5, n. 3, p. 2909-2910, 2020.

GILLOT, C. ENTOMOLOGY. Dordrecht: Springer; 3. Ed. 2005, p. 834.

GLAS, R. *et al.* Cross-species chromosome painting between human and marsupial directly demonstrates the ancient region of the mammalian X. **Mammalian Genome**, v. 10, n. 11, p. 1115, 1999.

GOLL, L. G. *et al.* High-Resolution Physical Chromosome Mapping of Multigene Families in *Lagria villosa* (Tenebrionidae): Occurrence of Interspersed Ribosomal Genes in Coleoptera. **Cytogenetic Genome Research**, p. 7, 2015.

GOLL, L. G. *et al.* Comparative Cytogenetics of *Omophoita abbreviata* and *O. aequinoctialis* (Coleoptera, Chrysomelidae, Alticini) from the Adolpho Ducke Forest Reserve in Brazilian Amazonia: Intrapopulation Variation in Karyotypes. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 156, n. 1, p. 56–64, 2018.

GÓMEZ-RODRÍGUEZ, C. *et al.* Validating the power of mitochondrial metagenomics for community ecology and phylogenetics of complex assemblages. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 6, n. 8, p. 883-894, 2015.

GRANT, J. R.; STOTHARD, P. The CGView Server: a comparative genomics tool for circular genomes. **Nucleic acids research**, v. 36, n. 2, p. 181-184, 2008.

MARSHALL-GRAVES, J. A.; SHETTY, S. Sex from W to Z: evolution of vertebrate sex chromosomes and sex determining genes. **Journal of Experimental Zoology**, v. 290, n. 5, p. 449-462, 2001.

GRAVES, J. A. M.; Sex chromosome specialization and degeneration in mammals. **Cell**, v. 124, n. 5, p. 901-914, 2006.

GREEN-MARROQUIN, B. L. *et al.* Orientation of nonrandomly segregating sex chromosomes in spermatocytes of the flea beetle, *Alagoasa bicolor* L. **Chromosoma**, v. 110, n. 1, p. 32-38, 2001.

GILBERT, C.; PECCOUD, J.; CORDAUX, R. Transposable elements and the evolution of insects. **Annual Review of Entomology**, v. 66, n. 1, p. 355-372, 2021.

GRÜTZNER, F. *et al.* In the platypus a meiotic chain of ten sex chromosomes shares genes with the bird Z and mammal X chromosomes. **Nature**, v. 432, n. 7019, p. 913-917, 2004.

GUAN, X. Y.; MELTZER, P. S.; TRENT, J. M. Rapid generation of whole chromosome painting probes (WCPs) by chromosome microdissection. **Genomics**, v. 22, n. 1, p. 101-107, 1994.

HADDAD, S.; MCKENNA, D. D. Phylogeny and evolution of the superfamily Chrysomeloidea (Coleoptera: Cucujiformia): Phylogeny and evolution of the superfamily Chrysomeloidea (Coleoptera: Cucujiformia). **Systematic Entomology**, v. 41, n. 4, p. 697–716, 2016.

HARDMAN, N. Structure and function of repetitive DNA in eukaryotes. **Biochemical Journal**, v. 234, n. 1, p. 1-11, 1986.

HADDAD, S. *et al.* Phylogeny and evolution of the superfamily Chrysomeloidea (Coleoptera: Cucujiformia). **Systematic Entomology**, v. 41, n. 4, p. 697-716, 2016.

HEJNÍČKOVÁ, M. *et al.* Degenerated, Undifferentiated, Rearranged, Lost: High Variability of Sex Chromosomes in Geometridae (Lepidoptera) Identified by Sex Chromatin. **Cells**, v. 10, n. 9, p. 1-21, 2021.

HONG, M. Y. *et al.* Complete mitogenome sequence of the jewel beetle, *Chrysochroa fulgidissima* (Coleoptera: Buprestidae) Full-length Research Article. **Mitochondrial DNA**, v. 20, n. 2, p. 46-60, 2009.

HOUBEN, A.; FIELD, B. L.; SAUNDERS, V. A. Microdissection and chromosome painting of plant B chromosomes. In: **Chromosome Painting**. Springer, Dordrecht, 2001. p. 115-124.

INOHIRA, K.; HARA, T.; MATSUURA, E. T. Nucleotide sequence divergence in the A+ T-rich region of mitochondrial DNA in *Drosophila simulans* and *Drosophila mauritiana*. **Molecular biology and evolution**, v. 14, n. 8, p. 814-822, 1997.

JIN, J. J. *et al.* GetOrganelle: a fast and versatile toolkit for accurate de novo assembly of organelle genomes. **Genome biology**, v. 21, n. 1, p. 1-31, 2020.

JOLIVET, P. Food habits and food selection of Chrysomelidae: Bionomic and evolutionary perspectives. *In*: JOLIVET, P.; PETITPIERRE, E.; HSIAO, T. H. **Biology of Chrysomelidae**. London: Kluwer Academic Publishers, 1988. p. 1-24.

KAISER, V. B.; BACHTROG, D. Evolution of sex chromosomes in insects. **Annual review of genetics**, v. 44, p. 91-112, 2010.

KIM, M. J.; WAN, X.; KIM, I. Complete mitochondrial genome of the seven-spotted lady beetle, *Coccinella septempunctata* (Coleoptera: Coccinellidae). **Mitochondrial DNA**, v. 23, n. 3, p. 179-181, 2012.

KRETSCHMER, R. *et al.* Novel insights into chromosome evolution of Charadriiformes: extensive genomic reshuffling in the wattled jacana (*Jacana jacana*, Charadriiformes, Jacanidae). **Genetics and Molecular Biology**, n. 43, v. 1, p. 01-08, 2020.

LASLETT, D.; CANBÄCK, B. ARWEN: a program to detect tRNA genes in metazoan mitochondrial nucleotide sequences. **Bioinformatics**, v. 24, n. 2, p. 172-175, 2008.

LONG, O. E.; DAWID, I. B. Repeated genes in eukaryotes. **Annual review of biochemistry**, v. 49, n. 1, p. 727-764, 1980.

LECLERCQ, S. *et al.* Birth of a W sex chromosome by horizontal transfer of Wolbachia bacterial symbiont genome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 52, p. 15036-15041, 2016.

LÓPEZ-FLORES, I.; GARRIDO-RAMOS, M. A. The repetitive DNA content of eukaryotic genomes. **Repetitive DNA**, v. 7, p. 1-28, 2012.

LORITE, P. *et al.* Satellite DNA in the elm leaf beetle, *Xanthogaleruca luteola* (Coleoptera, Chrysomelidae): characterization, interpopulation analysis, and chromosome location. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 98, n. 4, p. 302–307, 2003.

MA, Z. *et al.* Comparative mitogenomics of the genus *Odontobutis* (Perciformes: Gobioidae: Odontobutidae) revealed conserved gene rearrangement and high sequence variations. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 10, p. 25031-25049, 2015.

MARCHAL, J. A. *et al.* X chromosome painting in *Microtus*: origin and evolution of the giant sex chromosomes. **Chromosome Research**, v. 12, n. 8, p. 767-776, 2004.

MCKENNA, D. D. *et al.* The beetle tree of life reveals that Coleoptera survived end-Permian mass extinction to diversify during the Cretaceous terrestrial revolution. **Systematic Entomology**, v. 40, n. 4, p. 835-880, 2015.

MELLO, L. R. A. *et al.* Physical map of repetitive DNA and karyotype evolution in three species of the genus *Omophoita* (Coleoptera: Alticinae). **Italian Journal of Zoology**, v. 81, n. 1, p. 16–24, 2014.

MURRAY, M. G.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 8, n. 19, p. 4321-4326, 1980.

NATRI, H. M.; MERILÄ, J.; SHIKANO, T. The evolution of sex determination associated with a chromosomal inversion. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1-13, 2019.

NIE, R. *et al.* The phylogeny of Galerucinae (Coleoptera: Chrysomelidae) and the performance of mitochondrial genomes in phylogenetic inference compared to nuclear rRNA genes. **Cladistics**, v. 34, n. 2, p. 113-130, 2018.

NIE, R. *et al.* Diversification of mitogenomes in three sympatric *Altica* flea beetles (Insecta, Chrysomelidae). **Zoologica Scripta**, v. 48, n. 5, p. 657-666, 2019.

NIE. *et al.* The phylogeny of leaf beetles (Chrysomelidae) inferred from mitochondrial genomes. **Systematic Entomology**, v. 45, n. 1, p. 188-204, 2020.

NOKKALA, S.; KUZNETSOVA, V.; MARYAŃSKA-NADACHOWSKA, A. Achiasmate segregation of a B chromosome from the X chromosome in two species of *psyllids* (Psylloidea, Homoptera). **Genetica**, v. 108, n. 2, p. 181-189, 2000.

NOKKALA, S. *et al.* The origin of the achiasmatic XY sex chromosome system in *Cacopsylla peregrina* (Frst.) (Psylloidea, Homoptera). **Genetica**, v. 119, n. 3, p. 327-332, 2003.

OJALA, D.; MONTOYA, J.; ATTARDI, G. tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. **Nature**, v. 290, n. 5806, p. 470-474, 1981.

OHNO, S. *et al.* Sex chromosome and sex-linked genes. **Chromosoma**, v. 23, n. 1, p. 1-9, 1967.

OLIVEIRA, S. G. *et al.* Heterochromatin, sex chromosomes and rRNA gene clusters in *Coprophanæus* beetles (Coleoptera, Scarabaeidae). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 138, n. 1, p. 46-55, 2012.

PEASE, J. B.; HAHN, M. W. Sex chromosomes evolved from independent ancestral linkage groups in winged insects. **Molecular biology and evolution**, v. 29, n. 6, p. 1645-1653, 2012.

PERNA, N. T.; KOCHER, T. D. Patterns of nucleotide composition at fourfold degenerate sites of animal mitochondrial genomes. **Journal of molecular evolution**, v. 41, n. 3, p. 353-358, 1995.

PETITPIERRE, E. Cytogenetics, cytotaxonomy and genetics of Chrysomelidae. *In*: JOLIVET, P.; PETITPIERRE, E.; HSIAO, T. H. **Biology of Chrysomelidae**. London: Kluwer Academic Publishers, 1988. p. 131-160.

PETITPIERRE, E. *et al.* Chromosome Numbers and Meioformulae of Chrysomelidae. *In*: JOLIVET, P.; PETITPIERRE, E.; HSIAO, T. H. **Biology of Chrysomelidae**. London: Kluwer Academic Publishers, 1988. p. 161-204.

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

PETITPIERRE, E. A new contribution to the cytogenetic knowledge of Alticinae (Coleoptera, Chrysomelidae). **Hereditas**, v. 143, p. 58–61, 2006.

PITA, S. *et al.* Chromosome painting in triatomine insects reveals shared sequences between X chromosomes and autosomes. **Journal of medical entomology**, v. 54, n. 1, p. 44-49, 2017.

PITA, S. *et al.* Distribution and evolution of repeated sequences in genomes of Triatominae (Hemiptera-Reduviidae) inferred from genomic in situ hybridization. **PLoS One**, v. 9, n. 12, p. e114298, 2014.

PITA, S. *et al.* Chromosome Painting in *Triatomine* Insects Reveals Shared Sequences Between X Chromosomes and Autosomes. **Journal of Medical Entomology**, v. 54, n. 1, p. 44–49, 2016.

RECH, T.; LINZMEIER, A. M. Assembleia de Alticini (Coleoptera, Chrysomelidae, Galerucinae) em fragmentos florestais no sudoeste do Paraná, Brasil. **Iheringia Série Zoologia**, v. 109, 2019.

REID, C. A. M. Spilopyrinae Chapuis: a new subfamily in the Chrysomelidae and its systematic placement (Coleoptera). **Invertebrate Systematics**, v. 14, n. 6, p. 837-862, 2000.

RILEY, E. G. *et al.* **Chrysomelidae**. In: Arnett Jr., R. H.; Thomas, M. C.; Skelley, P. E. & Frank, J. H. (Ed.). American Beetles. Volume 2. Polyphaga: Scarabaeoidea through Curculionoidea. Boca Raton, CRC Press LLC, p. 617-691, 2002.

ROSOLEN, L. A. M.; VICARI, M. R.; ALMEIDA, M. C. Accumulation of Transposable Elements in Autosomes and Giant Sex Chromosomes of *Omophoita* (Chrysomelidae: Alticinae). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 156, n. 4, p. 215–222, 2018.

ROŽEK, M. *et al.* C-bands on chromosomes of 32 beetle species (Coleoptera: Elateridae, Cantharidae, Oedemeridae, Cerambycidae, Anthicidae, Chrysomelidae, Attelabidae and Curculionidae): C-bands on chromosomes of 32 beetle species. **Hereditas**, v. 140, n. 3, p. 161–170, 2004.

SAHARA, K.; YOSHIDO, A.; TRAUT, W. Sex chromosome evolution in moths and butterflies. **Chromosome Research**, v. 20, n. 1, p. 83-94, 2012.

SÁNCHEZ, L. Sex-determining mechanisms in insects. **International Journal of Developmental Biology**, v. 52, n. 7, p. 837-856, 2004.

SCHNEIDER, M. C. *et al.* Chromosomal similarities and differences among four Neotropical Elateridae (Conoderini and Pyrophorini) and other related species, with comments on the NOR patterns in Coleoptera. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 45, n. 4, p. 308–316, 2007.

SEKERKA, L. *et al.* **Coleoptera**. In: CATÁLOGO TAXONÔMICO DA FAUNA DO BRASIL. PNUD, 2021a. Disponível em: <http://fauna.jbrj.gov.br/fauna/faunadobrasil/143689>. Acesso em: 6 jul. 2021.

SEENO, T. N.; WILCOX, J. A. Leaf Beetle Genera (Coleoptera: Chrysomelidae). p. 126–156, 1982.

SEMBER, A. *et al.* Sex chromosome evolution and genomic divergence in the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). **Frontiers in genetics**, v. 9, n. 71, p. 1-11, 2018.

SHEFFIELD, N. C. *et al.* A comparative analysis of mitochondrial genomes in Coleoptera (Arthropoda: Insecta) and genome descriptions of six new beetles. **Molecular biology and evolution**, v. 25, n. 11, p. 2499-2509, 2008.

SHEFFIELD, N. C. *et al.* Nonstationary evolution and compositional heterogeneity in beetle mitochondrial phylogenomics. **Systematic biology**, v. 58, n. 4, p. 381-394, 2009.

SLIPINSKI, S. A.; LESCHEN, R. A. B.; LAWRENCE, J. F.; Order Coleoptera Linnaeus, 1758. In: Zhang, Z.-Q. (Ed.) Animal biodiversity: An outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness. **Zootaxa**, v. 3148, n. 1, p. 203–208, 2011.

SMITH, S. G. Evolutionary changes in the sex chromosomes of Coleoptera. **Genetica**, v. 25, n. 1, p. 522-524, 1951.

SMITH, S. G. Evolutionary Changes in the Sex Chromosomes of Coleoptera . I . Wood Borers of the Genus *agrilus*. **Society for the Study of Evolution**, v. 3, n. 4, p. 344–357, 1949.

SMITH, S. G.; VIRKKI, N. Coleoptera. p 366 in B John (Ed), Animal cytogenetics. **Volume 3. Insecta**, v. 5, 1978.

SERRANO, J. Chromosome numbers and karyotypic evolution of Caraboidea. **Genetica**, v. 55, n. 1, p. 51-60, 1981.

SUMNER, A. T. **Chromosomes: organization and function**. Malden, MA: Blackwell Publishing, 2003.

SUZUKI, K. Phylogenetic relationships among higher taxa of the family Chrysomelidae. **Chrysomela**, v. 12, p. 13-14, 1985.

TAMURA, K.; STECHER, G.; KUMAR, S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. **Molecular biology and evolution**, v. 38, n. 7, p. 3022-3027, 2021.

TELENIUS, H, *et al.* Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. **Genomics**, v. 13, n. 3, p.718-725, 1992.

TERUEL, M. *et al.* Microdissection and chromosome painting of X and B chromosomes in *Locusta migratoria*. **Chromosome Research**, v. 17, n. 1, p. 11–18, 2009.

THAKUR, J.; PACKIARAJ, J.; HENIKOFF, S. Sequence, chromatin and evolution of satellite DNA. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 9, p. 4309, 2021.

TRIPLEHORN, C.; JOHNSON, N. F. **Estudo dos insetos**. São Paulo: Cengage Learning, 2011.

VAIO, E. S. DE; POSTIGLIONI, A. Stolaine cassidines (coleoptera, chrysomelidae) with XYp sex chromosomes and a derivative system Xp NeoXNeoyp. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, v. 16, n. 2, p. 433–440, 1974.

VICOSO, B. Molecular and evolutionary dynamics of animal sex-chromosome turnover. **Nature ecology & evolution**, v. 3, n. 12, p. 1632-1641, 2019.

VIDAL, O. R. Chromosome numbers of Coleoptera from Argentina. **Genetica**, v. 65, n. 3, p. 235-239, 1984.

VIRKKI, N. High Chromosome Number and Giant Postreductional Sex Chromosomes in the Beetle *Walterianella venusta* Schaufuss (Chrysomelidae, Alticinae). **The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico**, v. 47, n. 3, p. 154–163, 1963.

VIRKKI, N. **On the cytology of some neotropical chrysomelids (Coleoptera)**. Suomalainen tiedeakatemia, v. 75, p. 1-24, 1964.

VIRKKI, N. Orientation and segregation of asynaptic multiple sex chromosomes in the male *Omophoita clerica* Erichson (Coleoptera: Alticidae). **Hereditas**, v. 57, n. 1-2, p. 275-288, 1967.

VIRKKI, N. Regular Segregation of Seven Asynaptic Sex Chromosomes in the Male of *Asphaera Daniela* Bechyné (Coleoptera, Alticidae). **Caryologia**, v. 21, n. 1, p. 47–51, 1968.

VIRKKI, N. Sex chromosomes and karyotypes of the Alticidae (Coleoptera). **Hereditas**, v. 64, n. 2, p. 267–282, 1970.

VIRKKI, N. Formation and maintenance of the distance sex bivalent in Oedionychina (Coleoptera, Alticidae). **Hereditas**, v. 68, n. 2, p. 305–312, 1971.

VIRKKI, N. Prophase of spermatocyte I in Oedionychina (Coleoptera). **The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico**, v. 60, n. 4, p. 661-674, 1976.

VIRKKI, N. Banding of Oedionychina (Coleoptera:Alticinae) Chromosomes: C- and Ag-bands. **Jounal of Agriculture of University of Puerto Rico**, p. 222–245, 1983.

VIRKKI, N. Chromosomes in evolution of Coleoptera. *In*: SHARMA, A.K.; SHARMA, A. **Chromosomes in evolution of eukaryotic groups**. Florida: CRC Press, 1984. p. 71–76.

VIRKKI, N. The sex chromosomes of Disonychina (Coleoptera, Alticinae): Xy + nX systems. **Cytobios**, v. 53, p. 43–55, 1988.

VIRKKI, N.; SANTIAGO-BLAY, J. A.; CLARK, S. M. Disonychina and Oedionychina (Coleoptera: Chrysomelidae: Alticinae: Oedionychini). **Psyche**, v. 98, p. 373-390, 1991.

VIRKKI, N.; SANTIAGO-BLAY, J. A. Trends of Karyotype Evolution in Neotropical Oedionychina (Coleoptera: Chrysomelidae: Alticinae). **Hereditas**, v. 119, p. 21, 1993.

VIRKKI, N.; BLAY, S. Atypical cytology in some neotropical flea beetles (Coleoptera: Chrysomelidae: Alticinae: Oedionychina) from one of the most intense natural radiation sites known, Morro do Ferro (Brazil). **Cytobios**, v. 85, p. 342, 1996.

VIRKKI, N.; SANTIAGO-BLAY, J. A. Chromosome numbers in 71 Puerto Rican species of leaf beetles (Coleoptera: Chrysomelidae). **The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico**, v. 82, n. 1-2, p. 69-83, 1998.

WRIGHT, A. E. *et al.* How to make a sex chromosome. **Nature communications**, v. 7, n. 1, p. 1-8, 2016.

WHITE, M. J. D. **Animal Cytology and Evolution**. Cambridge University Press, v. 3, p. 1–933, 1973.

WILSON, P. J.; FORER, A.; WISE, D. Microtubule distribution during meiosis I in flea-beetle [*Alagoasa* (*Oedionychus*)] spermatocytes: evidence for direct connections between unpaired sex chromosomes. **Journal of Cell Science**, v. 116, n. 7, p. 1235-1247, 2003.

WOLSKI, M. A. V. *et al.* Cytogenetic, morphological and molecular characterization of two cryptic species of the genus *Omophoita* Chevrolat, 1837 (Coleoptera: Chrysomelidae: Galerucinae). **Biologia**, v. 76, n. 8, p. 2253–2262, 2021.

YANO, C. F.; BERTOLLO, L. A. C.; CIOFFI, M. B. Fish-FISH: Molecular Cytogenetics in Fish Species. *In*: LIEHR, T. **Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH)**. Germany: Springer Protocols, 2017, p. 29-45.

YANG, F. *et al.* Generation of Paint Probes from Flow-Sorted and Microdissected Chromosomes. *In*: LIEHR, T. **Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH)**. Germany, Springer Protocols, 2017, p. 63–79.

YOSHIDO, A. *et al.* Rapid turnover of the W chromosome in geographical populations of wild silkmoths, *Samia cynthia* ssp. **Chromosome research**, v. 21, n. 2, p. 149-164, 2013.

YOSHIDO, A. *et al.* Evolution of multiple sex-chromosomes associated with dynamic genome reshuffling in *Leptidea wood-white* butterflies. **Heredity**, v. 125, n. 3, p. 138-154, 2020.

ZRZAVÁ, M. *et al.* Sex chromosomes of the iconic moth *Abraxas grossulariata* (Lepidoptera, Geometridae) and its congener *A. sylvata*. **Genes**, v. 9, n. 6, p. 279, 2018.

ZHANG, D. X.; HEWITT, G. M. Insect mitochondrial control region: a review of its structure, evolution and usefulness in evolutionary studies. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 25, n. 2, p. 99-120, 1997.

ZWICK, M. S., *et al.* A rapide procedure for the isolation of C0t-1 DNA from plants. **Genome**, v. 40, p. 138-142, 1997.

APÊNDICE A - ESPÉCIES E SEUS NÚMEROS DE ACESSO DO GENOMA MITOCONDRIAL NO GENBANK/NCBI UTILIZADAS PARA AS ANÁLISES FILOGENÉTICAS.

Subfamília	Espécie	Código genbank/NCBI
Alticinae	<i>Agasicles hygrophila</i>	NC_028332
Alticinae	<i>Altica cirsiicola</i>	NC_042876
Alticinae	<i>Altica ericeti</i>	KX943460
Alticinae	<i>Altica fragariae</i>	MH477593
Alticinae	<i>Altica viridicyanea</i>	NC_048472
Alticinae	<i>Aphthona albertinae</i>	KX943467
Alticinae	<i>Aphthona euphorbiae</i>	KX943409
Alticinae	<i>Aphthona lutescens</i>	KX943361
Alticinae	<i>Apteropeda orbiculata</i>	KX943507
Alticinae	<i>Apteropeda ovulum</i>	KX943422
Alticinae	<i>Batophila aerata</i>	KX943466
Alticinae	<i>Chaetocnema arida</i>	KX943445
Alticinae	<i>Chaetocnema depressa</i>	KX943408
Alticinae	<i>Chaetocnema obesa</i>	KX943442
Alticinae	<i>Chaetocnema paganettii</i>	KX943482
Alticinae	<i>Chaetocnema scheffleri</i>	KX943431
Alticinae	<i>Chaetocnema tibialis</i>	KX943476
Alticinae	<i>Crepidodera plutus</i>	KX087265
Alticinae	<i>Dibolia rugulosa</i>	KX087282
Alticinae	<i>Longitarsus aeneus</i>	KX943357
Alticinae	<i>Longitarsus atricillus</i>	KX943363
Alticinae	<i>Longitarsus cerinthes</i>	KX943478
Alticinae	<i>Longitarsus curtus</i>	KX943501
Alticinae	<i>Longitarsus dorsalis</i>	KX943359
Alticinae	<i>Longitarsus luridus</i>	KX943364
Alticinae	<i>Longitarsus melanocephalus</i>	KX943469
Alticinae	<i>Longitarsus niger</i>	KX943504
Alticinae	<i>Longitarsus nigrocillus</i>	KX943464
Alticinae	<i>Longitarsus rutilus</i>	KX943491
Alticinae	<i>Longitarsus tabidus</i>	KX943424
Alticinae	<i>Macrohaltica subplicata</i>	NC_041169
Alticinae	<i>Mantura chrysanthemii</i>	KX943486
Alticinae	<i>Neocrepidodera brevicollis</i>	KX943440

Alticinae	<i>Omophoita octoguttata</i> - ind. 1	Neste trabalho
Alticinae	<i>Omophoita octoguttata</i> - ind. 2	Neste trabalho
Alticinae	<i>Omophoita</i> sp	MG021084.1
Alticinae	<i>Orestia punctipennis</i>	KX943441
Alticinae	<i>Phyllotreta hemipoda</i>	KX943496
Alticinae	<i>Phyllotreta parallela</i>	KX943456
Alticinae	<i>Phyllotreta striolata</i>	NC_045901
Alticinae	<i>Phyllotreta tetrastigma</i>	KX943497
Alticinae	<i>Psylliodes chlorophana</i>	NC_053362
Alticinae	<i>Psylliodes chrysocephalus</i>	KX943483
Alticinae	<i>Psylliodes circumdatus</i>	KX943454
Alticinae	<i>Psylliodes cupreatus</i>	KX943439
Alticinae	<i>Psylliodes cupreus</i>	KX943425
Alticinae	<i>Psylliodes hispanus</i>	KX943503
Alticinae	<i>Psylliodes laevicollis</i>	KX943451
Alticinae	<i>Psylliodes punctifron</i>	MT890591
Alticinae	<i>Psylliodes thlaspis</i>	KX943362
Alticinae	<i>Sphaeroderma testaceum</i>	KX943444
Alticinae	<i>Syphrea</i> sp.	MG021085
Galerucinae	<i>Apophyllia</i> sp	MG021082
Galerucinae	<i>Aulacophora lewisii</i>	NC_039712
Galerucinae	<i>Diabrotica barberi</i>	NC_022935
Galerucinae	<i>Diabrotica virgifera virgifera</i>	KF658070
Galerucinae	<i>Diorhabda carinata</i>	NC_042945
Galerucinae	<i>Galeruca interrupta</i>	KX943479
Galerucinae	<i>Galeruca luctuosa</i>	KX943508
Galerucinae	<i>Galeruca macchoi</i>	KX943494
Galerucinae	<i>Galeruca</i> sp	KY039101
Galerucinae	<i>Monolepta occifluvis</i>	MK409736
Galerucinae	<i>Monolepta quadriguttata</i>	NC_039711
Galerucinae	<i>Paleosepharia posticata</i>	NC_033532
Galerucinae	<i>Phyllobrotica quadrimaculata</i>	KX087334

ANEXO A - PREPARAÇÃO DOS TESTÍCULOS SEGUINDO ALMEIDA, ZACARO E CELLA (2000), COM MODIFICAÇÕES.

- 1- Colocar éter etílico em um pote com algodão;
- 2- Colocar solução fisiológica na placa de petri;
- 3- Colocar o besouro no éter até ele “desmaiar”;
- 4- Colocar o alfinete entre o pronoto e o tórax, com outro alfinete abrir as asas e fixá-las;
- 5- Soltar o tecido do abdômen.
- 6- Retirar o testículo.
- 7- Colocar o testículo em solução hipotônica com água da torneira por 15 minutos;
- 8- Transferir para o fixador Carnoy I (metanol-ácido acético na proporção 3:1), deixar 1 minuto, trocar e deixar por 30 minutos;
- 9- Guardar na geladeira em um microtubo contendo fixador Carnoy I.

ANEXO B - PROTOCOLO PARA PREPARAÇÃO CITOLÓGICAS E COLORAÇÃO COM GIEMSA 3%.

Acidificação de lâmina:

- 1- Lavar as lâminas com algodão e detergente para retirar o óleo;
100
- 2- Colocar Sulfocrômica 50% na cubeta de vidro junto com as lâminas e deixar *overnight*;
- 3- Tirar a sulfocrômica e lavar por 20 minutos em água corrente;
- 4- Colocar as lâminas em álcool 70% e manter na geladeira até usar.

Preparação de lâmina:

- 1- Colocar o ácido acético 70% na lâmina acidificada;
- 2- Colocar o testículo no ácido acético e esperar clarear;
- 3- Macerar na lâmina e secar na chapa.

Coloração Giemsa 3%

- 1- 47 mL de água destilada;
- 2- 1,5 mL de corante Giemsa;
- 3- 1,5 mL de tampão;
- 4- Deixar por 12 minutos;
- 5- Lavar em água corrente;
- 6- Secar ao ar.

ANEXO C - Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) – Pintura cromossômica descrita por YANO et al., 2017.

Pré tratamento:

1. Desidrate a lâmina em série alcoólica (70%, 90% e 100%) para 2 minutos cada. (RT);
2. Segue ao ar e incube as lâminas a 60 °C por 1 hora;
3. Adicione 100 ul de RNAase (10 ug/ml) nas lâminas, cubra com uma lamínula e incube a 37 °C por 1 hora em câmara úmida;

Solução RNAse

- 5 µl RNAse 10mg/ml

975 µl 2xSSC

4. Remova a lamínula e incube em um frasco contendo 1x PBS por 5 minutos em um agitador a temperatura ambiente;
5. Adicione 100 ul de uma solução de pepsina 0,005% nas lâminas, cubra com uma lâmina e mantenha a 37 °C por 10 minutos;

Solução pepsina

- 99 mL de H₂O
- 1 mL de HCl 1M
- 50 µl de pepsina 10%

6. Remova a Lamínula e incube as Lâminas em um frasco contendo 1X PBS, mantenha em temperatura ambiente por 5 minutos;
7. Incube as lâminas por 10 minutos a temperatura ambiente em um frasco contendo 100 ml de solução de pós-fixação.
8. Jogue a solução de pós fixação, adicione 1X PBS na mesma cubeta e incube as lâminas por 5 minutos a temperatura ambiente;
9. Desidrate as lâminas em uma série alcoólica (70%, 90% e 100%) 2 minutos cada, e seque ao ar;

Hibridação *in situ*

1. Incube as lâminas em uma solução de formamida a 75 °C por 3 minutos (para besouros 3 minutos e 50 segundos) para desnaturação cromossômica;
2. Transfira as lâminas para um frasco cheio de etanol 70% frio (imediatamente) (Este álcool 70% deve ser jogado); para conservar as o DNA alvo como fita simples, prossiga com a série alcoólica (90% e 100%) 2 minutos cada e seque ao ar;
3. Desnature a mistura de hibridação (contendo 20ul do híbrido de tampão de concentração e 100 ng da sonda marcada) em um termo ciclador a 85 °C por 10 minutos (esta etapa pode ser realizada enquanto a série anterior estiver sendo realizada);
4. Adicione 20 ul da mistura de hibridação às lâminas, cubra com uma lamínula e incube por 37 °C por 14 horas em uma câmara úmida escura (papel molhado com 2x SSC); (NOTA 5)

Nota. Foi utilizado em besouro 30 ug/Lâmina de competidor, do qual em conjunto com o mix de hibridação foi colocado a temperatura de 100°C por 10 minutos e deixado para competição entre as sequências por 1 hora. É recomendado teste com diferentes concentrações de competidor.

SEGUNDO DIA

5. Remova a lamínula e lave em 1X SSC em uma temperatura variando de 42 °C a 65 °C dependendo da sonda aplicada (veja nota 6);
6. Coloque as lâminas em um frasco contendo 100 ml de 4x SSCTween (100ml de 20Xss + 400ML DE H2Od + 250ul de tween puro) e mantenha por 5 minutos em um agitador a temperatura ambiente. As etapas 7-10 são necessários se as sondas foram marcadas indiretamente, caso não, pode ir direto para a etapa 11;
7. Incube as lâminas em 3% NFDM/4x SSC por 10 minutos a temperatura ambiente;
8. Adicione 100 ul da solução de detecção 1 (ou 2-4) a cada lâmina, cubra com uma lamínula e incube por 1 hora a 37 °C em câmara úmida escura;
9. Remova a Lamínula e lave 3 vezes por 5 minutos em 4X SSCT sob agitação;

10. Lave as lâminas em 1x PBS e desidrate em série alcoólica (70, 90, 100%) por 2 minutos em temperatura ambiente;
11. Adicione 17 μ l de meio de montagem Vectashield com DAPI e cubra com uma lamínula e pressione levemente. As lâminas estão prontas para análise. Podem ser mantidas em 4 °C.

Notas:

1. Lembre-se de descartar a solução de formamida como perigosos resíduos, pois é um teratígeno.
2. Lembre-se de descartar a solução de paraformaldeído como risco desperdício ardente.
3. Em geral, o espermatozóide comercial de salmão pode funcionar muito bem como um bloqueador de DNA; no entanto, em alguns casos, não é suficiente para bloquear a hibridização de sequências de repetição de alta cópia. Assim, uma boa alternativa é usar Cot1-DNA isolado diretamente das espécies estudadas.
4. Um experimento bem-sucedido depende de alta qualidade sondas e placas metafásicas. Se as preparações cromossômicas contêm excesso de citoplasma, alguns ajustes na etapa de pré-tratamento de manutenção precisam ser realizados. Assim, a fim de remover ou reduzir o background, o tempo de pepsina e / ou RNase A o pré-tratamento deve ser aumentado. O sucesso do pré-tratamento pode ser verificado por inspeção de microscópio, e um etapa de pré-tratamento opcional pode ser realizada, se necessário. Mais distante, fundo também pode ser o resultado de pós-insuficiente lavagens de hibridização que são resolvidas aumentando a lavagem temperatura ou a concentração da solução de lavagem.
5. Em experimentos de WCP, uma etapa de pré-hibridização de 15-30 min em 37 C pode ser realizada a fim de evitar hibridismo inespecífico. Em experimentos de pintura de cromossomo inteiro (WCP), a quantidade de competidor (DNA de esperma de salmão ou Cot1-DNA) é essencial para obter um padrão de hibridização bem-sucedido. Em ordem para reduzir as hibridizações não específicas, a concentração de Cot1-DNA pode ser aumentada (de 1 a 5 μ g μ l).

6. Para sondas de DNA repetitivas, uma temperatura de 42 C é suficiente para lavar as lâminas, enquanto para as sondas WCP a temperatura ideal temperatura é cerca de 62-65 C.

SOLUÇÕES

Tratamento da lâmina:

1. PBS 1 (solução salina tamponada com fosfato - Cat. No: L1825, Biochrom, Alemanha; armazenar em temperatura ambiente ¼ RT).
2. Solução estoque de pepsina (Cat. No: P-7012, Sigma, EUA).
3. Solução de trabalho de pepsina (0,005%): 99 µl de H₂O, 10 µl de HCl e 2,5 µl de pepsina (20 mg ml⁻¹).
4. Solução pós-fixação (100 ml, 1% paraformaldeído) (ver Nota 2): misturar 50 ml de paraformaldeído a 2% (por exemplo, Merck, Alemanha) com 45 ml de 1 PBS e 5 ml de MgCl₂ 1M (fazer fresco como requeridos).

(Solução paraformaldeído 2%: Adicionar 2g de paraformaldeído à 100ml de água destilada).

5. RNase A (Cat. No: R4642, Sigma, EUA).
6. Solução de trabalho RNase (10 µg ml⁻¹): 1,5 µl RNase A (10 mg ml⁻¹) e 1,5 ml 2 SSC.

Procedimento FISH:

1. Avidin-FITC (Cat. No: A2901, Sigma, EUA).
2. Fluoresceína anti-digoxigenina (Cat. No: 11207741910, Roche Diagnostics, Suíça).
3. Rodamina anti-digoxigenina (Cat. No: 11207750910, Roche Tampão de desnaturação: 70% (v/v) formamida desionizada (ver Nota 1), 20% (v/v) de água bidestilada filtrada, 10% (v/v) 20 SSC; faça fresco conforme necessário.
4. Solução de detecção 1: 994 µl de 3% NFDM / 4 SSC, 2 µl de solução de trabalho avidina-FITC (1 mg ml⁻¹) e 5 µl de antidigoxigenina rodamina (200 µg ml⁻¹).
5. Solução de detecção 2: 995 µl de 3% NFDM / 4 SSC, 10 µl de estreptavidina-Cy3, e 5 µl de anti-digoxigenina fluoresceína (200 µg ml⁻¹).
6. Solução de detecção 3: 995 µl de 3% NFDM / 4 SSC, 10 µl de estreptavidina-Cy5 e 5 µl de fluoresceína anti-digoxigenina (200 µg ml⁻¹).

7. Solução de detecção 4: 995 µl de 3% NFDM / 4 SSC, 10 µl de estreptavidina-Cy5 e 5 µl de anti-digoxigenina rodamina (200 µg ml⁻¹).
8. Solução de formamida: 2 SSC / formamida 50% desionizada, pH 7.0 (ver Nota 1).
9. Tampão de hibridização: dissolver 2 g de sulfato de dextrano sódico em 10 ml de 50% formamida / 2 SSC / tampão fosfato 50 mM por 1 h a 70 C. Aliquotar e armazenar a 20 C.
10. NFDM ¼ Leite em pó desnatado (Cat. No: 9999, Cell Tecnologia de Sinalização, EUA).
11. NFDM3% / 4 SSC: 40 ml 20 SSC, 160 ml ddH₂O e 5 g de NFDM. Prepare a solução em agitação constante para dissolver o NFDM.
12. PBS 1 (solução salina tamponada com fosfato - Cat. No: L1825, Biochrom, Alemanha; armazenar na RT).
13. Tampão de fosfato: preparar Na₂HPO₄ 0,5 M e 0,5 M NaH₂PO₄, misture essas duas soluções (1: 1) para obter pH 7,0, e em seguida, alíquotar e armazenar a 20 ° C.
14. SSC 20 ¼ citrato de sódio salino (Cat. No: 15557-036; Invitrogen, EUA; armazenar na RT); configurar 1 e 2 SSC antes de usar.
15. Streptavidin-Cy5 (Cat. No: 25800881, GE Healthcare Life Ciências, EUA).
16. Streptavidin-Cy3 (Cat. No: S6402, Sigma, EUA).
17. Tween 20 ¼ monolaurato de polioxietileno sorbitano (Cat. No: 10670-1000, Sigma, Alemanha, armazenamento em RT).
18. Meio de montagem Vectashield com DAPI FR / 10 ml (Cat. Nº: H-1200, Vector, EUA).
19. Tampão de lavagem (4 SCCT): 4 SSC, Tween 20 a 0,05%; faça fresco conforme necessário.

ANEXO D - MONTAGEM DO GENOMA MITOCONDRIAL

A montagem do genoma mitocondrial de *Omophoita octoguttata* macho e fêmea foi realizado no servidor da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). Seguindo os seguintes passos: (I) verificação da qualidade das sequências brutas provindas do sequenciamento, (II) retirada das sequências com baixa qualidade, (III) verificação novamente da qualidade das sequências resultantes do passo (II), (IV) montagem do genoma mitocondrial, (V) anotação e curadoria do genoma mitocondrial.

Etapa I: Após o sequenciamento do genoma por NGS, os arquivos foram baixados utilizando o software FilleZilla, após isto, foi submetido ao servidor da UEPG. A primeira etapa consistiu em realizar a verificação da qualidade das *reads* provindas do sequenciamento, para isto, foi utilizado o FASTqc. Após a análise e verificação que as sequências estavam com qualidade boa, foi realizado a etapa (II).

Etapa II: Esta etapa é realizada para filtrar as sequências com baixa qualidade do sequenciamento bruto. Para realizar esta filtragem foi realizado a pipeline do Trimmomatic, para utilizar necessita realizar a seguinte linha de comando:

```
java -jar trimmomatic-0.39.jar PE -phred33 V350016532_L04_B5GFIShoduRAAAA-581_1.fq.gz V350016532_L04_B5GFIShoduRAAAA-581_2.fq.gz clean.1.fq.gz clean.u.1.fq.gz clean.2.fq.gz clean.u.2.fq.gz LEADING:20 TRAILING:20 SLIDINGWINDOW:4:20 MINLEN:36
```

Amarelo: Biblioteca 1 bruta do sequenciamento

Azul claro: Biblioteca 2 bruta do sequenciamento

Vermelho: Nome da biblioteca pareada e limpa da sequência 1

Cinza: Nome da biblioteca não pareada da sequência 1

Lilás: Nome da biblioteca pareada e limpa da sequência 2

Azul escuro: Nome da biblioteca não pareada da sequência 2

Vermelho escuro: parâmetros para verificação da qualidade das sequências, pode ser alterado conforme necessário.

Etapa III: Após a retirada das reads com baixa qualidade, é realizado novamente a verificação da qualidade das reads restantes, para isso, utiliza o comando do FASTqc.

Etapa IV: Após a verificação das reads, retiradas das reads com baixa qualidade e verificação novamente da qualidade é realizado a montagem da sequência do genoma mitocondrial, para isto, é utilizado a pipeline do get organelle, seguindo a seguinte linha de comando:

```
get_organelle_from_reads.py -1 /home/mara/Mitogenome/F1/clean.1.fq.gz -2
/home/mara/Mitogenome/F1/clean.2.fq.gz -s Alticinae.fasta -F animal_mt -o
pmophoita_octoguttata_mitogenoma -R 20
```

Amarelo: local onde o arquivo zip das bibliotecas estão armazenadas, consegue esta localização na interface.

Verde: Bibliotecas 1 e 2 usadas para montar o genoma mitocondrial, neste caso foram as bibliotecas limpas que foram arquivos de saída do trimmomatic.

Vermelho: o nome do arquivo que precisa estar na mesma pasta que foi feita com a sequência do genoma mitocondrial de espécies próximas.

Azul claro: comando do banco de dados para animal, se for utilizar sequencias de plantas, fungos, etc. procurar para o grupo.

Roxo: Nome da pasta que quer mandar o resultado da sequência, não precisa fazer uma nova pasta no servidor, com este comando ele mesmo faz a pasta.

Observações: durante a realização deste comando, pode ser que o genoma mitocondrial não saia como um resultado completo, ou seja, circular, para isso, verifique ao término da análise se o resultado no prompt está demonstrando DNA circular ou incompleto (scaffolds).

ETAPA V: Após a etapa IV, terá como resultado um arquivo .fasta, esta será a sequência do genoma mitocondrial da espécie desejada. Após isto, inicia o processo de curadoria. Para a anotação do genoma foi utilizado o servidor MITOS2 (DONATH et al., 2019) seguindo os parâmetros Referência: RefSeq 63 Metazoa, código genético: 5 invertebrados. Para identificação dos tRNAs foram utilizados os servidores MITOS2 (DONATH et al., 2019), ARWEN (LASLETT; CANBACK, 2008), seguindo os parâmetros padrão e tRNAscan-SE 2.0 (CHAN; LOWE, 2019). Para verificar o valor

de viés AT/GC, foi calculado de acordo com PERNA e KOCHER, 1995): Viés AT = $[A-T] / [A+T]$ e viés GC = $[G-C] / [G+C]$. As análises de composição e RSCU foram realizadas manualmente em MEGA 11 (TAMURA, STECHER e KUMAR, 2021), o mapa do genoma foi ilustrado utilizando CG *view* (GRANT; STOTHARD, 2008). Para identificar elementos repetidos em tandem foi utilizado o programa *Tandem repeat finder* (TRDB) (BENSON, 1999) utilizando os parâmetros básicos.