

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ESTRUTURAL, MOLECULAR E GENÉTICA

RAYLEN PEREIRA DE RAMOS

ESTUDO CITOGENÉTICO E MOLECULAR EM ESPÉCIES DO GÊNERO  
*Omophoita* CHEVROLAT, 1836 E *Alagoasa* BECHYNÉ, 1955  
(CHRYSOMELIDAE, ALTICINAE) COM DESCRIÇÃO DE UMA NOVA  
ESPÉCIE

PONTA GROSSA

2022

RAYLEN PEREIRA DE RAMOS

ESTUDO CITOGENÉTICO E MOLECULAR EM ESPÉCIES DO GÊNERO  
*Omophoita* CHEVROLAT, 1836 E *Alagoasa* BECHYNÉ, 1955  
(CHRYSOMELIDAE, ALTICINAE) COM DESCRIÇÃO DE UMA NOVA  
ESPÉCIE

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mara Cristina de Almeida

PONTA GROSSA

2022

R175 Ramos, Raylen Pereira de  
Estudo Citogenético e Molecular em espécies do gênero *Omophoita* Chevrolat, 1836 e *Alagoasa* Bechyné, 1955 (Chrysomelidae, Alticinae) com descrição de uma nova espécie / Raylen Pereira de Ramos. Ponta Grossa, 2022. 113 f.

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

Orientadora: Profa. Dra. Mara Cristina de Almeida.

1. Taxonomia. 2. Citogenética. 3. Genética molecular. 4. Dna repetitivo. 5. Pintura cromossômica. I. Almeida, Mara Cristina de. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Biologia Evolutiva. III.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. 04/2022/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, pela candidata Raylen Pereira de Ramos.

Aos trinta dias do mês de maio de dois mil e vinte e dois, sob a presidência do(a) Profa. Dra. Mara Cristina de Almeida Matiello em sessão pública por sessão remota, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação da aluna **Raylen Pereira de Ramos**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Área de concentração em Biologia Evolutiva, visando o título de Mestre, constituída pelos: Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni (PPG-BioEvol/UEPG), Profa. Dra. Michelle Andressa Vier Wolski (UniCesumar) e Profa. Dra. Renata da Rosa (UEL) – 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: “ESTUDO CITOGENÉTICO E MOLECULAR EM ESPÉCIES DO GÊNERO *Omophoita* CHEVROLAT, 1836 E *Alagoasa* BECHYNÉ, 1955 (CHRYSOMELIDAE, ALTICINAE) COM DESCRIÇÃO DE UMA NOVA ESPÉCIE”. 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, 30 de maio de dois mil e vinte e dois.

Profa. Dra. Mara Cristina de Almeida Matiello

Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni (UEPG)

Profa. Dra. Michelle Andressa Vier Wolski (UniCesumar)

Dedico este trabalho aos meus pais, Valdineia Iansen de Ramos e Alcione Pereira de Ramos, que me proporcionaram apoio de todas as formas e me ensinaram a ter persistência para continuar seguindo o caminho que escolhi.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais, Valdineia lensen e Alcion P. Ramos, por todo o apoio recebido, desde o emocional ao financeiro, por terem me ajudado a viver em outra cidade, desde a graduação e por conta de ter feito o mestrado sem bolsa de estudo. Obrigada pelo incentivo, pela paciência e pelos conselhos nos momentos mais difíceis. Vocês foram minha inspiração, meu porto seguro desde os anos iniciais, mas principalmente durante esse mestrado. Sem o suporte que vocês me deram, eu não teria chegado onde cheguei, eu não teria me tornado mestre em Biologia Evolutiva. Eu tenho orgulho de ser filha de vocês, não tenho como recompensar o que fizeram por mim, mas dedico esta dissertação a vocês, para demonstrar que se cheguei aqui, foi por vocês. Obrigada por tudo. Eu amo vocês.

Ao meu irmão, que por muitos anos compartilhamos do mesmo amor pela biologia. Obrigada por ter me ajudado com as apresentações, por ter me emprestado seu cantinho, por ter me incentivado, me inspirado, e também escutado as minhas inspirações. Obrigada por ser o melhor irmão, o meu amorzinho.

Ao meu amor, que entrou na minha vida no meio do mestrado, acompanhou a minha rotina e os meus sacrifícios. Me apoiou em todas as horas, me aconselhou em vários momentos e ouviu meus desabafos. Obrigada por me incentivar, por enaltecer a bióloga, professora e pesquisadora que me tornei. Sou muito grata e feliz por compartilhar a minha vida com você. Amo você.

A minha grande amiga, que também é colaboradora deste trabalho, Fernanda Lima. Com você tive o prazer de aprender a orientar, mas acima disso de construir uma amizade contigo. Juntas compartilhamos muitos momentos de derrotas, mas também de muitas vitórias, e aprendi com cada etapa que passamos, e cada conversa que tivemos. Sou muito grata por ter tido essa oportunidade e ter essa amizade incrível.

Aos meus parceiros de trabalho, que também são grandes amigos: Augusto Ferreira, obrigada pelos ensinamentos e trabalhos que publicamos juntos, mas acima de tudo, obrigada pela amizade que construímos, obrigada pelos conselhos e pelo apoio em todo tipo de situação. Bruno Begha, obrigada por ter tanta paciência comigo, em retirar minhas dúvidas de segunda a segunda, em me ensinar tudo que sei de taxonomia, obrigada pelo apoio e parceria. Tiago Degrandi, obrigada por essa amizade que temos, obrigada por todos os conhecimentos que me trouxe. Aos três,

agradeço pelos anos de amizade, e por terem aceitado fazer parte desse caminho comigo. Sou muito grata a isso e sei que posso contar com vocês.

Agradeço ao Jonatan P. Castro por todos os momentos que se disponibilizou em retirar as minhas dúvidas, a dar dicas e me ensinar a mexer com programas que não sabia. Agradeço ao Jhon A. D. Vidal por esses anos de trabalhos conjunto e por tanto conhecimento compartilhado. Agradeço ao Mateus H. Santos por ter se disponibilizados e me auxiliado nas análises filogenéticas. Obrigada a todos.

Agradeço a Rafaela Falachi, essa pesquisadora e mulher incrível, que me colocou pra cima, enalteceu o meu trabalho e me fez acreditar na mulher e cientista que sou. Obrigada pela ajuda com sistemática, uma área que entrei a pouco tempo, e você me trouxe muitos conhecimentos.

Agradeço a minha orientadora Mara Almeida, uma professora, cientista, e mulher incrível. Obrigada por ter aceitado me orientar na IC e me convidado a entrar pro Mestrado, no momento mais difícil da minha vida. Obrigada por ter acreditado que eu era capaz de um projeto como este, por todos os ensinamentos que me trouxe, as conversas do dia a dia, as caronas pra casa, as reuniões emergenciais quando eu estava perdida. Aprendi muito nesses quase quatro anos juntas, cresci profissionalmente e amadureci mais do que imaginei. Obrigada por tudo.

Agradeço a minha banca de qualificação e defesa, Michele V. Wolski, pela inspiração científica que recebi ao ler seu trabalho, e Roberto F. Artoni pela confiança e apoio. Agradeço a vocês por terem contribuído nesse trabalho.

Agradeço aos curadores dos museus: Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (São Paulo), Museu de Ciências Naturais UFPR (Curitiba); *Royal Belgian Institute of Natural Sciences* (Bélgica); *Natural History Museum* (Londres); *Smithsonian Institution* (Estados Unidos). Em especial ao curador Borer do *Naturhistorisches Museum Basel* (Basiléia), que se disponibilizou em fotografar e dissecar os exemplares para que eu tivesse acesso. Obrigada pela colaboração.

Agradeço ao Laboratório de Genética e Evolução (LabGev), por ter me acolhido, me dado espaço, confiança e liberdade nesses anos em que estive presente. Agradeço também aos meus colegas de laboratório, os quais compartilhamos muitos conhecimentos e bancada, e a todos que contribuíam de alguma forma neste trabalho.

“O fracasso sempre é um marcador  
de coragem, um marcador de alguém  
que saiu da zona de acomodação”  
Natália Souza

“Alguns, simplesmente, escolhem  
acreditar”  
Carina Rissi



## RESUMO

A ordem Coleoptera representa 40% dos insetos descritos e inclui a subfamília Alticinae que possui hierarquia taxonômica complexa e muitos casos de mimetismo o que dificulta mais essa categorização. A subtribo Oedionychina tem sido muito estudada com enfoque citogenético, por apresentar características peculiares em relação aos cromossomos sexuais gigantes e assinápticos. O genoma eucarioto é constituído de heterocromatina que contém vários tipos de DNA repetitivos e são importantes na sua estrutura e atividade, assim como na evolução cromossômica. A Pintura Cromossômica é uma técnica que utiliza sondas produzidas por DOP-PCR, e é usada para evidenciar rearranjos e homeologias de uma espécie, mas ela também pode mapear DNA repetitivo. O objetivo deste trabalho foi descrever a nova espécie *Alagoasa neoequestris*, utilizando estudos citogenéticos, morfológicos e moleculares, incluindo análise filogenética com as espécies semelhantes, conferindo um nome científico próprio, e mapear DNAs repetitivos obtidos pela DOP-PCR e mapeados pela técnica de Pintura Cromossômica em *Omophoita communis*. A espécie *Alagoasa neoequestris* possui características morfológicas que validam a posição taxonômica dentro do gênero. O padrão elitral não foi encontrado em outras espécies do gênero. A comparação da genitália masculina com outras espécies do gênero mostrou diferenças que sugerem isolamento reprodutivo. O número cromossômico  $2n=22$  e sistema sexual Xy com cromossomos gigantes e assinápticos é representativo da subtribo. A variação da morfologia cromossômica encontrada e a localização de heterocromatina constitutiva em três bivalentes estão associadas com diferenciações cariotípicas do gênero. Os cístrons rDNA 45S e 5S sintênicos e colocalizados em um par autossômico é considerada característica ancestral para Coleoptera. A análise filogenética agrupou *A. neoequestris* dentro do gênero *Alagoasa*, num ramo com *Alagoasa plaumanni*, e separada de *O. communis* e *O. equestris*, que são morfológicamente semelhantes. Na literatura há uma espécie denominada “*Alagoasa equestris*” descrita citogeneticamente com número cromossômico  $2n=12$ . Além disso, essa espécie é morfológicamente muito semelhante a *Omophoita communis* e *Omophoita equestris*. Os resultados obtidos no nosso trabalho discordam daqueles descritos na literatura para “*A. equestris*”. Esse número cromossômico de  $2n=12$  é igual ao número descrito para *O. communis*, e sugere que “*A. equestris*” possa ter sido confundida com *O. communis* durante tal estudo. Com base nisso e nas análises de relação filogenética, a espécie estudada no nosso trabalho é uma nova espécie de *Alagoasa* do sul do Brasil, suportado por taxonomia integrativa. A hibridação da sonda em *O. communis* evidenciou marcações centroméricas em todos os autossomos e na região pericentromérica do cromossomo sexual X e intersticial no sexual y sem o uso de competidor. Essas marcações são correspondentes a localização de heterocromatina com Bandas-C em Coleoptera e também em Oedionychina. O uso de 30 µg de competidor, padrão para pintura cromossômica, inibiu todas as hibridações confirmando que a sonda contém sequências repetitivas. Possivelmente estas sequências do genoma foram amplificadas em maioria pela DOP-PCR, como também já foi observado em outros trabalhos com Pintura Cromossômica. Apesar disso, ainda são necessários mais estudos com outras técnicas para complementar os resultados de caracterização de DNA repetitivo em *O. communis*.

**Palavras-Chave:** Taxonomia, citogenética, genética molecular, DNA repetitivo, Pintura Cromossômica.

## ABSTRACT

The Coleoptera order represents 40% of the described insects and includes the subfamily Alticinae, which has a complex taxonomic hierarchy and many cases of mimicry which makes this categorization more difficult. The subtribe Oedionychina has been studied with a cytogenetic approach due its peculiar characteristics about the giant and asynaptic sex chromosomes. The eukaryotic genome consists of heterochromatin that contains various types of repetitive DNA and have an important in its structure and activity, and chromosomal evolution. Chromosome Painting is a technique that uses probes produced by DOP-PCR, and is used to highlight rearrangements and homeologies of species, but it can also map repetitive DNA. The aim of this work was to describe the new specie *A. neoequestris*, using cytogenetic, morphological and molecular studies, including phylogenetic analysis with similar species, given it a scientific name, and map repetitive DNAs obtained by DOP-PCR and mapped by the technique of Chromosome Painting in *Omophoita communis*. The specie *Alagoasa neoequestris* has morphological features that validate its taxonomic position within the genus. Other species of the genus did not have the elytral pattern found. Comparison of the male genitalia with other species of the genus showed differences that suggest reproductive isolation. The chromosomal number  $2n=22$  and Xy sex determination system with giant and asynaptic sex chromosomes is representative of the subtribe. The variation in chromosomal morphology found and the location of constitutive heterochromatin in three bivalents are associated with karyotype differentiation of the genus. The 45S and 5S rDNA cistrons, colocalized in one autosomal pair is considered ancestral for Coleoptera. Phylogenetic analysis grouped *A. neoequestris* within the genus *Alagoasa*, in a branch with *Alagoasa plaumanni*, and separated from *O. communis* and *O. equestris*. In the literature, are individuals identified as "*Alagoasa equestris*" with chromosome number  $2n=12$  morphologically similar to *Omophoita communis* and *Omophoita equestris*. The results obtained in this study disagree with those described in the literature for "*A. equestris*" described as  $2n=12$ . This chromosomal number of "*A. equestris*" is equal to the number described for *O. communis* and suggests that "*A. equestris*" may have been confused with *O. communis* during that study. Based on this and in the analysis of the phylogenetic relationship, the species studied in this paper is a new specie of the genus in southern Brazil, supported by integrated taxonomy. The hybridization of the probe in *O. communis* showed centromeric markings in all autosomes and in the pericentromeric region of the X sex chromosome and interstitial of y chromosome. These markings correspond to the location of C-banded heterochromatin in Coleoptera and also in Oedionychina. The use of 30  $\mu\text{g}$  competitor, standard for chromosome painting, inhibited all hybridizations confirming that the probe contains repetitive sequences. Possibly these sequences in the genome were mostly amplified by DOP-PCR, as has also been observed in other work with Chromosome Painting. Nevertheless, further studies are still needed with techniques that complement the results of characterization repetitive DNA in *O. communis*.

**Keywords:** Taxonomy, cytogenetics, molecular genetics, repetitive DNA, chromosome painting.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Espécies analisadas no trabalho.....	28
<b>Figura 2</b> - Morfologia externa de <i>A. neoequestris</i> .....	47
<b>Figura 3</b> - Lobo Médio e ilustração de <i>A. neoequestris</i> . ....	47
<b>Figura 4</b> - Células meióticas de <i>A. neoequestris</i> coradas em Giemsa. ....	48
<b>Figura 5</b> - Células meióticas de <i>A. neoequestris</i> submetidas à técnica de obtenção de Bandas-C. ....	49
<b>Figura 6</b> - Metáfases meióticas de <i>A. neoequestris</i> submetidas à FISH.....	50
<b>Figura 7</b> - Árvore Consenso das sequências gênicas concatenadas .....	52
<b>Figura 8</b> - Sonda Autossômica de <i>Omophoita communis</i> 3BP+2DM .....	64
<b>Figura 9</b> - Sonda autossômica de <i>Omophoita communis</i> hibridada sem competidor.....	65
<b>Figura 10</b> - Sonda autossômica de <i>Omophoita communis</i> hibridada com 5 ug de competidor.....	66

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>13</b>
1.1	SUBFAMÍLIA ALTICINAE.....	15
1.2	DNA REPETITIVO.....	19
1.3	TAXONOMIA INTEGRATIVA.....	23
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....</b>	<b>26</b>
2.1	JUSTIFICATIVA.....	26
2.2	OBJETIVOS.....	27
2.2.1	Objetivo Geral.....	27
2.2.2	Objetivos Específicos.....	27
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>28</b>
3.1.	MATERIAL BIOLÓGICO E LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA.....	28
3.2	MÉTODOS.....	28
3.2.1	Análise Morfológica.....	28
3.2.2	Citogenética Convencional.....	29
3.2.2.1	Bandas-C.....	30
3.2.3	Citogenética Molecular.....	30
3.2.3.1	Hibridação <i>in situ</i> Fluorescente (FISH).....	30
3.2.4	Genética Molecular.....	31
3.2.4.1	Extração de DNA.....	31
3.2.4.2	Amplificação dos <i>genes</i> COI e rDNA 28S.....	32
3.2.4.3	Análise filogenética.....	33
3.2.5.	Microdissecção Cromossômica, Amplificação e Marcação da Sonda.....	34
3.2.6	Obtenção de C0T-PCR.....	35
3.2.7	Pintura Cromossômica.....	36
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>38</b>
4.1	ARTIGO 1 - DESCRIÇÃO DE UMA NOVA ESPÉCIE DO GÊNERO <i>Alagoasa</i> DO SUL DO BRÁSIL ( <i>Alagoasa neoequestris</i> ) (CHRYSOMELIDAE, ALTICINAE): CARACTERIZAÇÃO COM O USO DE TAXONOMIA INTEGRATIVA.....	39
4.1.1	Introdução.....	40
4.1.2	Material e Métodos.....	42
4.1.3	Resultados.....	44
4.1.3.1	Descrição morfológica.....	44

4.1.3.2	Caracterização citogenética.....	48
4.1.3.3	Genética molecular.....	51
4.1.4	Discussão.....	52
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>57</b>
4.2	ARTIGO 2 - OBTENÇÃO DE DNA REPETITIVO A PARTIR DE DOP-PCR MAPEADO POR PINTURA CROMOSSÔMICA EM <i>Omophoita communis</i> BECHYNÉ, 1959 (CHRYSOMELIDAE, ALTICINAE).....	58
4.2.1	Introdução.....	59
4.2.2	Material e Métodos.....	61
4.2.3	Resultados.....	63
4.2.4	Discussão.....	66
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>69</b>
5	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>70</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>71</b>
	<b>APÊNDICES.....</b>	<b>85</b>
	<b>APÊNDICE A - ESPÉCIES E SEUS NÚMEROS DE ACESSO NO GENBANK UTILIZADAS PARA AS ANÁLISES FILOGENÉTICAS.....</b>	<b>85</b>
	<b>APÊNDICE B - TABELA COM AS ESPÉCIES DO GÊNERO ALAGOASA ANALISADAS MORFOLOGICAMENTE.....</b>	<b>86</b>
	<b>APÊNDICE C - DISTÂNCIA INTERESPECÍFICA CALCULADA COM KIMURA 2-PARAMETER E BOOTSTRAP DE 1000 INTERAÇÕES NO SOFTWARE MEGA 11.....</b>	<b>97</b>
	<b>APÊNDICE D - ÁRVORE OBTIDA UTILIZANDO AS SEQUÊNCIAS GÊNICAS CONCATENADAS GERADAS POR MEIO DA ANÁLISE DE MAXIMUM LIKELIHOOD E BOOTSTRAP COM 5000 INTERAÇÕES. MODELO EVOLUTIVO GENERAL TIME REVERSIBLE + GAMMA DISTRIBUTION (GTR+G).....</b>	<b>97</b>
	<b>APÊNDICE E - ÁRVORE OBTIDA UTILIZANDO AS SEQUÊNCIAS GÊNICAS CONCATENADAS GERADAS POR MEIO DA ANÁLISE DE MAXIMUM PARSIMONY E BOOTSTRAP COM 5000 INTERAÇÕES.....</b>	<b>98</b>
	<b>APÊNDICE F - ÁRVORE OBTIDA UTILIZANDO AS SEQUÊNCIAS GÊNICAS CONCATENADAS GERADAS POR MEIO DA ANÁLISE DE NEIGHBOR-JOINING E BOOTSTRAP COM 5000 INTERAÇÕES. MODELO EVOLUTIVO KIMURA 2-PARAMETER.....</b>	<b>98</b>

<b>ANEXOS.....</b>	<b>97</b>
<b>ANEXO A - PROTOCOLO PARA DISSECAÇÃO DAS GENITÁLIAS SEGUINDO SMITH (1979), COM MODIFICAÇÕES.....</b>	<b>99</b>
<b>ANEXO B - EXTRAÇÃO DOS TESTÍCULOS SEGUINDO ALMEIDA, ZACARO E CELLA (2000), COM MODIFICAÇÕES.....</b>	<b>99</b>
<b>ANEXO C - PROTOCOLO PARA PREPARAÇÃO CITOLÓGICAS E COLORAÇÃO COM GIEMSA 3%.....</b>	<b>99</b>
<b>ANEXO D - PROTOCOLO PARA OBTENÇÃO DE BANDAS-C SEGUINDO FÉRNANDEZ <i>et al.</i> (2002), COM MODIFICAÇÕES.....</b>	<b>100</b>
<b>ANEXO E - PROTOCOLO DE PCR PARA MARCAÇÃO DAS SONDAS RDNA 18S E 5S SEGUINDO ALMEIDA <i>et al.</i> (2010).....</b>	<b>100</b>
<b>ANEXO F - PROTOCOLO PARA FISH SEGUINDO PINKEL, STRAUME E GRAY (1986), COM MODIFICAÇÕES. PARA 10 LÂMINAS.....</b>	<b>102</b>
<b>ANEXO G - SOLUÇÕES USADAS NO PROTOCOLO DE FISH.....</b>	<b>105</b>
<b>ANEXO H - EXTRAÇÃO DE DNA COM CTAB SEGUINDO MURRAY E THOMPSON (1980), COM MODIFICAÇÕES.....</b>	<b>106</b>
<b>ANEXO I - PROTOCOLO DE PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DO <i>GENE</i> CITOCROMO OXIDASE I (COI).....</b>	<b>107</b>
<b>ANEXO J - PROTOCOLO DE PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DO <i>GENE</i> DE DNA RIBOSSOMAL 28S. ....</b>	<b>108</b>
<b>ANEXO K - PROTOCOLO PINTURA CROMOSSÔMICA ADAPTADO PARA <i>Omophoita communis</i>.....</b>	<b>109</b>

## 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os besouros são muito conhecidos por serem abundantes e ocuparem vários habitats, como ambientes de água doce e alguns materiais em decomposição, além de serem muito diversos morfologicamente (GULLAN; CRASTON, 2017; MCKENNA *et al.*, 2015). Esses indivíduos pertencem a classe Insecta e correspondem à aproximadamente 40% dos insetos descritos, com cerca de 390.000 espécies, das quais aproximadamente 33.000 são encontradas no Brasil (GULLAN; CRASTON, 2017; SEKERKA *et al.*, 2021a). Duas são as possíveis explicações para a diversidade dessa ordem, a primeira é que os indivíduos são holometábolos e especialistas, o que permitiu a exploração de diferentes nichos; e a segunda é devido a seu tempo de vida na terra, com relatos do ancestral pertencente à grupo extinto do antigo permiano, há cerca de 280 milhões de anos, o que possibilitou uma alta taxa de diversificação (MCKENNA *et al.*, 2015; RAFAEL *et al.*, 2012).

A ordem Coleoptera possui aproximadamente 4.880 espécies analisadas citogeneticamente (BLACKMON; DEMUTH, 2015), a maioria apresenta cromossomos metacêntricos (PETITPIERRE, 1996; SMITH; VIRKKI, 1978) variando em número cromossômico e sistema de determinação sexual (VIRKKI, 1970). O menor número diploide encontrado foi em *Chalcolepidius zonatus* (Elateridae), com  $2n=4$  (FERREIRA *et al.*, 1984) e o maior número em *Xanthogaleruca luteola* (Chrysomelidae), com  $2n=72$  (LORITE *et al.*, 2003). A razão pela qual ocorre essa variação no número cromossômico dentro de Coleoptera tem sido explicada por fissões cêntricas seguidas de inversões pericêntricas (FERREIRA *et al.*, 1984; SMITH; VIRKKI, 1978; VIRKKI, 1963, 1967). Uma das subordens de Coleoptera é Polyphaga, cujo cariótipo basal é considerado  $2n=20=9II+Xyp$ , nessa associação dos cromossomos sexuais o cromossomo y é muito pequeno, comparado ao cromossomo X, e quando emparelham formam uma associação parecida com um paraquedas (BLACKMON; DEMUTH, 2015; PETITPIERRE *et al.*, 1988; SMITH; VIRKKI, 1978; VIRKKI, 1968).

Dentro de Polyphaga encontra-se a família Chrysomelidae, cujo significado traduzido do grego é “portador de cor” e seus besouros são conhecidos como besouros folha (*leaf beetles*), constituindo aproximadamente 40.000 espécies descritas (NIE *et al.*, 2019; PETITPIERRE, 1988; SEKERKA *et al.*, 2021b). As espécies são agrupadas em 12 subfamílias (HADDAD; MCKENNA, 2016), sendo que no Brasil foram descritas cerca de 6.000 espécies (SEKERKA *et al.*, 2021b). A maioria

dos crisomelídeos é fitófago e possui interações especializadas com plantas, devido a isso, eles representam um importante papel na biodiversidade e no controle biológico em relação a pragas (HADDAD; MCKENNA, 2016; JOLIVET, 1988; PETITPIERRE, 1997).

Alguns estudos apontam que a ausência do voo contribui para uma área de distribuição menor e pode influenciar uma rápida diversificação por alopatria, o que poderia explicar a divergência do número cromossômico, como por exemplo, nos gêneros *Timarcha* e *Chrysolina* (PETITPIERRE, 1988; ROFF, 1994). Por outro lado, espécies que possuem a capacidade de voar ou saltar eficientemente conseguem se dispersar mais, o que poderia explicar a alta taxa de conservadorismo no número cromossômico, como por exemplo no gênero *Longitarsus* (PETITPIERRE, 1988; SHUTE, 1980).

O cariótipo basal de Chrysomelidae é considerado  $2n=24=11II+Xyp$ , e esta família possui o número cromossômico mais diversificado entre todas as outras (PETITPIERRE *et al.*, 1988; SEGARRA; PETITPIERRE, 1982; SMITH; VIRKKI, 1978; VAIO; POSTIGLIONI, 1974), variando de  $2n=6=2II+neoXY$  em *Homoschema latitarsus* (PETITPIERRE, 1996) até  $2n=72=35II+Xyp$  em *Xanthogaleruca luteola* (LORITE *et al.*, 2003). Essa variação também é explicada por fissões cêntricas (FERREIRA *et al.*, 1984; PETITPIERRE, 1988) que são encontradas principalmente nas subfamílias Galerucinae, Chrysomelinae e Alticinae. Outros estudos apontam que muitos momentos da evolução cariotípica dessas subfamílias ocorreram por rearranjos cromossômicos, e sugerem que cariótipos com mais de 15 cromossomos haploides seriam altamente derivados, e que espécies com um número cromossômico muito pequeno são relacionadas a fusões cêntricas (PETITPIERRE, 1988; PETITPIERRE; SEGARRA; JUAN, 1993; VIRKKI, 1988).

Análises citogenéticas foram feitas em aproximadamente 940 espécies de Chrysomelidae (BLACKMON; DEMUTH, 2015) e a maior parte dos cromossomos são metacêntricos, submetacêntricos e apresentam pouca quantidade de heterocromatina (ROŽEK *et al.*, 2004; SMITH; VIRKKI, 1978). Também é possível notar uma grande variabilidade no sistema de determinação sexual dessa família, apesar da maioria das espécies possuir o sistema sexual Xyp, considerado ancestral de Polyphaga (SMITH; VIRKKI, 1978). Algumas espécies possuem o sistema sexual X0, encontrados em Galerucinae e Chrysomelinae, na qual o y diminuto foi perdido durante o processo evolutivo (PETITPIERRE *et al.*, 1988). O sistema Xy ocorre em algumas espécies e



XY e NeoXY na minoria dos crisomelídeos (PETITPIERRE, 1988; SMITH; VIRKKI, 1978). Essa variação no sistema sexual pode ser resultado dos rearranjos que ocorreram e alteraram a associação dos cromossomos sexuais (DUTRILLAUX; DUTRILLAUX, 2009). Apesar de Chrysomelidae apresentar variabilidade cariotípica, são poucos os números de espécies analisadas pela citogenética quando comparado ao número total de espécies descritas, e isso é refletido na classificação desses organismos que por vezes é sem consenso entre os autores, pois a maior parte das relações filogenéticas se baseia fortemente em caracteres morfológicos (GÓMEZ-ZURITA; HUNT; VOGLER, 2008).

### 1.1 SUBFAMÍLIA ALTICINAE

Uma das subfamílias de Chrysomelidae mais rica em números de gêneros e espécies na região Neotropical é o grupo Alticinae, que possui aproximadamente 10 mil espécies descritas (TRIPLEHORN; JOHNSON, 2011). Uma das explicações dessa diversidade se deve ao isolamento da América do Sul que ocorreu por aproximadamente 100 milhões de anos e possibilitou a especiação e adaptação a novos nichos (SCHERER, 1988). A maioria dos gêneros encontrados nessa região é endêmico, e o sul e sudeste do Brasil são ricos em estudos deste grupo; os alticines também são considerados especializados em sua planta hospedeira e são pragas agrícolas em potencial (JOLIVET, 1988), representando uma importância econômica.

A principal característica dos alticines é o fêmur dilatado com a presença da mola metafemoral interna, permitindo a realização de saltos ágeis, e conferindo-os o nome popular de besouros pulga (*flea beetles*) (FURTH, 1988). Essa mola é utilizada como um hábito de defesa secundário, e isso pode ter contribuído para a diversificação do grupo (GE *et al.*, 2011). O uso dessa característica que é evolutivamente convergente e do fêmur dilatado como base na classificação filogenética para diferenciação Alticinae-Galerucinae nos primeiros estudos, pode ter propiciado a confusão taxonômica que envolve o grupo (GE *et al.*, 2011). Alguns autores como Duckett; Gillespie e Kjer (2004) e Nadein e Bezdek (2014) dividem Galerucinae em Galerucinae Lato Sensu (s.l) e Galerucinae Stricto Sensu (s.s), e consideram Alticini como uma tribo dentro de Galerucinae s.l. na qual também estão incluídos os galerucíneos s.s. Tradicionalmente, outros autores a consideram como uma subfamília, Alticinae, separada da subfamília Galerucinae s.s. (BOUCHARD *et al.*, 2011; HADDAD; MCKENNA, 2016), como será referida neste trabalho.

Essa subfamília possui em torno de 230 espécies analisadas pela citogenética, e o aumento destes estudos é um fator que pode contribuir para esclarecer suas relações filogenéticas (PETITPIERRE, 2006; SMITH; VIRKKI, 1978; VIRKKI, 1988). Algumas de suas espécies possuem o número cromossômico conservado, sendo este  $2n=22$  com fórmula meiótica  $2n=10II+X+y$  (PETITPIERRE *et al.*, 1988; SMITH; VIRKKI, 1978; VIRKKI; SANTIAGO-BLAY; CLARK, 1991). Outras espécies apresentam pluralidade de números e sistemas cromossômicos (PETITPIERRE *et al.*, 1988; VIRKKI, 1988), bem como a diferença no tamanho e no comportamento dos cromossomos sexuais. Exemplos dessa variação estão na movimentação dos cromossomos sexuais ligeiramente atrás dos autossomos durante a anáfase, a ausência de sinapse entre eles devido a perda da homologia; porém com a presença da segregação regular (ALMEIDA *et al.*, 2010; MELLO *et al.*, 2014; VIRKKI, 1972, 1988; WILSON; FORER; WISE, 2003).

Tais características tornam Alticinae diferente entre os outros Coleoptera e um interessante grupo para estudo citogenético (ALMEIDA *et al.*, 2010; JOLIVET, 1988; VIRKKI, 1963; VIRKKI; SANTIAGO-BLAY; CLARK, 1991). Virkki (1963) sugeriu que a incorporação de heterocromatina, provinda de autossomos, em cromossomos sexuais e o aumento do número de autossomos por fissões são eventos que podem explicar a evolução cariotípica dessa subfamília. Dessa forma, a ampliação de métodos de estudos cariotípicos e genéticos poderia ajudar na compreensão destes processos evolutivos do genoma de Alticinae (ALMEIDA *et al.*, 2010).

Dentre as várias tribos que compõem Alticinae, destaca-se Oedionychini, considerada a mais derivada (BECHYNÉ; BECHYNÉ, 1966) e subdivida em duas subtribos: Disonychina considerada Neotropical e Oedionychina considerada Pantropical com representantes neotropicais (BECHYNÉ; BECHYNÉ, 1966; VIRKKI; SANTIAGO-BLAY; CLARK, 1991). Disonychina apresenta variações inter e intraespecífica em relação ao número diploide em algumas espécies analisadas, com números cromossômicos variando de  $2n=29$  até  $2n=64$ , em sua maioria metacêntricos com variáveis tipos de associações entre os cromossomos sexuais (SMITH; VIRKKI, 1978; VIRKKI, 1970, 1988).

Oedionychina é considerada uma subtribo recente, cujo número cromossômico mais frequente é  $2n=22=10II+X+y$  (ALMEIDA; CAMPANER; CELLA, 2009; VIRKKI, 1963, 1970, 1988) e apresenta cromossomos sexuais considerados gigantes (GÓMEZ-ZURITA; HUNT; VOGLER, 2008; VIRKKI; SANTIAGO-BLAY,

1993). Os membros dessa subtribo recebem uma atenção especial em relação ao número de trabalhos publicados, como os gêneros *Omophoita* e *Alagoasa* (ALMEIDA *et al.*, 2010; ALMEIDA; CAMPANER; CELLA, 2009; AZAMBUJA *et al.*, 2020; MELLO *et al.*, 2014; SMITH; VIRKKI, 1978; VIRKKI; SANTIAGO-BLAY, 1993; WOLSKI *et al.*, 2021).

O gênero *Omophoita* possui 83 espécies descritas taxonomicamente para o Brasil (SEKERKA *et al.*, 2021c) e somente cerca de 17 espécies desse gênero foram analisadas sob o ponto de vista citogenético (BLACKMON; HEATH; DEMUTH, 2015). Essas análises evidenciam que alguns indivíduos deste gênero apresentam variações intraespecíficas, e são identificados morfológicamente pela presença de uma mácula branca no vértice (MELLO *et al.*, 2014; ZEN; LINZMEIER, 2020). O gênero *Alagoasa* apresenta 65 espécies registradas para o Brasil, com cerca de 29 espécies estudadas citogeneticamente, considerado o grupo mais estudado (BLACKMON; DEMUTH, 2015; SEKERKA *et al.*, 2021d). *Alagoasa* possui muitas espécies aposemáticas e miméticas, tornando a identificação específica um processo complexo e rigoroso, havendo necessidade de junção de estudos moleculares, morfológicos, e genéticos para contribuir aos estudos taxonômicos (AZAMBUJA *et al.*, 2020; DUCKETT; DAZA, 2004; SCHLICK-STEINER *et al.*, 2010). A identificação do gênero é dada morfológicamente pela presença de quatro cerdas labrais dispostas horizontalmente, pronoto e élitros transversos, metafêmur em formato “D”, e os metatarsômeros distais globosos (SCHERER, 1983).

Os cromossomos sexuais gigantes e assinápticos são considerados exclusivos dessa subtribo (ALMEIDA; CAMPANER; CELLA, 2009; SEGARRA; PETITPIERRE, 1982). Eles podem possuir metade do genoma da espécie, e apesar da ausência de homologia, apresentam segregação regular (ALMEIDA *et al.*, 2010; ALMEIDA; CAMPANER; CELLA, 2009; SMITH; VIRKKI, 1978; VIRKKI, 1972, 1988). A formação desses cromossomos possivelmente é decorrente de rearranjos cromossômicos, como duplicações e translocações de heterocromatina autossômica, DNA repetitivo e elementos transponíveis (MELLO *et al.*, 2014; ROSOLEN; VICARI; ALMEIDA, 2018). Os últimos sendo apontados como responsáveis pelo aumento de tamanho e a perda de homologia, como observado em algumas espécies do gênero *Omophoita* (MELLO *et al.*, 2014; ROSOLEN; VICARI; ALMEIDA, 2018; SMITH; VIRKKI, 1978; VIRKKI, 1970, 1971, 1988).

Os representantes da subtribo analisados por meio da citogenética

apresentam diferentes morfologias dos autossomos, por exemplo: *Omophoita clerica* e *Omophoita cyanipennis* possuem todos metacêntricos (SMITH; VIRKKI, 1978; VIRKKI, 1970); *Omophoita magniguttis* e *Omophoita octoguttata* apresentam todos acrocêntricos (ALMEIDA; CAMPANER; CELLA, 2009); *Omophoita personata* apresenta dois pares acrocêntricos e dezoito metacêntricos, *Omophoita sexnotata* possui quatro pares acrocêntricos e dezesseis metacêntricos e *Alagoasa pantina* apenas um par acrocêntrico com os outros variando entre meta e submetacêntrico (ALMEIDA; CAMPANER; CELLA, 2009; AZAMBUJA *et al.*, 2020). *Paranaita opima* apresenta três pares submetacêntricos e sete metacêntricos, *Alagoasa areata*, *Alagoasa scissa* e *Omophoita communis* também apresentam autossomos metacêntricos e submetacêntricos (ALMEIDA; CAMPANER; CELLA, 2006; AZAMBUJA *et al.*, 2020; WOLSKI *et al.*, 2021).

Os cromossomos sexuais também possuem variação de morfologia e tamanho entre eles, por isso denominados X e y ou X e Y (sem diferença de tamanho) por exemplo: em *O. communis* o X é metacêntrico e y acrocêntrico (WOLSKI *et al.*, 2021); *O. octoguttata*, *O. magniguttis*, *O. personata*, *P. opima* e *A. scissa* tem X e Y metacêntricos (ALMEIDA; CAMPANER; CELLA, 2006; ALMEIDA *et al.*, 2010; AZAMBUJA *et al.*, 2020); *Omophoita aequinoctialis* e *A. pantina* tem X metacêntrico e y subtlocêntrico (AZAMBUJA *et al.*, 2020; GOLL *et al.*, 2018); *A. areata* tem sexual X e y subtlocêntricos (AZAMBUJA *et al.*, 2020).

Os cromossomos metacêntricos são considerados ancestrais de Coleoptera, e essas variações na morfologia cromossômica encontradas dentro de Oedionychina vem sendo relacionada com inversões pericêntricas, modificando a condição metacêntrica para acrocêntrica (ALMEIDA; CAMPANER; CELLA, 2009; GOLL *et al.*, 2018; SEGARRA; PETITPIERRE, 1988; SMITH; VIRKKI, 1978; VIRKKI, 1988). Além disso, também foi observada a tendência na redução do número cromossômico dentro dessa subtribo a partir do cariótipo ancestral de Chrysomelidae, por meio de rearranjos cromossômicos (SMITH; VIRKKI, 1978). Em *Walterianella* sp., *Omophoita abbreviata* e *P. opima* sugere-se a ocorrência de fusão, e em *O. aequinoctialis* também se supõe uma inversão pericêntrica além da fusão (ALMEIDA; CAMPANER; CELLA, 2006; GOLL *et al.*, 2018). Todas essas espécies tiveram seu número cromossômico reduzido para  $2n=22$ , como encontrado na maioria das espécies da subtribo (ALMEIDA; CAMPANER; CELLA, 2006; GOLL *et al.*, 2018; PETITPIERRE, 2006; VIRKKI, 1970).

As fusões cêntricas são atribuídas como responsáveis pela redução do número cariotípico de  $2n=22$  para  $2n=18$  em *Oedionychus limbatus* (PETITPIERRE, 2006), bem como em *O. communis* reduzindo para  $2n=12$  (WOLSKI *et al.*, 2021), em *Asphaera clerica* reduzindo para  $2n=7$  (VIRKKI; SANTIAGO-BLAY, 1993), em *Alagoasa parana* reduzindo para  $2n=16$  (SMITH; VIRKKI, 1978), e em *Asphaera octopunctata* e *Asphaera "pauperata-like"* reduzindo para  $2n=18$  por 2 fusões cêntricas (PETITPIERRE *et al.*, 1988; SMITH; VIRKKI, 1978; VIRKKI; SANTIAGO-BLAY, 1993). Ademais, tem sido indicada uma possível relação entre a diminuição do número autossômico e o aumento de tamanho dos bivalentes autossômicos devido as fusões cêntricas, principalmente por esse rearranjo envolver cromossomos ou braços cromossômicos inteiros (ELDER; HSU, 1988; SEGARRA; PETITPIERRE, 1988).

Cromossomos B também são observados em Oedionychina, estes possivelmente sendo fragmentos resultantes de fissões cariotípicas (SMITH; VIRKKI, 1978; VIRKKI; SANTIAGO-BLAY, 1993). No gênero *Omophoita* foi observado a sua presença na espécie *O. aequinoctialis* (GOLL *et al.*, 2018). Em *Alagoasa*, foram observados em *Alagoasa arcifera*, *Alagoasa fasciaticollis*, *Alagoasa transparente* e *Alagoasa oblecta* (SEGARRA; PETITPIERRE, 1988; SMITH; VIRKKI, 1978; VIRKKI; SANTIAGO-BLAY, 1993).

## 1.1 DNA REPETITIVO

A heterocromatina presente nos cromossomos eucarióticos é formada por diversos tipos de DNA com sequências repetitivas, como DNA satélite (satDNA), elementos transponíveis (TEs) e as famílias multigênicas (CHARLESWORTH; SNIEGOWSKI; STEPHAN, 1994; SUMNER, 2003). Essas últimas são representadas pelo cluster 45S, que codifica os genes ribossômicos (rDNA) 28S, 18S e 5.8S, pela família gênica 5S, que codifica o gene (rDNA) 5S (CABRAL-DE-MELLO *et al.*, 2011; LONG; DAWID, 1980). Esses DNAs repetitivos possuem importantes papéis na estrutura, atividade dos genomas e na evolução cromossômica (CABRAL-DE-MELLO *et al.*, 2011; ROŽEK *et al.*, 2004; SUMNER, 2003).

A heterocromatina constitutiva é identificada nos cromossomos pela técnica de obtenção de Bandas-C, uma das primeiras técnicas usadas para estudar a heterocromatina, que na Ordem Coleoptera revelou ser predominante na região centromérica dos autossomos e na região pericentromérica dos cromossomos sexuais (ROŽEK *et al.*, 2004). Atualmente, existem outras técnicas que permitem estudar toda

a composição de heterocromatina por meio de Hibridação *in situ* Fluorescente, tais como: DNA altamente repetitivo (C0t-1; C0t-PCR); DNA microssatélite; sequências teloméricas; sondas de DNA ribossomal, *genes* de histonas e elementos transponíveis tais como TC1/*mariner* (ALMEIDA *et al.*, 2010; AZAMBUJA *et al.*, 2020; CABRAL-DE-MELLO *et al.*, 2011; CHOWDHARY; RAUDSEEP, 2001; GOING; GUSTERSON, 1999; GOLL *et al.*, 2018; MELLO *et al.*, 2014; ROSOLEN; VICARI; ALMEIDA, 2018). Além disso, análises com dados de sequenciamento pela bioinformática também estão sendo usadas para analisar a composição de todo o conjunto de DNA satélite (satelitoma) de diversas espécies (MORA *et al.*, 2020; PALACIOS-GIMENEZ *et al.*, 2017).

A pintura cromossômica é uma técnica que permite evidenciar rearranjos cromossômicos que ocorreram durante a evolução cariotípica das espécies analisadas, portanto é uma ferramenta muito útil na identificação de homeologias (CHOWDHARY; RAUDSEEP, 2001; GOING; GUSTERSON, 1999; SCHUBERT *et al.*, 2001). Para a aplicação desta técnica, são obtidas sondas por meio de uma Reação em Cadeia da DNA Polimerase utilizando *primer* degenerado (DOP-PCR), e muitos estudos tem obtido sequências repetitivas devido a DOP-PCR amplificar predominantemente tais sequencias (HARVEY *et al.*, 2003; LIU *et al.*, 1999; LO *et al.*, 2009; PICCOLI, BARDELLA, CABRAL-DE-MELLO, 2018). Isso ocorre principalmente em insetos que são caracterizados por possuírem muito DNA repetitivo no genoma, havendo a possibilidade de utilizá-la para caracterização de DNA repetitivo (FUKOVÁ *et al.*, 2007; PITA *et al.*, 2016; TERUEL *et al.*, 2009; WILLHOEFT; MUELLER-NAVIA; FRANZ, 1998).

Em Oedionychina, as espécies analisadas com a técnica de obtenção de Bandas-C mostraram predominância da localização da heterocromatina na região pericentromérica dos autossomos, como em *O. personata*, *O. aequinoctialis* e *O. octoguttata* (ALMEIDA; CAMPANER; CELLA, 2009; GOLL *et al.*, 2018; VIRKKI, 1983). Por outro lado, *O. magniguttis* e *O. sexnotata* apresentaram marcações puntiformes na região centromérica da maioria dos autossomos, e *O. aequinoctialis* (citótipo 1) e *O. abbreviata* mostraram pequena quantidade de heterocromatina na região pericentromérica e centromérica dos autossomos (ALMEIDA; CAMPANER; CELLA, 2009; GOLL *et al.*, 2018).

Os cromossomos sexuais das espécies citadas acima tiveram padrões variáveis de heterocromatina, por exemplo, *O. magniguttis* na região pericentromérica

do sexual X e *O. sexnotata* na região centromérica/pericentromérica do sexual X e y, com pontuações na região intersticial de um braço cromossômico (ALMEIDA; CAMPANER; CELLA, 2009). *P. opima* apresentou marcações na região intersticial dos braços cromossômicos de ambos os sexuais, e *O. octoguttata* na região centromérica e intersticial do sexual X e y do braço longo (ALMEIDA; CAMPANER; CELLA, 2006, 2009). *O. personata* com padrão na região centromérica do sexual X e y, com terminal em um braço e intersticial no outro, e *O. sexnotata* na região centromérica e terminal no sexual X, intersticial no braço longo e terminal no braço curto do y (ALMEIDA; CAMPANER; CELLA, 2009). Em contrapartida, um estudo recente com Bandamento C evidenciou pouca heterocromatina nos cromossomos de *O. abbreviata* (citótipo 1) e *O. aequinoctialis* (GOLL *et al.*, 2018).

Essa variação no padrão de distribuição e na intensidade de heterocromatina das espécies de *Omophoita* pode representar a diferenciação cariotípica do grupo (GOLL *et al.*, 2018). As marcações intersticiais observadas nos cromossomos sexuais podem ser heterocromatina remanescente dos cromossomos autossômicos que fusionaram aos sexuais durante a formação do sistema sexual Xy gigante (VIRKKI 1970; ALMEIDA; CAMPANER; CELLA, 2006). E, as espécies que apresentaram pouca quantidade de heterocromatina podem ter sido resultado de eliminação ocorrida por rearranjos cromossômicos (GOLL *et al.*, 2018; SMITH; VIRKKI, 1978; VIRKKI, 1988).

Estudos com fluorocromos específico para bases GC, cromomicina A3 (CMA3), e para bases AT, 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), em *P. opima* mostraram que a região centromérica é rica em sequências repetitivas AT (ALMEIDA; CAMPANER; CELLA, 2006). Um outro estudo com obtenção de DNAs altamente repetitivos (C0t-1), quando comparado à Bandas-C e DAPI positivo em *O. octoguttata*, *O. personata* e *O. sexnotata* confirmou que as regiões pericentroméricas são ricas em sequências repetitivas AT (ALMEIDA; CAMPANER; CELLA, 2009; MELLO *et al.*, 2014). Nesse estudo, devido C0t-1 ter hibridado fracamente em alguns cromossomos, os autores propuseram que a composição do DNA repetitivo nessas espécies de *Omophoita* pode variar em sequências ou classes, e que essa variação de composição e localização nos sexuais indicam diferenciação de heterocromatina entre os cromossomos dessas espécies (MELLO *et al.*, 2014). Adicionalmente, a hibridação cruzada entre espécies mostrou que grande parte do genoma é compartilhado entre as espécies com regiões conservadas e repetitivas ao longo dos autossomos e

sexuais (MELLO *et al.*, 2014). Com isso, a localização de heterocromatina se torna uma ferramenta interessante para mostrar a diferenciação cromossômica das espécies e conhecimento da evolução cariotípica em outros gêneros de Oedionychina.

A localização das Regiões Organizadoras de Nucléolo (RON) obtida por impregnação por Íon de Prata de alguns representantes de Oedionychina, coincide com os padrões de heterocromatina observados por Bandas-C (ALMEIDA; CAMPANER; CELLA, 2006; VIRKKI, 1983). Foi observado que as RON estão associadas em um par autossômico (Par 6) que contém uma constrição secundária observada em *P. opima* (ALMEIDA; CAMPANER; CELLA, 2006). Estudos com fluorocromos CMA3 e DAPI mostraram que as RON são flanqueadas por sequencia repetitiva AT na região terminal e CG na região proximal (ALMEIDA; CAMPANER; CELLA, 2006, 2009). Na ordem Coleoptera as RON estão localizadas em somente um cromossomo autossômico, sugerindo que Oedionychina apresenta essa característica ancestral (ALMEIDA *et al.*, 2010; PETITPIERRE, 1996; SCHNEIDER *et al.*, 2007).

A Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH) foi aplicada em poucos representantes da subtribo para a localização das famílias gênicas 45S e 5S, a maioria dos representantes é do gênero *Omophoita*: *O. abbreviata*, *O. octoguttata*, *O. personata*, *O. magniguttis*, *O. aequinoctialis* (citótipo 1, 2 e 3) e *O. sexnotata*. Nesses indivíduos os cístrons apresentam-se sintênicos e colocalizados em um par autossômico, com exceção de *O. magniguttis*, que apresentou em dois pares autossômicos, *O. aequinoctialis* (citótipo 2 e 3), que apresentou em três pares e *O. sexnotata* que apresentou o 5S em todos os autossomos (ALMEIDA *et al.*, 2010; AZAMBUJA *et al.*, 2020; GOLL, 2018; WOLSKI, 2014).

Com relação ao gênero *Alagoasa*, que possui o maior número de estudos citogenéticos em Oedionychina (BLACKMON; DEMUTH, 2015), ainda são poucas as espécies analisadas para a localização de heterocromatina constitutiva e das famílias gênicas 45S e 5S. Apenas *Alagoasa januarina* foi analisada para obtenção de Bandas-C, e apresentou marcações na região centromérica em três pares autossômicos e também no cromossomo sexual X (VIRKKI, 1983). Com relação a localização dos cístron ribossomais rDNA 45S e 5S, somente *A. areata*, *A. pantina* e *A. scissa* foram analisadas, e todas apresentam marcação em apenas um par autossômico com cístrons sintênicos e colocalizados (AZAMBUJA *et al.*, 2020). Isso contrasta diretamente as características do grupo irmão (*Omophoita*), pois as espécies de



*Alagoasa* não apresentam variação na localização desses cístrons (AZAMBUJA *et al.*, 2020). Essas técnicas evidenciam características importantes para o entendimento da evolução cariotípica e ampliam os conhecimentos obtidos para a subtribo, além de permitirem a visualização de divergências que não são vistas com a citogenética convencional.

A ocorrência de cístrons sintênicos e colocalizados pode ser explicada pela conservação de cada cístrons, ou com um papel funcional na organização nucleolar (CABRAL-DE-MELLO *et al.*, 2011; KAPLAN *et al.*, 1993). Em outras famílias de Coleoptera, como Tenebrionidae (GOLL *et al.*, 2015) foi descrita sintonia e colocalização dos cístrons ribossomais (rDNA) 45S e 5S, e em Scarabaeidae (CABRAL-DE-MELLO *et al.*, 2011), foram vistas associações e/ou colocalizações de outras famílias gênicas, como *genes* de histona, além da sintonia e colocalização do rDNA 45S e 5S.

A localização da família multigênica 5S, em um par autossômico é considerada uma característica basal da ordem (SCHNEIDER *et al.*, 2007), dessa maneira, os rearranjos cromossômicos que ocorrem na subtribo, também são apontados como responsáveis pela variação dos cístrons ribossomais encontradas em *O. magniguttis*, *O. aequinoctialis* (citótipo 2 e 3) e *O. sexnotata* (ALMEIDA *et al.*, 2010; GOLL, 2018; WOLSKI, 2014). Em contrapartida, o cístron 45S é muito variável em Coleoptera, variando de um a vários pares autossômicos (CABRAL-DE-MELLO *et al.*, 2011). Adicionalmente, um trabalho utilizando a técnica de Fiber-FISH em Tenebrionidae com os cístrons rDNA 45S e 5S, mostrou que eles são inter-espaçados, sintênicos e colocalizados; portanto, há a possibilidade de nas outras famílias essa característica também ocorrer, e com isso nos representantes de Oedionychina (GOLL *et al.*, 2015).

## 1.2 TAXONOMIA INTEGRATIVA

Outra característica interessante em Oedionychina é a presença de espécies crípticas e miméticas, principalmente entre indivíduos do gênero *Omophoita* e *Alagoasa*, o que dificulta a identificação e classificação destes (AZAMBUJA *et al.*, 2020; BEGOSSI; BENSON, 1988; KONSTANTINOV; PRATHAPAN; VENCL, 2018; WOLSKI *et al.*, 2021). Situações como essa requerem o uso de taxonomia integrativa, definida como uma abordagem de espécies que une vários campos de estudos a fim de que sejam complementares (SCHLICK-STEINER *et al.*, 2010).

O mimetismo pode ser considerado uma estratégia de defesa em relações de espécies palatáveis e impalatáveis (BEGOSSI; BENSON, 1988; DEL-CLARO, 1991; GE *et al.*, 2011; SHERRATT, 2008). Um exemplo disso é o possível mimetismo entre *O. octoguttata*, confirmado como impalatável por se alimentar de substâncias tóxicas, e três espécies de *Alagoasa*: *A. pantina*, *A. scissa* e *A. areata* (BEGOSSI; BENSON, 1988). Todas estas espécies possuem de três a quatro pares de manchas claras no élitro e podem ser confundidas durante a identificação; nessa relação outras espécies podem ser beneficiadas por serem morfológicamente semelhantes à *O. octoguttata* (BEGOSSI; BENSON, 1988). Outro exemplo ocorre entre *O. personata* e *Alagoasa decemguttata* que possuem três pares de manchas brancas e transversais com borda vermelha no élitro, e pronoto branco (BEGOSSI; BENSON, 1988; DEL-CLARO, 1991).

Um estudo recente utilizando taxonomia integrativa com análise de citogenética convencional, análise molecular e morfológica entre duas espécies do gênero *Omophoita* que inicialmente foram considerados citótipos da mesma espécie, mostrou grande diferenciação cariotípica, e na genitália masculina, apontando isolamento reprodutivo (WOLSKI *et al.*, 2021). Com base na reconstrução filogenética com o gene Citocromo Oxidase I (COI), os indivíduos com citótipo I foram agrupados em *Omophoita equestris* apresentando  $2n=22=10II+X+y$  com sexuais metacêntricos e a presença de alguns autossomos acrocêntricos; e os indivíduos com citótipo II foram agrupados em *O. communis* com  $2n=12=5II+X+y$ , com o y acrocêntrico e autossomos meta e submetacêntricos (WOLSKI *et al.*, 2021). Além disso, o tamanho dos cromossomos de *O. communis* é 2,5 vezes maior que o dos cromossomos de *O. equestris*.

Em relação a morfologia, elas possuem quatro manchas claras no élitro, mudando apenas levemente na coloração: o tegumento corporal de *O. communis* é marrom avermelhado e *O. equestris* é marrom escuro (WOLSKI *et al.*, 2021). Essa semelhança morfológica pode contribuir para a classificação errônea desses organismos (SAVINI, 1999; SAVINI; FURTH, 2001), por isso se faz necessário o uso de técnicas que não envolvam apenas caracteres morfológicos. O estudo realizado pela autora, aponta que a diferenciação cariotípica e genital ocorreu a partir de um ancestral comum, com sugestão de derivação do cariótipo por rearranjos cromossômicos do tipo fusão. Esse rearranjo teria levado a diminuição do número cromossômico, porém com a manutenção das características fenotípicas, dessa forma ambas são reconhecidas como espécies crípticas (WOLSKI *et al.*, 2021). Assim, essas

espécies se apresentam como um grupo interessante para estudo citogenético e molecular (WOLSKI *et al.*, 2021).

O indivíduo atribuído como “*Alagoasa equestris*” é um representante da tribo Oedionychina, muito semelhante à *O. communis* e *O. equestris* descritas acima, por apresentarem padrões elitrais com dois pares de manchas claras e coloração corporal variando em tonalidade de marrom-avermelhado. Essa espécie só foi analisada uma única vez em 1993 por Virkki e Santiago-Blay, com a caracterização do número diploide  $2n=12$ . A aparência semelhante com estas espécies de *Omophoita*, tornam a identificação delas um processo complexo, havendo a necessidade de um estudo taxonômico integrado, com análises moleculares, morfológicas, genéticas e citogenéticas na identificação taxonômica.

## 2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

### 2.1 JUSTIFICATIVA

O gênero *Alagoasa* é o que foi menos analisado por técnicas convencionais tais como Bandas-C e Hibridação *in situ* Fluorescente, apesar de possuir o maior número de estudos citogenéticos dentro de Oedionychina. Essas técnicas se mostraram importantes ferramentas para entender o processo cariotípico ocorrido nos grupos estudados (AZAMBUJA *et al.*, 2020; VIRKKI, 1983). Muitas espécies desse gênero apresentam como estratégia de defesa o mimetismo, principalmente com o gênero *Omophoita*, tornando a identificação de espécie um ato complexo que precisa envolver diferentes técnicas de estudo (BEGOSSI; BENSON, 1988; DEL-CLARO, 1991).

O indivíduo "*A. equestris*," descrito na literatura, é muito semelhante a *O. communis* e *O. equestris*, e só possui o número cariotípico descrito, sendo que as espécies de *Omophoita* foram diferenciadas com o uso de taxonomia integrativa (VIRKKI; SANTIAGO-BLAY, 1993; WOLSKY *et al.*, 2021). Por conta disso, o uso de taxonomia integrativa é interessante para estudos morfológicos com a finalidade de identificar e descrever uma nova espécie, conferindo um nome científico próprio, além de análises citogenéticas e moleculares que podem contribuir aos estudos filogenéticos e taxonômicos do grupo.

O gênero *Omophoita* tem sido frequentemente caracterizado com relação a DNA repetitivos presentes no genoma (ALMEIDA; CAMPANER; CELLA, 2009; ALMEIDA *et al.*, 2010; GOLL *et al.*, 2018; MELLO *et al.*, 2014; ROSOLEN; VICARI; ALMEIDA, 2018; VIRKKI, 1983), porém, a espécie *Omophoita communis* ainda não foi caracterizada com relação a tais DNAs, e esta possui o número cariotípico reduzido por conta de rearranjos cromossômicos (WOLSKY *et al.*, 2021). Com base nisso, a Pintura Cromossômica é uma ferramenta importante para evidenciar rearranjos e homeologias, e eventualmente DNA repetitivo presentes no genoma das espécies analisadas (CHOWDHARY; RAUDSEEP, 2001; GOING; GUSTERSON, 1999; HARVEY *et al.*, 2003; LIU *et al.*, 1999; LO *et al.*, 2009; PICCOLI; BARDELLA; CABRAL-DE-MELLO, 2018; SCHUBERT *et al.*, 2001), principalmente em insetos, tornando-a uma ferramenta alvo para estudos em *O. communis*.

## 2.2 OBJETIVOS

### 2.2.1 Objetivo Geral

Descrever a nova espécie *Alagoasa neoequestris* por meio de análise integrativa, utilizando dados morfológicos, citogenéticos e de genética molecular para auxiliar na identificação e contribuir aos estudos sistemáticos. Adicionalmente, esclarecer as relações filogenéticas de *Alagoasa neoequestris*, com *Omophoita communis* e *Omophoita equestris* que são morfológicamente semelhantes entre si, e com outras espécies do gênero e de outros gêneros relacionados. Somando-se a isso, o objetivo desse trabalho também foi mapear DNA repetitivo em *Omophoita communis*.

### 2.2.2 Objetivos Específicos

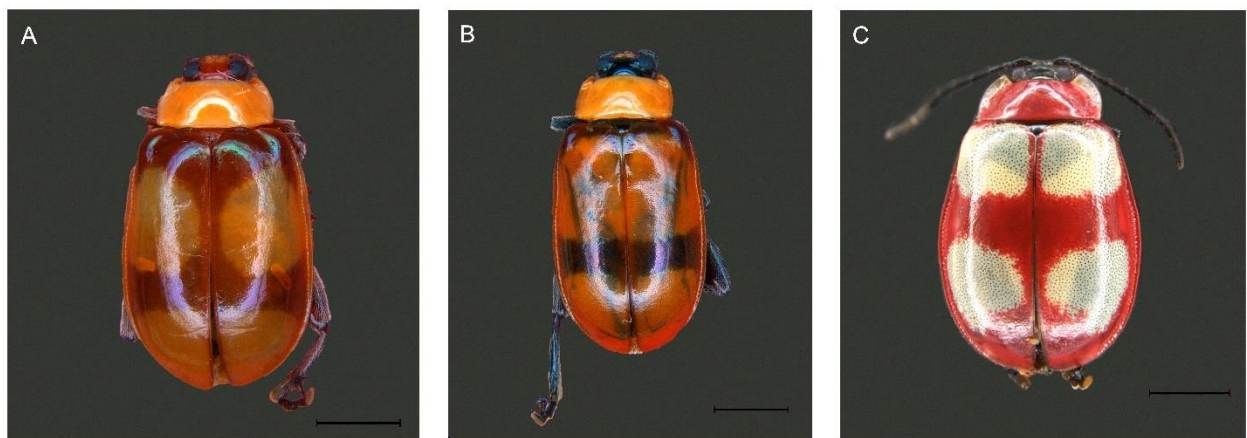
- Descrever morfológicamente a nova espécie *Alagoasa neoequestris*;
- Caracterizar molecularmente essa espécie com o uso de DNA Barcode;
- Caracterizar citogeneticamente *Alagoasa neoequestris* em relação a número diploide, heterocromatina e localização dos cístrons ribossomais (rDNA) 45S e 5S;
- Estabelecer as relações filogenéticas entre *Alagoasa neoequestris* e espécies relacionadas por meio das análises filogenéticas utilizando do sequenciamento dos genes COI e rDNA 28S;
- Mapear DNAs repetitivos obtidos pela técnica de Pintura Cromossômica em *Omophoita communis*;

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL BIOLÓGICO E LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA

Foram utilizados 53 indivíduos adultos de *O. communis*, 18 de *O. equestris* e 52 indivíduos da espécie nova *A. neoequestris* (Figura 1), pertencentes à ordem Coleoptera (Alticinae, Oedionychina). Os exemplares foram coletados utilizando puçá em populações naturais no distrito de Itaiacoca, Ponta Grossa, Paraná, Brasil (25°07'19" S 49°56'24" W). Posteriormente os espécimes foram fixados em álcool 95% no Laboratório de Genética e Evolução (LabGev) da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). Os representantes de *A. neoequestris* serão depositados no Museu de Ciências Naturais da Universidade Federal do Paraná (UFPR) (Curitiba), dois *paratipos* serão depositados no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (USP) (São Paulo), e oito *paratipos* estão depositados no Laboratório de Genética e Evolução (LabGev) da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG).

**Figura 1** - Espécies analisadas no trabalho.



**Legenda:** **A.** *O. communis*; **B.** *O. equestris*; **C.** *A. neoequestris*; **A-B.** Espécimes fixados em álcool 90%; **C.** Espécime fresco. **Escala:** 2 mm.

**Fonte:** A autora.

#### 3.2 MÉTODOS

##### 3.2.1 Análise Morfológica

O estudo da morfologia genital seguiu o protocolo de Smith (1979) com algumas modificações, na qual a estrutura o abdômen foi aquecida em água destilada por 3 minutos, sem fervura com o lobo médio, que foi dissecado com auxílio de alfinetes finos, e aquecido sem fervura em solução aquosa de KOH 10% por 3

minutos, para o amolecimento e clareamento da musculatura e estruturas esclerotizadas; posteriormente a genitália foi armazenada em glicerina.

As fotografias morfológicas foram obtidas utilizando a máquina fotográfica MC170 HD (Leica), acoplada a um estereomicroscópio óptico Leica M205 C, e utilizando o *software* LAS 4.8.0 (Leica) para automontagem. As ilustrações foram feitas com o *software* Adobe Illustrator CC 2015. As descrições seguiram a terminologia baseada em Smith (1979), Konstantinov (1998) e Duckett e Daza (2004). Espécimes alfinetados ou preservados em álcool tendem a perder a coloração e desbotar à medida que envelhecem, podendo haver diferenças ao comparar espécimes frescos e conservados.

Para revisão das descrições foi realizado um levantamento das espécies do gênero *Alagoasa* que têm registro para o Brasil pelo Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil (CTFB) (SEKERKA *et al.*, 2021d). Também foram feitas buscas por *tipo* que correspondessem ao padrão morfológico da *Alagoasa* estudada nos seguintes museus nacionais e internacionais que contém representantes de Oedionychina: Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (São Paulo), Museu de Ciências Naturais da Universidade Federal do Paraná (Curitiba), *Naturhistorisches Museum Basel* (Basiléia); *Royal Belgian Institute of Natural Sciences* (Bélgica); *Natural History Museum* (Londres); *Smithsonian Institution* (Estados Unidos).

### 3.2.2 Citogenética Convencional

Para extração dos testículos de indivíduos adultos seguiu-se o protocolo estabelecido por Almeida, Zacaro e Cella (2000), com algumas modificações: O animal foi dissecado em solução fisiológica para insetos, tendo o testículo retirado e transferido para uma placa de Petri contendo solução hipotônica (água de torneira), durante 20 minutos; após isso, o testículo foi fixado com Carnoy I (metanol-ácido acético na proporção 3:1), durante 1 minuto, com posterior troca do fixador e deixado mais 30 minutos. O testículo fixado foi armazenado na geladeira.

Para preparação das lâminas, os testículos foram deixados em uma solução de ácido acético 70% por alguns minutos e em seguida transferidos e macerados sobre uma lâmina acidificada em solução sulfocrômica 50%. A mesma foi seca em uma superfície de metal aquecida em 30°C/45°C. Para finalizar, essas lâminas foram coradas com uma solução de Giemsa contendo 47 mL de água destilada, 1,5 mL de tampão fosfato pH 6.8 e 1,5 mL de solução Giemsa, durante 12 minutos, à temperatura

ambiente, e posteriormente lavadas com água destilada e secas ao ar.

As lâminas foram fotografadas no fotomicroscópio de epifluorescência Zeiss *Imager 2*, acoplado a uma câmera AxioCam MRm (ZEISS), utilizando o *software* ZEN 2012. O tratamento das imagens foi realizado utilizando o *software* Adobe Photoshop CC 2019.

### 3.2.2.1 Bandas-C

A localização de heterocromatina constitutiva foi realizada por meio da técnica de obtenção de Bandas-C seguindo o protocolo de Fernández *et al.* (2002) com alterações. As lâminas foram incubadas por 2 minutos e 30 segundos em formamida 50% (2XSSC) em 70°C, e depois permaneceram na estufa por uma 1 hora à 40°C. Após foram realizados pequenos mergulhos das lâminas em água destilada e para finalizar elas foram incubadas em uma solução de 2XSSC por mais 1 hora. A coloração foi feita com 2' diaminofenilindol (DAPI) montado em uma solução antifade.

As lâminas foram fotografadas no fotomicroscópio de epifluorescência Zeiss *Imager 2*, acoplado a uma câmera AxioCam MRm (ZEISS), utilizando o *software* ZEN 2012. O tratamento das imagens foi realizado utilizando o *software* Adobe Photoshop CC 2019.

### 3.2.3 Citogenética Molecular

#### 3.2.3.1 Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH)

Para o mapeamento das regiões de DNA ribossomal 45S e 5S, foram utilizadas sondas clonadas e descritas para *O. octoguttata* (Alticinae, Oedionychina) (ALMEIDA *et al.*, 2010), marcadas por meio de uma PCR contendo: 1 X tampão Taq DNA polimerase (Sinapse®), 0,04 mM de dATP, dCTP e dGTP, 0,018 mM de dTTP e 0,012 mM de 16 dUTP–biotina-Roche (18S) e 11-dUTP-Roche (5S), 0,2 µM de cada *primer* (M13 *forward*; M13 *reverse*), 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 5 U de Taq DNA polimerase (Sinapse®) e 100-200 ng de DNA plasmidial. Para a detecção foi utilizada streptavidina Alexa-fluor (*Molecular Probes*) para o *gene* 18S, e pela antidigoxigenina rodamina (*Roche*) para o *gene* 5S. A PCR seguiu o programa: 1 ciclo de desnaturação inicial por 4 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, temperatura de anelamento de 51°C por 45 segundos, e seguido da etapa de extensão dos fragmentos a 72°C por 1 minuto e 20 segundos, com mais um passo de alongação



final a 72°C por 5 minutos.

A hibridação foi feita por meio de uma *double* FISH em preparações citológicas envelhecidas *overnight* à 37°C, e de acordo com o protocolo estabelecido por Pinkel, Straume e Gray (1986), com modificações contendo pré-tratamento em pepsina 0,005%. As lâminas foram tratadas com RNase (0,4%/2XSSC) à 37°C por uma hora, seguida de lavagens e incubação em Pepsina 0,005% (em 10 mM HCL) por 10 minutos à 37°C. Posteriormente foram fixadas em Formaldeído 1% (PBS1X/50 mM MgCl<sub>2</sub>), desidratadas em série alcoólica (70%, 90% e 100%) e desnaturadas em formamida 70% (2XSSC) à 70°C por 3 minutos e 50 segundos, com adição de álcool 70% gelado imediatamente após a desnaturação.

As lâminas foram hibridadas *overnight* em uma câmara úmida e escura, contendo solução de hibridação 77%, com formamida à 50%, sulfato de dextrano à 10%, 20XSSC à 2%, água ultrapura e a sonda previamente desnaturada à 100°C por 10 minutos. A concentração da sonda rDNA 18S e 5S utilizada foi de 300 ng/lâmina.

No segundo dia, após lavagens, elas foram incubadas em tampão 5% NFDm/4XSSC por 15 minutos em temperatura ambiente. Os cromossomos foram contracolorados com DAPI montado em uma solução antifade. As lâminas foram fotografadas no fotomicroscópio de epifluorescência Zeiss *Imager 2*, acoplado a uma câmara AxioCam MRm (ZEISS), utilizando o *software* ZEN 2012. O tratamento das imagens foi realizado utilizando o *software* Adobe Photoshop CC 2019.

### 3.2.4 Genética Molecular

#### 3.2.4.1 Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído de acordo com o protocolo de Murray e Thompson (1980), com modificações, a partir da fragmentação em nitrogênio líquido da cabeça, pronoto e os três pares de pernas em microtubos de 1,5 mL. Para a digestão foi adicionado tampão sem CTAB, CTAB 5%, proteinase K (10 mg/mL) e β-mercaptoetanol, deixado *overnight* à 50°C em banho-maria. Posteriormente, foi adicionado RNase (10 mg/mL) por 2 horas à 37°C, com subsequente acréscimo de clorofórmio. Os tubos foram centrifugados à 8.000 rpm por 5 minutos à 4°C, retirado o sobrenadante, e adicionado álcool 100% por 2 horas para precipitação do DNA. Posteriormente, foram feitas lavagens em série alcoólica (70%, 90% e 100%), com secagem do *pellet* à 37°C e ressuspensão em 20 µL de água ultrapura.

A concentração do DNA genômico foi quantificada por meio do espectrofotômetro *Nanovue* da GE Healthcare®, e a sua integridade por corrida eletroforética à 60 V por 50 minutos, em gel de agarose 1%, corado com 2 µL de *Gel Red* (Biotium®) mais tampão de carregamento azul de bromofenol (1:1). Posteriormente fotodocumentado sob luz ultravioleta no *Imagequant Las 4000* da GE Healthcare®. Para a amplificação as amostras de DNA foram diluídas para concentração de 20-50 ng/µL.

#### 3.2.4.2 Amplificação dos *genes* COI e rDNA 28S

A porção da subunidade I do *gene* mitocondrial Citocromo Oxidase (COI) foram amplificados a partir da PCR utilizando os *primers* descritos por Kim, Kjer e Duckett (2003) e o *gene* de DNA ribossomal 28S utilizando os *primers* descritos por Gillespie *et al.* (2003).

Para o *gene* COI foram realizadas reações em microtubos de 0,2 mL contendo: 1 X tampão Taq DNA polimerase (Sinapse®); 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM de solução dNTP; 1,0 µM de cada *primer* (*forward* 5' - TAA TTG GAG GAT TTG GAA YTG 3' e *reverse* 5' - CCT YGG TAA AAT TAA AAT ATA AAC TTC 3'); 2,5 U de Taq DNA polimerase (Sinapse®) e 50 ng de DNA molde para um volume final de reação de 35 µL.

A PCR seguiu o programa: 1 ciclo de desnaturação inicial por 4 minutos a 95°C, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, temperatura de anelamento de 53°C por 30 segundos, e seguido da etapa de extensão a 72°C por 30 segundos, com mais um passo final de alongação de 72°C por 10 minutos.

Para o *gene* rDNA 28S as reações foram realizadas em microtubos de 0,2 mL contendo: 1 X tampão Taq DNA polimerase (Sinapse®); 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,15 mM de solução dNTP; 2,0 µM de cada *primer* (D2 UP-4 *forward* 5' - GAG TTC AAG AGT ACG TGA AAC CG-3' e D2 DN-B *reverse* 5' - CCT TGG TCC GTG TTT CAA GAC-3'); 1 U de Taq DNA polimerase (Sinapse®) e 20 ng de DNA molde para um volume final de reação de 50 µL.

A PCR seguiu o programa: 1 ciclo de desnaturação inicial por 4 minutos a 95°C, seguido de 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, temperatura de anelamento de 58.9°C por 1 minuto, e seguido da etapa de extensão a 72°C por 1 minuto, com mais um passo final de alongação de 72°C por 10 minutos.

Os produtos de PCR foram conferidos em corrida eletroforética à 60 V por 50

minutos, em gel de agarose 1%, corado com 2  $\mu$ L de *Gel Red* (Biotium®) mais tampão de carregamento azul de bromofenol (1:1), fotodocumentados sob luz ultravioleta no *Imagequant Las 4000* da GE Healthcare®, e purificadas utilizando o kit de purificação *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification*, da GE Healthcare®, seguindo as instruções do fabricante. Após a purificação os produtos de PCR foram quantificados no espectrofotômetro *Nanovue* da GE Healthcare®, e a sua integridade foi verificada novamente em corrida eletroforética citada acima. As amostras foram encaminhadas para sequenciamento na empresa ACTGene Análises Moleculares, a qual utiliza um sequenciador automático (ABI-PRISM 3100 *Genetic Analyzer*) armado com capilares de 50 cm e polímero POP6 (*Applied Biosystems*).

#### 3.2.4.3 Análise filogenética

Os eletroferogramas foram analisados no *software* MEGA 11 (TAMURA; STECHER; KUMAR, 2021), no qual foi montado a sequência consenso entre as fitas 5' e 3'. As sequências consenso COI serão depositadas no banco de dados *Barcode of Life data Systems* (BOLD Systems), e as rDNA 28S no *GenBank*. Adicionalmente foram utilizadas sequências depositadas no *GenBank* para o restante das espécies consideradas no estudo (Apêndice A). Todas as sequências foram alinhadas usando o algoritmo *Muscle* implementado no *software* MEGA 11. As espécies *Endustomus* sp., *Diabrotica* sp. e *Monochamus sutur* foram utilizadas como grupos externos com base em estudos filogenéticos (KIM; KJER; DUCKETT, 2003; HADDAD; MCKENNA, 2016). A concatenação das sequências dos dois genes foi feita manualmente, e para o cálculo das distâncias interespecíficas, foi utilizado o modelo *Kimura 2-parameter* com *bootstrap* de 1000 interações. Para a seleção do melhor método de substituição nucleotídica para o conjunto de dados foi utilizado o critério *Bayesian Information Criterium* (BIC) implementado no MEGA 11, resultando no *General Time Reversible* (GTR) + *Gamma distribution* (G), aplicado na análise com *Maximum Likelihood*. Para a análise filogenética foi utilizado o modelo *Maximum Likelihood*, *Neighbor-Joining* e *Maximum Parsimony*, com *bootstrap* de 5000 interações. A árvore consenso foi tratada a partir da árvore resultante da *Maximum Parsimony* utilizando o *software* Adobe Photoshop CC 2019.

### 3.2.5 Microdissecção Cromossômica, Amplificação e Marcação da Sonda

Um cromossomo autossômico de *Omophoita communis* foi microdissectado segundo Yang *et al.* (2017), com algumas modificações, utilizando um microscópio invertido (Olympus), equipado com microdissector mecânico (Narishige) com capilares de pontas com aproximadamente 0,5-0,7 µm. Em seguida, a ponta da agulha contendo o material cromossômico foi quebrada no interior de um microtubo de 0,2 mL. Neste tubo o material da microdissecção foi amplificado com o Kit *Genome Plex Single Cell Whole Genome Amplification* (WGA4) (Sigma®), seguindo o protocolo do fabricante. Para isso foi adicionado 9 µL de água no material microdissectado, 1 µL de tampão de lise contendo Proteinase K e 10 X *Lysis fragmentation*, foram incubados à 50°C por 1 hora seguido de 99°C por 4 minutos (WGA1) e subsequente resfriamento ao gelo. Posteriormente foi adicionado 2 µL de 1 X *Single Cell Library Preparation* e 1 µL de solução estabilizadora, foram levados à 95°C por 2 minutos (WGA2) e deixados ao gelo por 1 minuto. Foi adicionado 1 µL de *Enzima Library Preparation* e incubados à 16°C, 24°C e 37°C por 20 minutos cada, e 75°C por 5 minutos (WGA3), resfriados ao gelo. Em seguida foi feita a reação de amplificação utilizando 61 µL de solução contendo 10 X *Amplification Master Mix* e WGA DNA Polimerase, incubados à 95°C por 3 minutos, seguido de 25 ciclos com 94°C por 30 segundos e 65°C por 5 minutos (WGA4).

Posteriormente o material amplificado foi purificado utilizando o kit de purificação *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification*, da GE Healthcare®, seguindo as instruções do fabricante. O material seguiu para as reações de DOP-PCR, segundo o procedimento descrito por Telenius *et al.* (1992) e Yano, Bertollo e Cioffi (2017), com algumas modificações, utilizando o *primer* 6MW (5' – CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G - 3'). A primeira DOP-PCR conteve três soluções: Solução A para ciclos de baixa temperatura, contendo 0,6 X tampão de Sequenase (ThermoFisher®); 4,8 µM de *primer* 6MW; 2 mM do mix dNTP, para 5 µL de solução. A solução B continha 4,38 X de tampão de Sequenase (ThermoFisher®) e 3,25 U de Sequenase (ThermoFisher®), para 2 µL de solução. A solução C, para ciclos de alta temperatura, continha 1 X tampão de Long Taq (LudWig®); 0,19 mM de dNTP; 0,55 µM de *primer* 6MW; 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub> e 6,4 U de Long Taq DNA polimerase (LudWig®), para 45 µL de solução.

Para seguir o programa de PCR, foi acrescentado a solução A no microtubo

em que foi realizada a pré-DOP, e seguiu-se um passo de desnaturação inicial à 92°C por 5 minutos. Antes de começar o próximo ciclo de 10x, foi acrescentado 1 µL da solução B e seguiu-se para o anelamento do *primer* à 25°C por 2 minutos e 20 segundos, a temperatura de elongação foi de 37°C com um passo final de 90°C por 1 minuto. Em seguida, iniciou-se um ciclo de 32x, no qual antes da desnaturação à 92°C por 1 minuto, foi acrescentada a solução C, seguida do anelamento do *primer* à 56°C por 2 minutos, elongação do DNA à 68°C por 2 minutos, com um passo de elongação final à 68°C por 5 minutos.

Do tubo contendo o primeiro produto da DOP-PCR foi aliquoteado 1 µL e feita uma nova reação de amplificação em um volume final de 50 µL contendo: 1 X tampão de Long Taq (LudWig®); 0,2 mM dNTP; 1 µM de *primer* 6MW; 2,5 µM MgCl<sub>2</sub> e 0,6 U de Long Taq DNA polimerase (LudWig®). O ciclo de PCR seguiu tais condições: desnaturação inicial à 92°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos à 91°C por 1 minuto de desnaturação, 56°C por 1 minuto de anelamento, 68°C por 2 minutos de elongação, seguido de um passo de elongação final à 68°C por 5 minutos.

As sondas foram marcadas por meio de uma reação de DOP-PCR para 50 µL contendo: 1 X tampão de Long Taq (LudWig®); 0,2 mM dATP; 0,2 mM dCTP; 0,2 mM dGTP; 0,18 mM dTTP; 0,06 mM (11-dUTP-Roche); 1 µM de *primer* 6MW; 2,5 µM MgCl<sub>2</sub>; 1 U de Long Taq DNA polimerase (LudWig®) e 1 µL produto da reamplificação. O ciclo de PCR seguiu tais condições: desnaturação inicial à 92°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos à 91°C por 1 minuto de desnaturação, 56°C por 1 minuto de anelamento, 68°C por 2 minutos de elongação, seguido de um passo de elongação final à 68°C por 5 minutos. A sonda foi nomeada como 3BP+D2M, na qual o 3B corresponde ao cromossomo microdissectado, o P corresponde a purificação, o D2 corresponde a reamplificação da DOP-PCR e o M corresponde a marcação da sonda. Todos os produtos tiveram a concentração do DNA quantificada por meio do espectrofotômetro *Nanovue* da GE Healthcare®, com integridade analisada em corrida eletroforética à 60 V por 50 minutos, em gel de agarose 1%, corado com 2 µL de *Gel Red* (Biotium®) mais tampão de carregamento azul de bromofenol (1:1). A fotodocumentação foi feita sob luz ultravioleta no *Imagequant Las 4000* da GE Healthcare®.

### 3.2.6 Obtenção de C0T-PCR

Para a obtenção da técnica de C0T-PCR de *Omophoita communis*, utilizado

como bloqueador do DNA repetitivo, foram utilizadas PCR utilizando dois *primers* degenerados: O *primer* G1\_4, utilizado como metodologia de rotina no laboratório de Thomaz Liehr, na Universidade de Jena, Alemanha; e o *primer* 6MW (TELENIUS *et al.*, 1992). A primeira reação utilizando o *primer* G1\_4 5'- GAG GAT GAG GTT GAG NNN NNN GTG G - 3' contendo 1 X tampão Long Taq DNA polimerase (LudWig®); 0,2 mM de solução dNTP; 4 µM do *primer* G1\_4; 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 5 U de Long Taq DNA polimerase (LudWig®), e 200-500 ng de DNA genômico. A PCR seguiu o programa: 1 ciclo de desnaturação inicial por 1 minuto a 92°C cada, seguido 8 ciclos de 92°C por 1 minuto, 30°C por 1 minuto e 30 segundos, e 68°C por 2 minutos. Posteriormente, foram 25 ciclos de 92°C por 1 minuto, temperatura de anelamento de 62°C por 1 minuto e 30 segundos, e seguido da etapa de extensão a 68°C por 2 minutos, com mais um passo de alongação final a 68°C por 5 minutos.

A segunda reação utilizando *primer* 6MW: 5' - CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G - 3', contendo: contendo 1 X tampão Long Taq DNA polimerase (LudWig®); 0,2 mM de solução dNTP; 5 µM do *primer* 6MW; 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 5 U de Long Taq DNA polimerase (LudWig®), e 200-500 ng de DNA genômico. A PCR seguiu o programa: 1 ciclo de desnaturação inicial por 4 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, temperatura de anelamento de 51°C por 45 segundos, e seguido da etapa de extensão a 72°C por 1 minuto 20 segundos, com mais um passo de alongação final a 72°C por 5 minutos.

Em seguida o DNA de bloqueio foi precipitado adicionando 5 µg de DNA por lâmina, 5 µL de acetato de sódio 3M, 6 µL de tRNA (Sigma®) e 120 µL de etanol 100%, incubado no -80°C por 30 minutos, e precipitado após centrifugação a 13.000 rpm por 20 minutos à 4°C. O bloqueio foi ressuspendido em 800 ng por lâmina da sonda utilizada e incubado por 2 horas à 42°C.

### 3.2.7 Pintura Cromossômica

A pintura cromossômica seguiu a técnica Híbridação *in situ* Fluorescente descrita por Pinkel, Straume e Gray (1986), com modificações (Ver Método 3.2.3.1), a partir da sonda do autossomo de *Omophoita communis*, obtidos e marcados por DOP-PCR. Para a detecção foi utilizado o anticorpo anti-digoxigenina rodamina (Roche).

As lâminas foram hibridadas por três dias em uma câmara úmida e escura, contendo solução de hibridação 77%, com formamida à 50%, sulfato de dextrano à

10%, 20XSSC à 2%, água ultrapura e a sonda com o competidor previamente desnaturada à 85°C por 10 minutos e depois com a renaturação à 37°C por 1 hora.

Os cromossomos foram contracolorados com DAPI montado em uma solução antifade. As lâminas foram fotografadas no fotomicroscópio de epifluorescência Zeiss *Imager 2*, acoplado a uma câmera AxioCam MRm (ZEISS), utilizando o *software* ZEN 2012. O tratamento das imagens foi realizado utilizando o *software* Adobe Photoshop CC 2019.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão estão dispostos em dois capítulos que correspondem aos artigos que serão publicados:

### ARTIGO 1

Descrição de uma nova espécie do gênero *Alagoasa* do Sul do Brasil (*Alagoasa neoequestris*) (CHRYSOMELIDAE, ALTICINAE): caracterização com o uso de taxonomia integrativa

### ARTIGO 2

Obtenção de DNA repetitivo a partir de DOP-PCR mapeados por Pintura Cromossômica em *Omophoita communis* Bechyné, 1959 (CHRYSOMELIDAE, ALTICINAE)



#### 4.1 ARTIGO 1 - DESCRIÇÃO DE UMA NOVA ESPÉCIE DO GÊNERO *Alagoasa* DO SUL DO BRASIL (*Alagoasa neoequestris*) (CHRYSOMELIDAE, ALTICINAE): CARACTERIZAÇÃO COM O USO DE TAXONOMIA INTEGRATIVA

##### RESUMO:

A subtribo Oedionychina (Alticinae) possui hierarquia taxonômica complexa e seus representantes geram dificuldade na identificação por apresentarem espécies miméticas e aposemáticas. O objetivo deste trabalho foi descrever a nova espécie *Alagoasa neoequestris*, utilizando estudos citogenéticos, morfológicos e moleculares, e estabelecer uma relação filogenética com espécies semelhantes morfológicamente e outras espécies relacionadas. *Alagoasa neoequestris* deste trabalho possui quatro cerdas labrais em linha horizontal, metafêmur com formato "D" e metatarsômero distal globoso, validando a posição taxonômica dentro do gênero. O padrão elitral com quatro manchas claras no élitro marrom avermelhado tem sido pouco descrito no gênero. A comparação da genitália masculina dessa espécie com outras espécies mostrou diferenças que sugerem isolamento reprodutivo. O número cromossômico  $2n=22$  e sistema sexual Xy com cromossomos gigantes e assinápticos está de acordo com a descrição da maioria dos representantes da subtribo Oedionychina. A variação da morfologia encontrada, com cromossomos submetacêntricos e acrocêntricos, além da localização de heterocromatina constitutiva em apenas três bivalentes está associada com diferenciações cariotípica do gênero. Os cístrons rDNA 45S e 5S são sintênicos, colocalizados e presentes em um par autossômico, característica predominante na subtribo, sendo essa característica considerada ancestral e conservada para Coleoptera. A análise filogenética agrupou *A. neoequestris* dentro do gênero *Alagoasa*, num ramo com *Alagoasa plaumanni*, e separada das espécies do gênero *Omophoita* e de outros gêneros relacionados. Os resultados citogenéticos obtidos neste trabalho não são concordantes com àqueles descritos na literatura para "*A. equestris*", descrita com  $2n=12$ . Esse número cromossômico, raro em Alticinae, é igual ao número descrito para *O. communis*, espécie muito semelhante morfológicamente. Isso sugere que "*A. equestris*" possa ter sido confundida com *O. communis* durante tal estudo. Com base nisso e nas análises de relação filogenética, a espécie descrita neste trabalho é uma nova espécie de *Alagoasa* do sul do Brasil, suportado por taxonomia integrativa.

**Palavras-Chave:** Oedionychina, morfologia, citogenética, genética molecular, sistemática.

#### 4.1.1 Introdução

Os besouros são animais abundantes no ecossistema e representam 40% dos insetos descritos (GULLAN; CRASTON, 2017; MCKENNA *et al.*, 2015; RAFAEL *et al.*, 2012; TRIPLEHORN; JOHNSON, 2011). A família Chrysomelidae, dentro de Coleoptera, é frequente na região Neotropical, na qual está localizado o Brasil (NIE *et al.*, 2019; PETITPIERRE *et al.*, 1988), e agrupa a subfamília Alticinae, considerada uma das mais diversificadas desta região (TRIPLEHORN; JOHNSON, 2011).

Os alticíneos são conhecidos como besouros pulga (*flea beetle*) por saltarem como um hábito de defesa, devido à presença interna de molas esclerotizadas em seus fêmures posteriores (FURTH, 1988). Além disso, são especialistas, indicadores biológicos e pragas em determinadas lavouras (FURTH, 1988; GE *et al.*, 2011; JOLIVET, 1988; KONSTANTINOV; PRATHAPAN; VENCL, 2018; LINZMEIER; RIBEIRO-COSTA; MARINONI, 2006). O grupo também é cercado por problemas taxonômicos dependendo dos autores, sendo considerada como uma tribo dentro de Galerucinae (DUCKETT; GILLESPIE; KJER, 2004; GÓMEZ-ZURITA *et al.*, 2007; LINGAFELTER; KONSTANTINOV, 1999; NADEIN; BEZDEK, 2014), ou subfamília irmã de Galerucinae (BOUCHARD *et al.*, 2011; GE *et al.*, 2011; GÓMEZ-ZURITA *et al.*, 2007; HADDAD; MCKENNA, 2016). Um dos fatores que contribuiu para tais problemas foram os estudos filogenéticos iniciais terem usado a descrição da mola metafemoral e do fêmur dilatado para a diferenciação Alticinae-Galerucinae, o que revelou ser inconclusivo, pois a mola metafemoral é uma estrutura convergente (GE *et al.*, 2011).

Alticinae agrupa a subtribo Oedionychina, considerada mais recente, e contém representantes neotropicais (BECHYNÉ; BECHYNÉ, 1966; VIRKKI; SANTIAGO-BLAY; CLARK, 1991). Estudos citogenéticos nessa subtribo são muito interessantes, pois ela possui número cromossômico constante, em torno de  $2n=22$ , e sistema sexual Xy, com os cromossomos sexuais peculiares no tamanho, considerados gigantes com cerca de metade do genoma, e também no comportamento, pois são assinápticos com segregação regular (ALMEIDA *et al.*, 2010; ALMEIDA; CAMPANER; CELLA, 2009; GÓMEZ-ZURITA; HUNT; VOGLER, 2008; MELLO *et al.*, 2014; VIRKKI, 1970; VIRKKI; SANTIAGO-BLAY, 1993). A ocorrência desses cromossomos é explicada por rearranjos cromossômicos, DNA repetitivo e elementos transponíveis, que podem ter sido os responsáveis pelo

aumento de tamanho, a diferenciação entre ambos e a perda de homologia (MELLO *et al.*, 2014; ROSOLEN; VICARI; ALMEIDA, 2018; SMITH; VIRKKI, 1978; VIRKKI, 1970, 1971, 1988).

Os representantes de Oedionychina estudados pela técnica de Bandamento C mostraram a maioria da heterocromatina na região pericentromérica dos autossomos e com padrão variável nos cromossomos sexuais, como centroméricas, pericentroméricas, intersticiais e terminais (ALMEIDA; CAMPANER; CELLA, 2009). Essa variação no padrão de distribuição de heterocromatina representa a diferenciação cariotípica do grupo (GOLL *et al.*, 2018). No gênero *Alagoasa*, somente a espécie *A. januaría* foi estudada por Bandas-C, apresentando marcações na região centromérica em três pares autossômicos (VIRKKI, 1983).

Em alguns representantes de *Omophoita* e *Alagoasa*, a Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH) para localização dos cístrons ribossomais (rDNA) 45S e 5S mostrou sintenia e colocalização (ALMEIDA *et al.*, 2010; AZAMBUJA *et al.*, 2020). As poucas espécies do gênero *Alagoasa* estudadas até agora apresentam esses cístrons em apenas um par autossômico, e para o 5S isso tem sido considerado uma característica ancestral da ordem (AZAMBUJA *et al.*, 2020; OLIVEIRA *et al.*, 2012). Apesar do gênero *Alagoasa* possuir o maior número de estudos citogenéticos em Oedionychina, ainda são poucas as técnicas citogenéticas utilizadas no gênero, sendo que estas evidenciam características importantes para entender a evolução cariotípica do grupo, além de permitirem uma caracterização específica para cada espécie, e mostrarem divergências que não são vistas com a citogenética convencional.

Algumas espécies do gênero *Omophoita* e *Alagoasa* são possivelmente miméticas, como por exemplo, entre *O. octoguttata*, *A. pantina*, *A. scissa* e *A. areata* que possuem padrões elitrais muito semelhantes e são simpátricas (BEGOSI; BENSON, 1988; DEL-CLARO, 1991; GE *et al.*, 2011; KONSTANTINOV; PRATHAPAN; VENCL, 2018; SHERRATT, 2008). Na literatura, há uma espécie descrita como "*Alagoasa equestris*" que foi analisada citogeneticamente uma única vez em 1993 por Virkki e Santiago-Blay. Esta "*A. equestris*" tem descrição de número cariotípico  $2n=12$  e é muito semelhante a *Omophoita communis* e *Omophoita equestris* por apresentarem o mesmo padrão elitral, sendo que as espécies de *Omophoita* só foram diferenciadas por meio de taxonomia integrativa, evidenciando a sua importância aos estudos sistemáticos.

Dessa maneira, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a nova espécie *A.*

*neoequestris* com análises integrativas de modo a descrever a espécie, conferindo um nome científico próprio, além de verificar o seu posicionamento sistemático no gênero e sua relação com espécies morfológicamente parecidas.

#### 4.1.2 Material e Métodos

Os 52 indivíduos adultos de *A. neoequestris* coletados no distrito de Itaiacoca, Ponta Grossa, Paraná, Brasil (25°07'19" S 49°56'24" W) serão depositados no Museu de Ciências Naturais da Universidade Federal do Paraná (UFPR), dentre esses, dois *paratipos* serão depositados no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (USP), e oito *paratipos* estão depositados no Laboratório de Genética e Evolução (LabGev) da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG).

Para dissecação da genitália masculina seguiu-se o protocolo de Smith (1979), com armazenamento em glicerina. As fotografias foram obtidas utilizando a máquina fotográfica MC170 HD (Leica), acoplada a um estereomicroscópio óptico Leica M205 C, e utilizando o *software* LAS 4.8.0 (Leica) para automontagem. As ilustrações foram feitas com o *software* Adobe Illustrator CC 2015. As descrições seguiram a terminologia baseada em Smith (1979), Konstantinov (1998) e Duckett e Daza (2004). Para revisão das descrições foi realizado um levantamento das espécies do gênero *Alagoasa* que habitam o Brasil pelo Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil (CTFB) (SEKERKA *et al.*, 2021d), e buscas por *tipo* que correspondessem ao padrão morfológico da *Alagoasa* estudada nos seguintes museus nacionais e internacionais que contém representantes de Oedionychina: Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (São Paulo), Museu de Ciências Naturais da Universidade Federal do Paraná (Curitiba), *Naturhistorisches Museum Basel* (Basiléia); *Royal Belgian Institute of Natural Sciences* (Bélgica); *Natural History Museum* (Londres); *Smithsonian Institution* (Estados Unidos).

Para extração dos testículos, seguiu-se o protocolo estabelecido por Almeida, Zacaro e Cella (2000), com fixação em Carnoy I. Para a preparação das lâminas, os testículos foram macerados, com posterior coloração em Giemsa. A localização de heterocromatina constitutiva seguiu a técnica de obtenção de Bandas-C de Fernández *et al.* (2002) coradas com 2' diaminofenilindol (DAPI) montado em uma solução antifade. A *double FISH* para mapeamento das regiões de DNA ribossomal (rDNA) 45S e 5S utilizou as sondas clonadas e descritas para *O. octoguttata* (ALMEIDA *et al.*, 2010), marcadas por meio de uma Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) contendo

16 dUTP–biotina-Roche (18S) e 11-dUTP-Roche (5S) com posterior detecção pela streptavidina Alexa-fluor (*Molecular Probes*), e pela antidigoxigenina rodamina (Roche), respectivamente. A hibridação foi feita em preparações citológicas envelhecidas à 37°C, e seguindo o protocolo de Pinkel, Straume e Gray (1986), com modificações contendo pré-tratamento em pepsina 0,005%, utilizando 77% de estrigência e com 300 ng de cada sonda. Os cromossomos foram contracolorados com DAPI montado em uma solução antifade. As lâminas foram fotografadas no fotomicroscópio de epifluorescência Zeiss *Imager 2*, acoplado a uma câmera AxioCam MRm (ZEISS), utilizando o *software* ZEN 2012. O tratamento das imagens foi realizado utilizando o *software* Adobe Photoshop CC 2019.

O DNA genômico foi extraído de acordo com o protocolo de Murray e Thompson (1980) com tampão CTAB. A porção da subunidade I do *gene* mitocondrial Citocromo Oxidase (COI) (KIM; KJER; DUCKET, 2003) e o *gene* de DNA ribossomal 28S (GILLESPIE *et al.*, 2003) foram amplificados a partir da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando os seguintes *primers*: COI *forward* 5' – TAA TTG GAG GAT TTG GAA YTG - 3' e *reverse*: 5' – CCT YGG TAA AAT TAA AAT ATA AAC TTC - 3'; 28S D2 UP-4 *forward* 5' – GAG TTC AAG AGT ACG TGA AAC CG - 3' e 28S D2 DN-B *reverse* 5' - CCT TGG TCC GTG TTT CAA GAC - 3'. A reação do *gene* COI utilizou 1 X tampão Taq DNA polimerase (Sinapse®); 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM de solução dNTP; 1,0 µM de cada *primer*; 2,5 U de Taq DNA polimerase (Sinapse®) e 50 ng de DNA molde para um volume final de reação de 35 µL. O *gene* rDNA 28S conteve na reação 1 X tampão Taq DNA polimerase (Sinapse®); 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,15 mM de solução dNTP; 2,0 µM de cada *primer*; 1 U de Taq DNA polimerase (Sinapse®) e 20 ng de DNA molde para um volume final de reação de 50 µL. A PCR de ambas as reações seguiu um ciclo de desnaturação inicial por 4 minutos à 95°C, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, anelamento de 53°C por 30 segundos para o *gene* COI e 58.9°C por 1 minuto para o *gene* rDNA 28S, extensão a 72°C por 30 segundos para o *gene* COI e 1 minuto para o rDNA 28S, e alongação final de 72°C por 10 minutos. As amostras foram encaminhadas para sequenciamento na empresa ACTGene Análises Moleculares.

Os eletroferogramas foram analisados no *software* Mega 11 (TAMURA; STECHER; KUMAR, 2021), no qual foi montado a sequência consenso entre as fitas 5' e 3'. As sequências consenso COI serão depositadas no banco de dados *Barcode of Life data Systems* (BOLD Systems), e as rDNA 28S no *GenBank*. Adicionalmente

foram utilizadas sequências depositadas no *GenBank* para o restante das espécies consideradas no estudo (Apêndice A). Todas as sequências foram alinhadas usando o algoritmo *Muscle* implementado no software MEGA 11. As espécies *Endustomus* sp., *Diabrotica* sp. e *Monochamus sutur* foram utilizadas como grupos externos com base em estudos filogenéticos (KIM; KJER; DUCKETT, 2003; HADDAD; MCKENNA, 2016). A concatenação das sequências dos dois genes foi feita manualmente, e para o cálculo das distâncias interespecíficas, foi utilizado o modelo *Kimura 2-parameter* com *bootstrap* de 1000 interações. Para a seleção do melhor método de substituição nucleotídica para o conjunto de dados foi utilizado o critério *Bayesian Information Criterium* (BIC) implementado no MEGA 11, resultando no *General Time Reversible* (GTR) + *Gamma distribution* (G), aplicado na análise com *Maximum Likelihood*. Para a análise filogenética foi utilizado o modelo *Maximum Likelihood*, *Neighbor-Joining* e *Maximum Parsimony*, com *bootstrap* de 5000 interações. A árvore consenso foi tratada a partir da árvore resultante da *Maximum Parsimony* utilizando o software Adobe Photoshop CC 2019.

#### 4.1.3 Resultados

As pesquisas por *tipo* realizada junto ao Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, ao Museu de Ciências Naturais da Universidade Federal do Paraná e ao *Smithsonian Institution*, mostraram que não há exemplares do gênero *Alagoasa* com características correspondentes aos da espécie estudada neste trabalho. O levantamento das espécies de *Alagoasa* encontradas no Brasil, juntamente com as depositadas no *Naturhistorisches Museum Basel*, resultaram em 105 espécies (Apêndice B) que foram analisadas utilizando como diagnose o padrão elital.

Após a comparação com outras espécies do gênero *Alagoasa* (ver abaixo) obtidas da pesquisa de busca por *tipo*, afirmamos que os espécimes estudados neste trabalho correspondem a uma nova espécie do gênero *Alagoasa* encontrada no sul do Brasil, recebendo o nome científico de *Alagoasa neoequestris*.

##### 4.1.3.1 Descrição morfológica

**sp. n. *Alagoasa neoequestris* (Figura 2-3)**

**Comprimento:** Machos: 6-8 mm. Fêmeas: 7–9 mm.

**Cabeça:** Tegumento preto. Com duas a sete pontuações visíveis no vértice; duas

máculas claras de cada lado da fronte na margem interocular. A largura do olho em vista frontal é um pouco menor que o espaço interocular. **Antenas.** Pedicelo com a mesma coloração das máculas da fronte; escapo e flagelo com a mesma coloração da cabeça. **Pronoto.** Região posterior mais larga que a região anterior; coloração igual ao élitro; calo do hipômero levemente arredondado e pouco desenvolvido. **Labro.** Quatro cerdas visíveis, dispostas em uma linha horizontal.

**Metatórax e Mesotórax.** Pretos.

**Élitros.** Tegumento elitral avermelhado em espécimes frescos (Figura 2), espécimes montados tornam-se alaranjados e fixados em álcool 90% tornam-se amarelados. Quatro máculas claras visíveis; duas máculas presentes na região anterior do élitro, quadriculares, próximo as margens; duas presentes na região posterior, arredondadas, atingindo as margens laterais interna e externa. Espécimes montados e/ou fixados em álcool tendem a perder as máculas.

**Pernas.** Pretas. Pernas posteriores e medianas similares. Metafêmur alargados, com formato semelhante a "D"; pilosidade concentrada na face externa do metafêmur, com pouca densidade. Metatarsômero distal com aspecto globoso. **Abdômen.** Preto.

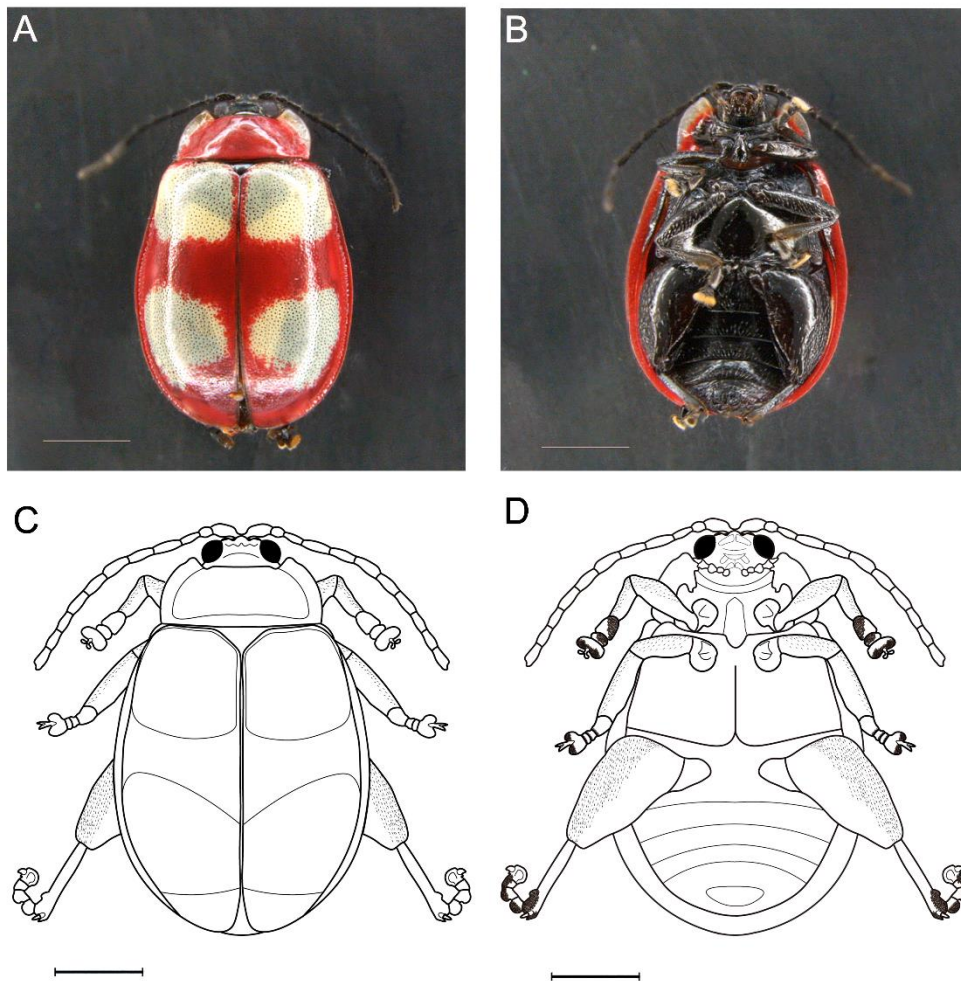
**Lobo médio** (Figura 3). Comprimento da porção mediana é subigual ao comprimento da porção apical. Esclerito ventral acuminado com ápice truncado arredondado. Processo mediano dorsal com a porção anterior ovalada; expansões do processo mediano bífidas, divergentes e retangulares com os vértices arredondados. Esclerito lateral dorsal com aspecto de losango. Processo oblíquo dorsal levemente paralelo com a porção apical ligeiramente curvada. Aba apical retangular com vértices arredondados; ganchos basais curtos e acuminados.

**Material examinado:** Brasil: Paraná, Ponta Grossa, Itaiacoca, 25°07'19"S 49°56'24"W, 19.x.2016, [Método de coleta puçá, Ponto B], Tozetto L. 1M. (LabGEv); Paraná, Ponta Grossa, Itaiacoca, 25°07'05.4"S 49°56'27.7"W, 04.xi.2016, [Método de coleta puçá, Ponto A], Tozetto L., 1M. (LabGEv); Paraná, Ponta Grossa, Itaiacoca, 25°08'23.8"S 49°53'49.0"W, 08.iii.2017, [Método de coleta puçá, Calponta], Tozetto L., Rosolen L., Azambuja M. 1M. (LabGEv); Paraná, Ponta Grossa, Itaiacoca, Passo do Pupo, 25°08'36.8"S 49°57'47.6"W, 22.ix.2017, [Método de coleta puçá], sem coletor 3M. (LabGEv); Paraná, Ponta Grossa, Itaiacoca, 25°07'05.4"S 49°56'27.7"W, 22.xii.2020, [Método de coleta puçá, Ponto A], Almeida M., Ramos R., Vidal J. 4F. (LabGEv); Paraná, Ponta Grossa, Itaiacoca, 25°08'55.34"S 49°53'23.96"W, 19.ix.2018, [Método de coleta puçá, Chácara], Almeida M. 1M. (LabGEv); Paraná,

Ponta Grossa, Itaiacoca, 25°08'55.34"S 49°53'23.96"W, 10.i.2021, [Método de coleta puçá, Chácara], Almeida M., 1M. (LabGEv); Paraná, Ponta Grossa, Itaiacoca, 25°07'05.4"S 49°56'27.7"W, 25.x.2019, [Método de coleta puçá, Ponto A], Almeida M., Araujo E., Vidal J, 4F, 3M. (LabGEv); Paraná, Ponta Grossa, Itaiacoca, 25°07'05.4"S 49°56'27.7"W, 18.xii.2020, [Método de coleta puçá, Ponto A], Almeida M., Ramos R., Vidal J. 2F. (LabGEv); Paraná, Ponta Grossa, Itaiacoca, 25°07'05.4"S 49°56'27.7"W, 25.iv.2019, [Método de coleta puçá, Ponto A], Almeida M., Araujo E., Falachi R. 2M. (LabGEv); Paraná, Ponta Grossa, Itaiacoca, 25°07'05.4"S 49°56'27.7"W, 25.xi.2019, [Método de coleta puçá, Ponto A], Almeida M., Araujo E., Vidal J. 1M. (LabGEv); Paraná, Ponta Grossa, Itaiacoca, 25°07'19"S 49°56'24"W, 19.ii.2020, [Método de coleta puçá, Ponto B], Begha B., Araujo E. 1M. (LabGEv); Paraná, Ponta Grossa, Itaiacoca, 25°07'05.4"S 49°56'27.7"W, 26.ix.2019, [Método de coleta puçá, Ponto A], Araujo E. 1F (LabGEv); Paraná, Ponta Grossa, Itaiacoca, 25°07'05.4"S 49°56'27.7"W, 19.xii.2019, [Método de coleta puçá, Ponto A], Araujo E., Begha B., Vidal J. 1F. (LabGEv); Paraná, Ponta Grossa, Itaiacoca, 25°07'05.4"S 49°56'27.7"W, 27.i.2020, [Método de coleta puçá, Ponto A], Almeida M.; Araujo E., Vidal J. 2F. (LabGEv); Paraná, Ponta Grossa, Itaiacoca 25°07'05.4" S 49°56'27.7" W, 23.x.2021, [Método de coleta puçá, Ponto A], Almeida M., Ramos R, Lima F, Mayer, B. 4F, 4M. (LabGEv).

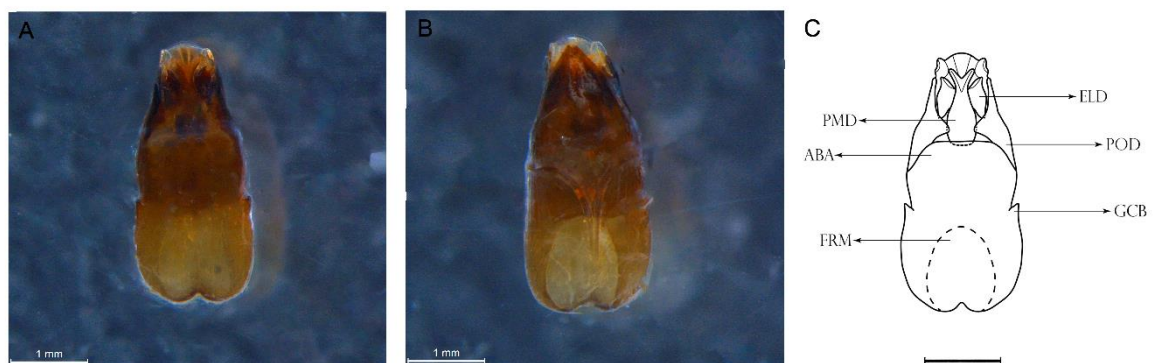


**Figura 2 -** Morfologia externa de *A. neoequestris*.



**Legenda:** A-B. Fêmea em espécime fresco de *A. neoequestris*; **A.** Vista dorsal; **B.** Vista ventral; **C-D.** Ilustração da morfologia externa de *A. neoequestris*; **C.** Vista dorsal; **D.** Vista ventral. **Escala:** 2 mm. **Fonte:** Autora.

**Figura 3 -** Lobo Médio e ilustração de *A. neoequestris*.

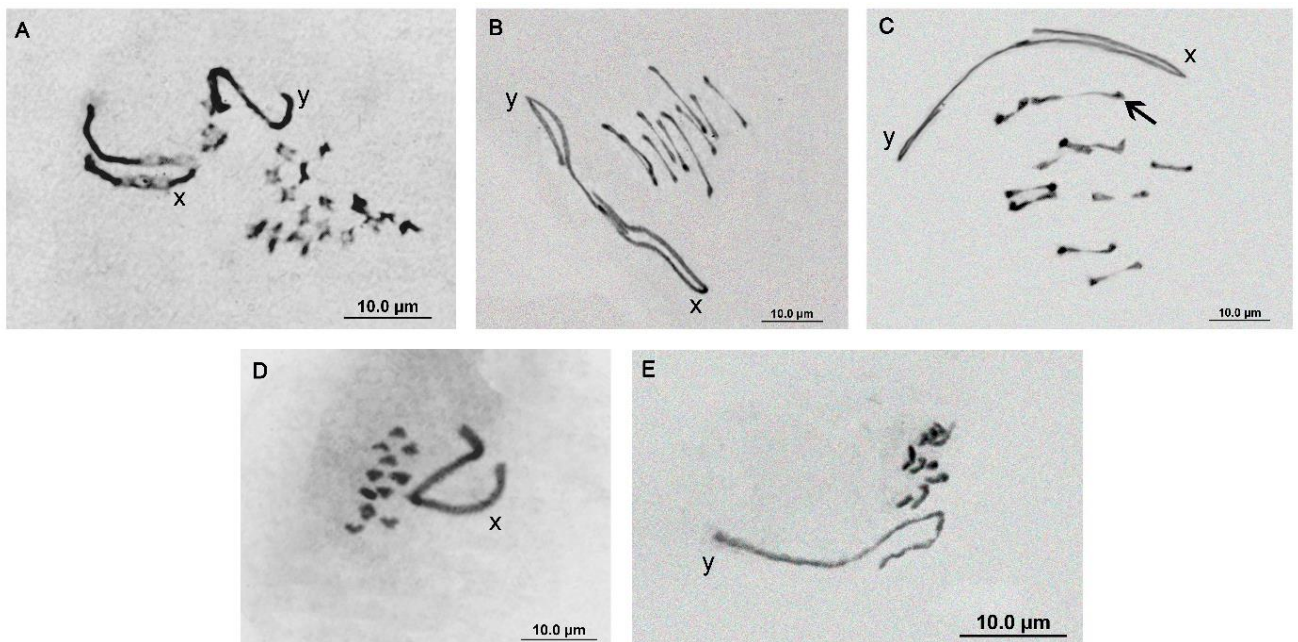


**Legenda:** **A.** Vista dorsal; **B.** Vista ventral; **C.** Ilustração indicando estruturas relevantes para a discussão sistemática em vista dorsal. Esclerito Lateral Dorsal (ELD); Processo Mediano Dorsal (PMD); Processo Oblíquo Dorsal (POD); Aba Apical (ABA); Ganchos Basais (GCB); Forâmen (FRM) em vista ventral. **Escala:** 1mm. **Fonte:** Autora.

#### 4.1.3.2 Caracterização citogenética

A análise de células meióticas, com coloração convencional, revelou que *A. neoequestris* possui um número diploide  $2n=22$  (Figura 4). O estudo da metáfase espermatogonial e metáfase II mostrou que o complemento diploide possui autossomos com morfologia submetacêntrica e acrocêntrica (Figura 4 A e D). Em relação aos cromossomos sexuais, estes são gigantes, o X é metacêntrico e o y submetacêntrico (Figura 4). Nas células metafásicas I foi observado a fórmula meiótica  $2n=10II+X+y$ , os cromossomos sexuais são assinápticos e com orientação sintética (Figura 4 B-C). Além disso, um bivalente autossômico mostrou segregação precoce (Figura 4 C). E, a análise de células metafásicas II mostrou o complemento haplóide  $n=10+X$  e  $n=10+y$  (Figura 4 D-E), evidenciando a segregação correta.

**Figura 4** - Células meióticas de *A. neoequestris* coradas em Giemsa.



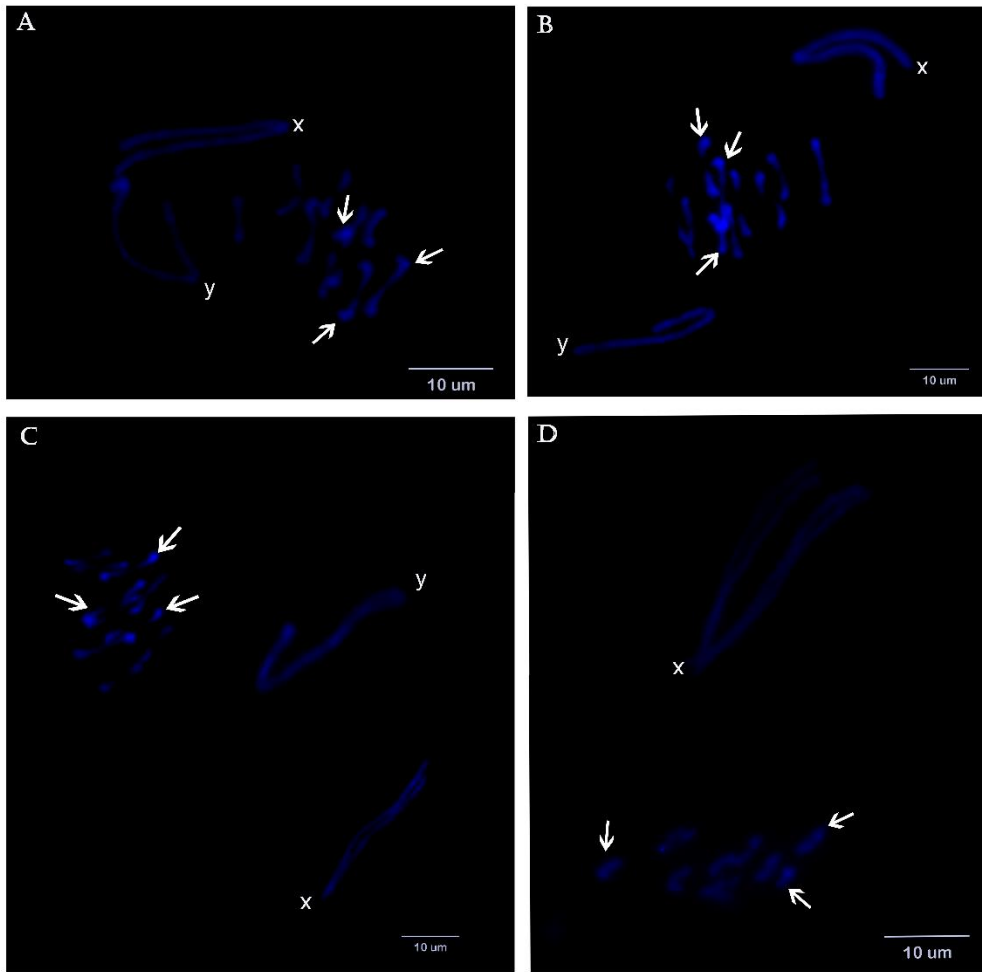
**Legenda:** **A.** Metáfase espermatogonial; **B-C.** Metáfases I, com a segregação precoce de um bivalente autossômico (seta); **D.** Metáfase II com o cromossomo sexual X; **E.** Metáfase II com o cromossomo y.

**Escala:** 10 µm.

**Fonte:** Autora.

A técnica de obtenção de Bandas-C evidenciou presença de heterocromatina nas regiões centroméricas de três bivalentes autossômicos em metáfase I (Figura 5 A-C), e em três cromossomos em metáfase II (Figura 5 D). Os cromossomos sexuais não mostraram marcações.

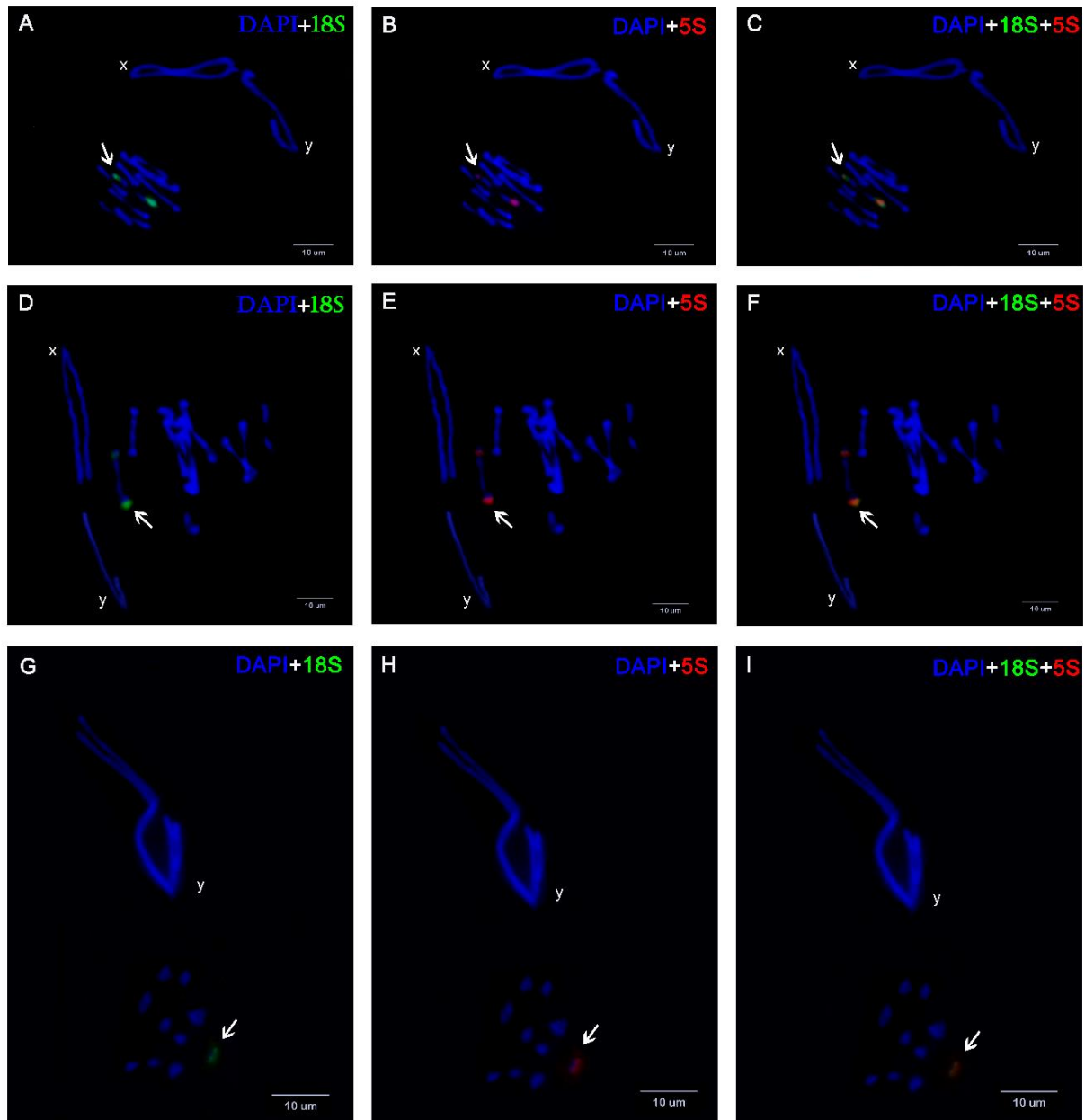
**Figura 5** - Células meióticas de *A. neoequestris* submetidas à técnica de obtenção de Bandas-C.



**Legenda:** A-C. Metáfase I; D. Metáfase II com o cromossomo X. Setas indicam marcações. **Escala:** 10  $\mu\text{m}$ .

**Fonte:** Autora.

**Figura 6-** Metáfases meióticas de *A. neoequestris* submetidas à FISH



**Legenda:** Sondas rDNA 18S (Verde) e 5S (Vermelho). **A-F.** Metáfase I; **G-I.** Metáfase II com o cromossomo sexual y; **C, F e I.** Sobreposição das fotos. Setas indicam marcações. **Escala:** 10  $\mu$ m. **Fonte:** Autora.

A Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH) com sondas de rDNA 18S e 5S evidenciou marcação em um bivalente autossômico em metáfase I (Figura 6 A-E) e em um cromossomo em metáfase II (Figura 6 G-H). A sobreposição das imagens revelou que os cístrons rDNA 45S e 5S são sintênicos e colocalizados nesse par (Figura 6 C, F e I).

#### 4.1.3.3 Genética molecular

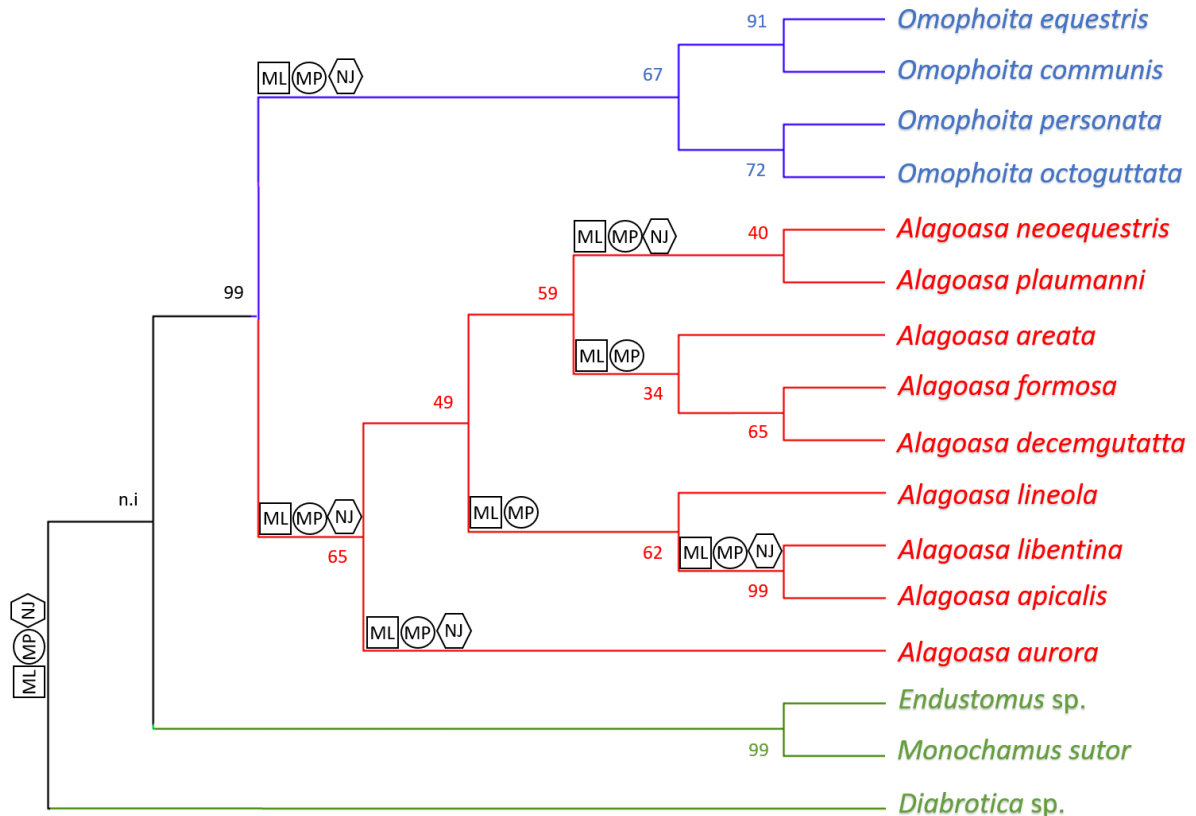
A amplificação do gene Citocromo Oxidase I nos indivíduos de *A. neoequestris* visualizado em gel de agarose mostrou um tamanho aproximado de 600 pares de base (pb). As sequências consenso obtidas desse fragmento por meio do sequenciamento resultaram em 527 pb.

A amplificação do gene de DNA ribossomal 28S nos indivíduos de *A. neoequestris*, *O. communis* e *O. equestris* visualizados em gel de agarose mostrou um tamanho aproximado de 400 pb. As sequências consenso obtidas desse fragmento por meio do sequenciamento resultaram em 335 pares de base para *A. neoequestris*, 383 para *O. communis* e 316 para *O. equestris*. A distância interespecífica entre *Alagoasa neoequestris* e as outras espécies do gênero variou de 0,0650 a 0,1288. A distância entre *Alagoasa neoequestris* e *Omophoita communis* foi de 0,1069, e entre *Omophoita equestris* foi de 0,1054 (apêndice C).

As árvores das sequências gênicas concatenadas geradas utilizando *Maximum Likelihood* (Apêndice D), *Maximum Parsimony* (Apêndice E) *Neighbor-Joining* (Apêndice F) formaram topologias com três grupos. A árvore consenso dessas três análises (Figura 7), contém um agrupamento com as espécies do grupo externo, um agrupamento com as espécies do gênero *Omophoita* e outro grupo com as espécies de *Alagoasa*, sendo esse ramo suportado com um valor de *bootstrap* de 99%. O agrupamento do gênero *Omophoita* foi suportado com *bootstrap* de 67% e o gênero *Alagoasa* com 65%. No grupo que contém as espécies do gênero *Alagoasa*, encontra-se um agrupamento com a espécie *Alagoasa neoequestris* e *Alagoasa plaumanni*. Nas análises filogenéticas realizadas, *Alagoasa neoequestris* permanece no agrupamento do gênero *Alagoasa*, e a relação com *Alagoasa plaumanni* foi suportada pelas três análises.



**Figura 7** - Árvore Consenso das sequências gênicas concatenadas



**Legenda:** Árvore criada a partir das análises evolutivas com *Maximum Parsimony* utilizando o software Adobe Photoshop CC 2019. Símbolos e letras representam as análises filogenéticas realizadas que suportam os ramos demonstrados: ML - *Maximum Likelihood*; MP - *Maximum Parsimony*; NJ - *Neighbor-Joining*. Cor azul: Agrupamento do gênero *Omophoita*. Cor vermelho: Agrupamento do gênero *Alagoasa*. Cor verde: Agrupamento externo. n.i.- *Bootstrap* não informado.  
**Fonte:** Autora.

#### 4.1.4 Discussão

As principais características de identificação morfológica de gênero foram encontradas em *A. neoequestris* validando a sua posição taxonômica (CHAPUIS, 1875; DUCKETT; DAZA, 2004; SCHERER, 1983; BEGHA, 2021). O padrão de coloração de *A. neoequestris* mostrou divergência dependendo do método de conservação do animal alertando na identificação de espécie com base apenas na coloração, pois isso pode causar identificações errôneas. Todas as espécies resultantes da revisão pelo Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil (CTFB) e do *Naturhistorisches Museum Basel* foram analisadas e não correspondem ao espécime de *A. neoequestris*. Àquelas que se pareçam morfológicamente, tiveram a genitália masculina dissecada e são discutidas abaixo.

O padrão elital de *A. neoequestris* é diferente de algumas espécies

encontradas em outros países como Bolívia, Paraguai, México e Colômbia, assim como das espécies encontradas no Brasil, como: *A. areata* (Germar, 1824) e *A. scissa* (Germar, 1824) que possuem máculas brancas e élitro preto (BEGHA, 2021). Por outro lado, as espécies que apresentam padrão elitral variando em tons de marrom e vermelho como *A. decemguttata* (Fabricius, 1801), *Alagoasa florigera* (Harold, 1877), *Alagoasa lacordairei* (Bryant, 1949), *Alagoasa libentina* (Germar, 1824) e *Alagoasa rufina* (Illiger, 1807) apresentam um padrão variável de máculas e listras que não correspondem ao de *A. neoequestris*. A espécie *Alagoasa labiata* (Schaufuss, 1874) encontrada na Colômbia, foi a única que se assemelhou ao padrão elitral de *A. neoequestris*. Portanto, esse padrão elitral de quatro manchas claras em um élitro marrom avermelhado tem sido pouco descrito em espécies de *Alagoasa*.

Em contrapartida, o padrão elitral de *A. neoequestris* é encontrado em *O. communis* e *O. equestris* (WOLSKI *et al.*, 2021), e reforça a hipótese de que são espécies miméticas, pois essa relação já foi descrita para outras espécies envolvendo esses gêneros, mas apenas estudos específicos podem comprovar tal hipótese (ANTEPARRA; VELÁSQUEZ, 2014; BEGOSSI; BENSON, 1988; GE *et al.*, 2011; JOLIVET, 1988; KONSTANTINOV; PRATHAPAN; VENCL, 2018; SHERRATT, 2008).

A comparação da genitália masculina de *A. neoequestris* com *A. aurora*, *A. decemguttata*, *A. libentina*, *A. scissa*, e *A. labiata*, mostrou diferenças evidentes no formato do processo mediano dorsal, do processo oblíquo dorsal, do processo lateral dorsal e do esclerito ventral, pois essas apresentam padrões variáveis em cada estrutura, evidenciando isolamento reprodutivo (BEGHA, 2021; DUCKETT; DAZA, 2004). Em relação a todas essas espécies, *A. neoequestris* é a única que apresenta esclerito lateral dorsal em formato de losango, e processo oblíquo dorsal com a porção apical ligeiramente curvada. Isso vem de encontro que o lobo médio é uma das características que contribuem na identificação de espécie e pode mostrar isolamento reprodutivo (BARYSHNIKOVA, 2016; JONES *et al.*, 2016; WOLSKI *et al.*, 2021). Com relação à *O. communis* e *O. equestris*, a genitália masculina dessas espécies possui padrões que a classificam dentro de *Omophoita*, o que representa isolamento reprodutivo com o gênero *Alagoasa* (WOLSKI *et al.*, 2021), e também com relação *A. neoequestris*.

O número diploide  $2n=22$  e a fórmula meiótica  $2n=10II+X+y$  encontrado em *A. neoequestris* está de acordo com àqueles descritos para a maioria dos representantes de Oedionychina, e são considerados conservados para o grupo (ALMEIDA;

CAMPANER; CELLA, 2006, 2009; AZAMBUJA *et al.*, 2020; GOLL, 2018; VIRKKI; SANTIAGO-BLAY, 1993; WOLSKI *et al.*, 2021). Esse número possivelmente é resultado de rearranjos cromossômicos que diminuíram o número cromossômico do ancestral de Chrysomelidae ( $2n=24$ ) (ALMEIDA; CAMPANER; CELLA, 2009; AZAMBUJA *et al.*, 2020; PETITPIERRE, 2006; PETITPIERRE *et al.*, 1988; SMITH; VIRKKI, 1978; VIRKKI; SANTIAGO-BLAY; CLARK, 1991).

A presença de autossomos acrocêntricos e submetacêntricos é de baixa frequência em Oedionychina (ALMEIDA; CAMPANER; CELLA, 2006, 2009; ALMEIDA *et al.*, 2010; AZAMBUJA *et al.*, 2020; PETITPIERRE, 1988; SMITH; VIRKKI, 1978; VIRKKI, 1970, 1988). Esta morfologia foi observada, até agora, em *O. communis*, que possui quatro pares submetacêntricos e um acrocêntrico (WOLSKI *et al.*, 2021) e em *A. neoequestris* deste trabalho. Em relação a morfologia dos sexuais, o cromossomo X metacêntrico e o Y submetacêntrico também foi encontrado em outra espécie do gênero, *A. pantina* (ALMEIDA; CAMPANER; CELLA, 2006; ALMEIDA *et al.*, 2010; AZAMBUJA *et al.*, 2020).

Essa variação de morfologia vista em *A. neoequestris* é decorrente de rearranjos cromossômicos do tipo inversão pericêntrica, que explica a variação de cromossomos ancestrais metacêntricos para submetacêntricos e acrocêntricos (ALMEIDA; CAMPANER; CELLA, 2009; GOLL *et al.*, 2018; VIRKKI, 1984). O sistema sexual Xy, com cromossomos gigantes e assinápticos é uma característica representativa da subtribo Oedionychina (VIRKKI, 1985). É provável que o aumento desses cromossomos sexuais possa ter acontecido pelo acúmulo de sequências repetitivas de DNA que contribuíram para a diferenciação dos cromossomos sexuais e também especiação do grupo (ALMEIDA; CAMPANER; CELLA, 2006; MELLO *et al.*, 2014; ROSOLEN; VICARI; ALMEIDA, 2018). Nos cromossomos sexuais, tais rearranjos também podem ter sido responsáveis pela perda de homologia tornando-os assinápticos (ALMEIDA; CAMPANER; CELLA, 2009).

A heterocromatina observada em três bivalentes nas regiões centroméricas de *A. neoequestris*, também foi observada em *A. januarina* (VIRKKI, 1983). *O. communis* e *O. equestris* também possuem pequenos blocos de heterocromatina na região centromérica (WOLSKI *et al.*, 2021). A heterocromatina também é encontrada nessa região em outros coleópteros, sendo vista como uma característica da ordem (ALMEIDA; CAMPANER; CELLA, 2006, 2009; VIRKKI, 1983).

Com relação ao número de autossomos com a presença de heterocromatina,



há uma variação na subtribo de alguns pares à todos os autossomos, causadas por rearranjos cromossômicos (ALMEIDA; CAMPANER; CELLA, 2006, 2009; GOLL, 2018; VIRKKI, 1983). Dessa forma, é possível inferir que os rearranjos que ocorreram em *A. neoequestris* e mudaram a morfologia dos autossomos para submetacêntricos e acrocêntricos, eliminaram a heterocromatina nesse processo, restando apenas em três bivalentes. Da mesma forma, supõe-se que a ausência de heterocromatina nos sexuais também se deve a tais rearranjos (ALMEIDA; CAMPANER; CELLA, 2009; VIRKKI, 1983). Assim, foi possível evidenciar a diferenciação cariotípica ocorridos durante os processos de diferenciação dessas espécies (MELLO *et al.*, 2014; ROŽEK *et al.*, 2004).

Os cístrons rDNA 45S e 5S encontrados em um par autossômico de *A. neoequestris* são frequentemente observados em espécies relacionadas (ALMEIDA *et al.*, 2010; AZAMBUJA *et al.*, 2020), mostrando ser uma característica predominante na subtribo Oedionychina. A localização do 5S em apenas um par é considerada como uma característica ancestral e conservada para Coleoptera (CABRAL-DE-MELLO; MOURA; MARTINS, 2010; SCHNEIDER *et al.*, 2007). A sintonia e colocalização desses cístrons também foi encontrada em outros representantes da subtribo (ALMEIDA *et al.*, 2010; AZAMBUJA *et al.*, 2020), assim como em outras famílias de Coleoptera, como Scarabaeidae e Tenebrionidae (AZAMBUJA *et al.*, 2020; CABRAL-DE-MELLO *et al.*, 2011; GOLL *et al.*, 2015). Além disso, os resultados são concordantes com àqueles obtidos por Azambuja *et al.* (2020), nos quais a localização dos cístrons é conservada nas espécies de *Alagoasa*.

Com relação a reconstrução filogenética por meio da árvore das sequências gênicas COI e rDNA 28S concatenadas, os dados filogenéticos resultantes das três análises realizadas evidenciam e corroboram com os dados morfológicos e citogenéticos deste trabalho, somado a distância interespecífica chegando a 12% entre as espécies do gênero *Alagoasa*, provando que *A. neoequestris* é uma nova espécie desse gênero. Foi possível observar que os indivíduos de *A. neoequestris* formam um agrupamento com *Alagoasa plaumanni* dentro do ramo que contém as espécies do gênero *Alagoasa* em todas as análises realizadas, e ambas apresentam menor distância interespecífica de 6,5%, podendo ser consideradas como partes de um grupo irmão e descendentes de um ancestral comum.

As espécies *O. communis* e *O. equestris* estão agrupadas como grupo irmão dentro do gênero *Omophoita*, o que também foi observado por Wolski *et al.* (2021). A

distância interespecífica acima de 10% com relação *A. neoequestris*, corrobora com os dados morfológicos de classificação de gênero de cada uma. Isso também reforça a hipótese de que essa nova espécie pode ser mimética de *O. communis* e *O. equestris*, pois são morfológicamente semelhantes e ocupam o mesmo habitat.

Após as análises citogenéticas, sugere-se que a espécie descrita citogeneticamente como "*A. equestris*" por Virkki e Santiago-Blay em 1993, com  $2n=12=5II+X+y$ , com autossomos metacêntricos e submetacêntricos, sexual X metacêntrico e y acrocêntrico, seja *O. communis* com base nas características cariotípicas e morfológicas (VIRKKI; SANTIAGO-BLAY, 1993; WOLSKI *et al.*, 2021), e que recebeu esse nome pois essa espécie também é confundida com *O. equestris*. Com isso, esse trabalho evidencia a importância de uma taxonomia integrativa, na identificação e sistemática em complexo de espécies e espécies miméticas.

## REFERÊNCIAS

As referências bibliográficas deste capítulo se encontram no final da dissertação no item “**REFERÊNCIAS**”.

#### 4.2 ARTIGO 2 - OBTENÇÃO DE DNA REPETITIVO A PARTIR DE DOP-PCR MAPEADO POR PINTURA CROMOSSÔMICA EM *Omophoita communis* BECHYNÉ, 1959 (CHRYSOMELIDAE, ALTICINAE)

##### RESUMO:

O genoma eucarioto é constituído de heterocromatina que contém vários tipos de DNA repetitivos que compõem grande parte do genoma e são importantes na sua estrutura e atividade, assim como na evolução cromossômica. O gênero *Omophoita* (Alticinae: Oedionychina) apresenta variação de distribuição e composição de DNA repetitivo, além de possuírem elementos transponíveis no genoma que podem ter contribuído no aumento e diferenciação dos cromossomos sexuais. A Pintura Cromossômica é uma técnica que utiliza sondas produzidas por DOP-PCR, e é usada para evidenciar rearranjos e homeologias de uma espécie, mas ela também pode mapear DNA repetitivo pelo uso da DOP-PCR. Assim, esse trabalho teve como objetivo mapear DNAs repetitivos obtidos pela técnica de DOP-PCR por meio Pintura Cromossômica em *Omophoita communis*, cuja redução do número cariótipo se deu por meio de rearranjos cromossômicos e ainda não foi mapeada com relação a repetitivos. O cromossomo autossômico de *O. communis* foi microdissectado, amplificado pelo Kit Genômico WGA4 e por DOP-PCR, e hibridado por meio da FISH. A hibridação da sonda em *O. communis* sem o uso de competidor resultou em marcações centroméricas nos autossomos, pericentromérica no sexual X e intersticial no sexual y. Com adição de competidor usado na metodologia de Pintura Cromossômica, produziu marcações centroméricas em todos os autossomos e na região intersticial do cromossomo y. O uso de 30 µg de competidor inibiu todas as hibridações. As marcações na região centromérica nos autossomos e pericentromérica/intersticial nos sexuais de *O. communis* possuem o mesmo padrão de heterocromatina constitutiva descrita para algumas espécies de Alticinae e Coleptera, e vão de encontro que a amplificação por DOP-PCR predomina a obtenção de DNA repetitivos presentes nos blocos de heterocromatina. A inibição das hibridações com o uso de 30 µg confirma que a sonda é constituída por DNA repetitivo. Na literatura tem descrição de outros trabalhos que tiveram resultados semelhantes com a obtenção de DNA repetitivo mapeados com Pintura Cromossômica. Apesar disso ainda são necessários mais estudos para complementar os resultados da caracterização de DNA repetitivo dessa espécie, para que assim possa contribuir ao entendimento da evolução cromossômica ocorrida em *Omophoita communis*.

**Palavras-Chave:** Oedionychina, citogenética, heterocromatina, técnica citogenética.

#### 4.2.1 Introdução

O genoma eucarioto é constituído de eucromatina e heterocromatina, sendo que a última contém variáveis tipos de DNA repetitivos, por exemplo o DNA satélite (satDNA), elementos transponíveis (TEs) e as famílias multigênicas (BARDELLA; MILANI; CABRAL-DE-MELLO, 2020; CABRAL-DE-MELLO; MOURA; MARTINS, 2010; CHARLESWORTH; SNIEGOWSKI; STEPHAN, 1994; SUMNER, 2003). Esses DNAs repetitivos compõem grande parte do genoma e são importantes na sua estrutura e atividade, assim como na evolução cromossômica (CABRAL-DE-MELLO *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2012; ROŽEK *et al.*, 2004; SUMNER; 2003).

As sequências de DNA repetitivo são importantes marcadores citogenéticos, pois podem contribuir no entendimento organizacional do genoma e no processo evolutivo das espécies (CABRAL-DE-MELLO; MOURA; MARTINS, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2012). A heterocromatina constitutiva/DNAs repetitivos podem ser localizados nos cromossomos por várias técnicas, como Bandas-C (ROŽEK *et al.*, 2004), e por meio da Hibridação *in situ* Fluorescente com DNA altamente repetitivo (C0t-1), DNA microssatélite, sequências teloméricas, sondas de DNA ribossomal (rDNA) e *genes* de histonas (ALMEIDA *et al.*, 2010; ALMEIDA; CAMPANER; CELLA, 2009; AZAMBUJA *et al.*, 2020; CABRAL-DE-MELLO *et al.*, 2011; GOLL *et al.*, 2018). Elementos transponíveis tais como TC1/*mariner* também podem ser localizados, assim como sequências repetitivas provindas de Reação em Cadeia da DNA Polimerase com *primer* degenerado (DOP-PCR) e análises com dados de sequenciamento pela bioinformática (CHOWDHARY; RAUDSEEP, 2001; MELLO *et al.*, 2014; MORA *et al.*, 2020; PALACIOS-GIMENEZ *et al.*, 2017; ROSOLEN; VICARI; ALMEIDA, 2018).

Diversos trabalhos tem relatado a obtenção de DNA repetitivo mapeados pela técnica de pintura cromossômica, principalmente em insetos que possuem muito DNA repetitivo no genoma (PITA *et al.*, 2016). Por exemplo, em *Ceratitis capitata* uma sonda com cromossomos sexuais evidenciou que o cromossomo sexual Y é degenerado e contém sequências repetitivas compartilhadas com o sexual X e autossomos (WILLHOEFT; MUELLER-NAVIA; FRANZ, 1998). Em *Locusta migratória*, o cromossomo B é rico em sequencias repetitivas provindas do sexual X e dos autossomos, e está relacionado com elementos transponíveis (TERUEL *et al.*, 2009). Insetos do gênero *Triatoma*, também tiveram sequências repetitivas de DNA

compartilhadas entre o cromossomo sexual X e os autossomos (PITA *et al.*, 2016), assim como em *Cydia pomonella* com a sonda do cromossomo sexual W rica em sequências repetitivas e transposons verificadas por meio de clonagem (FUKOVÁ *et al.*, 2007).

Em *Tropidacris cristata grandis* a microdissecação e amplificação por WGA4 do cromossomo X resultou em hibridações correspondentes a heterocromatina localizada por Bandas-C (BALDISSERA *et al.*, 2019). Análise em *Melipona scutellaris* com DOP-PCR e C0t-1 hibridaram a mesma região heterocromática rica em DNA microssatélite (PICCOLI; BARDELLA; CABRAL-DE-MELLO, 2018). A obtenção de tais sequências repetitivas nos estudos com Pintura Cromossômica vem sendo relacionada ao método de obtenção da sonda por meio da DOP-PCR, pois esta amplifica predominantemente sequências de DNA repetitivo (FUKOVÁ *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 1999; LO *et al.*, 2009; TERUEL *et al.*, 2009).

Na subtribo Oedionychina (Alticinae), a heterocromatina é predominantemente localizada, com a técnica de obtenção de Bandas-C, na região pericentromérica e centromérica dos autossomos, como observado em *O. personata*, *O. aequinoctialis*, *O. octoguttata*, *O. magniguttis*, *O. sexnotata*, e *O. abbreviata* (ALMEIDA; CAMPANER; CELLA, 2009; GOLL *et al.*, 2018; VIRKKI, 1983). Com relação aos cromossomos sexuais, são encontrados padrões variáveis de localização, como na região centromérica, pericentromérica, intersticial e terminal, dependendo da espécie analisada (ALMEIDA; CAMPANER; CELLA, 2006, 2009; GOLL *et al.*, 2018). Estudos apontam que essa variação de distribuição em *Omophoita* representa a diferenciação cariotípica do grupo (GOLL *et al.*, 2018), e as marcações intersticiais dos cromossomos sexuais são heterocromatina remanescentes da formação do sistema sexual Xy (ALMEIDA; CAMPANER; CELLA, 2006).

Estudos em *O. octoguttata*, *O. sexnotata*, *O. personata* e *P. opima* utilizando DNAs altamente repetitivo (C0t-1) e fluorocromos específicos para bases GC, cromomicina A3 (CMA3), e para bases AT, 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), evidenciaram que a localização da heterocromatina na região pericentromérica é rica em sequências repetitivas AT, sendo que tais bases são relacionadas a eventos iniciais de replicação e transcrição (ALMEIDA; CAMPANER; CELLA, 2009; MELLO *et al.*, 2014; SUMNER, 2003). Além disso, foi proposto que a composição do DNA repetitivo em *Omophoita* pode variar em sequências e/ou classes, e que grande parte do genoma é compartilhado entre as espécies do gênero, com regiões conservadas e

repetitivas ao longo dos autossomos e sexuais (MELLO *et al.*, 2014).

Também, foram encontrados elementos transponíveis no genoma dessas três espécies de *Omophoita*, na região pericentromérica dos autossomos e em diferentes sítios nos cromossomos sexuais, sugerindo a contribuição deles no aumento do tamanho, na diferenciação dos cromossomos assinápticos e na especiação do grupo (ROSOLEN; VICARI; ALMEIDA, 2018). A espécie *Omophoita communis* possui número cromossômico  $2n=12$  com possível redução cariotípica ocorrida por meio de fusões cromossômicas, e ainda não foi mapeada com relação a DNA repetitivos. Devido a ausência de estudos com relação a DNA repetitivo e a redução cariorípica por meio de rearranjos cromossômicos, o uso da Pintura Cromossômica se torna uma ferramenta alvo para esta espécie. Desta forma, este trabalho tem como objetivo mapear DNAs repetitivos obtidos pela DOP-PCR por meio da técnica de Pintura Cromossômica em *Omophoita communis*.

#### 4.2.2 Material e Métodos

Um cromossomo autossômico de *Omophoita communis* foi microdissectado segundo Yang *et al.* (2017), utilizando um microscópio invertido (Olympus) com microdissector mecânico (Narishige). A ponta da agulha contendo o material cromossômico foi quebrada no interior de um microtubo, no qual foi realizada amplificação do material genômico com o *Kit Genome Plex Single Cell Whole Genome Amplification* (WGA4) (Sigma®). Em seguida o material foi purificado utilizando o kit *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification*, da GE Healthcare®, ambos seguindo as instruções do fabricante.

As reações de DOP-PCR seguiram o protocolo descrito por Telenius *et al.* (1992) e Yano, Bertollo e Cioffi (2017), com algumas modificações, utilizando o *primer* 6MW 5' – CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G - 3'. Na primeira DOP-PCR foram utilizadas três soluções: Solução A (ciclos de baixa temperatura) contendo 0,6 X tampão de Sequenase (ThermoFisher®); 4,8  $\mu$ M de *primer* 6MW; 2 mM do mix dNTP, para 5  $\mu$ L de solução. A solução B com 4,38 X de tampão de Sequenase (ThermoFisher®) e 3,25 U de Sequenase (ThermoFisher®), para 2  $\mu$ L de solução. E a solução C (ciclos de alta temperatura) com 1 X tampão de Long Taq (LudWig®); 0,19 mM de dNTP; 0,55  $\mu$ M de *primer* 6MW; 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, e 6,4 U de Long Taq DNA polimerase (LudWig®), para 45  $\mu$ L de solução. Antes de seguir o programa da

PCR, foi acrescentado a solução A no microtubo em que foi realizada a pré-DOP, seguindo um passo de desnaturação inicial à 92°C por 5 minutos. No início do próximo ciclo de 10x, foi acrescentado 1 µL da solução B, seguindo para o anelamento do *primer* à 25°C por 2 minutos e 20 segundos, alongação à 37°C por 2 minutos, com um passo final de 90°C por 1 minuto. Em seguida, foi acrescentada a solução C e iniciou-se um ciclo de 32x, com desnaturação à 92°C por 1 minuto, anelamento à 56°C por 2 minutos, alongação à 68°C por 2 minutos, com alongação final à 68°C por 5 minutos.

Do tubo contendo o primeiro produto da DOP-PCR foi aliquoteado 1 µL e feita uma reação de reamplificação, para um volume final de 50 µL contendo: 1 X tampão de Long Taq (LudWig®); 0,2 mM dNTP; 1 µM de *primer* 6MW; 2,5 µM MgCl<sub>2</sub> e 0,6 U de Long Taq DNA polimerase (LudWig®). O ciclo de PCR seguiu tais condições: desnaturação inicial à 92°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos à 91°C por 1 minuto de desnaturação, 56°C por 1 minuto de anelamento, 68°C por 2 minutos de alongação, seguido de um passo de alongação final à 68°C por 5 minutos. As sondas foram marcadas por meio de uma reação de PCR igual à reamplificação da DOP-PCR, utilizando 0,2 mM de cada nucleotídeo e 0,06 mM de 11-dUTP-Roche, com 1 U de Long Taq DNA polimerase (LudWig®). O ciclo de PCR foi o mesmo da reamplificação. A sonda foi nomeada como 3BP+D2M, na qual o 3B corresponde ao cromossomo microdissectado, o P corresponde a purificação, o D2 corresponde a reamplificação da DOP-PCR e o M corresponde a marcação da sonda.

Para obter o DNA utilizado como competidor (COT-PCR) foi feita extração de DNA, de acordo com o protocolo de Murray e Thompson (1980), com modificações, utilizando CTAB e nitrogênio líquido para maceração dos tecidos. Posteriormente foram feitas PCR utilizando dois *primers* degenerados: O *primer* G1\_4, utilizado como metodologia de rotina no laboratório de Thomaz Liehr, na Universidade de Jena, Alemanha; e o *primer* 6MW (TELENIUS *et al.*, 1992). A primeira reação utilizando o *primer* G1\_4 5' – GAG GAT GAG GTT GAG NNN NNN GTG G - 3' e a segunda reação utilizando *primer* 6MW: 5' - CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G - 3'. Ambas continham 1 X tampão Long Taq DNA polimerase (LudWig®), 0,2 mM de solução dNTP, 4 µM para o *primer* G1\_4 e 5 µM do *primer* 6MW, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 5 U de Long Taq DNA polimerase (LudWig®), e 200-500 ng de DNA genômico. A PCR seguiu 2 ciclos de desnaturação inicial por 1 minuto a 92°C cada, seguido de 8 ciclos à 92°C por 1 minuto, 30°C por 1 minuto e 30 segundos, e 68°C por 2 minutos. Seguidos de 25 ciclos à 92°C por 1 minuto, 62°C por 1 minuto e 30 segundos, 68°C por 2 minutos



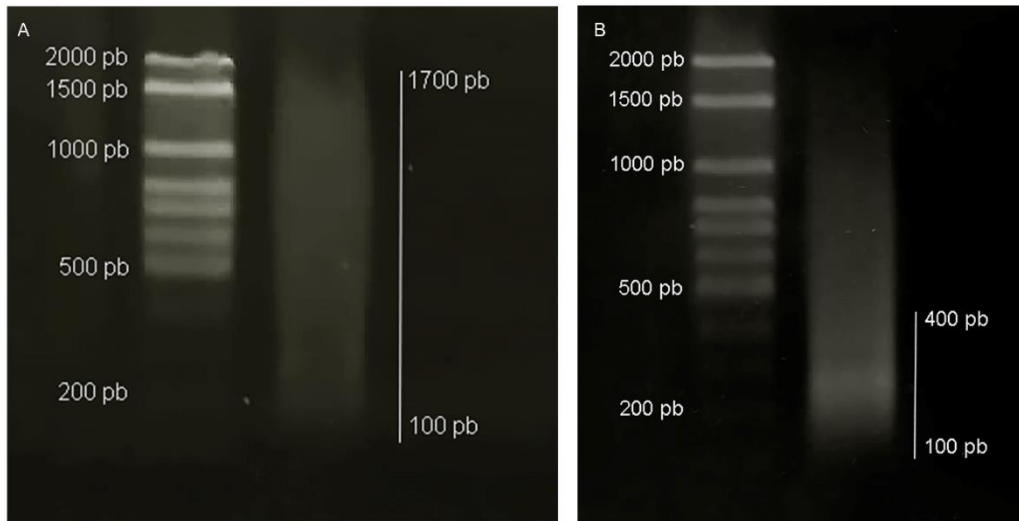
e 68°C por 5 minutos. A segunda PCR teve 1 ciclo à 94°C por 4 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 51°C por 45 segundos, 72°C por 1 minuto e 20 segundos e 72°C por 5 minutos.

O DNA de bloqueio foi precipitado adicionando 5 µg e 30 µg de DNA por lâmina. O bloqueio foi ressuscitado em 800 ng da sonda utilizada e incubado por 2 horas à 42°C. A pintura cromossômica seguiu a técnica de Hibridação *in situ* Fluorescente descrita por Pinkel, Straume e Gray (1986), com modificações. A sonda foi marcada por DOP-PCR utilizando 11-dUTP-Roche e para detecção foi utilizado o anticorpo anti-digoxigenina rodamina (*Roche*). A hibridação foi feita em preparações citológicas envelhecidas à 37°C, com pré-tratamento em pepsina 0,005%, com desnaturação em formamida 70% (2XSSC) à 70°C por 3 minutos e 50 segundos. As lâminas de pintura cromossômica foram hibridadas por três dias. A solução de hibridação foi de 77% de estringência, utilizando a sonda com o competidor previamente desnaturada à 85°C por 10 minutos e depois com a renaturação à 37°C por 1 hora. Os cromossomos foram contracolorados com DAPI montado em uma solução antifade. As lâminas foram fotografadas no fotomicroscópio de epifluorescência Zeiss *Imager 2*, acoplado a uma câmera AxioCam MRm (ZEISS), utilizando o *software* ZEN 2012. O tratamento das imagens foi realizado utilizando o *software* Adobe Photoshop CC 2019.

#### 4.2.3 Resultados

A sonda obtida a partir do cromossomo autossômico de *Omophoita communis* foi nomeada 3BP+D2M, como explicado na seção acima. A amplificação utilizando o kit WGA4 seguido da amplificação por DOP-PCR gerou um arrasto de 100 a 1700 pb em corrida eletroforética utilizando marcador de 100 pb (Figura 8 A). A reamplificação por DOP-PCR gerou um arrasto de 100 a 400 pb (Figura 8 B).

**Figura 8** - Sonda Autossômica de *Omophoita communis* 3BP+2DM

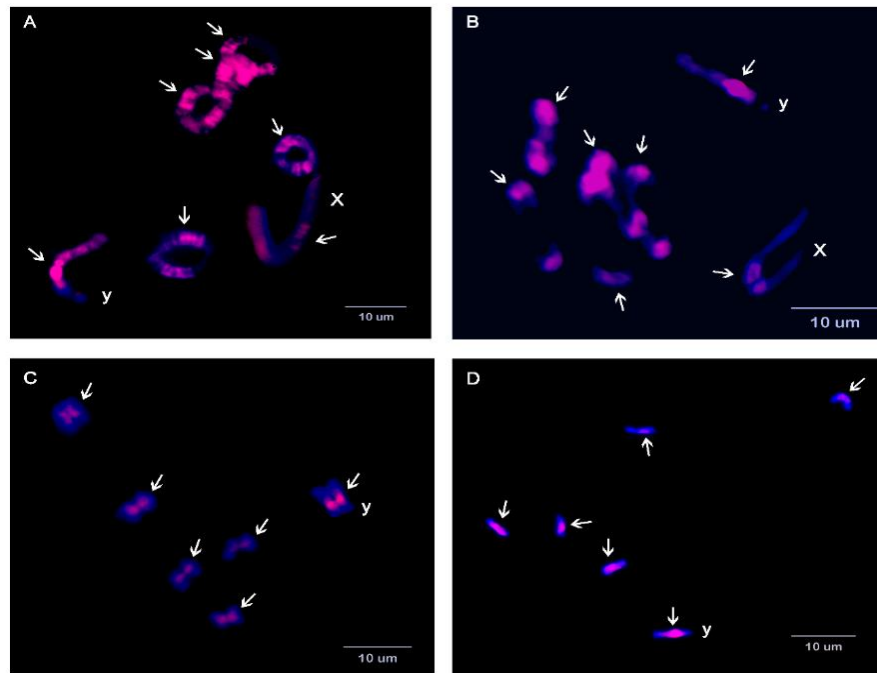


**Legenda:** **A.** Amplificação por DOP-PCR após amplificação por WGA4; **B.** Reamplificação da sonda por DOP-PCR. **Marcador:**100pb.

**Fonte:** Autora.

A hibridação da sonda em *Omophoita communis* sem o uso de competidor mostrou marcações centroméricas e pericentroméricas em todos os braços autossômicos em metáfase I e II (Figura 9). Três bivalentes mostraram marcações ao longo de todo os braços cromossômicos (Figura 9 A). Alguns autossomos em metáfase II marcaram somente a região centromérica (Figura 9 C). O cromossomo sexual X apresentou marcações na região pericentromérica (Figura 9 A) evidentes em metáfase I. O cromossomo sexual y apresentou marcações predominantes na região intersticial observada em metáfase I e II (Figura 9 A-D).

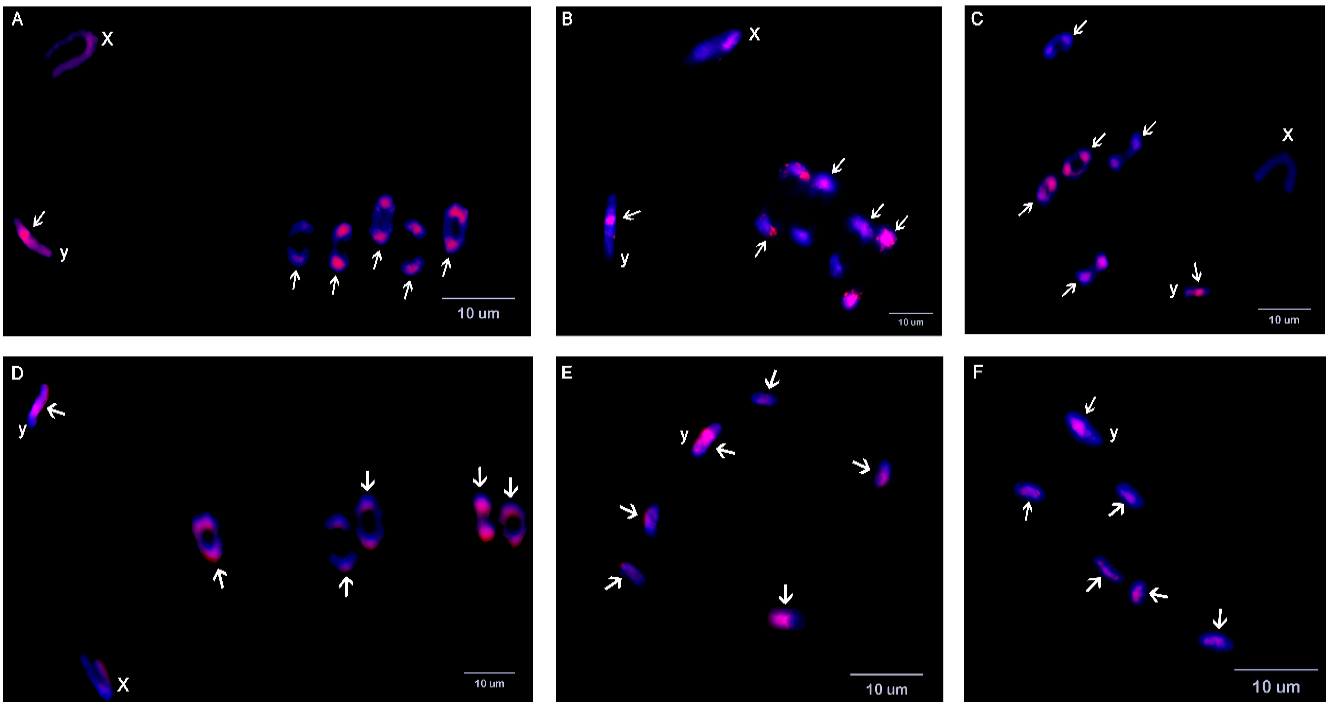
**Figura 9** - Sonda autossômica de *Omophoita communis* hibridada sem competidor.



**Legenda:** A-B. Metáfase I; C-D. Metáfase II com o cromossomo y. Setas indicam marcações.  
**Escala:** 10  $\mu\text{m}$ .  
**Fonte:** Autora.

O uso de competidor durante as hibridações é devido a metodologia usada na técnica de Pintura Cromossômica. A hibridação da sonda 3BP+D2M com adição de 5  $\mu\text{g}$  de competidor evidenciou marcações centroméricas em todos os autossomos em metáfase I e II, alguns pares evidenciaram fracas marcações (Figura 10). O cromossomo sexual X não apresentou marcações evidentes. O cromossomo sexual y apresentou marcações na região intersticial predominante em metáfase I e II (Figura 10 A-F). A adição de 30  $\mu\text{g}$  de competidor, padrão para Pintura Cromossômica, inibiu todas as marcações (resultados não mostrados).

**Figura 10** - Sonda autossômica de *Omophoita communis* hibridada com 5 µg de competidor



**Legenda:** A-D. Metáfase I; E-F. Metáfase II com o sexual y. Setas indicam marcações. **Escala:** 10 µm.

**Fonte:** Autora.

#### 4.2.4 Discussão

O tamanho dos fragmentos de DNA analisados em corrida eletroforética da sonda 3BP+D2M está dentro do intervalo de fragmentos obtidos por outros trabalhos que utilizaram amplificação após microdissecação por Kit genômico e DOP-PCR (FUKOVÁ *et al.*, 2007; JAMILENA; GARRIDO-RAMOS; REJ, 1995; TERUEL *et al.*, 2009; ZHOU *et al.*, 2021). Somado a isso, o uso de 30 µg de competidor (Padrão para Pintura Cromossômica), inibiu todas as hibridações quando utilizado junto com a sonda, pois a composição repetitiva do competidor bloqueia sequências de DNA repetitivo presentes no genoma da espécie alvo da hibridação (CABRAL-DE-MELO; MOURA; MARTINS, 2010; YANG, F. *et al* 2017; YANO, BERTOLLO, CIOFI, 2017). Isso confirma que a sonda produzida neste trabalho é composta por sequências de DNA repetitivas.

A obtenção de DNA repetitivo está de encontro ao que tem sido proposto para a técnica utilizada na obtenção e amplificação do genoma, pois vários trabalhos apontam que a microdissecação contém apenas parte do material eucromático, que posteriormente é amplificado por DOP-PCR, sendo que esta predomina a obtenção

de DNA repetitivos presentes nos blocos de heterocromatina nas espécies (CABRAL-DE-MELLO; MOURA; MARTINS, 2010; FUKOVÁ *et al.*, 2007; GRUBER *et al.*, 2014; HARVEY *et al.*, 2003; LIU *et al.*, 1999; TERUEL *et al.*, 2009; WILLHOEFT; MUELLER-NAVIA; FRANZ, 1998; ZHOU *et al.*, 2021; ZHOU; HU, 2007).

As marcações da sonda 3BP+D2M encontradas na região centromérica dos autossomos de *Omophoita communis* possuem o mesmo padrão encontrado em estudos de Bandas-C na ordem Coleoptera, com relação a heterocromatina constitutiva (ALMEIDA; CAMPANER; CELLA, 2006, 2009; SMITH; VIRKKI, 1978; VIRKKI, 1983). Na subfamília Alticinae, os estudos com Bandas-C também evidenciam marcações pericentroméricas e centroméricas nos autossomos de espécies relacionadas, como em: *O. aequinoctialis* (GOLL, 2018), *O. sexnotata*, *O. magniguttis* (ALMEIDA; CAMPANER; CELLA, 2009), *O. annularis*, *O. personata*, *O. octoguttata*, *A. januaría* (VIRKKI, 1983), *P. opima* (ALMEIDA; CAMPANER; CELLA, 2006), e *Alagoasa neoequestris* do capítulo I deste trabalho.

As marcações na região pericentromérica/intersticial dos cromossomos sexuais também estão de acordo aos resultados de caracterização de heterocromatina da ordem que apresenta predominância nessa região (ALMEIDA; ZACARO; CELLA, 2000; ROŽEK *et al.*, 2004). Dado que a sonda obtida neste trabalho é formada por sequências repetitivas, ao usar 5 µg de competidor, nem todas as sequências foram inibidas. Isso resultou em um padrão de repetitivo correspondentes a heterocromatina constitutiva de *Omophoita communis*, quando comparado ao padrão de hibridações por Bandas-C nas espécies relacionadas, podendo ser um tipo de DNA satélite localizado na região centromérica dos autossomos.

Outros trabalhos tiveram resultados semelhantes ao de *O. communis* com o uso da DOP-PCR em Pintura Cromossômica, como em *Tropidacris cristata grandis* e insetos do gênero *Triatoma*, na qual os autossomos e sexual X resultaram em marcações correspondentes ao padrões de Bandas-C do grupo, sugerindo que elementos repetitivos estão inter-espaçados na eucromatina e são compartilhados entre o sexual X e autossomos (BALDISSERA *et al.*, 2019; PITA *et al.*, 2016). A pintura a partir dos sexuais de *Oreochromis niloticus* revelou marcações na região centromérica dos cromossomos, que após clonagem evidenciou grande quantidade de elementos transponíveis (HARVEY *et al.*, 2003), e em *Ceratitís capitata*, foi observado que o sexual y é degenerado e acumulou sequências repetitivas presentes no sexual X e nos autossomos (WILLHOEFT; MUELLER-NAVIA; FRANZ, 1998).

Apesar de os resultados obtidos serem correspondentes aos padrões de heterocromatina em Coleoptera e Oedionychina, e outras técnicas revelarem sequências repetitivas com o uso da DOP-PCR e Pintura Cromossômica, ainda são necessários mais estudos com técnicas que complementem os padrões de hibridações com DNA repetitivo em *O. communis*. Um exemplo é a localização DNA altamente repetitivo (C0t-1) por meio da FISH, assim como clonagem e identificação das sequências por meio de sequenciamento de baixa cobertura (ALMEIDA; CAMPANER; CELLA, 2006, 2009; CABRAL-DE-MELLO; MOURA; MARTINS, 2010; FUKOVÁ *et al.*, 2007; MELLO *et al.*, 2014; PICCOLI; BARDELLA; CABRAL-DE-MELLO, 2018; PITA *et al.*, 2016; ROSOLEN; VICARI; ALMEIDA, 2018). Estas técnicas permitem a caracterização de DNA repetitivo e podem contribuir no entendimento da organização do genoma e na evolução cromossômica (BALDISSERA *et al.*, 2019; CABRAL-DE-MELLO; MAREC, 2021; JIANG; GILL, 2006; PICCOLI; BARDELLA; CABRAL-DE-MELLO, 2018).

Esse trabalho evidenciou que a sonda produzida por meio da DOP-PCR gerou sequências repetitivas de DNA que correspondem aos padrões heterocromáticos em espécies relacionadas. Apesar disso, ainda se faz necessário a caracterização de DNA repetitivo com outras ferramentas na espécie estudada, e assim entender a evolução cromossômica ocorrida em *Omophoita communis*.

## REFERÊNCIAS

As referências bibliográficas deste capítulo se encontram no final da dissertação no item “**REFERÊNCIAS**”.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A taxonomia integrativa do capítulo I desse trabalho, e as buscas por *tipo*, considerou o espécime analisado uma nova espécie do gênero *Alagoasa* do Sul do Brasil, recebendo o nome científico de *Alagoasa neoequestris*. Esse trabalho sugere que a “*Alagoasa equestris*” descrita na literatura com  $2n=12$  foi confundida taxonomicamente com *Omophoita communis* durante o estudo realizado por Virkki e Santiago-Blay em 1993 e recebeu o nome “*A. equestris*” por também ser confundida com *Omophoita equestris*.

As principais características morfológicas de gênero e as características cariotípicas foram encontradas em *Alagoasa neoequestris* validando a sua posição da taxonômica. A genética molecular corroborou com os dados morfológicos e citogenéticos colocando *A. neoequestris* dentro do gênero *Alagoasa*, em um agrupamento com *Alagoasa plaumanni* e separada das espécies *O. communis* e *O. equestris*, ressaltando a hipótese que estas podem ser miméticas.

Esse estudo destaca a importância de uma taxonomia integrativa na identificação e sistemática das espécies de Oedionychina que muitas vezes apresentam grande semelhança morfológica, e podem vir causar confusões taxonômicas.

A obtenção da sonda autossômica de *Omophoita communis* por meio da DOP-PCR (Pintura Cromossômica), no capítulo II, gerou sequências repetitivas de DNA que foram hibridadas resultando em padrões heterocromáticos observados em espécies relacionadas. Outros trabalhos utilizando Pintura Cromossômica tiveram resultados semelhantes ao obtido com sondas de cromossomos sexuais.

Apesar disso, ainda são necessários mais estudos com outras técnicas para caracterização de DNA repetitivo em *Omophoita communis*, como C0t-1, clonagem e sequenciamento de baixa cobertura, para que os resultados obtidos nesse trabalho possam ser complementados e que a caracterização dos repetitivos dessa espécie possa contribuir ao entendimento da evolução cromossômica.



## 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. *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.
- 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.; ZACARO, A. A.; CELLA, D. M. Cytogenetic analysis of *Epicauta atomaria* (Meloidae) and *Palembus dermestoides* (Tenebrionidae) with Xy sex determination system using standard staining, C-bands, NOR and synaptonemal complex microspreading techniques. **Hereditas**, v. 133, p. 147-157, 2000.
- ANTEPARRA, M.; VELÁSQUEZ, J. Revisión de la familia Chrysomelidae asociada a leguminosas de grano en el trópico sudamericano. **Investigación y Amazonía**, v. 4, p. 62-69, 2014.
- AZAMBUJA, M. *et al.* Cytogenetic and Molecular Characterization of Three Mimetic Species of the Genus *Alagoasa* Bechyné 1955 (Coleoptera: Alticinae) from the Neotropical Region. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 160, n. 4, p. 214–223, 2020.
- BALDISSERA, J. N. C. *et al.* Cytomolecular analysis of the male sex chromosome of *Tropidacris cristata grandis* (Thunberg, 1824) (Orthoptera: Romaleidae). **Entomological Science**, v. 22, p. 80-85, 2019.
- BALY, J. S. **Characters of undescribed species of Halticinae**. 9. ed. [s.l.] Journal of Natural History, 1878. v. 2

BARDELLA, V. B.; MILANI, D.; CABRAL-DE-MELLO, D. C. Analysis of *Holhymenia histrio* genome provides insight into the satDNA evolution in an insect with holocentric chromosomes. **Chromosome Research**, v. 28, n. 3–4, p. 369–380, 2020.

BARYSHNIKOVA, S. V. Morphological differentiation of closely related species of the genus *Bucculatrix* Zeller, 1839 (Lepidoptera, Bucculatricidae) with an analysis of their distribution and mechanisms of reproductive isolation. **Entomological Review**, v. 96, n. 6, p. 672–678, 2016.

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

BECHYNÉ, J. **Beiträge zur Kenntnis der neotropischen Altíciden un Galeruciden.** Munich: Entomologischen Arbeiten aus dem Museum G. Frey, 1956. v. 7

BECHYNÉ, J. **Notizen zu den neotropischen Chrysomeloidea (Col. Phytophaga).** 2. ed. Munich: Entomologische Arbeiten aus dem Museum G. Frey, 1958. v. 9

BECHYNÉ, J. **Beiträge zur Kenntnis der altícidenfauna boliviens.** 4. ed. [s.l.] Studies on Neotropical Fauna and Environment, 1959. v. 1

BECHYNÉ, J.; BECHYNÉ, B. S. Evidenz der bisher bekannten Phenrica-Arten (Col. Phytophaga, Altícidae). **Entomol. Ts. Arg.**, v. 87, p. 142-170, 1966.

BEGHA, B. P. **Espécies de *Omophoita* Chevrolat, 1836 e *Alagoasa* Bechyné, 1955 (Coleoptera, Chrysomelidae, Galerucinae, Altícini) 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 (Altícinae) *In*: JOLIVET, P.; PETITPIERRE, E.; HSIAO, T. H. **Biology of Chrysomelidae.** London: Kluwer Academic Publishers, 1988. p. 57-72.

BLACKMON, H.; DEMUTH, J. P. Coleoptera Karyotype Database. **The Coleopterists Bulletin**, v. 69, n. 1, p. 174–175, 2015.

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

BRYANT, G. E. **New species of Oedionychus (Col. Halticinae) from South America**. 17. ed. [s.l.] Journal of Natural History, 1949. v. 2

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.

CABRAL-DE-MELLO, D. C.; MAREC, F. Universal fluorescence *in situ* hybridization (FISH) protocol for mapping repetitive DNAs in insects and other arthropods. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 296, n. 3, p. 513–526, 2021.

CABRAL-DE-MELLO, D. C.; MOURA, R. C.; MARTINS, C. Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the beetle *Dichotomius geminatus* provides the first evidence for an association of 5S rRNA and histone H3 genes in insects, and repetitive DNA similarity between the B chromosome and A complement. **Heredity**, v. 104, n. 4, p. 393–400, 2010.

CHAPUIS, F. Famille des Phytophages. *In*: LACORDAIRE, J.; CHAPUIS, F. **Histoire naturelle des insectes: Genera des coléoptères, ou exposé méthodique et critique de tous les genres proposés jusqu'ici dans cet ordre d'insectes**. Paris: Librairie Encyclopédique de Roret, 1875. p. 1–420.

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

CHEVROLAT, A. Catalogue des coléoptères de la collection de M. le comte Dejean. **Méquignon-Marvis Père et Fils**, v. 5, p. 361–442, 1836.

CHOWDHARY, B. P.; RAUDSEEP, T. Chromosome painting in farm, pet and wild animal species. *In*: SHARMA, A. K.; SHARMA A. **Chromosome Painting: Painting Principles, Strategies and Scope**. Calcultta, India, Methods in Cell Science, 2001. p. 37–55.

DEL-CLARO, K. Notes on mimicry between two tropical beetles in south-eastern

Brazil. **Journal of Tropical Ecology**, v. 7, n. 3, p. 407–410, 1991.

DUCKETT, C. N.; DAZA, J. D. A New Species of Flea Beetle in the Genus *Alagoasa* Bechyné (Coleoptera: Chrysomelidae: Galerucinae) from Highland Costa Rica. **The Coleopterists Bulletin**, v. 58, n. 1, p. 84–96, 2004.

DUCKETT, C. N.; GILLESPIE, J. J.; KJER, K. M. Relationships among the subfamilies of Chrysomelidae inferred from small subunit ribosomal DNA and morphology, with special emphasis on the relationship among the flea beetles and the Galerucinae. *In*: JOLIVET, P.; SANTIAGO-BLAY, J.; SCHMITT, M. **New Developments in the Biology of Chrysomelidae**. [s.l.] BRILL, 2004. p. 3–18.

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

ELDER, F. F. B.; HSU, T. C. Tandem fusions in the evolution of mammalian chromosomes. *In*: ART, D. **The Cytogenetics of Mammalian Autochromosomal Rearrangements**. New York: Progress and topics in cytogenetics, 1988, p. 481–506.

FABRICIUS, J. C. **Systema eleutheratorum secundum ordines, genera, species: adiectis synonymis, locis, observationibus, descriptionibus**. Paris: Kiliae, 1801. v. 2

FÉRNANDEZ, R. *et al.* New C-band protocol by heat denaturation in the presence of formamide. **Hereditas**, v. 137, n. 2, p. 145–148, 2002.

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

FUKOVÁ, I. *et al.* Probing the W chromosome of the codling moth, *Cydia pomonella*, with sequences from microdissected sex chromatin. **Chromosoma**, v. 116, n. 2, p. 135–145, 2007.

FURTH, D. G. The jumping apparatus of flea beetles (Alticinae) - the metafemoral spring. *In*: JOLIVET, P.; PETITPIERRE, E.; HSIAO, T. H. **Biology of Chrysomelidae**. London: Kluwer Academic Publishers, 1988. p. 285-298.

GE, D. *et al.* Anti-predator defence drives parallel morphological evolution in flea

beetles. **Proceedings of the Royal Society Biological Sciences**, v. 278, p. 2133–2141, 2011.

GERMAR, E. F. **Insectorum species novae aut minus cognitae, descriptionibus illustratae**. [s.l.] Halae: Hendel & Sons, 1824.

GILLESPIE, J. J. *et al.* Convergent evolution of cucurbitacin feeding in spatially isolated rootworm taxa (Coleoptera: Chrysomelidae; Galerucinae, Luperini). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 29, n. 1, p. 161–175, 2003.

GOING, J. J.; GUSTERSON, B. A. Molecular pathology and future developments. **European Journal of Cancer**, v. 35, n. 14, p. 1895–1904, 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.

GOLL, L. G. **Dinâmica evolutiva dos cromossomos sexuais em Coleoptera e marcadores epigenéticos associados**. 2018. Tese (Doutorado em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonia, Amazonia, 2018.

GÓMEZ-ZURITA, J. *et al.* Recalibrated Tree of Leaf Beetles (Chrysomelidae) Indicates Independent Diversification of Angiosperms and Their Insect Herbivores. **PLOS ONE**, v. 2, n. 4, p. e360, 2007.

GÓMEZ-ZURITA, J.; HUNT, T.; VOGLER, A. P. Multilocus ribosomal RNA phylogeny of the leaf beetles (Chrysomelidae). **Cladistics**, v. 24, n. 1, p. 34–50, 2008.

GRUBER, S. *et al.* Possible interspecific origin of the B chromosome of *Hypsiboas albopunctatus* (Spix, 1824) (Anura, Hylidae), revealed by microdissection, chromosome painting, and reverse hybridisation. **Comparative Cytogenetics**, v. 8, n.

3, p. 185–197, 2014.

GULLAN, P. J.; CRASTON, P. S. **Insetos: Fundamentos da entomologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2017.

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.

HAROLD, E. V. **Beiträge zur Kenntniss der Fauna von Neu-Granada. vom Herausgeber. Halticinae (Zweites Stück.)**. [s.l.] Coleopterische Hefte, 1876. v. 15

HAROLD, E. V. **Coleopterorum species novae**. [s.l.] Mittheilungen Münchener Entomologischen Vereins, 1877. v. 1

HAROLD, E. V. Berliner entomologische Zeitschrift. *In*: DEWITZ, H. **Commission der Nicolai'schen Verlagsbuchhandlung**. Berlin: 1881.

HARVEY, S. C. *et al.* Analysis of repetitive DNA sequences in the sex chromosomes of *Oreochromis niloticus*. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 101, n. 3–4, p. 314–319, 2003.

ILLIGER, C. **Fauna Etrusca**, Liburni: Masi, 1807.

JACOBY, M. **Descriptions of new Species of Phytophagous Coleoptera**. London: Zoological Society of London, 1880.

JACOBY, M. **Descriptions of New Species of Coleoptera of the Genera *Oedionychis* and *Asphaera***. [s.l.] Zoological Society of London, 1894.

JACOBY, M. **Descriptions of new Species of Phytophagous Coleoptera of the Genera *Homophoeta*, *Asphaera*, and *Oedionychis***. 4. ed. London: Zoological Society of London, 1905. v. 75

JAMILENA, M.; GARRIDO-RAMOS, M.; REJ, M. R. Characterisation of repeated sequences from microdissected B chromosomes of *Crepis capillaris*. **Chromosoma**, v. 104, p.113-120, 1995.

JIANG, J.; GILL, B. S. Current status and the future of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in plant genome research. **Genome**, v. 49, n. 9, p. 1057–1068, 2006.

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.

JONES, G. L. *et al.* The worm has turned: Behavioural drivers of reproductive isolation between cryptic lineages. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 98, p. 11–17, 2016.

KAPLAN, F. *et al.* The Topographic Organization of Repetitive DNA in the Human Nucleolus. **Genomics**, v. 15, p. 123–132, 1993.

KIM, S. J.; KJER, K. M.; DUCKETT, C. N. Comparison between molecular and morphological-based phylogenies of galerucine/alticine leaf beetles (Coleoptera: Chrysomelidae). **Insect Systematics & Evolution** v. 34, p. 53–64, 2003.

KONSTANTINOV, A. S. On the structure and function of the female genitalia in flea beetles (Coleoptera: Chrysomelidae: Alticinae). **Entomological Society of Washington**, v. 100, p. 353–360, 1998.

KONSTANTINOV, A. S.; PRATHAPAN, K. D.; VENCL, F. V. Hiding in plain sight: leaf beetles (Chrysomelidae: Galerucinae) use feeding damage as a masquerade decoy. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 123, n. 2, p. 311–320, 2018.

LINGAFELTER, S. W.; KONSTANTINOV, A. S. The monophyly and relative rank of alticine and galerucine leaf beetles: A cladistic analysis using adult morphological characters (Coleoptera: Chrysomelidae). **Insect Systematics & Evolution**, v. 30, n. 4, p. 397–416, 1999.

LINZMEIER, A. M.; RIBEIRO-COSTA, C. S.; MARINONI, R. C. Fauna de Altícini (Newman) (Coleoptera, Chrysomelidae, Galerucinae) em diferentes estágios sucessionais na Floresta com Araucária do Paraná, Brasil: diversidade e estimativa de riqueza de espécies. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 1, p. 101–109, 2006.

LIU, B. *et al.* Microdissection of chromosome 7B of common wheat and cloning of low-copy specific DNA sequences. **Chinese Science Bulletin**, v. 44, n. 7, p. 632–636,

1999.

LO, K. *et al.* Isolation and Characterization of New Maize B Sequences from a Microdissected Library. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 27, n. 3, p. 350–354, 2009.

LONG, E. O.; DAWID, I. B. Repeated Genes in Eukaryotes. **Annual Review of Biochemistry**, v. 49, n. 1, p. 727–764, 1980.

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.

MCKENNA, D. D. *et al.* The beetle tree of life reveals that Coleoptera survived end Permian mass extinction to diversity 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.

MORA, P. *et al.* Satellitome Analysis in the Ladybird Beetle *Hippodamia variegata* (Coleoptera, Coccinellidae). **Genes**, v. 11, n. 7, p. 783, 2020.

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.

NADEIN, K. S.; BEZDEK, J. Coleoptera, Beetles *In*: LESCHEN, R.A.B; BEUTEL, R. G. **Arthropoda: Insecta: Morphology and Systematics (Phytophaga)**. Berlin: Walter de Gruyter, 2014, p. 251–259.

NIE, R. *et al.* The phylogeny of leaf beetles (Chrysomelidae) inferred from mitochondrial genomes. **Systematic Entomology**, v. 45, n. 1, p. 188–204, 2019.

OLIVEIRA, S. G. *et al.* Heterochromatin, Sex Chromosomes and rRNA Gene Clusters in *Coprophanaeus* Beetles (Coleoptera, Scarabaeidae). **Cytogenetic Genome Research**, v. 138, p. 10, 2012.



PALACIOS-GIMENEZ, O. M. *et al.* High-throughput analysis of the satellitome revealed enormous diversity of satellite DNAs in the neo-Y chromosome of the cricket *Eneoptera surinamensis*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2017.

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. 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. 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. The value of cytogenetics for the taxonomy and evolution of Leaf Beetles (Coleoptera, Chrysomelidae). **Miscel Lânia Zoológica**, v. 20, n. 1, p. 9-18, 1997.

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

PETITPIERRE, E.; SEGARRA, C.; JUAN, C. Genome Size and Chromosomal Evolution in Leaf Beetles (Coleoptera, Chrysomelidae). **Hereditas**, v. 119, n. 1, p. 1–6, 1993.

PICCOLI, M. C. A.; BARDELLA, V. B.; CABRAL-DE-MELLO, D. C. Repetitive DNAs in *Melipona scutellaris* (Hymenoptera: Apidae: Meliponidae): chromosomal distribution and test of multiple heterochromatin amplification in the genus. **Apidologie**, v. 49, n. 4, p. 497–504, 2018.

PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, n. 9, p. 2934–2938, 1986.

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.

RAFAEL, J. A. *et al.* **Insetos do Brasil: Diversidade e taxonomia**. Ribeirão Preto: Halos, 2012.

ROFF, D. A. The evolution of flightlessness: Is history important? **Evolutionary Ecology**, v. 8, n. 6, p. 639–657, 1994.

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.

SAVINI, V. The genus *Heikertingerella* Csiki (Coleoptera: Chrysomelidae: Alticinae). **Boletín Entomologic Veneza**. v. 14, p. 95–190, 1999.

SAVINI, V.; FURTH, D. G. The status of *Heikertingerella*, *Monotalla*, *Pseudodibolia*, and *Sphaeroderma* (Coleoptera: Chrysomelidae: Alticinae) in the New World. **Proceedings of the Entomological Society of Washington**. v. 103, p. 903–912, 2001

SCHAUFUSS, L. W. *In*; SCHAUFUSS, L. W. **Nunquam otiosus: zoologische Mittheilungen**. Dresden: Gesellschaft für Botanik und Zoologie zu Dresden, 1874.

SCHERER, G. **Diagnostic Key for the Neotropical Alticine Genera (Coleoptera: Chrysomelidae: Alticinae)**. [s.l.] Entomologische Arbeiten aus dem Museum G. Frey, 1983.

SCHERER, G. The Origins of the Alticinae. *In*: JOLIVET, P.; PETITPIERRE, E.; HSIAO, T. H. **Biology of Chrysomelidae**. London: Kluwer Academic Publishers, 1988. p. 115-130.

SCHLICK-STEINER, B. C. *et al.* Integrative Taxonomy: A Multisource Approach to

Exploring Biodiversity. **Annual Review of Entomology**, v. 55, n. 1, p. 421–438, 2010.

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.

SCHUBERT, I. *et al.* Chromosome painting in plants. *In*: SHARMA, A. K.; SHARMA A. **Chromosome Painting: Painting Principles, Strategies and Scope**. Calcutta, India, Methods in Cell Science, 2001, p. 57–69.

SEGARRA, C.; PETITPIERRE, E. Preliminary data on the chromosomes of European Alticinae (Coleoptera, Chrysomelidae). **Spixiana**, p. 29–37, 1982.

SEGARRA, C.; PETITPIERRE, E. Chromosomes of sixteen European species of *Longitarsus* flea beetles. **Genetica**, v. 76, p. 203–208, 1988.

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. 2021a.

SEKERKA, L. *et al.* **Chrysomelidae** *In*: CATÁLOGO TAXONÔMICO DA FAUNA DO BRASIL. PNUD, , 2021b. Disponível em: <http://fauna.jbrj.gov.br/fauna/faunadobrasil/142907>. Acesso em: 6 ago. 2021b

SEKERKA, L. *et al.* **Omophoita** *In*: CATÁLOGO TAXONÔMICO DA FAUNA DO BRASIL. PNUD, 2021c. Disponível em: <http://fauna.jbrj.gov.br/fauna/faunadobrasil/143689>. Acesso em: 12 dez. 2021c.

SEKERKA, L. *et al.* **Alagoasa** *In*: CATÁLOGO TAXONÔMICO DA FAUNA DO BRASIL. PNUD, 2021d. Disponível em: <http://fauna.jbrj.gov.br/fauna/faunadobrasil/143689>. Acesso em: 12 dez. 2021d.

SHERRATT, T. N. The evolution of Müllerian mimicry. **Naturwissenschaften**, v. 95, n. 8, p. 681–695, 2008.

SHUTE, S. L. Wing-polymorphism in British species of *Longitarsus* beetles (Chrysomelidae: Alticinae). **Systematic Entomology**, v. 5, n. 4, p. 437–448, 1980.

SMITH, E. H. Techniques for the Dissection and Mounting of the Male (Aedeagus) and Female (Spermatheca) Genitalia of the Chrysomelidae (Coleoptera). **The Coleopterists Bulletin**, v. 33, n. 1, p. 93–103, 1979.

SMITH, S. G.; VIRKKI, N. **Animal Cytogenetic, Insecta 5: Coleoptera**. Berlin: Gebruder Borntraeger, 1978. v. 3

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

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 doi: 10.1016/0888-7543(92)90147-k.

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.

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

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

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. Rapid allocyclic changes in the centric and an arm segment of the X chromosome in meiosis of male *Omophoita superba* Weise (Coleoptera, Alticinae). **Hereditas**, v. 58, n. 1–2, p. 262–264, 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. Contraction stage and formation of the distance sex bivalent in Oedionychina (Coleoptera, Alticidae). **Hereditas**, v. 71, n. 2, p. 259–287, 1972.

VIRKKI, N. Banding of Oedionychina (Coleoptera:Alticinae) Chromosomes: C- and Ag-bands. **Journal 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 cytogenetic system of Oedionychina (Alticinae). **First International Symposium on the Chrysomelidae**, p. 489–497, 1985.

VIRKKI, N. Cytotaxonomy of Alticinae. *In*: JOLIVET, P.; PETITPIERRE, E.; HSIAO, T. H. **Biology of Chrysomelidae**. London: Kluwer Academic Publishers, 1988. p. 187–204.

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

VIRKKI, N.; SANTIAGO-BLAY, J. A.; CLARK, S. M. Chromosomes of Some Puerto Rican Disonychina and Oedionychina (Coleoptera: Chrysomelidae: Alticinae: Oedionychini): Evolutionary Implications. **Psyche: A Journal of Entomology**, v. 98, n. 4, p. 373–390, 1991.

WILLHOEFT, U.; MUELLER-NAVIA, J.; FRANZ, G. Analysis of the sex chromosomes of the Mediterranean fruit fly by microdissected DNA probes. **Genome**, v. 41, p. 74–78, 1998.

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. **Inferências evolutivas para duas espécies do gênero *Omophoita* (coleoptera, chrysomelidae): diferenciação cariotípica e molecular.** 2014. Dissertação (Mestrado em Biologia Evolutiva) - Universidade Estadual De Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2014.

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.

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.

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.

ZEN, E.; LINZMEIER, A. M. A. M. **Histórico do gênero *Omophoita* (Chrysomelidae, Galerucinae, Alticini).** XXXIII Congresso Brasileiro de Zoologia. **Anais...** Aguás de Lindóia: Sociedade Brasileira de Zoologia, 2020. Disponível em: [https://www.cbzoo.com.br/br/portal/conteudo/33\\_congresso](https://www.cbzoo.com.br/br/portal/conteudo/33_congresso). Acesso em: 13 mar. 2022

ZHOU, J. *et al.* Cloning and physical localization of male-biased repetitive DNA sequences in *Spinacia oleracea* (Amaranthaceae). **Comparative Cytogenetics**, v. 15, n. 2, p. 101–118, 2021.

ZHOU, R.-N.; HU, Z.-M. The Development of Chromosome Microdissection and Microcloning Technique and its Applications in Genomic Research. **Current Genomics**, v. 8, n. 1, p. 67–72, 2007.

## APÊNDICES

APÊNDICE A - ESPÉCIES E SEUS NÚMEROS DE ACESSO NO *GENBANK* UTILIZADAS PARA AS ANÁLISES FILOGENÉTICAS.

<b>Espécie</b>	<b>Código acesso COI</b>	<b>Código acesso rDNA 28S</b>
<i>Alagoasa neoequestris</i>	A.ne-4706 (Esse estudo)	A.ne-4706 (Esse estudo)
	A.ne-4767 (Esse estudo)	A.ne-4767 (Esse estudo)
	A.ne-4016 (Esse estudo)	A.ne-4016 (Esse estudo)
	A.ne-4059 (Esse estudo)	A.ne-4059 (Esse estudo)
	A.ne-4765 (Esse estudo)	A.ne-4765 (Esse estudo)
	A.ne-3409 (Esse estudo)	A.ne-3409 (Esse estudo)
<i>Omophoita equestris</i>	AF479432.1	O.e- 3175 (Esse estudo)
	-	O.e- 4634 (Esse estudo)
	-	O.e-4853 (Esse estudo)
	-	O.e-4824 (Esse estudo)
	-	O.e-4831 (Esse estudo)
<i>Omophoita communis</i>	MT547908	O.c-4870 (Esse estudo)
	-	O.c-4878 (Esse estudo)
	-	O.c-4337 (Esse estudo)
	-	O.c-4882 (Esse estudo)
	-	O.c-4873 (Esse estudo)
<i>Alagoasa libentina</i>	AF479471.1	AY313813.1
<i>Alagoasa formosa</i>	AY313807.1	AY313807.1
<i>Alagoasa plaumanni</i>	AF479475.1	AY313821.1
<i>Alagoasa scissa</i>	MN506234.1	AY313822.1
<i>Alagoasa areata</i>	MN506232.1	AY313802.1
<i>Alagoasa lineola</i>	AY308975.1	AY313815.1
<i>Alagoasa decemgutatta</i>	AY308968.1	AY313804.1
<i>Alagoasa aurora</i>	AF545065.1	AF545066.1
<i>Alagoasa apicalis</i>	AF479463.1	AY313801.1
<i>Omophoita octoguttata</i>	AF479430.1	AY313838.1
<i>Omophoita personata</i>	AF479431.1	AY313839.1
<i>Endustomus</i> sp.	MK155656.1	MK153780.1
<i>Diabrotica</i> sp.	AY242477.1	AY243743.2
<i>Monochamus sutur</i>	DQ861321.1	KC692745.1

**APÊNDICE B - TABELA COM AS ESPÉCIES DO GÊNERO ALAGOASA  
ANALISADAS MORFOLOGICAMENTE.**

<b>Espécie</b>	<b>Diagnose</b>	<b>Ocorrência</b>	<b>Material examinado</b>	<b>Referência</b>
<i>Alagoasa abbreviata</i> (Jacoby, 1880)	Élitro amarelo com três manchas pretas em cada élitro	Amazonas - BR	<i>Naturhistorisches Museum Basel</i>	-
<i>Alagoasa acutangula</i> (Jacoby, 1886)	Élitro azul escuro metálico	México, Guatemala, Salvador	<i>Naturhistorisches Museum Basel</i>	-
<i>Alagoasa aenea</i> (Jacoby, 1905)	Coloração azul violácea com faixa horizontal que não chega nas margens	Amazonas, Pará - BR	Consulta à descrição e <i>Naturhistorisches Museum Basel</i>	JACOBY (1905)
<i>Alagoasa angulosignata</i> (Bryant, 1949)	Élitro roxo com marcações metálicas	Rio de Janeiro, Paraná, Santa Catarina- BR	<i>Naturhistorisches Museum Basel</i>	BRYANT (1949)
<i>Alagoasa apicalis</i> (Csiki, 1940)	Élitro roxo púrpura com faixa clara apical e outra horizontal no meio de cada élitro	Rio de Janeiro, Minas Gerais- BR	Consulta à descrição e <i>Naturhistorisches Museum Basel</i>	BECHYNÉ, (1955)
<i>Alagoasa arcifera</i> (Harold, 1876)	Élitros densamente convexos, fortemente pontuados, com faixas preto-bronze, na porção distal e proximal	São Paulo - BR	Consulta à descrição e <i>Naturhistorisches Museum Basel</i>	HAROLD (1876)
<i>Alagoasa areata</i> (Germar, 1824)	Élitro testáceo com margens pretas	Rio de Janeiro, Paraná - BR	Consulta à descrição e <i>Naturhistorisches Museum Basel</i>	GERMAR, (1824)
<i>Alagoasa bellinda</i> Bechyné, 1958	Élitro castanho-amarelado claro, brilhante e com duas faixas verdes metálicas horizontais	Rio de Janeiro, São Paulo - BR	Consulta à descrição	BECHYNÉ, (1958)



<i>Alagoasa bicolor</i> (Linné, 1767)	Élito preto azuláceo metálico	Espanha	<i>Naturhistorisches Museum Basel</i>	-
<i>Alagoasa bighifasciata</i> (Jacoby, 1905)	Élito amarelo com três manchas pretas em cada élitro, uma no ápice, outra no meio e uma pequena na base	Peru, Equador	<i>Naturhistorisches Museum Basel</i>	-
<i>Alagoasa biloba</i> (Illiger, 1807)	Élito amarelo com duas manchas marrons	Bolívia	<i>Naturhistorisches Museum Basel</i>	-
<i>Alagoasa bipartita</i> (Jacoby, 1905)	Élito verde metálico com duas faixas horizontais amarelas	Colômbia	<i>Naturhistorisches Museum Basel</i>	-
<i>Alagoasa bipunctulata</i> (Jacoby, 1905)	Élitros testáceos com um ponto preto abaixo do meio	Brasil (estado desconhecido), Argentina	Consulta descrição	à JACOBY, (1905)
<i>Alagoasa blanda</i> (Harold, 1876)	Élito com coloração variável e alto dimorfismo sexual, placas intercoxais do prosterno sulcadas	Rio de Janeiro - BR	Consulta descrição <i>Naturhistorisches Museum Basel</i>	à BECHYNÉ, (1958)
<i>Alagoasa burmeisteri</i> (Harold, 1881)	Élito negro brilhante	Mato Grosso - BR, Paraguai, Bolívia	Consulta descrição <i>Naturhistorisches Museum Basel</i>	e HAROLD, (1881)
<i>Alagoasa callopteryx</i> Bechné, 1958	Élitros com duas faixas horizontais pretas que são separadas uma da outra por um pequeno espaço amarelo. Cada faixa tem uma grande mancha amarela	Rio de Janeiro - BR	Consulta descrição	à BECHYNÉ, (1958)

<i>Alagoasa cardinalis</i> (Jacoby, 1905)	Élitro com coloração azul violáceo e duas faixas azuis, uma reta e outra redonda	Amazonas BR, Peru	Consulta à descrição e <i>Naturhistorisches Museum Basel</i>	JACOBY, (1905)
<i>Alagoasa causiwilis</i> (Jacoby, 1905)	Élitro testáceo	Peru, Bolívia	<i>Naturhistorisches Museum Basel</i>	-
<i>Alagoasa centurio</i> (Jacoby, 1894)	Élitro amarelo com duas manchas pretas em cada élitro: uma no ápice e outra no meio	Colômbia, Venezuela, Panamá	<i>Naturhistorisches Museum Basel</i>	-
<i>Alagoasa chevolati</i> (Baly, 1878)	Élitro marrom com faixas pretas	México, Honduras, Guatemala	<i>Naturhistorisches Museum Basel</i>	-
<i>Alagoasa chrysoxantha</i> Bechyné, 1958	Élitro de coloração violeta negra	Rio de Janeiro BR	Consulta à descrição	BECHYNÉ, (1958)
<i>Alagoasa clypeata</i> (Jacoby, 1892)	Élitro preto metálico	México	<i>Naturhistorisches Museum Basel</i>	-
<i>Alagoasa coccineloides</i> (Harold, 1877)	Élitro testáceo, com uma mancha amarela de margem preta na lateral central de cada élitro	Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul BR, Uruguai	Consulta à descrição e <i>Naturhistorisches Museum Basel</i>	HAROLD, (1877)
<i>Alagoasa condensata</i> Bechyné, 1956	Vértice marrom avermelhado, metálico. Élitro amarelo com listra preta no meio, e laterais do élitro as vezes preta	São Paulo, Minas Gerais BR	Consulta à descrição	BECHYNÉ, (1956)
<i>Alagoasa confusa</i> (Bowditch, 1912)	Élitro amarelo escuro com duas faixas pretas horizontais	Colômbia	<i>Naturhistorisches Museum Basel</i>	-
<i>Alagoasa cosmogramica</i> (Harold, 1876)	Élitro preto, com linha amarelada do ápice à base e margem amarela	Rio de Janeiro BR	<i>Naturhistorisches Museum Basel</i>	-

<i>Alagoasa crassipleura</i> Bechyné, 1958	Élito azul esverdeado metálico	São Paulo - BR	Consulta descrição	à	BECHYNÉ, (1958)
<i>Alagoasa crucifera</i> (Jacoby, 1894)	Élito preto violáceo com duas manchas amarelas	Brasil (estado desconhecido)	<i>Naturhistorisches Museum Basel</i>	-	
<i>Alagoasa crucigera</i> (Jacoby, 1880)	Élito branco amarelado com uma faixa horizontal no meio, no ápice e perto da base que não tocam as laterais. Sutura metálica arrozeada	Brasil (estado desconhecido)	Consulta descrição	à e	JACOBY, (1880)
<i>Alagoasa cyria</i> Bechyné, 1955	Élito testáceo	Venezuela	<i>Naturhistorisches Museum Basel</i>	-	
<i>Alagoasa decemguttata</i> (Fabricius, 1801)	Élito vermelho com seis manchas arredondadas brancas envoltas por margem preta em cada élito	Paraná, Rio Grande do Sul, Rio Grande do Norte, São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Pará - BR, Paraguai, Bolívia	Consulta descrição	à	FABRICIUS, (1801)
<i>Alagoasa dipus</i> (Illiger, 1807)	Élito metálico	Pará, Amapá - BR	Consulta descrição	à	JACOBY, (1905)
<i>Alagoasa discopunctata</i> (Schauff, 1814)	Élito amarelo com duas manchas pretas em cada élito	Colômbia	<i>Naturhistorisches Museum Basel</i>	-	
<i>Alagoasa dissepta</i> (Ericlevon, 1847)	Élito preto brilhante com faixa fina e amarela no meio	Bolívia, Peru	<i>Naturhistorisches Museum Basel</i>	-	
<i>Alagoasa divisa</i> (Germar, 1824)	Élito marrom- acastanhado com duas faixas violetas	Minas Gerais - BR	Consulta descrição	à e	GERMAR, (1824)
<i>Alagoasa eburata</i> (Germar, 1824)	Cabeça preta. Élito preto brilhante, com mancha amarela no centro	Rio de Janeiro, Minas Gerais - BR	Consulta descrição	à e	GERMAR, (1824)

<i>Alagoasa ega</i> Bechyné, 1959	Corpo amarelo acastanhado. Élitros pretos com marcas esbranquiçadas	Amazonas - BR	Consulta descrição	à	BECHYNÉ, (1959)
<i>Alagoasa elegans</i> (Baly, 1878)	Élitro azul escuro, com duas faixas largas amarelas na lateral	Bahia - BR	Consulta descrição <i>Naturhistorisches Museum Basel</i>	à e	BALY, (1878)
<i>Alagoasa faceta</i> (Harold, 1876)	Élitro esbranquiçado com uma mancha na base	Rio de Janeiro - BR	Consulta descrição <i>Naturhistorisches Museum Basel</i>	à e	HAROLD, (1876)
<i>Alagoasa figurata</i> (Chevrolat, 1829)	Élitro preto com duas faixas amarelas	Rio de Janeiro - BR	<i>Naturhistorisches Museum Basel</i>		-
<i>Alagoasa fimbriota</i> (Forster, 1771)	Élitro amarelo escuro com duas faixas pretas	Estados Unidos da América, México	<i>Naturhistorisches Museum Basel</i>		-
<i>Alagoasa flaviana</i> Bechyné, 1958	Élitro marrom amarelado claro, brilhante. Antenômeros grossos. Pontuação mais fina	São Paulo, Santa Catarina - BR	Consulta descrição	à	BECHYNÉ, (1958)
<i>Alagoasa flavomarginata</i> (Jacoby, 1905)	Élitro preto, as vezes com faixas amarelas	Espirito Santo - BR	<i>Naturhistorisches Museum Basel</i>		-
<i>Alagoasa florigera</i> (Harold, 1877)	Élitro marrom avermelhado com duas listras irregulares amarelas em cada élitro	Minas Gerais, Mato Grosso, São Paulo, Paraná, Santa Catarina - BR, Bolívia	Consulta descrição <i>Naturhistorisches Museum Basel</i>	à e	HAROLD, (1877)
<i>Alagoasa formosa</i> (Harold, 1877)	Élitro preto com quatro manchas amarelo queimado: duas grandes do ápice ao meio, e duas pequenas na base	Uruguai, Paraguai	<i>Naturhistorisches Museum Basel</i>		-
<i>Alagoasa fulvotibialis</i> (Jacoby, 1905)	Élitro preto com faixa amarela no meio	Bolívia	<i>Naturhistorisches Museum Basel</i>		-

<i>Alagoasa gemmata</i> (Jacoby, 1892)	Élitro finamente perfurado, cor púrpura metálica com tom verde/violeta	Panamá	<i>Naturhistorisches Museum Basel</i>	-
<i>Alagoasa godmani</i> (Jacoby, 1880)	Élitro amarelo com duas manchas marrons avermelhadas redondas	México, Panamá	<i>Naturhistorisches Museum Basel</i>	-
<i>Alagoasa hellwigi</i> (Illiger, 1867)	Élitro amarelo com quatro manchas marrons	Pará - BR	<i>Naturhistorisches Museum Basel</i>	-
<i>Alagoasa hypolysia</i> Bechyné, 1956	Élitro com duas manchas violetas metálicas, uma na base e outra no topo	Santa Catarina - BR	Consulta descrição	à BECHYNÉ, (1956)
<i>Alagoasa icteridera</i> (Harold, 1876)	Élitro preto violáceo	México	<i>Naturhistorisches Museum Basel</i>	-
<i>Alagoasa illustris</i> (Jacoby, 1905)	Élitro com duas faixas largas arroxeadas, uma subquadrada e outra triangular	Amapá - BR	Consulta descrição e <i>Naturhistorisches Museum Basel</i>	JACOBY, (1905)
<i>Alagoasa inconstans</i> (Harold, 1881)	Corpo preto com élitro marrom amarelado	Colômbia, Panamá	<i>Naturhistorisches Museum Basel</i>	-
<i>Alagoasa iringa</i> Bechyné, 1958	claro, com duas faixas pretas horizontais. Coloração brilhante	São Paulo - BR	Consulta descrição	à BECHYNÉ, (1958)
<i>Alagoasa itaituba</i> Bechyné, 1959	Élitro preto escuro com manchas marrom amarelado claro	Pará - BR	Consulta descrição	à BECHYNÉ, (1959)

<i>Alagoasa jaculus</i> (Illiger, 1807)	Élitro amarelo queimado com duas manchas pretas	Bahia - BR	<i>Naturhistorisches Museum Basel</i>	-
<i>Alagoasa januaria</i> Bechyné, 1955	Élitro azul metálico/roxo e seis manchas amarelas em cada	Rio de Janeiro, Minas Gerais - BR	Consulta descrição	à BECHYNÉ, (1955)
<i>Alagoasa joella</i> Bechyné, 1958	Élitro castanho, amarelo, claro com faixa basal e anel no ápice preto	São Paulo - BR	Consulta descrição	à BECHYNÉ, (1958)
<i>Alagoasa kraatzi</i> (Harold, 1880)	Élitro pálido com filete dorsal preto-verde- latão	Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina - BR	Consulta descrição <i>Naturhistorisches Museum Basel</i>	à e HAROLD, (1881)
<i>Alagoasa labiata</i> (Schauff, 1874)	Élitro amarelo com duas manchas quadradas vermelhas próximo às margens, e duas do meio até próximo a base	Colômbia	<i>Naturhistorisches Museum Basel</i>	-
<i>Alagoasa lacordairei</i> (Bryant, 1949)	Élitro ruivo com ampla mancha no meio, no ápice e pequena perto da base	Amazonas, Pará, Mato Grosso - BR	Consulta descrição <i>Naturhistorisches Museum Basel</i>	à e BRYANT, (1949)
<i>Alagoasa lateralis</i> (Jacoby, 1892)	Élitro preto com margem amarela	Estados Unidos da América, México	<i>Naturhistorisches Museum Basel</i>	-
<i>Alagoasa lativittis</i> (Harold, 1877)	Élitro preto, com faixa do ápice à base e margem amarela brilhante	Brasil (estado desconhecido)	<i>Naturhistorisches Museum Basel</i>	-
<i>Alagoasa libentina</i> (Germar, 1824)	Élitro marrom acastanhado na base, no meio roxo, coloração brilhante e corpo preto	Minas Gerais, Rio de Janeiro, Santa Catarina -BR	Consulta descrição <i>Naturhistorisches Museum Basel</i>	à e GERMAR, (1824)

<i>Alagoasa mamanguapensis</i> Bechyné, 1958	Élitro amarelo acastanhado	Paraíba - BR	Consulta descrição	à	BECHYNÉ, (1958)
<i>Alagoasa marginicollis</i> (Jacoby, 1880)	Élitro azul violáceo	Rio de Janeiro - BR	Consulta descrição <i>Naturhistorisches Museum Basel</i>	à e	JACOBY, (1880)
<i>Alagoasa mboya</i> Bechyné, 1958	Élitro marrom amarelado marcados de preto	São Paulo - BR	Consulta descrição	à	BECHYNÉ, (1958)
<i>Alagoasa microsuturalis</i> (Jacoby, 1905)	Élitro amarelo liso	Brasil (estado desconhecido)	<i>Naturhistorisches Museum Basel</i>		-
<i>Alagoasa militaris</i> (Harold 1876)	Élitro amarelo brilhante com duas faixas pretas	Minas Gerais - BR	<i>Naturhistorisches Museum Basel</i>		-
<i>Alagoasa myrrha</i> Bechyné, 1955	Élitro testáceo com três manchas vermelhas, duas no ápice e uma grande na base de cada élitro	Amazonas - BR	Consulta descrição <i>Naturhistorisches Museum Basel</i>	à e	BECHYNÉ, (1955)
<i>Alagoasa nigromaculata</i> (Harold, 1876)	Élitros testáceos com dez manchas pretas, corpo preto	Minas Gerais, São Paulo - BR	Consulta descrição <i>Naturhistorisches Museum Basel</i>	à e	HAROLD, (1876)
<i>Alagoasa nigroscutata</i> (Jacoby, 1894)	Élitro testáceo e uniforme	Santa Catarina - BR	Consulta descrição <i>Naturhistorisches Museum Basel</i>	à e	JACOBY, (1894)
<i>Alagoasa occipitalis</i> (Jacoby, 1905)	Élitro testáceo	Bolívia	<i>Naturhistorisches Museum Basel</i>		-
<i>Alagoasa orquela</i> Bechyné, 1955	Élitro preto com uma faixa amarela fina horizontal	Paraguai	<i>Naturhistorisches Museum Basel</i>		-
<i>Alagoasa osascoensis</i> Bechyné, 1958	Élitro violeta negro uniforme	São Paulo - BR	Consulta descrição <i>Naturhistorisches Museum Basel</i>	à e	BECHYNÉ, (1958)

	Élitro com três faixas horizontais	Espírito Santo, São Paulo, Paraná, Santa Catarina - BR	Consulta à descrição e	
<i>Alagoasa pantina</i> Bechyné, 1958	castanho amareladas claras com segmentos escuros		<i>Naturhistorisches Museum Basel</i>	BECHYNÉ, (1958)
<i>Alagoasa paralleoptera</i> Bechyné, 1956	Élitro com duas faixas horizontais violeta metálico	Amazonas - BR	Consulta à descrição	BECHYNÉ, (1956)
<i>Alagoasa picifrons</i> (Jacoby, 1905)	Élitro testáceo	Minas Gerais, Santa Catarina - BR	Consulta à descrição e	JACOBY, (1905)
			<i>Naturhistorisches Museum Basel</i>	
<i>Alagoasa plaumanni</i> Bechyné, 1955	Élitro castanho ou castanho escuro preto	Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul - BR, Paraguai	Consulta à descrição e	BECHYNÉ, (1955)
			<i>Naturhistorisches Museum Basel</i>	
<i>Alagoasa porosa</i> (Baly, 1878)	Élitro preto, rico em pontuações e margem amarela	Equador	<i>Naturhistorisches Museum Basel</i>	-
<i>Alagoasa posticalis</i> (Kirsh 1883)	Élitro amarelo com duas faixas pretas horizontais	Bolívia, Peru	<i>Naturhistorisches Museum Basel</i>	-
<i>Alagoasa pterocallis</i> Bechyné, 1958	Élitro marrom-amarelado claro com listras roxas escuras na porção da base e do ápice	São Paulo, Rio de Janeiro - BR	Consulta à descrição	BECHYNÉ, (1958)
<i>Alagoasa pulchella</i> (Jacoby, 1894)	Élitro preto com duas manchas amarelas	Venezuela	<i>Naturhistorisches Museum Basel</i>	-
<i>Alagoasa quadripustulata</i> (Jacoby, 1894)	Élitros pálidos com uma faixa horizontal na base e outra no meio ferruginoso	Minas Gerais, Rio de Janeiro, Santa Catarina - BR	Consulta à descrição	JACOBY, (1894)
<i>Alagoasa quaerula</i> (Harold, 1881)	Corpo vermelho ferrugem, élitro amarelo com manchas longitudinais preto azuladas	Mato Grosso, Goiás, Minas Gerais - BR, Paraguai, Bolívia	Consulta à descrição	HAROLD, (1881)



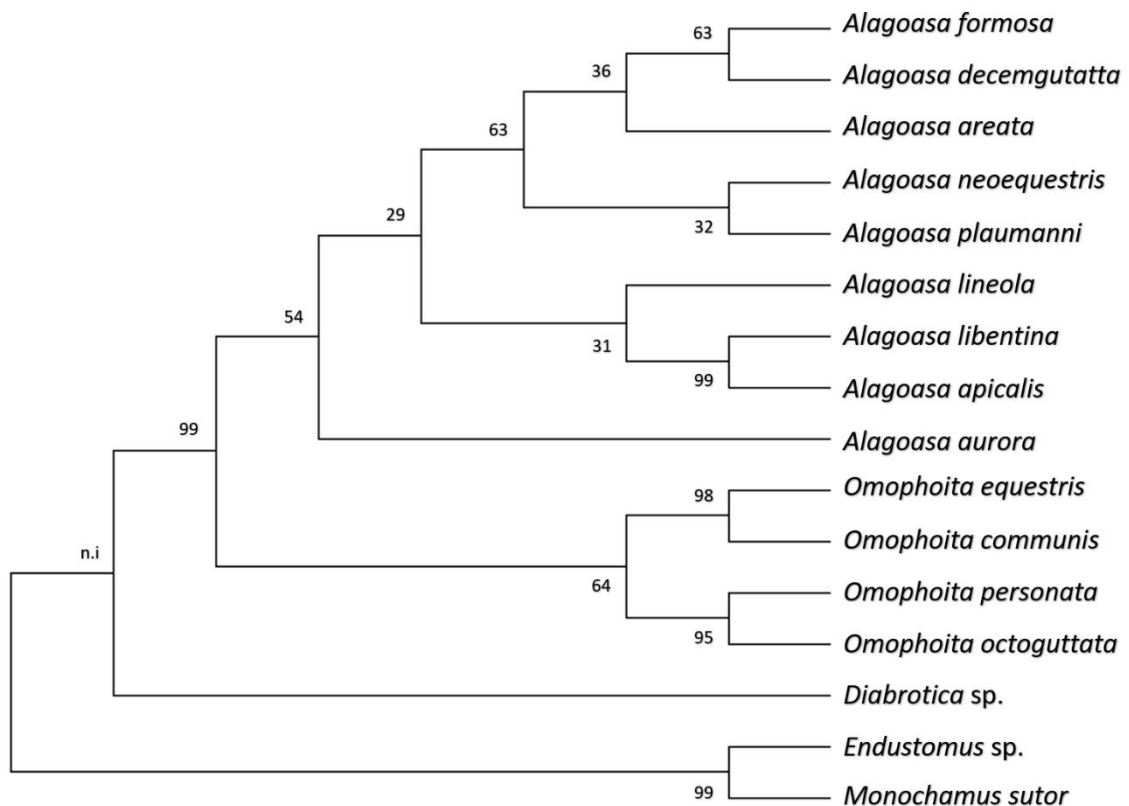
<i>Alagoasa rectehumeralis</i> Bechyné, 1956	Élito marrom escuro com faixa horizontal e ponto arredondado no meio Élito preto esverdeado	Pará - Brasil	Consulta descrição	à	BECHYNÉ, (1956)
<i>Alagoasa regina</i> (Jacoby, 1905)	metálico com faixa horizontal e margem amarela Élito amarelo queimado com duas faixas pretas horizontais, uma no ápice e outra na base	Espírito Santo - BR	<i>Naturhistorisches Museum Basel</i>	-	-
<i>Alagoasa rosenberg</i> (Bryant, 1949)	Élito amarelo queimado com duas faixas pretas horizontais, uma no ápice e outra na base	Equador	<i>Naturhistorisches Museum Basel</i>	-	-
<i>Alagoasa rotundicollis</i> (Jacoby, 1905)	Élito testáceo pálido	Rio de Janeiro, Minas Gerais - BR	Consulta descrição e <i>Naturhistorisches Museum Basel</i>	à	JACOBY, (1905)
<i>Alagoasa rufina</i> (Illiger, 1807)	Élito marrom avermelhado com duas linhas horizontais amarelas	Pará, Amazonas, Mato Grosso, Minas Gerais, Goiás, São Paulo - BR, Venezuela	<i>Naturhistorisches Museum Basel</i>	-	-
<i>Alagoasa scioa</i> Bechyné, 1958	Élito marrom amarelado claro com estigma violeta metálico escuro	São Paulo - BR	Consulta descrição	à	BECHYNÉ, (1958)
<i>Alagoasa scissa</i> (Germar, 1824)	Élito com quatro faixas de bordas roxas. Corpo preto e brilhante	Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Paraná - BR, Paraguai	Consulta descrição e <i>Naturhistorisches Museum Basel</i>	à	GERMAR, (1824)
<i>Alagoasa seriata</i> (Baly 1978)	Élito testáceo com manchas pretas	México, Guatemala, El Salvador	<i>Naturhistorisches Museum Basel</i>	-	-
<i>Alagoasa serrulate</i> (Ulrich, 1883)	Élito preto com uma faixa amarela horizontal	Peru	<i>Naturhistorisches Museum Basel</i>	-	-

<i>Alagoasa sexplagiata</i> (Jacoby, 1880)	Élitro fulvo (amarelado) com uma mancha triangular na base, uma no ápice e uma faixa horizontal no meio	Amazonas, Amapá - BR	Consulta à descrição	JACOBY, (1880)
<i>Alagoasa submarginata</i> (Baly, 1859)	Élitro testáceo com duas faixas pretas do ápice à base, uma na margem interna e outra na externa	Paraná - BR	<i>Naturhistorisches Museum Basel</i>	-
<i>Alagoasa tippmanni</i> (Bechyné, 1951)	Élitro preto esverdeado metálico com três manchas amarelas	Peru	<i>Naturhistorisches Museum Basel</i>	-
<i>Alagoasa tricruciatata</i> (Germar, 1824)	Élitro marrom com linhas pretas	Rio de Janeiro - BR	Consulta à descrição e <i>Naturhistorisches Museum Basel</i>	GERMAR, (1824)
<i>Alagoasa vestita</i> (Harold, 1881)	Élitro brilhante com faixas pretas	Rio de Janeiro - BR	Consulta à descrição	HAROLD, (1881)
<i>Alagoasa virgata</i> (Harold, 1880)	Élitro testáceo com faixas pretas	México	<i>Naturhistorisches Museum Basel</i>	-
<i>Alagoasa vittata</i> (Harold, 1876)	Corpo "Bronze escuro", com linha arroxeada	Rio de Janeiro - BR	Consulta à descrição e <i>Naturhistorisches Museum Basel</i>	HAROLD, (1876)
<i>Alagoasa wittmeri</i> Bechyné, 1955	Élitro metálico com três faixas horizontais pretas	Minas Gerais, Rio de Janeiro, Santa Catarina - BR	Consulta à descrição <i>Naturhistorisches Museum Basel</i>	BECHYNÉ, (1955)

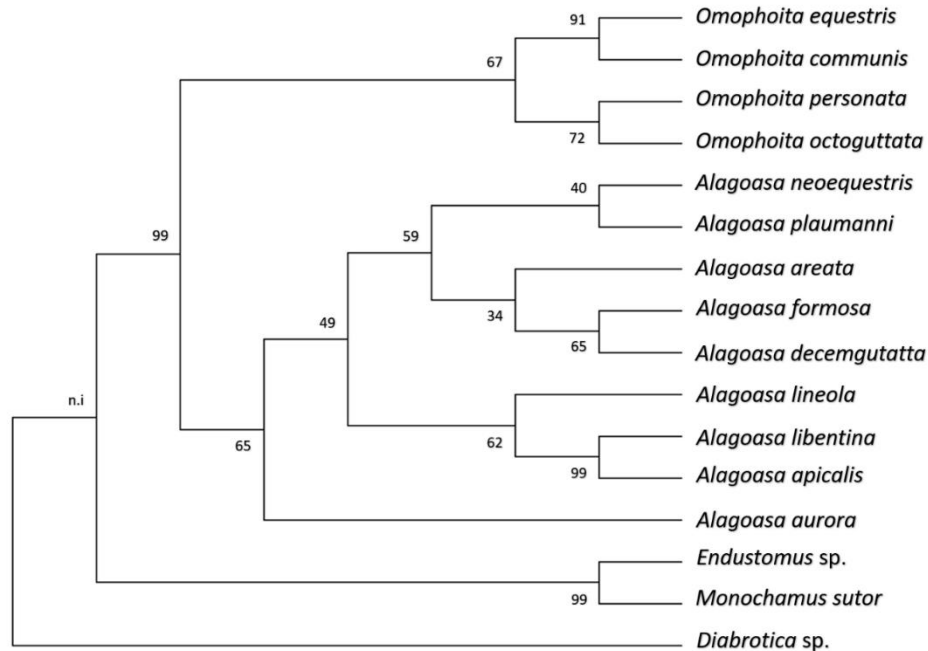
**APÊNDICE C - DISTÂNCIA INTERESPECÍFICA CALCULADA COM KIMURA 2-PARAMETER E BOOTSTRAP DE 1000 INTERAÇÕES NO SOFTWARE MEGA 11**

	Espécie	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	<i>Omophoita equestris</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	<i>Omophoita communis</i>	0,0739	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	<i>Omophoita personata</i>	0,0830	0,1042	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	<i>Omophoita octoguttata</i>	0,0843	0,0909	0,0481	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	<i>Alagoasa neoequestris</i>	0,1054	0,1069	0,0925	0,1032	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	<i>Alagoasa areata</i>	0,1111	0,1240	0,0936	0,0989	0,0675	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	<i>Alagoasa lineola</i>	0,0960	0,1145	0,0956	0,0925	0,0941	0,0778	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	<i>Alagoasa libentina</i>	0,1428	0,1630	0,1126	0,1282	0,1288	0,1155	0,1078	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	<i>Alagoasa formosa</i>	0,1034	0,1201	0,0936	0,0934	0,0703	0,0603	0,0695	0,1154	-	-	-	-	-	-	-	-
10	<i>Alagoasa apicalis</i>	0,1215	0,1455	0,0919	0,1125	0,1098	0,1004	0,1081	0,0729	0,1074	-	-	-	-	-	-	-
11	<i>Alagoasa aurora</i>	0,1037	0,1202	0,0952	0,0913	0,1273	0,0838	0,0888	0,1294	0,0952	0,1108	-	-	-	-	-	-
12	<i>Alagoasa decemgutatta</i>	0,1057	0,1130	0,1078	0,1042	0,0709	0,0669	0,0906	0,1267	0,0627	0,1098	0,1028	-	-	-	-	-
13	<i>Alagoasa plaumanni</i>	0,1102	0,1250	0,0945	0,0885	0,0650	0,0654	0,0796	0,1277	0,0592	0,1085	0,0831	0,0716	-	-	-	-
14	<i>Endustomus</i> sp.	0,3489	0,3662	0,3142	0,3172	0,3197	0,3039	0,2923	0,3430	0,3037	0,3051	0,3284	0,3377	0,3174	-	-	-
15	<i>Diabrotica</i> sp.	0,2073	0,2294	0,2056	0,2091	0,2278	0,2106	0,2166	0,2279	0,2013	0,2330	0,1954	0,2195	0,2243	0,3242	-	-
16	<i>Monochamus sutor</i>	0,2409	0,2674	0,2480	0,2472	0,2539	0,2350	0,2294	0,2762	0,2221	0,2652	0,2318	0,2589	0,2392	0,2438	0,2071	-

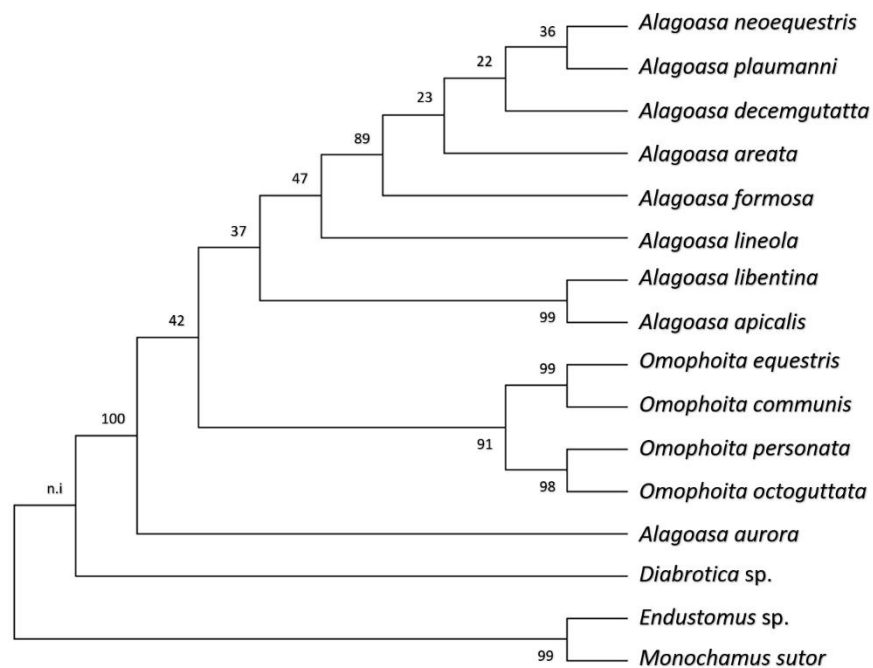
**APÊNDICE D - ÁRVORE OBTIDA UTILIZANDO AS SEQUÊNCIAS GÊNICAS CONCATENADAS GERADAS POR MEIO DA ANÁLISE DE MAXIMUM LIKELIHOOD E BOOTSTRAP COM 5000 INTERAÇÕES. MODELO EVOLUTIVO GENERAL TIME REVERSIBLE + GAMMA DISTRIBUTION (GTR+G).**



**APÊNDICE E - ÁRVORE OBTIDA UTILIZANDO AS SEQUÊNCIAS GÊNICAS CONCATENADAS GERADAS POR MEIO DA ANÁLISE DE *MAXIMUM PARSIMONY* E *BOOTSTRAP* COM 5000 INTERAÇÕES.**



**APÊNDICE F - ÁRVORE OBTIDA UTILIZANDO AS SEQUÊNCIAS GÊNICAS CONCATENADAS GERADAS POR MEIO DA ANÁLISE DE *NEIGHBOR-JOINING* E *BOOTSTRAP* COM 5000 INTERAÇÕES. MODELO EVOLUTIVO *KIMURA 2-PARAMETER*.**



## ANEXOS

### **ANEXO A - PROTOCOLO PARA DISSECAÇÃO DAS GENITÁLIAS SEGUINDO SMITH (1979), COM MODIFICAÇÕES.**

- 1- Separar o abdômen do besouro em soro fisiológico com ajuda de alfinetes;
- 2- Hidratar o abdômen com água destilada na chapa por três minutos;
- 3- Colocar no KOH 10%;
- 4- Levar na chapa deixar por três minutos;
- 5- Separar a genitália em álcool ou soro fisiológico;
- 6- Fixar na glicerina.

#### Observações:

- Não pode deixar ferver em nenhuma etapa;
- A glicerina deve estar em local protegido da luz;
- As genitálias fixadas devem ser imediatamente armazenadas fora da luz.

### **ANEXO B - EXTRAÇÃO 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 C - PROTOCOLO PARA PREPARAÇÃO CITOLÓGICAS E COLORAÇÃO COM GIEMSA 3%.**

#### Acidificação de lâmina:

- 1- Lavar as lâminas com algodão e detergente para retirar o óleo;

- 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 D - PROTOCOLO PARA OBTENÇÃO DE BANDAS-C SEGUINDO FÉRNANDEZ *et al.* (2002), COM MODIFICAÇÕES.**

- 1- Colocar 20 µL (ou 80 µL se for lâmina grande) de formamida 50% (2XSSC);
- 2- Incubar por 2 minutos a 70°C;
- 3- Incubar por 1 hora na estufa a 40°C;
- 4- Lavar com água destilada (3 mergulhos);
- 5- Incubar em 2XSSC a 1 hora em temperatura ambiente;
- 6- Corar em uma solução de DAPI montado em Antifade.

#### **ANEXO E - PROTOCOLO DE PCR PARA MARCAÇÃO DAS SONDAS RDNA 18S E 5S SEGUINDO ALMEIDA *et al.* (2010).**

<b>Reagentes</b>	<b>Concentração inicial</b>	<b>Concentração Final</b>	<b>Volume</b>
Água ultrapura	-	-	32,5 µL
Tampão	10 X	1 X	5 µL

MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2 mM	4 µL
<i>Primer M13 F</i>	10 mM	0,2 mM	1 µL
<i>Primer M13 R</i>	10 mM	0,2 mM	1 µL
dATP	2 mM	0,04 mM	1 µL
dCTP	2 mM	0,04 mM	1 µL
dGTP	2 mM	0,04 mM	1 µL
dTTP	2 mM	0,028 mM	0,7 µL
dUTP Biotina (18S) /Digoxigenina (5S)	1 mM	0,02 mM	1 µL
Taq polimerase	5 U/µL	5 U	1 µL
DNA	120 ng/µL	150 ng	1,25 µL
		Total	50 µL

- 1- Colocar o tampão, a água ultrapura, luvas, ponteiras, pipetas com a caixa aberta e microtubos na capela, para receber UV por 15 minutos;
- 2- Fazer gelo na máquina;
- 3- Pegar todo os outros reagentes e colocar no gelo;
- 4- Colocar a quantidade de cada reagente na parede do microtubo, exceto a Taq polimerase;
- 5- Misturar os itens;
- 6- Levar ao termociclador.

*Primer rDNA 18S* descrito por Almeida *et al.* (2010):

rDNA18S\_F: 5' – TTG TCT CAA AGA TTA AGC CA – 3'

rDNA18S\_R: 5' – TGG GCC GCC CTT GCG AGC TA – 3'

*Primer rDNA 5S* código de acesso: KX858924.1

#### Ciclo da PCR Marcada rDNA 18S e 5S

1. 94°C – 4 minutos. Desnaturação inicial
2. 94°C – 1 minuto.
3. 51°C – 45 segundos. Temperatura de anelamento
4. 72°C – 1 minuto e 20 segundos. Elongação do DNA

Repetir os passos 2-4 por 35x

5. 72°C – 5 minutos. Elongação final

6. 4°C – *Forever*

## **ANEXO F - PROTOCOLO PARA FISH SEGUINDO PINKEL, STRAUME E GRAY (1986), COM MODIFICAÇÕES. PARA 10 LÂMINAS.**

### **Pré-Tratamento com Pepsina 0,005%**

-99 mL de água destilada;

-1 mL de HCL 1M;

-50 µL de pepsina 10%;

Deixar à 37°C por 1 hora e 30 minutos.

### **Tratamento com RNase**

1- Lavar as lâminas em tampão PBS 1X durante 3 minutos em temperatura ambiente (shaker);

2- Desidratar as lâminas em série alcoólica 70%, 90% e 100%, 3 minutos cada (secar e reaproveitar o álcool);

3- Lavar as lamínulas com álcool 70%;

4- Incubar as lâminas em 100 µL de RNase (0,4%RNAase/2XSSC) (em cada lâmina) a 37°C por 1 hora em câmara úmida com água destilada.

### Solução de RNase

-5 µL RNase 10 mg/mL;

-975 µL 2XSSC;

5- Lavar 3 vezes por 3 minutos em 2XSSC;

6- Lavar durante 5 minutos em PBS 1X.

Observação: Durante a incubação na RNase preparar o mix de hibridação, colocar a formamida 70% a 70°C, preparar a solução de pepsina 0,005% e o formaldeído 1%.

### **Tratamento com pepsina**

7- Incubar as lâminas por 10 minutos em solução de pepsina 0,005% a 37°C;

### Solução de pepsina

-99 mL de água destilada;

-1 mL de HCL 1M;

-50 µL de pepsina 10%;



- 8- Lavar 3x em 2XSSC por 3 minutos a temperatura ambiente (shaker);

### **Fixação**

- 9- Fixar em formaldeído 1% em PBS 1X/50 mM MgCl<sub>2</sub> durante 10 minutos a temperatura ambiente.

#### Solução de Formaldeído 1%

- 10 mL PBS 10X;
- 5 mL de MgCl<sub>2</sub>;
- 4 mL de formaldeído;
- Completar para 100 mL com água destilada.

- 10- Lavar em PBS 1X por 5 minutos (shaker);
- 11- Desidratar as lâminas em série alcoólica 70%, 90% e 100% por 3 minutos cada (sem mixer e reaproveitar os álcoois);

### **Pré-hibridação**

- 12- Simultaneamente a desidratação em série alcoólica, desnaturar a solução de hibridação a 100°C por um período de 10 minutos e passá-la imediatamente ao gelo;
- 13- Desnaturar o DNA cromossômico (lâmina) com formamida 70% em 2XSSC a 70°C por 3:50 minutos (reaproveitar);
- 14- Imediatamente após a formamida, desidratar em álcool 70%, 90% e 100% por 3 minutos cada (jogar o álcool 70%);
- 15- Secar as lâminas na estufa;

#### Solução de formamida 70%

- 70 mL de formamida;
- 30 mL de 2XSSC;

### **Hibridação**

- 16- Preparar a câmara úmida a 37°C;
- 17- Montar cada lâmina com 50 µL de solução de hibridação (colocar 40 µL e se sobrar redistribui);
- 18- Cobrir com a lamínula (limpa em álcool 70%) e deixar *overnight* a 37°C;

Solução de hibridação: (estringência 77%) duas sondas (*Double FISH*)

- 200 µL de formamida (concentração final de 50%);
- 80 µL de Sulfato de dextrano 50% (concentração final de 10%);
- 40 µL de 20XSSC (concentração final 2XSSC);
- 300 ng/lâmina de cada sonda;
- Volume final 400 µL (completar com água ultrapura)

Observação: Calcular  $C_1V_1.C_2V_2$  com a quantidade de lâminas usadas e concentração dos reagentes

**LAVAGENS – SEGUNDO DIA**

- 22 - Lavar 2 vezes em solução Tween 0,5%/4XSSC por 3 minutos cada (shaker);

Solução Tween 0,5%/4XSSC

- 200 mL de 20XSSC;
- 5 mL de solução estoque Tween 10%; ou 500 µL Tween puro;
- Completar para 1 L de água destilada;

**Bloqueio**

- 23- Incubar as lâminas em tampão 5% NFDM/4XSSC por 15 minutos;

Tampão 5% NFDM/4XSSC (na chapa)

- 20 mL de 20XSSC;
- 80 mL de água destilada;
- 5 g de leite em pó mólculo Ca++ desnatado;

Observação: antes de incubar, alicotar 5 microtubos com 1000 µL cada do tampão.

- 24- Lavar 2 vezes com Tween 0,5%/4XSSC por 3 minutos (shaker, descartar na pia);

**Detecção de duas sondas (*Double FISH*)**

- 25- Montar o mix contendo 994 µL de NFDM + 1 µL de estreptavidina + 5 µL de anti-digoxigenina rodamina conjugada (geladeira);

- 26- Incubar as lâminas com 100 µL de cada do mix de anticorpos durante 1 hora em câmara úmida e escura, em temperatura ambiente;

- 27- Lavar três vezes por 5 minutos com Tween 0,5%/4XSSC (shaker);
- 28- Desidratar em álcool 70%, 90% e 100%, 5 minutos cada (sem shaker);
- 29- Secar as lâminas;

### **Montagem das lâminas com DAPI**

- 30- Misturar 400 µL de antifade + 1 µL de dapi (0,2 mg/mL);
- 31- Colocar 50 µL da mistura e cobrir com lamínula limpas com álcool 70%;
- 32- Guardar no escuro.

### **Lavagem para redetectar FISH**

- 1- Lavar 1x em PBS 1X por 5 minutos;
- 2- Lavar 3x em Tween 0,5%/4XSSC por 5 minutos cada;
- 3- Lavar 1x em 2XSSC por 5 minutos;
- 4- Série alcoólica (70%, 90% e 100%) por 5 minutos cada;
- 5- Fixador Carnoy I por 5 minutos;

-Usar mixer;

-Secar na estufa.

## **ANEXO G - SOLUÇÕES USADAS NO PROTOCOLO DE FISH.**

### **PBS 10X**

- 75,8 g de NaCl (1,36 M);
- 9,93 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (70 mM), ou 12,45 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O;
- 4,14 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (30 mM);

Completar pra 1000 mL e autoclavar.

### **20xSSC**

- 175,6 g NaCl;
- 88,2 g de Citrato de sódio;

Dissolver em 1L de água destilada, autoclavar.

### **Sulfato dextrano 50%**

- 0,5 g de sulfato dextrano;

- 1 mL de água destilada;

#### **Antifade**

- 50 mg de 1,4-Phenylendiamin-dihydrochlorid (Fluka 78460);
- Dissolver em 5 mL de tampão PBS 1X;
- Elevar o pH até 8 do antifade com bicarbonato de sódio pH=9,0;
- Completar para o volume de 50 mL com glicerol Merck;
- Filtrar com papel filtro (papel 0,45), envolver com papel alumínio, guardar no freezer.

#### **DAPI 0,2 mg/mL (solução estoque 100x)**

- Dissolva 2 mg de DAPI em 10 mL de água destilada.

#### **DAPI 2 µg/mL (solução uso)**

- Dissolva 100 µL da solução estoque em 10 mL de tampão McIlvaine pH 7,0.

#### **RNAse 10 mg/mL**

- Dissolver 10 mg RNAse pancreática (RNAse A) em 1 mL de 10 mM Tris HCl pH 7,5 e 15 mM NaCl;
- Aquecer a 100°C por 10 minutos;
- Estoque a -20°C;

### **ANEXO H - EXTRAÇÃO DE DNA COM CTAB SEGUNDO MURRAY E THOMPSON (1980), COM MODIFICAÇÕES.**

**Tampão de extração sem CTAB.** Para 15 mL de solução tampão

- 5 mL de NaCl 5 M (Concentração final 1 M)
- 5 mL EDTA 0,5 M (Concentração final 0,1 M)
- 5 mL TRIS-HCL 1 M pH 8,0 (Concentração final 0,1 M)

Guardar o tampão de extração em temperatura ambiente.

#### **Processo de extração:**

- 1- Em um microtubo de 1,5 mL colocar:

- Tecido (cabeça, pronoto e patas);
  - 180  $\mu\text{L}$  de tampão sem CTAB;
  - 120  $\mu\text{L}$  de CTAB 5% (0,5 g para 10 mL de água destilada)
  - 10  $\mu\text{L}$  de proteinase K (10 mg/mL)
  - 5  $\mu\text{L}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol.
- 2- Colocar a 50°C por 10 horas (*overnight*), ou até que o tecido esteja completamente digerido;
  - 3- Adicionar 10  $\mu\text{L}$  de RNAse (10 mg/mL)
  - 4- Colocar a 37°C, em banho maria, por 2 horas. Mexer a cada 20 minutos.
  - 5- Adicionar 500  $\mu\text{L}$  de clorofórmio;
  - 6- Inverter os tubos suavemente durante 5 minutos;
  - 7- Centrifugar a 8.000 rpm por 5 minutos a 4°C;
  - 8- Retirar o sobrenadante e transferir para um novo tubo identificado;
  - 9- Adicionar 600  $\mu\text{L}$  de etanol 100% gelado e deixar a -20°C por 2 horas;
  - 10- Centrifugar a 12.000 rpm por 15 minutos a 4°C;
  - 11- Descartar o sobrenadante;
  - 12- Lavar o *pellet* com 200  $\mu\text{L}$  de etanol 70% gelado;
  - 13- Centrifugar por 3 minutos a 10.000 rpm a 4°C;
  - 14- Descartar o sobrenadante;
  - 15- Lavar o *pellet* com 200  $\mu\text{L}$  de etanol 100% gelado;
  - 16- Centrifugar por 3 minutos a 10.000 rpm a 4°C;
  - 17- Descartar o sobrenadante;
  - 18- Deixar secar na estufa a 37°C;
  - 19- Ressuspender em 40  $\mu\text{L}$  de água ultrapura ou TE.

#### **ANEXO I - PROTOCOLO DE PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DO *GENE* CITOCROMO OXIDASE I (COI).**

<b>Reagentes</b>	<b>Concentração inicial</b>	<b>Concentração Final</b>	<b>Volume</b>
Água ultrapura	-	-	17,41 $\mu\text{L}$
Tampão	10 X	1 X	3,5 $\mu\text{L}$
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1,5 mM	2,1 $\mu\text{L}$

<i>Primer F – COI</i>	10 mM	1,5 mM	2,5 µL
<i>Primer R – COI</i>	10 mM	1,5 mM	2,5 µL
dNTP's	2 mM	0,2 mM	0,6 µL
Taq polimerase	5 U/µL	2,5 U	0,5 µL
DNA	50,5 ng/µL	50 ng	0,99 µL
		Total	35 µL

*Primer COI* descrito por Kim, Kjer e Duckett (2003):

*COI forward: 5' - TAA TTG GAG GAT TTG GAA YTG - 3'*

*COI reverse: 5' - CCT YGG TAA AAT TAA AAT ATA AAC TTC - 3'*

#### Ciclo da PCR COI

1. 95°C – 4 minutos. Desnaturação inicial
2. 94°C – 1 minuto.
3. 53°C – 30 segundos. Temperatura de anelamento
4. 72°C – 3 segundos. Elongação do DNA

Repetir os passos 2-4 por 35x

5. 72°C – 5 minutos. Elongação final
6. 4°C - *Forever*

#### **ANEXO J - PROTOCOLO DE PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DO GENE DE DNA RIBOSSOMAL 28S.**

Reagentes	Concentração inicial	Concentração Final	Volume
Água ultrapura	-	-	21,58 µL
Tampão	10 X	1 X	5 µL
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1,5 mM	3 µL
<i>Primer F – D2 UP-4</i>	10 mM	1,5 mM	7,5 µL
<i>Primer R – D2 DN-B</i>	10 mM	1,5 mM	7,5 µL
dNTP's	2 mM	0,15 mM	3,75 µL
Taq polimerase	5 U/µL	1 U	0,2 µL
DNA	13,6 ng/µL	20 ng	1,47 µL
		Total	50 µL

*Primer rDNA 28S* descrito por Gillespie *et al.* (2003):

28S D2 UP-4 *forward* 5' - GAG TTC AAG AGT ACG TGA AAC CG - 3'

28S D2 DN-B *reverse* 5' - CCT TGG TCC GTG TTT CAA GAC - 3'

#### Ciclo da PCR rDNA 28S

1. 95°C – 4 minutos. Desnaturação inicial
  2. 95°C – 1 minuto.
  3. 58.9°C – 1 minuto. Temperatura de anelamento
  4. 72°C – 1 minuto. Extensão do DNA
- Repetir os passos 2-4 por 35x
5. 72°C – 5 minutos. Extensão final
  6. 4°C - *Forever*

### **ANEXO K - PROTOCOLO PINTURA CROMOSSÔMICA ADAPTADO PARA *Omophoita communis*.**

#### **Microdissecção segundo Yang *et al.* (2017):**

1. Colocar o testículo em duas gotas de ácido acético 70%, esperar alguns minutos até o tecido esbranquiçar e macerar. Acrescentar mais gotas de ácido acético, misturar e pingar a preparação citogenética em lamínulas para a microdissecção.
2. Microdissectar os cromossomos de interesse com agulhas de vidro com diâmetro variável, de acordo com o tamanho dos cromossomos (por volta de 2 mm).
3. Coletar os cromossomos microdissectados em microtubos de 0,2 mL quebrando a ponta das agulhas dentro.

Observação: Todo material deverá estar autoclavado e colocado em luz UV por no mínimo 15 minutos antes de realizar a microdissecção.

#### **Amplificações dos fragmentos (DOP1 e DOP2)**

##### **1. DOP 1 PCR:**

*Primer 6MW* descrito por Telenius *et al.* (1992):

DOP\_6MW: 5' - CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G - 3'

Protocolo utilizando a Long Taq, adaptar para utilizar outras enzimas.

#### **Solução A – Mix do PCR1** (ciclos de temperatura baixa)

Reagentes	Concentração inicial	Concentração final	Volume
Água ultrapura	-	-	1,9 µL
Sequenase <i>reaction buffer</i>	5 X	0,6 X	0,6 µL
<i>primer</i> 6MW	10 µM	4,8 µM	2 µL
dNTP's	2,0 µM	0,2 µM	0,5 µL
<b>Vol. final por sonda</b>			<b>5 µL</b>

### Solução B – Mix da Sequenase

Reagentes	Concentração inicial	Concentração final	Volume
Sequenase	13 U/µL	1,6 U	0,25 µL
Sequenase <i>reaction buffer</i>	5 X	4,48 X	1,75 µL
<b>Vol. final por sonda</b>			<b>2 µL</b>

### Solução C – Mix do PCR2 (ciclos de alta temperatura)

	Concentração inicial	Concentração final	Volume
Água ultrapura			30,25 µL
Long Taq <i>Buffer</i>	5 X	1 X	9 µL
dNTP's	2,0 mM	0,19 mM	4,4 µL
<i>primer</i> 6MW	10 µM	0,55 µM	2,5 µL
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	2,5 mM	2,25 µL
Long Taq	4 U/µL	6,4 U	1,6 µL
<b>Vol. final por sonda</b>			<b>45 µL</b>

### Ciclos da DOP 1 e processos

Adicionar **solução A - Mix do PCR1** no microtubo em que foi realizada a pré DOP. Dar um “*spin*”.

1. 92°C 5 minutos. Desnaturação inicial
2. 25°C 2 minutos 20 segundos. Adicionar 0,25 µL da **solução B – mix de Sequenase**. Temperatura de anelamento
3. 37°C 2 minutos. Elongação do DNA
4. 90°C 1 minuto

Repetir os passos 2-4 10x



5. 92°C 1 minuto. Adicionar 45 µL da **solução C** antes de começar.

Desnaturação

6. 56°C 2 minutos. Temperatura de anelamento

7. 68°C 2 minutos. Elongação do DNA

Repetir os passos 5-7 32x

8. 68°C 5 minutos. Elongação final

9. 4°C *Forever*

Guardar a -20°C.

## 2. DOP 2 – PCR de Reamplificação

	Concentração inicial	Concentração final	volume
Água ultrapura	-	-	26,85 µL
Long Taq <i>buffer</i>	5 X	1 X	10 µL
dNTP's	2,0 mM	0,2 mM	4,5 µL
<i>primer</i> 6MW	10 µM	1 µM	5 µL
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	2,5 mM	2,5 µL
Long Taq	4 U/µL	0,6 U	0,15 µL
DOP 1 produto	-	-	1 µL
<b>Vol. final</b>			<b>50 µL</b>

### Ciclos da DOP 2

1. 92°C 3 minutos. Desnaturação inicial

2. 91°C 1 minuto. Desnaturação do DNA

3. 56°C 1 minuto. Temperatura de anelamento

4. 68°C 2 minutos. Elongação do DNA

Repetir os passos 2-4 35x

5. 68°C 5 minutos . Elongação final

6. 4°C *Forever*

Guardar a -20°C.

### **Marcação das sondas**

Para marcar as sondas foi feita uma terceira DOP, usando-se um dinucleotídeo marcado com 0,06 mM de 11-dUTP-Roche. Os ciclos são os mesmos da DOP 2.

### Preparação do C0T-PCR (Bloqueador do DNA repetitivo)

Fazer duas DOP-PCR, a primeira usando *primer* G1\_4 e a segunda o *\_primer* 6MW:  
*Primer* G1\_4 utilizado como metodologia de rotina no laboratório de Thomaz Liehr, na Universidade de Jena, Alemanha.

G1\_4: 5' – GAG GAT GAG GTT GAG NNN NNN GTG G - 3'

	Concetração inicial	Concentração final	Volume
Água ultrapura	-	-	28,25 µL
Long Taq buffer	5 X	1 X	10 µL
dNTP's	2,0 mM	0,2 mM	5 µL
<i>primer</i> G1_4	100 µM	4 µM	2 µL
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	2,5 mM	2,5 µL
Long Taq	4 U/µL	5 U/µL	1,25 µL
DNA			1 µL
<b>Vol. final</b>			<b>50 µL</b>

#### Ciclo da PCR:

1. 92°C – 1 minuto. Desnaturação inicial
2. 92°C – 1 minuto
3. 30°C – 1 minuto e 30 segundos. Desnaturação inicial
4. 68°C – 2 minutos. Elongação do DNA

Repetir passo 2-4 8X

5. 92°C – 1 minuto
6. 62°C – 1 minuto 30 segundos
7. 68°C – 2 minutos. Elongação do DNA

Repetir passo 5-7 25x

8. 68°C – 5 minutos. Elongação final
9. 4°C - *Forever*

#### Reamplificação:

	Concentração Inicial	Concentração final	Volume
Água ultrapura	-	-	28,75 µL
Long Taq <i>buffer</i>	5 X	1 X	10 µL

dNTP's	2,0 mM	0,2 mM	5 µL
<i>primer</i> 6MW	100 µM	5 µM	2,5 µL
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	2,5 mM	2,5 µL
Long Taq	4 U/µL	5 U/µL	1,25 µL
DNA			2 µL
<b>Vol. final</b>			<b>50 µL</b>

Ciclo da PCR de reamplificação:

1. 92°C – 3 minutos. Desnaturação inicial
2. 91°C – 1 minuto. Desnaturação do DNA
3. 56°C – 1 minuto. Temperatura de anelamento
4. 68°C – 2 minutos. Elongação do DNA

Repetir passo 2-4 30x

5. 68°C – 5 minutos. Elongação final
6. 4°C - *Forever*

**Precipitação do C0T-PCR**

Precipitar o C0T-PCR (Bloqueador) antes de seguir à FISH:

- 50 µL da sonda/C0T
- 5 µL Acetado de Sódio 3M
- 6 µL tRNA
- 120 µL Etanol 100%

1. Misturar cuidadosamente e incubar a -80°C;
2. Centrifugar a 13.000 rpm por 20 minutos a 4°C;
3. Remover o sobrenadante com uma pipeta sem tocar no *pellet*;
4. Secar o *pellet* a temperatura ambiente ou em centrífuga a vácuo;
5. Depois de seco, ressuspender o C0T-PCR com 20 µL de água ultrapura.