

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUCAS ROSOLEN DE ALMEIDA MELLO

ESTUDO EVOLUTIVO DO PAPEL DOS DNAs REPETITIVOS ENVOLVIDOS NA
EVOLUÇÃO DOS CROMOSSOMOS SEXUAIS GIGANTES EM OEDIONYCHINA
(COLEOPTERA, CHRYSOMELIDAE, ALTICINAE)

CURITIBA

2019

LUCAS ROSOLEN DE ALMEIDA MELLO

ESTUDO EVOLUTIVO DO PAPEL DOS DNAS REPETITIVOS ENVOLVIDOS NA
EVOLUÇÃO DOS CROMOSSOMOS SEXUAIS GIGANTES EM OEDIONYCHINA
(COLEOPTERA, CHRYSOMELIDAE, ALTICINAE)

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR) como parte dos requisitos para obtenção de título de Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração Genética.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari

Coorientadora: Prof. Dra Mara Cristina de Almeida

CURITIBA

2019

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Dulce Maria Bieniara – CRB/9-931)

Mello, Lucas Rosolen de Almeida

Estudo evolutivo do papel dos DNAs repetitivos envolvidos na evolução dos cromossomos sexuais gigantes em *Oedionychina* (Coleoptera, Chrysomelidae, Alticinae). / Lucas Rosolen de Almeida Mello. – Curitiba, 2019.

92 p.: il.

Orientador: Marcelo Ricardo Vicari

Coorientadora: Mara Cristina de Almeida

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Elementos de DNA transponíveis 2. Coleópteros 3. Cromossomos sexuais I. Título II. Vicari, Marcelo Ricardo III. Almeida, Mara Cristina de IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

CDD (20. ed.) 575.1



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO GENÉTICA -
40001016006P1

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em GENÉTICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de LUCAS ROSOLEN DE ALMEIDA MELLO intitulada: **Estudo evolutivo do papel dos DNAs repetitivos envolvidos na evolução dos cromossomos sexuais gigantes em *Oedionychina (Coleoptera, Chrysomelidae, Alticinae)***., após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 30 de Abril de 2019.

MARCELO RICARDO VICARI
Presidente da Banca Examinadora

MICHELLE ORANE SCHEMBERGER
Avaliador Externo (UEPG)

KALINE ZIEMNICZAK
Avaliador Externo (UNESPAR)

PATRICIA BARBOSA
Avaliador Externo (UNESPAR)

ORLANDO MOREIRA-FILHO
Avaliador Externo (UFSCAR)

*Dedico este trabalho a
minha mãe Ivanilde, a meu pai
Edson, a meus Orientadores, a
mim, a toda minha família e
amigos.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** primeiramente, pois nos momentos difíceis é quem sempre me reconforta e sossega meu coração.

A meus pais **Edson** e **Ivanilde** por todo apoio desde emocional e financeiro quando precisei (mesmo com toda dificuldade), se não fosse por vocês, por seus ensinamentos, princípios morais, éticos, humildade e simplicidade eu não seria nada. Agradeço a vocês por tudo, são minha base, com os quais sempre posso contar e me inspirar, agradeço também a outros familiares que de alguma forma contribuíram para minha jornada até aqui.

Agradeço a meu orientador prof. Dr. **Marcelo Ricardo Vicari**, primeiramente por ter aceitado me orientar no doutorado, mesmo que no susto e com todas as adversidades do momento, obrigado pela confiança. Quero te agradecer por todos os conselhos, ensinamentos, apoio, dedicação, paciência e ideias ao longo desses anos, que vão além do doutorado, sempre me auxiliando quando precisei. Além de considerá-lo um amigo, obrigado também pelos momentos de descontração, churrascos e festas.

Agradeço à minha co-orientadora prof Dra. **Mara Cristina de Almeida** pelo voto de confiança durante todos esses anos, por todo o apoio, conselhos e ensinamentos, desde a graduação com as aulas de genética, fazendo me interessar pela área, me orientando no IC, TCC, Mestrado e agora me co-orientando no doutorado, sempre acessível quando precisei, com um imenso respeito, cordialidade, dedicação e carinho.

Agradeça a minha banca de acompanhamento Dra. **Michele Orane Schemberger** e Dr. **Daniel Bruschi** pelas contribuições e por acompanharem o desenvolvimento deste trabalho ao longo desses anos.

Agradeço à Professora Dra **Viviane Nogaroto Vicari** pelo apoio, amizade e ensinamentos.

Agradeço a meus amigos pessoais que sempre me deram força, seja nos momentos difíceis ou felizes.

Agradeço a meus antigos amigos de laboratório, os quais eu não convivo mais, mas que de alguma forma me ajudaram em momentos na minha pesquisa.

Agradeço aos meus amigos da labuta diária dos últimos anos, principalmente a minha grande amiga **Viviane**, por quem hoje considero uma irmã,

junto com meus amigos **Matheus, Leonardo, Thais, Geize, Larissa, Caroline e Sebastião**. Com os quais sempre tive bom relacionamento, bom trabalho em equipe, parcerias no laboratório, sempre dispostos a contribuir, além das boas risadas nas horas de descontração e das nossas festas.

Agradeço à UFPR, ao programa de Pós-Graduação em Genética, a UEPG, aos laboratórios CBSF-Lab e LABGEV por todo apoio para realização deste trabalho, à CAPES pela bolsa e aos órgãos de fomento CNPq e Fundação Araucária.

“Você pode ignorar a realidade, mas não pode ignorar as consequências de ignorar a realidade.”
(Ayn Rand)

“Idéias e somente idéias podem iluminar a escuridão.”
(Ludwig von Mises)

“O mestre disse a um dos seus alunos: Yu, queres saber em que consiste o conhecimento? Consiste em ter consciência tanto de conhecer uma coisa quanto de não a conhecer. Este é o conhecimento.”
(Confúcio)

RESUMO

Uma grande diversidade de sistemas de cromossomos sexuais é observada na ordem Coleoptera, como os aquiasmáticos XY, Xy_p , Xny_p/nXy_p , Xy_c , X0 e X_1+X_2 ou quiasmáticos neoXY, Xy, Xy_r , X_1X_2Y , XXXY, XXY e XY_1Y_2 . Esta ampla diversidade abre possibilidade de estudos genéticos a respeito da diferenciação cariotípica e dos mecanismos cromossômicos de diferenciação sexual. Espécies de *Omophoita* (Oedionychina: Alticinae: Chrysomelidae) possuem cromossomos sexuais gigantes e assinápticos durante a meiose, $2n=22$, fórmula meiótica $10II+X+Y$, sendo organismos interessantes para estudos evolutivos e moleculares relacionados aos seus cromossomos sexuais. Adicionalmente, devido a alta plasticidade e mobilidade genômica, os elementos transponíveis (TEs) podem ser importantes para o entendimento dos mecanismos moleculares que atuaram na diversificação dos cromossomos sexuais gigantes X e Y em Oedionychina. Este estudo teve por objetivo verificar o papel dos TEs nas alterações cariotípicas em *Omophoita*, com enfoque especial na diversificação dos seus cromossomos sexuais gigantes de *O. octoguttata*, *O. sexnotata*, *O. personata* e *O. magniguttis*. Diferentes TEs foram isolados e caracterizados a partir do genoma de *Omophoita octoguttata*. Posteriormente, estes TEs foram mapeados nos cromossomos por hibridização *in situ* fluorescente (FISH). Seis tipos de TEs foram obtidos e as análises de similaridade genética mostraram que estas sequências compõem TEs das famílias: *Tc1/Mariner*, *RTE/L1-56_XT*; LTR *Copia-26_CQ-I*; LTR *GYPSY39_AG*; *HARB-1_TAI/hAT-N7B_Crp* e *Helitron-1_BTa/Helitron-1_PM*. As hibridações *in situ* mostraram que todos estes TEs estão acumulados nos autossomos e nos cromossomos sexuais XY de *Omophoita*. Os resultados obtidos sugerem que houve uma grande expansão do tamanho dos cromossomos sexuais e consecutivamente do genoma na linhagem de Oedionychina e, que esta expansão é, em parte, decorrente de invasões genômicas e movimentações de TEs. Acúmulos diferenciais dos diferentes tipos de TEs foram observados entre os cromossomos X e Y. Os acúmulos dos TEs em posições cromossômicas diferentes, principalmente no cromossomo Y quando comparado ao X foram sugeridas a atuar na diversificação do par sexual, o qual é completamente assináptico nestas espécies de *Omophoita*. Diferenças na localização dos TEs também foram observadas quando comparados os cromossomos sexuais das quatro espécies. Com toda esta movimentação dos TEs, foi sugerido que possam estar atuando na divergência das espécies do grupo. Por fim, a situação incomum de acúmulo extensivo de TEs nos cromossomos X de *O. octoguttata*, *O. sexnotata*, *O. personata* e *O. magniguttis* foi hipotetizada quanto a modificação de sequências gênicas no cromossomo X, as quais segundo as regras de Haldane, grande efeito do X em “genes da especiação” poderiam contribuir para a evolução da incompatibilidade reprodutiva entre as espécies.

Palavras-chave: transposons, evolução cariotípica, assinápticos, cromossomos gigantes.

ABSTRACT

A large diversity of sex chromosome systems is observed in the order Coleoptera, as the aquiasmatics XY, Xy_p , Xny_p/nXy_p , Xy_c , X0 e X_1+X_2 or quiasmatics neoXY, Xy, Xy_r , X_1X_2Y , XXXY, XXY e XY_1Y_2 . This wide diversity opens the possibility of genetic studies regarding karyotypic differentiation and of the chromosomal mechanisms of sexual differentiation. Species of *Omophoita* (Oedionychina: Alticinae: Chrysomelidae) possess giant sex chromosomes and asynaptics during meiosis, $2n=22$, meiotic formula, $10II+X+Y$, being interesting organisms for evolutionary and molecular studies related to their sexual chromosomes. Additionally, due to high plasticity and genomic mobility, the transposable elements (TEs) may be important for the understanding of the molecular mechanisms that have acted in the diversification of the giant sex chromosomes X and Y in Oedionychina. This study aimed to verify the role of TEs in the karyotype alterations in *Omophoita*, with a special focus on the diversification of their giant sex chromosomes of *O. octoguttata*, *O. sexnotata*, *O. personata* and *O. magniguttis*. Different TEs were isolated and characterized from the genome of *Omophoita octoguttata*. Subsequently, these TEs were mapped on the chromosomes by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). Six types of TEs were obtained and analyzes of genetic similarity showed that these sequences compose families TEs: *Tc1/Mariner*, *RTE/L1-56_XT*; LTR *Copia-26_CQ-I*; LTR *GYPSY39_AG*; *HARB-1_TA/hAT-N7B_Crp* e *Helitron-1_BTa/Helitron-1_PM*. *In situ* hybridizations have shown that all these TEs are accumulated in the autosomes and the XY sex chromosomes of *Omophoita*. The results obtained suggest that there was a great expansion of the sex chromosomes and consecutively of the genome size in the Oedionychina lineage and, that this expansion is partly due to genomic invasions and TEs movements. Differential accumulations of different types of TEs were observed between the X and Y chromosomes. The accumulations of TEs in different chromosomal positions, mainly in the Y chromosome when compared to the X were suggested to act in the diversification of the sexual pair, which is completely asynaptic in these species of *Omophoita*. Differences in the location of TEs were also observed when comparing the sex chromosomes of the four species. With all this movement of TEs, it has been suggested that they may be acting in the divergence of the species of the group. Finally, the unusual situation of extensive accumulation of TEs on the X chromosomes of *O. octoguttata*, *O. sexnotata*, *O. personata* and *O. magniguttis* was hypothesized for the modification of gene sequences on the X chromosome, which second Haldane's rules, great effect of the X on "genes of the speciation" could contribute to the evolution of the reproductive incompatibility between the species.

Keywords: transposable, karyotype evolution, asynaptics, giant chromosomes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

MATERIAL E MÉTODOS

Figura 1- Espécies de *Omophoita* analisadas: (A) *O. octoguttata*, macho; (B) *O. sexnotata*, macho; (C) *O. personata*, macho; (D) *O. magniguttis*, macho. Barra = 1,0 centímetro Fonte: O AUTOR (2019).....**30**

CAPÍTULO I

Figura 1- Sequences obtained from transposable elements by alignment analysis using the repetitive DNA database from the Genetic Information Research Institute. Sequence A showed total identity in the 1,048-bp alignment with the Tc1 DNA transposon, *Tc1-6_AFC*, and was named *Tc1/Mariner-Ooc*. Sequence B showed 100-bp alignment identity with the non-LTR retrotransposon *RTE-36_LMi* and was named *RTE-Ooc partial* in this study.....**42**

Figura 2- Meiotic cells of the 3 *Omophoita* species after FISH with the *Tc1/Mariner-Ooc* probe and idiograms representing the sex chromosomes. A–C *O. octoguttata*. D–F *O. sexnotata*. G–I *O. personata*. The black circles in the idiograms indicate the centromeres. Scale bars, 10 µm.....**43**

Figura 3- Meiotic cells of *O. octoguttata* (A, B), *O. sexnotata* (C, D), and *O. personata* (E, F) after FISH with the *RTE Ooc partial* probe. G Idiogram representing the accumulations in the sex chromosomes. The black circles indicate the centromeres. Scale bars, 10 µm.....**44**

CAPÍTULO II

Figura 1. Representação das sequências parciais dos elementos transponíveis obtidas de *Omophoita octoguttata*. A sequência A tem 716 pb e um segmento de 81 pb com similaridade ao TE Retrotransposon LTR *Copia-26_CQ-I*; A sequência B tem 644 pb e um segmento de 591 pb com similaridade ao Retrotransposon LTR *GYPSY39_AG*, esta sequência contém um domínio proteico truncado para a enzima Transcriptase Reversa *RT_LTR* e *RVT_1* entre os segmentos 342 a 629 pb. A sequência C tem 882 pb e dois fragmentos com similaridade à DNA transposons, 77 pb relacionado ao TE *HARB-1_TA* e 121 pb ao *hAT-N7B_Crp*; A sequência D tem 327 pb e dois segmentos lado a lado com similaridade ao DNA transposon *Helitron*, 89 pb ao *Helitron-1_BTa* e 182 pb ao *Helitron-1_PM*, esta sequência contém um domínio proteico truncado para a enzima *Helicase PIF1* entre os segmentos 100 a 282 pb.....**65**

Figura 2. Células meióticas das espécies de *Omophoita* submetidas à FISH com sondas dos Retrotransposons LTRs: *Copia Ooc parcial* e *Gypsy Ooc parcial* respectivamente. *O.o* = *O. octoguttata* (A-B); *O.s* = *O. sexnotata* (C-D); *O.p* = *O. personata* (E-F) e, *O.m* = *O. magniguttis* (G-H). Barra = 10 uM.....66

Figura 3. Células meióticas das espécies de *Omophoita* submetidas à FISH com sondas dos transposons de DNA *HARB/hAT Ooc parcial* e *Helitron Ooc parcial* respectivamente. *O.o* = *O. octoguttata* (A-B); *O.s* = *O. sexnotata* (C-D); *O.p* = *O. personata* (E-F) e, *O.m* = *O. magniguttis* (G-H). Barra = 10 uM.....67

Figura 4. Ideogramas representativos dos cromossomos sexuais X Y com a localização dos TEs *Copia*, *Gypsy*, *HARB/hAT* e *Helitron* (cores vermelho ou verde) nas espécies: *O.o* = *O. octoguttata* (A-D); *O.s* = *O. sexnotata* (E-H); *O.p* = *O. personata* (I-L) e , *O.m* = *O. magniguttis* (M-P). Os círculos pretos correspondem a região centromérica.....68

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Sequências dos primers e dados da PCR dos TEs utilizados neste estudo com DNA de *Omophoita octoguttata*..... **64**

Tabela 2. Sumário dos dados obtidos para a similaridade genética dos TEs obtidos de *Omophoita octoguttata*..... **64**

LISTA DE ABREVIATURAS

Cot-1: Cinética de reassociação de DNA altamente e moderadamente repetitivo

DNAsat: DNAs satélite

dNTPs: Desoxinucleotídeos trifosfatos

DSBs: Quebras casuais de filamentos duplos

FISH: Hibridização *in situ* fluorescente

GAG: Antígeno específico do grupo

Hel: DNA helicase

INT: integrase DDE

ITSs: Intersticiais

LINEs: Elementos intercalados longos

LTR: Repetições terminais longas

Non-LTR: Repetições terminais curtas

ORFs: Quadros de leitura abertos

Pb: Pares de base

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PLEs: Elementos *Penelope*

POL: DNA polimerase

RC: Domínios iniciadores de replicação

RH: RNase H

RT: Transcriptase reversa

SINEs: Elementos intercalados curtos

SSRs: Repetição de sequências simples

TEs: Elementos transponíveis

TIRs: Repetições terminais invertidas

VNTR: Número variável de repetição *in tandem*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 ASPECTOS GERAIS DE COLEOPTERA E SUBFAMÍLIA ALTICINAE	16
2.2 ASPECTOS CITOGENÉTICOS COLEOPTERA E SUBFAMÍLIA ALTICINAE	18
2.3 ASPECTOS GERAIS DE HETEROCROMATINA E DOS DNAS REPETITIVOS EM COLEOPTERA E SUBFAMÍLIA ALTICINAE	19
2.4 CLASSIFICAÇÃO, ORGANIZAÇÃO CROMOSSÔMICA E FUNÇÕES DOS DNAS REPETITIVOS <i>IN TANDEM</i> E DISPERSOS	21
3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	28
3.1 JUSTIFICATIVA.....	28
3.2 OBJETIVO GERAL	28
3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	30
4.2 PREPARAÇÕES DE CROMOSSOMOS MEIÓTICOS E EXTRAÇÃO DO DNA	30
4.3 AMPLIFICAÇÃO, CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DE TES	31
4.4 ANÁLISES DAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS	31
4.5 HIBRIDAÇÃO <i>IN SITU</i> FLUORESCENTE (FISH).....	32
5 RESULTADOS	33
ACCUMULATION OF TRANSPOSABLE ELEMENTS IN AUTOSOMES AND GIANT SEX CHROMOSOMES OF <i>Omophoita</i> (CHRYSOMELIDAE: ALTICINAE)	34
ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS E A DIFERENCIAÇÃO DOS CROMOSSOMOS SEXUAIS GIGANTES DE <i>Omophoita</i> (CHRYSOMELIDAE, ALTICINAE)	49
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	70
REFERÊNCIAS	72
8 ANEXOS	86
8.1 CITOGENÉTICA CONVENCIONAL	86
8.2. EXTRAÇÃO DE DNA.....	86
8.3 CLONAGEM.....	88
8.4 HIBRIDAÇÃO <i>IN SITU</i> FLUORESCENTE (FISH) (PINKEL, STRAUME E GRAY, 1986) COM MODIFICAÇÕES.....	90

1 INTRODUÇÃO

Existem mais de 400.000 espécies descritas de Coleopteras distribuídos em quase todos os cantos do planeta (GULLAN e CRANSTON, 2010; SLIPINSKI et al., 2011). Entre a família Chrysomelidae e suas subfamílias, Alticinae é a mais rica em número de espécies da região neotropical, a qual possui 570 gêneros e mais de 10.000 espécies descritas. (BORROR e DELONG; 1988; SEENO e WILCOX, 1982; SCHERER, 1988; LINGAFELTER, 2001; TRIPLEHORN e JOHNSON, 2011).

Em Coleoptera, se observa grande diversidade para sistemas de cromossomos sexuais, a exemplo dos aquiasmáticos XY, Xy_p , Xny_p/nXy_p , Xy_c , $X0$ e X_1+X_2 e, quiasmáticos neoXY, Xy, Xy_r , X_1X_2Y , XXXY, XXY e XY_1Y_2 , nas diferentes linhagens evolutivas (SMITH e VIRKKI, 1978, GALIÁN et al. 2002, ALMEIDA et al., 2009, GOLL et al., 2013). Citogeneticamente as espécies da subtribo Oedionychina dentre Alticinae possuem representantes com cariótipos intrigantes relacionados ao número diplóide $2n=22$, fórmula meiótica $10II+X+y$, com cromossomos sexuais gigantes e assinápticos, porém com segregação regular durante a meiose (SMITH e VIRKKI, 1978; ALMEIDA et al., 2009; MELLO et al., 2014; GOLL et al., 2018; ROSOLEN et al., 2018).

Os DNAs repetitivos compõem grande parte dos genomas eucarióticos e são representados por diversos tipos de sequências repetitivas (SUMNER, 2003). São agrupados de acordo com seu padrão de repetições em: (i) repetições *in tandem*, a exemplo das famílias multigênicas e dos DNAs satélites (DNAsat), minissatélites e microssatélites e, (ii) repetições dispersas, composta pelos elementos de transposição (TEs), os quais divididos em transposons e retrotransposons (SUMNER, 2003).

Os TEs mostram grande diversidade de sequências e suas transposições deixam rastros nas mais diversificadas regiões genômicas (FESCHOTE, 2008). Esses elementos apresentam alto potencial mutagênico, contribuindo para alterações do tamanho, estrutura e da diversidade dos cromossomos e genomas, podendo acumular nos cromossomos sexuais de diferentes espécies (STEINEMANN e STEINEMANN, 1998; KIDWELL, 2002; SCHEMBERGER et al., 2014, 2016; ROSOLEN et al., 2018).

Com isso, os estudos de identificação e caracterização DNAs repetitivos dispersos atrelados aos citogenéticos poderiam servir de ferramentas para

elucidações relacionadas à evolução das linhagens e tipos de rearranjos cromossômicos. Além disso, devido sua alta taxa mutacional e plasticidade os TEs poderiam estar diretamente envolvidos no rearranjo e diferenciação dos cromossomos sexuais gigantes em Alticinae. Nesse sentido, no estudo foram caracterizados e localizados *in situ* TEs com objetivo de verificar a atuação destes elementos na diversificação cariotípica e especialmente da expansão do tamanho dos cromossomos sexuais em espécies do gênero *Omophoita*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ASPECTOS GERAIS DE COLEOPTERA E SUBFAMÍLIA ALTICINAE

Na classe dos insetos, Coleoptera é maior entre as suas ordens (COSTA, 2003; LEWINSOHN e PRADO, 2005; TRIPLEHORN e JOHNSON, 2011). Coleoptera é, também, a mais diversa entre todos os organismos existentes, correspondendo a 40% dos insetos e 30% dos animais, possuindo 25.500 gêneros distribuídos em mais de 400.000 espécies descritas (LAWRENCE e BRITTON, 1994; COSTA, 2003; GILLOT, 2005; GULLAN e CRANSTON, 2010; SLIPINSKI et al., 2011). No Brasil foram descritas mais de 30.000 espécies taxonomicamente válidas para Coleoptera, classificadas em 99 famílias e 4319 gêneros (COSTA, 2003; LEWINSOHN e PRADO, 2005; TRIPLEHORN e JOHNSON, 2011).

Coleoptera agrupa quatro subordens: Adephaga, Archostemata, Myxophaga e Polyphaga. A subordem Polyphaga é a mais diversa entre as quatro, possui 88 famílias e compõe cerca de 90% das espécies de besouros. Entre estas famílias, a família Chrysomelidae possui 16 subfamílias, onde são descritos 2.600 gêneros e mais de 40.000 espécies, sendo 4.362 espécies encontradas no Brasil (COSTA et al., 1988; GILLOTT, 2005; TRIPLEHORN e JOHNSON, 2011). Alticinae é a mais rica em número de espécies entre as subfamílias de Chrysomelidae da região neotropical, a qual possui 570 gêneros e mais de 10.000 espécies descritas. Além da ocorrência na região neotropical existem representantes de Alticinae em quase todas as regiões geográficas do planeta, exceto Antártica (BORROR e DELONG; 1988; SEENO e WILCOX, 1982; SCHERER, 1988; LINGAFELTER, 2001; TRIPLEHORN e JOHNSON, 2011).

Segundo Scherer (1988) os eventos geológicos e ecológicos na história da Terra tiveram importante participação na irradiação dos espécimes de Alticinae. A maior diversificação de suas espécies ocorreu na região Neotropical, sendo 200 gêneros na América do Sul, dos quais 196 são endêmicos (SCHERER, 1988). Toda esta vasta diversificação foi atribuída ao efeito isolador da deriva continental para o continente americano há cerca de 100 milhões de anos.

Popularmente as espécies de Alticinae são conhecidas no inglês como *leap beetles* (os besouros pulgas), devido a sua característica de dar grandes saltos semelhantes às pulgas. Essa característica de salto é possibilitada pela estrutura

dos seus fêmures posteriores serem dilatados e com musculatura especializada, sendo uma das principais características morfológicas que os diferencia das outras subfamílias de crisomelídeos (BORROR; DELONG, 1988; ARNETT et al., 2002; GILLOTT, 2005).

As colorações típicas das espécies de Alticinae são esverdeada, azul metálica, marrom, preta com manchas claras ou totalmente pretas (TRIPLEHORN e JOHNSON, 2011). Além disso, outra característica destes besouros é a presença de somente um testículo (provavelmente resultado de fusões), sendo o órgão localizado no abdômen, na região anterior direita (SMITH e VIRKKI, 1978; BORROR e DELONG, 1988; GILLOTT, 2005; TRIPLEHORN e JOHNSON, 2011).

Ecologicamente os espécimes de Alticinae podem ser apontados como indicadores biológicos em potencial (LINZMEIER et al., 2006). Isso se deve a suas espécies ocorrerem principalmente em áreas degradadas, áreas de sucessão primária e regiões de borda e, em menor quantidade, nas áreas mais preservadas de mata fechada (LINZMEIER et al., 2006).

Economicamente espécimes de Alticinae podem ter importância agrônômica, pois algumas espécies são consideradas pragas de diferentes cultivos pelo mundo, como das culturas de mostarda, colza, canola, repolho (BRELIH et al., 2003; CAPINERA, 2008). As pragas mais prejudiciais são espécies do gênero *Phyllotreta* (SOROKA et al., 2005; TRDAN et al., 2005; DOSDALL e MASON 2010). No Brasil, há poucos dados relacionados à Alticinae vistos como pragas. Segundo Costa et al. (2006) espécies do gênero *Omophoita* foram encontradas em culturas de feijão e melancia.

Na subfamília Alticinae, existem organismos interessantes para diversas linhas de estudos, como espécimes da tribo Oedionychini a qual inclui duas subtribos, Disonychina e Oedionychina. Citogeneticamente as espécies da subtribo Oedionychina possuem representantes com cariótipos intrigantes relacionados ao número diplóide $2n=22$ cromossomos, fórmula meiótica $10II+X+y$, com cromossomos sexuais gigantes e assinápticos, porém com segregação regular durante a meiose (SMITH e VIRKKI, 1978; VIRKKI, 1988a, 1988b, 1989, 1991; VIRKKI e SANTIAGO-BLAY, 1993; PETITPIERRE et al., 1988; SEGARRA e PETITPIERRE, 1990; ALMEIDA et al., 2009; MELLO et al., 2014; GOLL et al., 2018; ROSOLEN et al., 2018).

2.2 ASPECTOS CITOGENÉTICOS COLEOPTERA E SUBFAMÍLIA ALTICINAE

Em relação à citogenética pouco mais de 3.000 espécies da ordem Coleoptera foram estudadas, o que corresponde à aproximadamente 1% das espécies do grupo (SMITH e VIRKKI, 1978; FERREIRA et al., 1984; SERRANO, 1981; PETITPIERRE, 1996). Entre estes estudos, a maior parte dos dados são de espécies das subordens Adephaga e Polyphaga. No entanto, essas análises existentes permitiram detectar uma grande diversidade cariotípica para as espécies de besouros descritas, com uma ampla variação de número cromossômico entre elas, desde $2n=4$ em *Chalcolepidius zonatus* a $2n=64$ em *Ditomus capito* (SMITH e VIRKKI, 1978; FERREIRA et al., 1984; SERRANO, 1981; PETITPIERRE, 1996).

Segundo Smith e Virkki (1978), a maioria das espécies de Coleoptera apresenta cromossomos com morfologia predominante metacêntrica. Em relação ao tamanho cromossômico, os cromossomos podem ser pequenos ou médios, variando de 0,5 a 6,5 μm nas metáfases mitóticas (PETITPIERRE, 1996).

A fórmula cromossômica primitiva sugerida para os Coleoptera é $2n=20=9\text{II}+\text{Xyp}$, sendo o sistema de cromossomos sexuais Xyp o mais frequente e ancestral (SMITH, 1950). O cromossomo X em espécies que apresentam este sistema de cromossomos sexuais tem tamanho médio similar aos autossomos, sendo o X maior que o cromossomo y, denominado de “p” pois representa a associação meiótica que lembra a forma de um paraquedas (SMITH, 1950; SMITH e VIRKKI, 1978). Na subordem Polyphaga a fórmula basal $2n=20=9\text{II}+\text{Xyp}$ é proposta como ancestral (SMITH e VIRKKI, 1978; VIRKKI, 1984). Segundo estes autores, a evolução cariotípica em Coleoptera ocorreu por fissões cêntricas seguidas de inversões pericentroméricas. Com estes mecanismos são explicadas a prevalência de cromossomos metacêntricos e o aumento do número de cromossomos em representantes de Polyphaga (SMITH e VIRKKI, 1978; VIRKKI, 1984).

Em relação aos cromossomos sexuais estudados até o momento para Coleoptera, se observa grande diversidade, pois podem apresentar sistemas de cromossomos sexuais bem variados, a exemplo dos aquiasmáticos XY, Xy_p , $\text{Xny}_p/n\text{Xy}_p$, Xy_c , X_0 e X_1+X_2 e, quiasmáticos neoXY, Xy, Xy_r , $\text{X}_1\text{X}_2\text{Y}$, XXXY, XXY e XY_1Y_2 , nas diferentes linhagens evolutivas (SMITH e VIRKKI, 1978, GALIÁN et al. 2002, ALMEIDA et al., 2009, GOLL et al., 2013).

Para Alticinae alguns autores consideram que os números cromossômicos mais frequentes seriam 11 ou 12 pares (VIRKKI, 1967, 1968, 1970; PETITPIERRE 1988, 2006). E o sistema de cromossomos sexuais mais frequentes seria o do tipo X+y. Contudo, para esta subfamília já foram descritos 19 tipos diferentes de sistemas de cromossomos sexuais (VIRKKI, 1967, 1968, 1970; PETITPIERRE, 1988, 2006; ALMEIDA et al., 2009).

A tribo Oedionychini (Alticinae) inclui duas subtribos, Disonychina e Oedionychina. Na subtribo Oedionychina, suas espécies possuem número diplóide $2n=22$, fórmula meiótica $10II+X+y$, com cromossomos sexuais gigantes e assinápticos, mas com segregação regular durante a meiose. Os autossomos podem ter morfologia metacêntrica e acrocêntrica, provavelmente uma característica de Oedionychina, como é o caso das espécies do gênero *Omophoita*, entre outros gêneros (SMITH e VIRKKI, 1978; VIRKKI, 1988a, 1988b, 1989; VIRKKI et al., 1991; PETITPIERRE et al., 1988; SEGARRA e PETITPIERRE, 1990;; VIRKKI e SANTIAGO-BLAY, 1993; ALMEIDA et al., 2009; MELLO et al., 2014; ROSOLEN et al., 2018; GOLL et al., 2018).

Segundo Virkki (1972), o fato dos cromossomos sexuais da subtribo Oedionychina serem assinápticos é devido à perda de homologia entre estes cromossomos sexuais. Contudo este evento deve ser antigo, pois a tribo basal Alticini, também não faz sinapses entre os cromossomos sexuais (VIRKKI, 1972). Relacionado à investigação desses cromossomos sexuais gigantes, existem organismos contendo esta condição compartilhada na subtribo Oedionychina, como as espécies do gênero *Omophoita*, entre elas as espécies descritas citogeneticamente por Almeida et al. (2009): *Omophoita octoguttata*, *Omophoita sexnotata*, *Omophoita personata* e *Omophoita magniguttis*, as quais possuem $2n=22=20+X+Y$ e fórmula meiótica $10II+X+Y$, cromossomos sexuais gigantes e assinápticos com segregação regular durante a meiose.

2.3 ASPECTOS GERAIS DE HETEROCROMATINA E DOS DNAS REPETITIVOS EM COLEOPTERA E SUBFAMÍLIA ALTICINAE

A maioria dos besouros possui uma pequena quantidade de heterocromatina no seu cariótipo, característica também comum e compartilhada na família Chrysomelidae (ROZEK et al., 2004). Para Alticinae a localização da

heterocromatina é preferencialmente centromérica, característica comum em Coleoptera (SMITH e VIRKKI, 1978; VIRKKI, 1978; VIRKKI, 1983; ROZEK et al., 2004; ALMEIDA et al., 2006, 2009; MELLO et al., 2014; GOLL et al., 2018).

Existem somente nove espécies estudadas em relação à distribuição da heterocromatina nos cromossomos de Alticinae (VIRKKI, 1983; ALMEIDA et al., 2006, 2009; MELLO et al., 2014; GOLL et al., 2018). As espécies *Omophoita octoguttata*, *Omophoita annularis* e *Omophoita personata* apresentam bandas heterocromáticas pericentroméricas em todos os autossomos e nos cromossomos sexuais, variando em posição, intensidade de marcação e número de bandas (VIRKKI, 1983). Essa distribuição da heterocromatina preferencialmente em regiões pericentroméricas também foi relatado em outras espécies de *Omophoita* (ALMEIDA et al., 2009; MELLO et al., 2014; GOLL et al., 2018).

Smith e Virkki (1978) propuseram que os cromossomos sexuais gigantes em Alticinae tem origem por rearranjos cromossômicos do tipo translocação e, mudanças na quantidade da heterocromatina. A heterocromatina, por sua vez, seria composta por diversos tipos de DNAs repetitivos, conforme modelo proposto por Charlesworth et al. (1994).

Os estudos citogenéticos relacionados à distribuição dos DNAs repetitivos nos cromossomos têm sido aplicados em várias espécies de Coleoptera. Os DNAs repetitivos mais comumente mapeados nesta ordem são os ribossomais 5s e 18s, além dos genes de histonas (GALIÁN et al., 1995; DE LA RÚA et al., 1996; PROENÇA et al., 2002 ; BIONE et al., 2005; CABRAL-DE-MELLO et al., 2010, 2011; ALMEIDA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2012; GOLL et al., 2013, 2018). Em adição, a localização de DNAs satélites já foi realizada em *Xanthogaleruca luteolae*, *Chrysolina americana* e *Chrysolina carnifex* (LORITE et al., 2001, 2002; PALOMEQUE et al., 2005).

No gênero *Omophoita* foi isolada e localizada *in situ* a fração repetitiva do DNA por meio da análise de cinética de reassociação altamente e moderadamente repetitiva do DNA (Cot-1). Os autores verificaram uma alta quantidade de DNAs repetitivos tanto nos autossomos quanto na composição dos cromossomos sexuais gigantes nas diferentes espécies de *Omophoita* (MELLO et al., 2014). Adicionalmente, os grandes acúmulos de DNAs repetitivos mostraram diferenças de localização entre os cromossomos X e Y e diferenças interespecíficas em *Omophoita* (ALMEIDA et al., 2009; MELLO et al., 2014; ROSOLEN et al., 2018).

Todas estas diferenças quanto ao acúmulo de DNAs repetitivos, observados nos cromossomos sexuais de espécies de *Omophoita*, contribuem para a explicação da proposta de perda de homologia entre o X e Y em espécies de *Oedionychina* (VIRKKI, 1972), além de explicar o aumento do tamanho dos cromossomos sexuais na linhagem (MELLO et al., 2014; ROSOLEN et al., 2018). Esta proposta de acúmulo e movimentação dos DNAs repetitivos para o aumento do tamanho de cromossomos sexuais é comum e encontrada na planta *Silene latifolia* (KEJNOVSKY, 2009).

Por outro lado, estudos de localização *in situ* de elementos transponíveis (TEs) são escassos em Coleoptera. O elemento *DsmarMITE* foi localizado nos cromossomos das espécies *Dichotomius schiffleri*, *Dichotomius guaribensis* e *Dichotomius gilletti* (XAVIER et al., 2014; AMORIM et al., 2018). Mais recentemente, os TEs *Tc1-Mariner* e *RTE* foram isolados e localizados *in situ* em três espécies de *Omophoita*: *O. octoguttata*, *O. sexnotata* e *O. personata* (ROSOLEN et al., 2018).

Com isso, os estudos de identificação e caracterização DNAs repetitivos atrelados aos citogenéticos podem servir de ferramentas para elucidções relacionadas à evolução das linhagens e tipos de rearranjos cromossômicos que ocorreram em diferentes grupos (ALMEIDA et al., 2009, 2010; CABRAL-DE-MELLO et al., 2010; 2011; GOLL et al., 2013, 2018; MELLO et al., 2014; ROSOLEN et al., 2018).

2.4 CLASSIFICAÇÃO, ORGANIZAÇÃO CROMOSSÔMICA E FUNÇÕES DOS DNAs REPETITIVOS *IN TANDEM* E DISPERSOS

Os DNAs repetitivos compõem grande parte dos genomas eucarióticos e são representados por diversos tipos de sequências repetitivas (SUMNER, 2003). São agrupados de acordo com seu padrão de repetições em: (i) repetições *in tandem*, a exemplo das famílias multigênicas e dos DNAs satélites (DNAsat), minissatélites e microsatélites e, (ii) repetições dispersas, composta pelos elementos de transposição (TEs), os quais divididos em transposons e retrotransposons (SUMNER, 2003).

Entre as repetições *in tandem*, os DNAs satélites são unidades de repetição que variam em tamanho, a partir de um único par de bases até milhares de pares de bases de nucleotídeos (TIMBERLAKWE, 1978; WALSH, 2001; GARRIDO-RAMOS,

2015, 2017). Os microssatélites ou também chamados de sequências repetidas simples (do inglês – *simple sequence repeats* - SSRs) são unidades simples que variam de 1 a menos de 10 nucleotídeos e, que são repetidas de cinco até centenas de vezes no loco (ELLEGREN, 2004; GARRIDO-RAMOS, 2017). Os minissatélites ou também chamados de repetições *in tandem* de número variável (do inglês - *variable number of tandem repeats* - VNTR) são unidades de repetição com tamanho intermediário, geralmente de 10 a 60 pb e, que são encontrados em dezenas de repetições por loco (JEFFREYS et al., 1985; GARRIDO-RAMOS, 2015). As sequências de DNA com repetições *in tandem* que apresentam unidade de maior tamanho são denominadas de DNAs satélites (DNA Sat) (TIMBERLAKWE, 1978; WALSH, 2001). O DNA Sat geralmente possui unidades que variam de 100 a 300 pb de comprimento e, podem conter de 1.000 a mais de 1.000.000 de cópias nos genomas (TIMBERLAKWE, 1978; WALSH, 2001). Atualmente o termo DNA satélite é aplicado a qualquer tamanho de unidade com um conjunto de centenas a milhares de unidades repetidas localizadas na heterocromatina constitutiva (GARRIDO-RAMOS, 2015, 2017).

Os DNAs repetitivos têm diversas funções genéticas, entre elas a importância na organização estrutural dos cromossomos (CHARLESWORTH et al., 1994). Estes podem também promover eventos de alterações cromossômicas podendo participar de rearranjos cromossômicos estruturais, DNAs repetitivos acumulados nas fronteiras entre a eucromatina e a heterocromatina podem participar de rearranjos cromossômicos dos tipos translocações, duplicações, deleções e inversões, além disso, podem desempenhar um papel de transformação evolutiva dos genomas, resultando em expansão do tamanho genômico e cromossômico (ELDER e TURNER 1995; BADAIEVA et al. 2007; CHEN et al., 2010).

Além da diversificação cariotípica proporcionada pela movimentação de blocos sintênicos em autossomos (EICHLER e SANKOFF, 2003; VICARI et al., 2010; BARBOSA et al., 2017) os DNAs repetitivos têm forte influência no processo de origem e diferenciação dos cromossomos sexuais (STEINEMANN E STEINEMANN, 2005, KAISER e BACHTROG, 2010; SCHEMBERGER et al., 2011, 2014, 2016; ZIEMNICZAK et al., 2014). Na proposta de origem de cromossomos sexuais os acúmulos de DNAs repetitivos levariam a diversificação do cromossomo heteromórfico, e este acúmulo, por sua vez, geraria a supressão da recombinação meiótica entre parte dos elementos do par de cromossomos sexuais (STEINEMANN

e STEINEMANN, 2005, KAISER e BACHTROG, 2010; SCHEMBERGER et al., 2011, 2014; ZIEMNICZAK et al., 2014). Além disso, os DNAs repetitivos podem participar nos rearranjos cromossômicos estruturais na diferenciação dos cromossomos sexuais, tais como: deleções, inserções, acúmulo de TEs e expansão de sequências satélites (STEINEMANN e STEINEMANN, 2005; KAISER e BACHTRONG, 2010).

Além dos DNAs repetidos *in tandem*, os genomas estão repletos de sequências de DNAs repetitivas dispersas, as quais podem estar repetidas milhares de vezes nos genomas (SUMMER, 2003). Esta classe de DNAs repetitivos compreendem os TEs, os quais são divididos em duas grandes classes: os Transposons de DNA e os Retrotransposons (FESCHOTTE, 2004; WICKER et al., 2007).

Wicker et al. (2007) propuseram o primeiro sistema de classificação hierárquico unificado de TEs, o qual foi projetado com base nos mecanismos de transposição, similaridades de sequências e relações estruturais. A classe I, dos retrotransposons (que se transpõe por intermédio da transcrição reversa de um RNA) foi dividida nas ordens: retrotransposons *LTR*, elementos *DIRS*, elementos *Penelope (PLEs)*, elementos intercalados longos (*LINES*) e elementos intercalados curtos (*SINES*). A classe II, dos transposons de DNA (que se transpõe de uma região a outra por meio de um DNA intermediário) foi dividida em subclasse 1, nas ordens *TIR* e *Crypton* compreendendo os TEs do tipo cortar e colar, caracterizados por repetições terminais invertidas (TIRs) e; Subclasse 2, representado pelas ordens *Helitron* e *Polintons/Maverick*, os quais compreendem os elementos do tipo copiar e colar (WICKER et al., 2007).

Além disso, os TEs podem ser considerados autônomos ou não autônomos nos genomas. Os TEs autônomos têm quadros de leitura abertos (do inglês *open reading frame* - ORFs) com domínios para codificação do aparato enzimático necessário para sua transposição (WICKER et al., 2007). Já os TEs não autônomos não produzem enzimas funcionais e se utilizam de enzimas de outros TEs para se moverem e se inserirem em outras regiões no genoma (WICKER et al., 2007).

Os TEs constituem parte dos genomas de eucariotos. Esses elementos mostram grande diversidade de sequências e suas transposições deixam rastros (assinaturas genéticas) nas mais diversificadas regiões genômicas (FESCHOTE, 2008). Estes TEs são como fósseis genéticos quando estão senescentes nos

genomas (FESCHOTTE e PRITHAM, 2007). Geralmente a compreensão do papel do TE na organização da cromatina é aplicável em estudos evolutivos de modificações gênicas, onde os TEs estão relacionados à interferência e/ou na regulação da atividade de genes (FESCHOTE, 2008; FEDOROFF, 2012). Neste contexto, já foi observado diversos acúmulos de TEs em regiões eucromáticas de genomas de insetos, as quais podem influenciar na alteração de regiões regulatórias e na regulação de genes, ou mesmo gerar novos genes (FESCHOTTE e PRITHAM, 2007; FESCHOTE, 2008; FEDOROFF, 2012).

Em Coleoptera já foi observado acúmulos de TEs em regiões eucromáticas com o mapeamento do elemento *DsmarMITE* nas espécies *Dichotomius schiffleri*, *Dichotomius guaribensis* e *Dichotomius gilletti* (XAVIER et al., 2014; AMORIM et al., 2018). Um TE geralmente torna-se inativo por meio de mecanismos epigenéticos, como a de metilação do DNA, além de aparatos para promover remodelamento das histonas, a exemplo da heterocromatização (DIMITRI et al. 2003; KAISER e BACHTROG, 2010; SIGMAN et al., 2016). A heterocromatinização de regiões de cromatina que contém TEs podem, estar relacionadas à diferenciação e origem de cromossomos sexuais heteromórficos (DIMITRI et al. 2003; STEINEMANN e STEINEMANN 2005; KAISER e BACHTROG, 2010; SIGMAN et al., 2016). Visto que em alguns grupos de Coleoptera é proposto que os aumentos de tamanhos cromossômicos estão associados ao acréscimo de heterocromatina (PETITPIERRE, 1988; VIRKKI, 1988). Nesta via, as regiões com acúmulos de TEs estariam sujeitas a ação de sistemas de defesa do organismo para torná-los inativos assim ocorrendo heterocromatinização nessas regiões e aumentando o tamanho cromossômico (DIMITRI et al. 2003).

Alguns TEs são bem difundidos na natureza, distribuídos em grande número de espécies e, em diversos reinos (PLASTERK et al., 1999). Um exemplo é o elemento *Tc1/Mariner*, uma importante superfamília de transposon de DNA (DOAK et al., 1994; PLASTERK et al., 1999). Os TEs *Tc1/Mariner* apresentam cerca de 1.300-2.400 pb de comprimento e abrigam um único gene, flanqueado por TIRs, de 28 a 30 pb e uma ORF que codifica uma transposase de aproximadamente 345 aminoácidos (DOAK et al., 1994; PLASTERK et al., 1999).

Os transposons de DNA da subclasse Helitron compõem uma fração substancial de muitos genomas eucarióticos e detém cerca de 2% dos genomas de invertebrados (KAPITONOV e JURKA, 2001). Os Helitrons são conhecidos como

elementos transponíveis círculos rolantes, pois se supõem que suas transposições ocorram por um mecanismo de replicação de círculos rolantes através de um intermediário de DNA de fita simples (KAPITONOV e JURKA, 2001, 2007; THOMAS e PRITHAM, 2015). É conhecido também que os Helitrons frequentemente capturam diversos genes no genoma hospedeiro, alguns dos quais podem evoluir para novas funções ou se tornarem essenciais para o próprio Helitron. A maioria dos Helitrons visualizados nos genomas é elemento não autônomo, mas compartilham regiões comuns com Helitrons autônomos. As principais características enzimáticas de Helitrons são os domínios iniciadores de replicação (RC) e DNA helicase (Hel), a qual faz parte da família PiF1 (KAPITONOV e JURKA, 2001, 2007; THOMAS e PRITHAM, 2015). Estes domínios proteicos são universalmente conservados nos TEs Helitrons (KAPITONOV e JURKA, 2001, 2007; THOMAS e PRITHAM, 2015).

Outro elemento observado em diversas classes de animais é o *RTE*, um *non-long terminal repeat retrotransposon* (non-LTR RTE) (MALIK e EICKBUSH, 1998). Os TEs membros do clado *RTE* são os mais curtos entre os retrotransposons non-LTR e possuem estrutura organizacional altamente conservada, com 1.024 aminoácidos compondo suas ORFs para a endonuclease e a transcriptase reversa (MALIK e EICKBUSH, 1998; MALIK et al., 1999; ŽUPUNSKI et al., 2001).

Segundo Wicker et al. (2007) os *long terminal repeat retrotransposon* (LTR RTE) compõem outra ordem de elementos de classe I, os retrotransposons LTR são os mais amplamente difundidos na natureza. As LTRs que flanqueiam os retroelementos variam de centenas de pares de bases a mais de 5000 pb (WICKER et al., 2007). Os LTR-RTEs normalmente contêm ORFs com domínios para uma proteína estrutural antígeno específico do grupo (GAG) e um domínio polimerase (POL), o qual contém ORFs para a RNase H (RH), transcriptase reversa (RT) e integrase DDE (INT) (WICKER et al., 2007).

Gypsy e *Copia* são duas superfamílias de LTR-RTEs altamente difundidas entre os organismos (KIM et al., 2011). Estes dois retroelementos diferem um do outro na ordem de leitura de suas sequências para os domínios da RT, INT e POL (WICKER et al., 2007; KIM et al., 2011). Segundo Neumann et al. (2003) a classe *Gypsy* possui um enorme retroelemento LTR, denominado TE *Ogre*, o qual foi descoberto no genoma de ervilha. O TE *Ogre* possui segmentos gigantes, chegando a atingir 25kb, com mais de 10.000 cópias, correspondendo a pelo menos 5% do conteúdo genômico da ervilha (NEUMANN et al., 2003).

Kaiser e Bachtrog (2010) sugeriram que os TEs podem estar associados à evolução dos cromossomos sexuais homogaméticos e heterogaméticos em insetos. Chalopin et al. (2015) propuseram que os TEs podem desempenhar um papel na dosagem da expressão de genes relacionados ao sexo, podendo promover o silenciamento e a condensação da cromatina sexual de um dos pares dos cromossomos sexuais homogaméticos. Por outro lado, em cromossomos heterogaméticos, os TEs poderiam alterar a organização gênica e cromossômica, além do tamanho dos cromossomos sexuais (KAISER e BACHTROG, 2010; CHALOPIN et al., 2015).

Alguns autores sugeriram que os TEs catalisam o crescimento e diferenciação dos cromossomos sexuais, especialmente o heteromórfico, por acúmulo de sequências parálogas (LISCH, 2013; SCHEMBERGER et al., 2014; ZIEMNICZAK et al., 2014). TEs foram encontrados na origem de vários tipos de rearranjos cromossômicos em muitas espécies, como em insetos, onde diversos elementos parecem ter mediado rearranjos cromossômicos em *Drosophila*, a exemplo dos TEs *P*, *hobo*, *BEL*, *roo*, *HeT-A*, *TART*, *Mariner* e *Tango* (LIM e SIMMONS, 1994; CÁCERES et al., 1999; GRAY, 2000; LONNIG e SAEDLER, 2002; BIEMONT e VIEIRA, 2006).

Alguns TEs foram co-optados para outras funções genômicas durante a evolução, como por exemplo, a desempenhar funções celulares importantes. Os retrotransposons *Het-A*, *TART* e *TAHRE* atuam como se fossem sequências teloméricas e agem na manutenção dos telômeros de *Drosophila* (MASON e BIESSMANN, 1995; PARDUE et al., 1996; ABAD et al., 2004). Ainda em relação aos telômeros, os TEs podem estar envolvidos na movimentação de regiões teloméricas e formação de sítios com acúmulos teloméricos intersticiais (ITS) (BOLZÁN, 2017; SLIJEPCEVIC, 1998; SÁNCHEZ-GUILLÉN et al., 2015; NERGADZE et al., 2004; NERGADZE et al., 2007; AKSENOVA e MIRKIN, 2019). Em inúmeros casos, transposições de repetições teloméricas podem ocorrer no decurso da recombinação genética, por meio de carreamento e movimentação a partir de elementos transponíveis para regiões cromossômicas intersticiais (SLIJEPCEVIC, 1998; NERGADZE et al., 2004; NERGADZE et al., 2007; SÁNCHEZ-GUILLÉN et al., 2015; BOLZÁN, 2017; AKSENOVA e MIRKIN, 2019).

Peccoud et al. (2017) descreveram que a ocorrência de transferência horizontal de TEs é comum em insetos. Em seu estudo com 195 genomas de insetos,

representando 123 gêneros e 28 ordens, em 13 dessas ordens foi observado que os TEs estavam envolvidos em mais de 2.248 eventos de transferência horizontal (PECCOUD et al., 2017). Neste estudo foi demonstrado que os TEs transferidos horizontalmente geraram até 24% de todos os nucleotídeos dos genomas em insetos e, descobriu-se também que os transposons de DNA são transferidos horizontalmente com mais frequência do que os retrotransposons (PECCOUD et al., 2017).

Os TEs estão diretamente ligados a expansões significativas no tamanho de genomas em períodos relativamente curtos de tempo evolutivo (KIDWELL, 2002). Essas expansões podem estar envolvidas nos rearranjos genômicos, na diferenciação, bem como no crescimento dos genomas e do tamanho dos cromossomos (MONTIEL et al., 2012). Montiel et al. (2012) demonstraram que o tamanho gigante do genoma no gafanhoto *Eyprepocnemis plorans* foi decorrente de acúmulos intensos dos TEs *Gypsy*, *RTE* e *Mariner*. Neste contexto, também foi sugerido que os cromossomos sexuais de *Omophoita* se tornaram gigantes por acúmulos, inserção e expansão de TEs no genoma em Alticinae (ROSOLEN et al., 2018).

Nesta linha de pesquisa é plausível que devido a alta plasticidade e mobilidade dos TEs, estes possam estar envolvidos na evolução e rearranjo dos cromossomos sexuais gigantes em espécies da subfamília Alticinae. Desta forma, a caracterização molecular e a localização *in situ* dos TEs podem auxiliar na compreensão de mecanismos moleculares que atuaram na composição dos cromossomos X e Y de Oedionychina.

3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

3.1 JUSTIFICATIVA

A ordem Coleoptera é a mais diversificada entre todos os seres vivos, existindo ampla possibilidade de estudos no que diz respeito à diversidade cariotípica e aos mecanismos de diferenciação. As espécies da subtribo Oedionychina (Alticinae; Chrysomelidae) com $2n=22$, fórmula meiótica $10II+X+Y$ e cariótipo com predominância de cromossomos metacêntricos são interessantes para estudos evolutivos e moleculares, pois possuem cromossomos sexuais gigantes e assinápticos durante a meiose. Estes cromossomos sexuais gigantes são considerados derivados no grupo. As informações obtidas com diversas classes de DNAs repetitivos, como por exemplo, os elementos transponíveis, por sua alta plasticidade e mobilidade podem ser valiosos para o entendimento das relações evolutivas relacionados à distribuição, localização cromossômica, movimentação e rearranjos cromossômicos que atuam na diferenciação cariotípica. *Omophoita* é um gênero de Alticinae que detém estes cromossomos sexuais X e Y gigantes. Neste contexto, a caracterização e localização *in situ* de TEs nos cariótipos de *Omophoita* podem ser úteis no entendimento da diversificação cromossômica do grupo.

3.2 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi contribuir para o conhecimento dos processos de diferenciação e evolução dos cromossomos sexuais gigantes de espécies da subfamília Alticinae. Além deste, identificar e inferir o papel dos DNAs repetitivos dispersos no processo de diferenciação e evolução dos cromossomos sexuais da subtribo Oedionychina.

3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar diferentes TEs obtidos de *Omophoita octoguttata* em termos moleculares;
- Analisar a dispersão dos TEs nos cromossomos de diferentes espécies de Alticinae;
- Caracterizar a evolução cromossômica ocorrida na subfamília Alticinae e o papel exercido pelos DNAs repetitivos dispersos;
- Estudar a dinâmica evolutiva dos TEs associados aos cromossomos sexuais gigantes presentes na subfamília Alticinae.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Para as preparações biológicas foram utilizados indivíduos adultos machos, de quatro espécies de Coleoptera da subfamília Alticinae: *Omophoita octoguttata* (28 indivíduos), *Omophoita sexnotata* (26 indivíduos), *Omophoita personata* (22 indivíduos) e *Omophoita magniguttis* (9 indivíduos) (Figura 1). Esses indivíduos foram coletados em populações naturais no município de Ponta Grossa, PR, Brasil (25°07'10"S e 49°56'24"O).

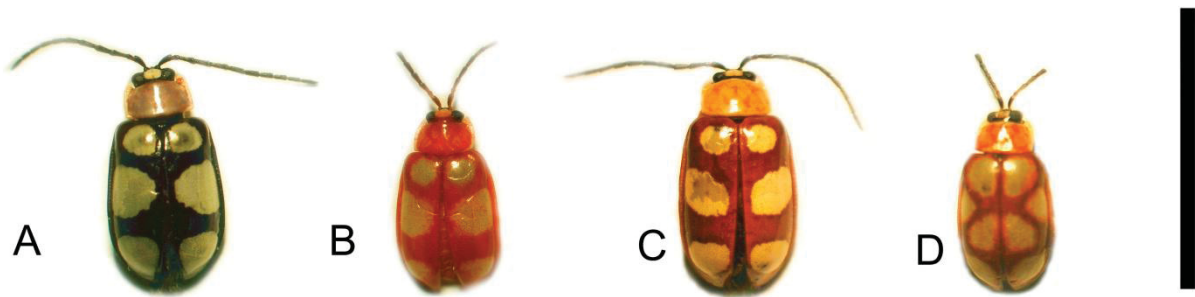


Figura 1. Espécies de *Omophoita* analisadas: (A) *O. octoguttata*, macho; (B) *O. sexnotata*, macho; (C) *O. personata*, macho; (D) *O. magniguttis*, macho. Barra = 1 centímetro. Fonte: O AUTOR (2019).

4.2 PREPARAÇÕES DE CROMOSSOMOS MEIÓTICOS E EXTRAÇÃO DO DNA

Foram obtidas preparações cromossômicas meióticas de *O. octoguttata*, *O. sexnotata*, *O. personata* e *O. magniguttis*. Para isso os animais foram dissecados em solução fisiológica para insetos, na obtenção das preparações citológicas foram utilizadas gônadas de exemplares adultos segundo a metodologia descrita por Almeida et al. (2000) (Anexo 8.1) com modificações: a gônada foi macerada em lâmina com ácido acético 60%, a solução macerada foi dissociada com micropipeta sobre a lâmina, posteriormente o material foi gotejado a uma altura de cerca de 30 cm sobre a lâmina aquecida em placa de metal a 40 °C. O DNA genômico foi extraído pelo protocolo de Murray e Thompson (1980) (Anexo 8.2), com modificações, onde a cabeça, o pronoto e o fêmur foram macerados com nitrogênio líquido.

4.3 AMPLIFICAÇÃO, CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DE TEs

A amplificação dos TEs foi realizada por reação em cadeia da polimerase (PCR) a partir do DNA da espécie *O. octoguttata*, utilizando um primer único para a sequência TIR dos TEs: Tc1-Mariner (SCHEMBERGER et al., 2016) e Harbinger (elaborado a partir do alinhamento da TIR desse elemento presente no GenBank).

Além desses primers foram sintetizados mais quatro conjuntos de primers para a amplificação parcial dos TEs Copia, Gypsy, Harbinger e Helitron. Inicialmente foram utilizados os primers dos TEs de *Apareiodon* sp. (Schemberger et al., submetido para publicação). Após sequenciamento dos produtos de PCR, primers específicos para estes TEs de *O. octoguttata*, foram sintetizados utilizando o programa Primer3plus software (UNTERGASSER e NIJVEEN, 2007).

As reações de PCR individuais consistiram de: 40 ng de DNA genômico, 0,2 µM do *primer*, 0,4 mM de desoxinucleotídeos trifosfatos (dNTPs), 1× Taq tampão de reação (200 mM Tris, pH 8.4, 500 mM KCl), 2 mM MgCl₂ e 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen). Os parâmetros da amplificação foram: desnaturação inicial 5 min a 94 °C, 35 ciclos de três passos (1 min a 94 °C, 45 segundos a ~55 °C e 1 min e 30 segundos a 72 °C) e extensão final de 5 min a 72 °C. As temperaturas de anelamento variaram de 55° até 61° C entre os conjuntos de primers específicos.

Os produtos de amplificação dos TEs foram separados em eletroforese em gel de agarose 1%, posteriormente as bandas foram recortadas e purificadas utilizando o PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare), segundo as instruções do fabricante. As sequências foram então ligadas ao plasmídeo pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega) e transformadas em células de *Escherichia coli* DH5α CaCl₂ competentes (Anexo 8.3). As colônias bacterianas com plasmídeos recombinantes foram extraídas por meio de mini-preparação plasmidial por kit (GE Healthcare) e estes submetidos ao sequenciamento automático do DNA utilizando o ABI-PRISM Genetic Analyzer (Applied Biosystems) utilizando primers para o vetor.

4.4 ANÁLISES DAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS

Para identificação de similaridade genética, as sequências nucleotídicas obtidas foram submetidas a buscas online no software CENSOR, presente no Genetic Information Research Institute (GIRINST) disponível em:

<http://www.girinst.org/censor/index.php> (KOHANY et al., 2006). As open reading frames (ORFs) das sequências de TEs foram pesquisadas no banco de dados do Blastx do NCBI (ALTSCHUL et al., 1997) e matching Pfam families (<http://pfam.sanger.ac.uk>) (FINN et al., 2010) para a identificação dos domínios proteicos.

4.5 HIBRIDAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH)

As sequências obtidas com as PCRs, foram marcadas com digoxigenina-11-dUTP ou biotina-16-dUTP utilizando os Kits Dig-Nick Translation Mix e Bio-Nick Translation Mix, respectivamente (Roche Applied Science). A FISH foi realizada segundo Pinkel et al. (1986) (anexo 8.4) com pequenas modificações descritas por Almeida et al. (2010). As condições de hibridação foram de alta estrigência (2.5 ng/ μ L da sonda, 50 % formamida, 2 \times SSC, 10 % sulfato dextrano, pH 7.0–7.2, a 37 °C por 16h). A detecção de sinal foi realizada utilizando os anticorpos anti-digoxigenin rhodamine, fab fragments (Roche Applied Science) e streptavidin alexa fluor 488 (Molecular Probes). Os cromossomos foram contra corados com 0,2 μ g/mL de 4', 6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) em meio de montagem Vectashield (Vector, Burlingame, CA) e analisados em microscópio de campo claro e epifluorescência Olympus BX41. As imagens foram capturadas com auxílio da câmera CCD Olympus DP-71 (12 Mp).

5 RESULTADOS

Os resultados estão organizados em dois capítulos correspondentes aos artigos científicos:

CAPÍTULO I

ACCUMULATION OF TRANSPOSABLE ELEMENTS IN AUTOSOMES AND GIANT SEX CHROMOSOMES OF *Omophoita* (CHRYSOMELIDAE: ALTICINAE)

CAPÍTULO II

ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS E A DIFERENCIAÇÃO DOS CROMOSSOMOS SEXUAIS GIGANTES DE *Omophoita* (CHRYSOMELIDAE, ALTICINAE)

CAPÍTULO I- Artigo publicado na revista Cytogenetic and Genome Research

ACCUMULATION OF TRANSPOSABLE ELEMENTS IN AUTOSOMES AND GIANT SEX CHROMOSOMES OF *Omophoita* (CHRYSOMELIDAE: ALTICINAE)

Cytogenet Genome Res 2018;156:215–222 DOI: 10.1159/000495199

Lucas A. M. Rosolen ^a, Marcelo R. Vicari ^{a,b}, Mara C. Almeida ^b

^a Programa de Pós-graduação em Genética, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, and ^b Programa de Pós-graduação em Biologia Evolutiva, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, Brazil

ABSTRACT

Coleoptera is the most diverse order among insects, and comparative molecular cytogenetic studies in this group are lacking. The species of *Omophoita* (Oedionychina) possess a karyotype of $2n = 22 = 10II+X+Y$. They are interesting models for evolutionary cytogenetic studies due to giant sex chromosomes which are asynaptic during meiosis. Transposable elements (TEs) confer plasticity and mobility to genomes and are considered hotspots for DNA double-strand breaks and chromosomal rearrangements. The objective of the present study was to verify the role of TEs in the karyotype and in the size expansion of the giant sex chromosomes in *Omophoita*. Thus, different TEs were characterized in the *Omophoita* genome and localized in the chromosomes by fluorescence in situ hybridization (FISH). The DNA sequencing data revealed identity with TE families *Tc1/Mariner* and *RTE/L1-56_XT*. FISH showed signals of all TEs in the karyotypes and a high accumulation in the sex chromosomes of the 3 *Omophoita* species analyzed. These data suggest that the genome size expansion and the origin of the giant sex chromosomes of *Omophoita* are due to an intensive genomic invasion of TEs, as those characterized here as *Tc1/Mariner-Ooc* and *RTE-Ooc*. Differences in the chromosomal location of the TEs among the 3 species indicate that they have participated in the karyotype differentiation in *Omophoita*.

Keywords: asynaptic segregation, chromosomal evolution, meiotic segregation, repetitive dnas, sex chromosomes, transposons

Accepted: July 6, 2018 Published online: December 1, 2018

1 INTRODUCTION

Repetitive DNAs constitute the largest fraction of eukaryotic genomes [Charlesworth et al., 1994]. These DNA units are found as tandem repeats, such as satellite DNAs (satDNA), minisatellites, and microsatellites, or as dispersed units, as the transposable elements (TEs) [Sumner, 2003]. The latter, known as mobile genetic elements, are organized into 2 major classes: class I, or retrotransposons, which are transposed by means of the reverse transcription mechanism of an intermediate RNA, and class II, or DNA transposons, which transpose via DNA molecules [Wicker et al., 2007].

Characterization of the genomic repeat fraction is key knowledge for understanding the mechanisms of modification of the genomic architecture and for the emergence of genetic innovations in different eukaryotic lineages [Feschotte and Pritham, 2007; Hernández-Hernández et al., 2008; Bussiek et al., 2009; Pucci et al., 2014]. The repeat DNAs contribute to structural and functional activities in the genomes [for a review, see Sumner, 2003; Feschotte, 2008]. The repeat DNAs possess notable features in chromosome and genomic evolution. They are involved in the accumulation of paralogous sequences and expansion of genome sizes. Sometimes, they act as hotspots for DNA double-strand breaks, which promote chromosomal rearrangements [Kidwell and Lisch, 2000, 2001; Kidwell, 2002; Barros et al., 2017; Glugoski et al., 2018]. The TEs hobo, BEL, element P, roo, HeT-A, TART, Mariner, and Tango of *Drosophila* were involved in several chromosomal rearrangements and karyotypic diversification [Lim and Simmons, 1994; Gray, 2000; Lönnig and Saedler, 2002].

In addition to karyotype diversification due to syntenic block reshuffling in autosomes [Eichler and Sankoff, 2003; Vicari et al., 2010; Barbosa et al., 2017], the repeat DNAs also act on the origin and differentiation process of heteromorphic sex chromosomes [Steinemann and Steinemann, 2005; Kaiser and Bachtrog, 2010; Schemberger et al., 2011, 2014; Ziemniczak et al., 2014]. Repeat DNAs mediate structural chromosome rearrangements in sex chromosome differentiation, such as deletions, insertions, TE accumulation, and expansion of satellite sequences [Steinemann and Steinemann, 2005; Kaiser and Bachtrog, 2010].

The subtribe *Oedionychina* (Coleoptera: Alticinae) is endemic to the Neotropical region [Riley et al., 2002], and studies on the genomic repeat fraction are

scarce in this group [Almeida et al., 2010; Mello et al., 2014]. In Oedionychina, species of the Omophoita possess $2n = 22$ chromosomes and the meiotic formula $10II+X+Y$. The occurrence of asynaptic giant sex chromosomes during meiosis is a notable karyotypic feature in this group [Smith and Virkki, 1978; Almeida et al., 2009, 2010; Mello et al., 2014]. Sex chromosome differentiation is independent among animal groups, and, in insects, the innumerable systems differ in type and morphology of chromosomes within each evolutionary lineage [Kaiser and Bachtrog, 2010]. Coleoptera is the largest order in Insecta [Gullan and Cranston, 2010], and its species possess extremely diversified sex chromosome systems such as achiasmatic XY, Xy_p , Xny_p/nXy_p , Xy_c , $X0$, and $X_1 + X_2$ or chiasmatic neoXY, Xy , Xy_r , $X_1 X_2 Y$, XXXY, XXY, and $XY_1 Y_2$ [Smith and Virkki, 1978; Galián et al., 2002; Almeida et al., 2009; Goll et al., 2013].

Cytogenetic studies employing C 0 t-1 repetitive DNA and in situ localization were performed in Omophoita species. A high amount of the C 0 t-1 repetitive fraction was detected in the autosomes and the giant sex chromosomes in different species of Omophoita [Mello et al., 2014]. Hence, probably the accumulation and the movement of the repetitive DNAs have contributed to the significant increase in the size of the sex chromosomes in Omophoita, as demonstrated for the Y chromosome of the plant *Silene latifolia* [Kejnovsky et al., 2009].

Some TEs are widespread in a large number of species such as Tc1/Mariner, an important transposon superfamily. These elements are approximately 1,300–2,400 bp in length and contain a single gene, flanked by terminal inverted repeats (TIRs) of 28–30 bp and a single open reading frame (ORF), which encodes a transposase of about 345 amino acids [Doak et al., 1994; Plasterk et al., 1999]. RTE, a retrotransposable non-long terminal repeat (non-LTR), is another TE studied in several classes of animals such as insects, mammals, and fishes [Malik and Eickbush, 1998]. Members of the RTE clade are the shortest of the non-LTR retrotransposons and have a highly conserved structural organization, encoding 1,024 amino acids containing endonucleases and reverse transcriptase domains [Malik and Eickbush, 1998; Malik et al., 1999; Župunski et al., 2001].

The TEs are directly linked to significant expansions in genome size in relatively short evolutionary periods [Kidwell, 2002]. Due to their high mutation rate and plasticity, the TEs may be directly involved in chromosomal rearrangements and differentiation of the giant sex chromosomes in Alticinae. Here, different TEs were

isolated, identified, characterized and in situ localized with the objective of verifying their role in karyotypic diversification and, especially, in the expansion of the size of the sex chromosomes in *Omophoita* species.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 PREPARATION OF MEIOTIC CHROMOSOMES AND DNA EXTRACTION

Meiotic chromosome preparations were obtained from *Omophoita octoguttata* (11 individuals), *O. sexnotata* (10 individuals), and *O. personata* (9 individuals). The animals were dissected in physiological solution for insects. For the cytological preparations, gonads of adult specimens were processed according to the method described by Almeida et al. [2000] with modifications. The gonads were macerated on a slide with 60% acetic acid, the macerated material was dissociated with a micropipette, and subsequently the cell suspension was dripped from a height of about 30 cm onto the heated slide at 40°C. Genomic DNA was extracted according to Murray and Thompson [1980], with modifications: head, pronotum, and femur were macerated in liquid nitrogen.

2.2 AMPLIFICATION, CLONING, AND SEQUENCING OF TES

Amplification of the repetitive elements was performed by PCR using genomic DNA of *O. octoguttata* and a primer unique to the TIRs of the TEs Tc1/Mariner [Schemberger et al., 2016] and Harbinger (drawn from the alignment of the TIR for this element present in GenBank). The individual PCR reactions consisted of 40 ng genomic DNA, 0.2 μ M primer, 0.4 m M dNTPs, 1 \times Taq reaction buffer (200 m M Tris, pH 8.4, 500 m M KCl), 2 mM MgCl₂, and 1 U Taq DNA polymerase (Invitrogen). The amplification parameters were as follows: initial denaturation for 5 min at 94°C, 35 cycles of 1 min at 94°C, 45 s at 56°C, and 2 min at 72°C, and final extension for 7 min at 72 ° C.

The amplification products for the TEs were separated in 1% agarose gel, and the DNA bands were purified using the PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare), according to the manufacturer's instructions. The sequences were linked to the plasmid pGEM[®] -T Easy Vector Systems (Promega) and transformed into

cells of competent *Escherichia coli* DH5 α by CaCl₂ treatment. Recombinant plasmids were extracted by minipreparation using the Illustra plasmidPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare) and subjected to automatic DNA sequencing (ABI PRISM Genetic Analyzer, Applied Biosystems) using the vector primers.

2.3 ANALYSIS OF NUCLEOTIDE SEQUENCES

To identify genetic similarities, the obtained nucleotide sequences were searched online employing the software CENSOR from the Genetic Information Research Institute (<http://www.girinst.org/censor/index.php>) [Kohany et al., 2006]. The ORFs of the TE sequences were searched in the database Blastx in NCBI [Altschul et al., 1997] and Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk>) [Finn et al., 2010] for the identification of protein domains.

2.4 FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION

The individual sequences of the TEs were labeled as probes using digoxigenin-11-dUTP or biotin-16-dUTP by the kits Dig- and Bio-Nick Translation Mix, respectively (Roche Applied Science). FISH was performed according to Pinkel et al. [1986] with minor modifications as described by Almeida et al. [2010]. The hybridizations were carried out under high stringency conditions (2.5 ng/ μ L of probe, 50% formamide, 2 \times SSC, 10% dextran sulfate, pH 7.0–7.2, at 37°C for 16 h). Signal detection was done using anti-digoxigenin rhodamine, fab fragments (Roche Applied Science) and streptavidin-Alexa fluor 488 (Molecular Probes). The chromosomes were counterstained with 0.2 μ g/mL DAPI in Vectashield mounting medium (Vector, Burlingame, CA) and analyzed under an Olympus BX41 epifluorescence microscope. Images were captured using the CCD Olympus DP-71 (12 Mp) camera.

3 RESULTS

Amplification of Tc1/Mariner from the genome of *O. octoguttata* resulted in a DNA band of around 1,100 bp. Nucleotide sequencing evidenced 1,048 bp with 81.7% similarity with the transposon *Tc1-6_AFC*, here named *Tc1/Mariner-Ooc* (Fig. 1, sequence A). The amplification using the primer for the TIR of the Harbinger

transposon resulted in the 376-bp sequencing a 100-bp segment with similarity to the non-LTR *RTE-36_LMi*, here named *RTE- Ooc partial* (Fig. 1 , sequence B) . The ORFs of the sequences obtained did not identify protein domains in the databases Pfam and Blastx.

The cytogenetic analysis of the meiotic cells of the 3 *Omophoita* species showed $2n = 22 = 10II+X+Y$ and asynaptic giant sex chromosomes with regular segregation. FISH with the probe *Tc1/Mariner- Ooc* revealed different accumulation sites in the chromosomes of the 3 species (Fig. 2). In *O. octoguttata*, *Tc1/Mariner- Ooc* was located only in an interstitial region of the X chromosome (Fig. 2 A–C). In *O. sexnotata*, *Tc1/Mariner- Ooc* was spread on the chromosomes, with regions of accumulation in the chromosomes X and Y (Fig. 2 D–F) and some autosomes. *O. personata* showed *Tc1/Mariner- Ooc* scattered in the autosomes and in the X and Y sex chromosomes (Fig. 2 G–I).

The in situ localization of the probe *RTE- Ooc partial* exhibited its spread over the entire X and Y sex chromosomes, in addition to accumulations in the autosomes of the species *O. octoguttata*, *O. sexnotata*, and *O. personata* (Fig. 3).

4 DISCUSSION

DNA repeat fraction studies can provide important information for the understanding of genomic structure and function. The *Omophoita* species analyzed here demonstrated similar karyotypes, arranged as described by Almeida et al. [2009], of $2n = 10II+X+Y$ with asynaptic giant sex chromosomes and regular segregation. Studies of the genomic composition and karyotypic distribution of TEs are rare in Alticinae [Almeida et al., 2010; Mello et al., 2014]. The data obtained in this study evidenced accumulation of TE sequences, which are related to the *Tc1/Mariner* transposon DNA and to the retrotransposable element *RTE*.

The element *Tc1/Mariner- Ooc* did not show an ORF for transposase protein domains, proving it to be a nonautonomous copy. Nonautonomous copies of TEs are the most frequent ones in the genomes and, in countless times, with a high index of molecular degeneration, as already demonstrated for *Tc1/Mariner* from other groups [Schemberger et al., 2016; Primo et al., 2018]. For amplification of the sequence *RTE -Ooc partial*, degenerated primers for the TIR sequence of the Harbinger DNA transposon were used. Although a nonspecific PCR amplification product, the *RTE*

element is also accumulated in the genome of *Omophoita* species.

These nonspecific data can be explained by the abundance of repetitive elements in the *O. octoguttata* genome. Gene conversion, unequal crossover, and the nonallelic homologous recombination mechanisms mixed different TE sequences into the *O. octoguttata* genome, as also observed in fishes [Schemberger et al., 2014; Glugoski et al., 2018]. In addition to the accumulation of TEs in each genome, the comparative mapping of TEs among *O. octoguttata*, *O. sexnotata*, and *O. personata* demonstrated differential chromosomal accumulation sites, especially when the TE distributions in the X and Y sex chromosomes were compared.

In other insects, as in *Eyprepocnemis plorans* (grasshopper), an intense accumulation of the *Gypsy*, *RTE*, and *Mariner* TEs has been demonstrated in the genome, with distribution along almost the entire length of the chromosomes [Montiel et al., 2012]. Although *E. plorans* and *Omophoita* are not phylogenetically closely related, the similarity of the distribution of TEs between these species indicates a great invasion of these elements, which could have contributed to the expansion of the genome sizes in the different groups. Among insects, the Orthoptera have the largest genomes [Hanrahan and Johnston, 2011], and *E. plorans* has a genome size of 10.16 Gb [Ruiz-Ruano et al., 2011]. In Coleoptera, different analyzed species show genome size estimates ranging from 152 Mb for *Tribolium castaneum* [Tribolium Genome Sequencing Consortium, 2008] to 2.5 Gb for *Cybister fimbriolatus* [Hanrahan and Johnston, 2011]. Up to the moment, for no Alticinae species, the genome has been assembled or size estimated.

In parallel, when comparing the karyotype of the *Omophoita* species [Almeida et al., 2009] with that of other more basal species of Alticinae, such as *Systema* and *Heikertingerella* [Smith and Virkki, 1978] and *T. castaneum* [Stuart and Mocelin, 1995], it is possible to visualize that *Omophoita* species present distinctly larger chromosome sizes, especially regarding the sex chromosomes. Regarding these chromosome sizes, it is possible to infer an increase in the genome size for *Omophoita*, and this could be directly related to the TE accumulation detected in this study. This could partially explain the genomic expansion, although the presence of other repetitive sequences cannot be ruled out. It has already been reported that TEs are closely related to expansions in genome sizes [Kidwell, 2002; Lisch, 2013], as observed in corn, where genomic expansion is related to TEs, mainly the *Ac* element [Yu et al., 2011].

In situ localization of the *Tc1/Mariner*-*Ooc* probe showed accumulations in the chromosomes, especially in the X and Y, in addition to the pericentromeric regions of the autosomes in 2 species, as was also observed with the C0t-1 repetitive fraction [Mello et al., 2014]. Yet, a comparison of the *Tc1/Mariner* accumulation sites among *O. octoguttata*, *O. sexnotata*, and *O. personata* karyotypes showed major differences in the X and Y sex chromosomes. Belyayev [2014] demonstrated that TEs act in events of genomic modification and in the evolution of the species. In this context, some studies with *Drosophila* have also demonstrated a major role of TEs in chromosome architecture, where their participation in chromosomal rearrangements is well-documented [Cáceres et al., 1999; Casals et al., 2003; Evans et al., 2007]. Due to the differential accumulation of TEs and their location in different chromosomal regions in the sex chromosomes of *Omophoita*, it is possible to infer their participation in the sex chromosome differentiation and in the speciation of this group. In another pathway, the TEs had enormous participation in genomic expansion, which probably led to the loss of chromosomal homology and consequently asynaptic segregation of the sex chromosomes in *Omophoita*.

Genetic studies suggest that TEs may be associated with the evolution of homogametic and heterogametic sex chromosomes in insects [Kaiser and Bachtrog, 2010]. In homogametic sex chromosomes, TEs take an important role in the expression of sex-related genes, being able to promote gene silencing and sex chromatin condensation [Chalopin et al., 2015]. On the other hand, in heterogametic sex chromosomes, the TEs promote the alteration of the genetic and chromosomal organization and lead to size variation of the sex chromosomes [Chalopin et al., 2015]. This last model is in agreement with the differential locations of the TE accumulations in the heterogametic sex chromosomes of *Omophoita*.

The TEs catalyze the growth and differentiation of the sex chromosomes, especially the heteromorphic Y or W chromosomes, by accumulation of paralogous sequences [Lisch, 2013; Schemberger et al., 2014; Ziemniczak et al., 2014]. In another hypothesis, the formation of these TE accumulation sites occurred as a genome defense mechanism that protects the adjacent gene regions from the deleterious effects of TEs [Sigman and Slotkin, 2016]. In this way, these TE-accumulated regions would be subject to the action of epigenetic mechanisms like DNA/histone methylation, as well as histone remodeling in heterochromatin nucleation [Sigman and Slotkin, 2016]. In the present study, the data demonstrated

that both the heteromorphic Y chromosome and the X chromosome had differential accumulations of the repetitive sequences. These findings differ from most species where only the heteromorphic chromosome accumulates TEs, and they expose the need to evaluate the role of the repetitive sequences for the asynaptic segregation in *Omophoita*.

Herein, we suggest that the TEs *Tc1/Mariner-Ooc* and *RTE-Ooc* partial are involved in the transposition mechanisms and accumulation of repeat sequences that promote genomic expansion and giant sex chromosome formation in *Omophoita*. Differential TE accumulations in the sex chromosomes of the different *Omophoita* species show their participation in the genome architecture modification in different pathways in each evolutionary lineage. The TEs promoted chromosomal differentiation in *Omophoita*, and this can help to explain the speciation of the group.

Acknowledgements

This work was supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), Secretaria de Ciência e Tecnologia do Estado do Paraná (SETI-PR), and Fundação Araucária (Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná). The authors are grateful to the expert Carlos Campaner for assistance in the identification of the species.

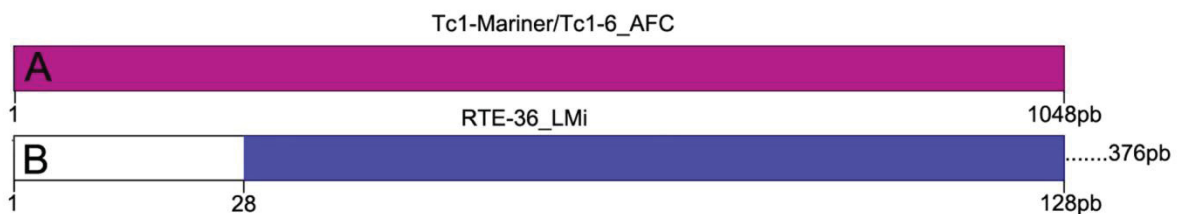


Fig. 1. Sequences obtained from transposable elements by alignment analysis using the repetitive DNA database from the Genetic Information Research Institute. Sequence A showed total identity in the 1,048-bp alignment with the Tc1 DNA transposon, *Tc1-6_AFC*, and was named *Tc1/Mariner-Ooc*. Sequence B showed 100-bp alignment identity with the non-LTR retrotransposon *RTE-36_LMi* and was named *RTE-Ooc* partial in this study.

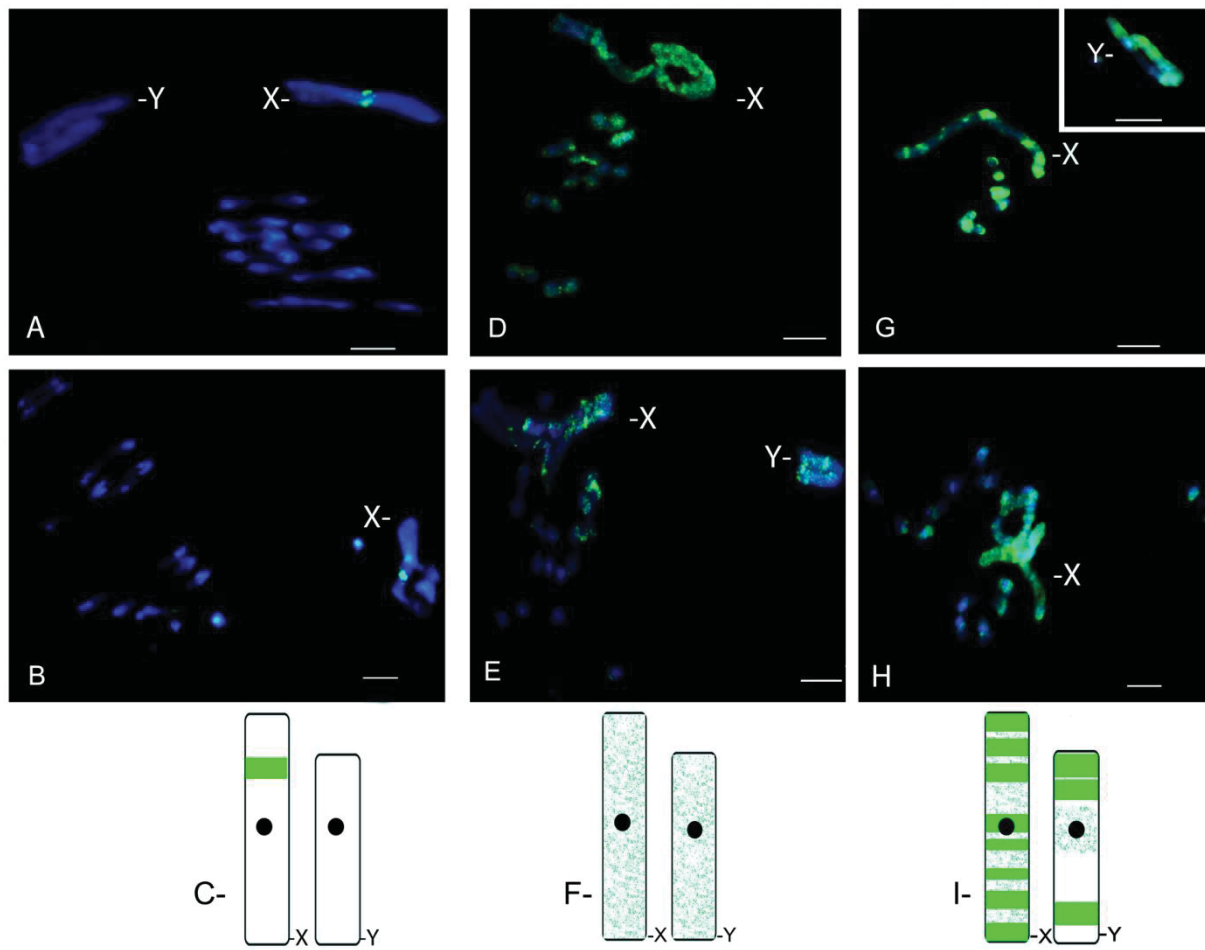


Fig. 2. Meiotic cells of the 3 *Omophoita* species after FISH with the *Tc1/Mariner-Ooc* probe and idiograms representing the sex chromosomes. A–C *O. octoguttata*. D–F *O. sexnotata*. G–I *O. personata*. The black circles in the idiograms indicate the centromeres. Scale bars, 10 μ m.

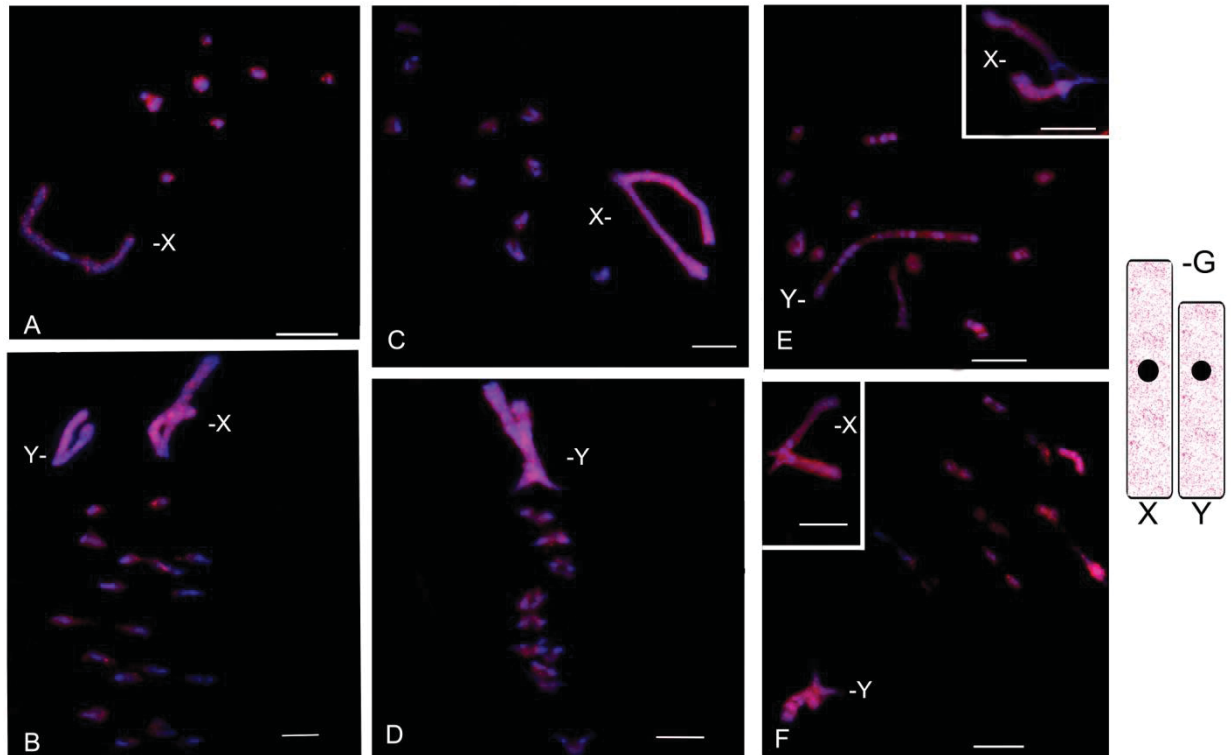


Fig. 3. Meiotic cells of *O. octoguttata* (A , B), *O. sexnotata* (C , D), and *O. personata* (E , F) after FISH with the *RTE Ooc partial* probe. G Idiogram representing the accumulations in the sex chromosomes. The black circles indicate the centromeres. Scale bars, 10 μ m.

REFERENCES

Almeida MC, Zacaro AA, Cella DM: Cytogenetic analysis of *Epicauta atomaria* (Meloidae) and *Palembus dermestoides* (Tenebrionidae) with Xy p sex determination system using standard staining, C-bands, NOR and synaptonemal complex microspreading techniques. *Hereditas* 133:147–157 (2000).

Almeida MC, Campaner C, Cella DM: Cytogenetics of four *Omophoita* species (Coleoptera, Chrysomelidae, Alticinae): a comparative analysis using mitotic and meiotic cells submitted to the standard staining and C-banding technique. *Micron* 40:586–596 (2009).

Almeida MC, Goll LG, Artoni RF, Nogaroto V, Matiello RR, Vicari MR: Physical mapping of 18S rDNA cistron in species of the *Omophoita* genus (Coleoptera, Alticinae) using fluorescent in situ hybridization. *Micron* 41:729– 734 (2010).

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, et al: Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389– 3402 (1997).

Barbosa P, Pucci MB, Nogaroto V, Almeida MC, Artoni RF, Vicari MR: Karyotype analysis of three species of *Corydoras* (Siluriformes: Callichthyidae) from southern Brazil: rearranged karyotypes and cytotaxonomy. *Neotrop Ichthyol* 15:e160056 (2017).

Barros AV, Wolski MAV, Nogaroto V, Almeida MC, Moreira-Filho O, Vicari MR: Fragile sites, dysfunctional telomere and chromosome fusions: what is 5S rDNA role? *Gene* 608:20–27 (2017).

Belyayev A: Bursts of transposable elements as an evolutionary driving force. *J Evol Biol* 27: 2573–2584 (2014).

Bussiek M, Hoischen C, Diekmann S, Bennink ML: Sequence-specific physical properties of African green monkey alpha-satellite DNA contribute to centromeric heterochromatin formation. *J Struct Biol* 167:36–46 (2009).

Cáceres M, Ranz JM, Barbadilla A, Long M, Ruiz A: Generation of a widespread *Drosophila* inversion by a transposable element. *Science* 285:415–418 (1999).

Casals F, Cáceres M, Ruiz A: The Foldback -like transposon Galileo is involved in the generation of two different natural chromosomal inversions of *Drosophila buzzatii*. *Mol Biol Evol* 20:674–685 (2003).

Chalopin D, Volff JN, Galiana D, Anderson JL, Schartl M: Transposable elements and early evolution of sex chromosomes in fish. *Chromosome Res* 23:545–560 (2015).

Charlesworth B, Snlegowski P, Stephan W: The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* 371:215–220 (1994).

Doak TG, Doerder FP, Jahn CL, Herrick G: A proposed superfamily of transposase genes: transposon-like elements in ciliated protozoa and a common “D35E” motif. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:942–946 (1994).

Eichler EE, Sankoff D: Structural dynamics of eukaryotic chromosome evolution. *Science* 301: 793–797 (2003).

Evans AL, Mena PA, McAllister BF: Positive selection near an inversion breakpoint on the neo-X chromosome of *Drosophila americana*. *Genetics* 177:1303–1319 (2007).

Feschotte C: Transposable elements and the evolution of regulatory networks. *Nat Rev Genet* 9:397–405 (2008).

Feschotte C, Pritham EJ: DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes. *Annu Rev Genet* 41:331–368 (2007).

Finn RD, Mistry J, Tate J, Coggill P, Heger A, et al: The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* 38:D211–D222 (2010).

Galián J, Hogan JE, Vogler AP: The origin of multiple sex chromosomes in tiger

beetles. *Mol Biol Evol* 19:1792–1796 (2002).

Glugoski L, Giuliano-Caetano L, Moreira-Filho O, Vicari MR, Nogaroto V: Co-located hAT transposable element and 5S rDNA in an interstitial telomeric sequence suggest the formation of robertsonian fusion in armored catfish. *Gene* 650:49–54 (2018).

Goll LG, Artoni RF, Vicari MR, Nogaroto V, Petitpierre E, Almeida MC: Cytogenetic analysis of *Lagria villosa* (Coleoptera, Tenebrionidae): emphasis on the mechanism of association of the Xy p sex chromosomes. *Cytogenet Genome Res* 139:29–35 (2013).

Gray YHM: It takes two transposons to tango: transposable-element-mediated chromosomal rearrangements. *Trends Genet* 16:461–468 (2000).

Gullan PJ, Cranston P: *The Insects. An Outline of Entomology*, ed 4 (Wiley-Blackwell, Chichester, 2010).

Hanrahan SJ, Johnston JS: New genome size estimates of 134 species of arthropods. *Chromosome Res* 19:809–823 (2011).

Hernández-Hernández A, Rincón-Arano H, Recillas-Targa F, Ortiz R, Valdes-Quezada C, et al: Differential distribution and association of repeat DNA sequences in the lateral element of the synaptonemal complex in rat spermatocytes. *Chromosoma* 117:77–87 (2008).

Kaiser VB, Bachtrog D: Evolution of sex chromosomes in insects. *Annu Rev Genet* 44:91–112 (2010).

Kejnovsky E, Hobza R, Cermak T, Kubat Z, Vyskot B: The role of repetitive DNA in structure and evolution of sex chromosomes in plants. *Heredity* 102:533–541 (2009).

Kidwell MG, Lisch DR: Transposable elements and host genome evolution. *Trends Ecol Evol* 15:95–99 (2000).

Kidwell MG, Lisch DR: Perspective: transposable elements, parasitic DNA, and genome evolution. *Evolution* 55:1–24 (2001).

Kidwell MG: Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. *Genetica* 115:49–63 (2002).

Kohany O, Gentles AJ, Hankus L, Jurka J: Annotation, submission and screening of repetitive elements in Repbase: RepbaseSubmitter and Censor. *BMC Bioinformatics* 7:474 (2006).

Lim JK, Simmons MJ: Gross chromosome rearrangements mediated by transposable elements in *Drosophila melanogaster*. *Bioessays* 16:269–275 (1994).

Lisch D: How important are transposons for plant evolution? *Nat Rev Genet* 14:49–61 (2013).

Lönnig WE, Saedler H: Chromosome rearrangements and transposable elements. *Annu Ver Genet* 36:389–410 (2002).

Malik HS, Eickbush TH: The RTE class of nonLTR retrotransposons is widely distributed in animals and is the origin of many SINEs. *Mol Biol Evol* 15:1123–1134 (1998).

Malik HS, Burke WD, Eickbush TH: The age and evolution of non-LTR retrotransposable elements. *Mol Biol Evol* 16:793–805 (1999).

Mello LRA, Tasiar D, Goll LG, Artoni RF, Vicari MR, et al: Physical map of repetitive DNA and karyotype evolution in three species of the genus *Omophoita* (Coleoptera: Alticinae). *Ital J Zool* 81:16–24 (2014).

Montiel EE, Cabrero J, Camacho JPM, LópezLeón MD: Gypsy , RTE and Mariner transposable elements populate *Eyprepocnemis plorans* genome. *Genetica* 140:365–374 (2012). Murray MG, Thompson WF: Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* 8:4321–4325 (1980).

Pinkel D, Straume T, Gray JW: Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:2934–2938 (1986). Plasterk RHA, Izsvák Z, Ivics Z: Resident aliens: the *Tc1/mariner* superfamily of transposable elements. *Trends Genet* 15:326–332 (1999).

Primo CC, Glugoski L, Vicari MR, Nogaroto V: Chromosome mapping and molecular characterization of the *Tc1/Mariner* element in *Rineloricaria* (Siluriformes: Loricariidae). *Braz Arch Biol Biotechnol* 61:e18170623 (2018).

Pucci MB, Barbosa P, Nogaroto V, Almeida MC, Artoni RF, et al: Population differentiation and speciation in the genus *Characidium* (Characiformes: Crenuchidae): effects of reproductive and chromosomal barriers. *Biol J Linn Soc* 111:541–553 (2014). Riley EG,

Riley EG, Clark SM, Flowers RW, Gilbert AJ: Family 124. Chrysomelidae, in Arnett RH, Thomas MC, Skelley PE, Frank JH (eds): *American Beetles, Volume II. Polyphaga: Scarabaeoidea through Curculionoidea*, pp 617–691 (CRC Press, London 2002).

Ruiz-Ruano FJ, Ruiz-Estévez M, Rodríguez-Pérez J, López-Pino JL, Cabrero J, Camacho JPM: DNA amount of X and B chromosomes in the grasshoppers *Eyprepocnemis plorans* and *Locusta migratoria*. *Cytogenet Genome Res* 134: 120–126 (2011).

Schemberger MO, Bellafronte E, Nogaroto V, Almeida MC, Schuhli GS, et al: Differentiation of repetitive DNA sites and sex chromosome systems reveal closely related group in Parodontidae (Actinopterygii, Characiformes). *Genetica* 139:1499–1508 (2011).

Schemberger MO, Oliveira JI, Nogaroto V, Almeida MC, Artoni RF, et al: Construction and characterization of a repetitive DNA library in Parodontidae (Actinopterygii:

Characiformes): a genomic and evolutionary approach to the degeneration of the W sex chromosome. *Zebrafish* 11:518–527 (2014).

Schemberger MO, Nogaroto V, Almeida MC, Artoni RF, Valente GT, et al: Sequence analyses and chromosomal distribution of the *Tc1/Mariner* element in Parodontidae fish (Teleostei: Characiformes). *Gene* 593: 308–314 (2016)

Sigman MJE, Slotkin RK: The first rule of plant transposable element silencing: location, location, location. *Plant Cell* 28:304–313 (2016).

Smith SG, Virkki N: Coleoptera, in John B (ed): *Animal Cytogenetics Vol 3, Insecta 5*. (Gebrüder Borntraeger, Berlin 1978).

Steinemann S, Steinemann M: Retroelements: tools for sex chromosome evolution. *Cytogenet Genome Res* 110:134–143 (2005).

Stuart JJ, Mocelin G: Cytogenetics of chromosome rearrangements in *Tribolium castaneum*. *Genome* 38:673–680 (1995).

Sumner AT: *Chromosomes: Organization and Function*, ed 1 (Blackwell Publishing, London 2003).

Tribolium Genome Sequencing Consortium: The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. *Nature* 452:949–955 (2008).

Vicari MR, Nogaroto V, Noletto RB, Cestari MM, Cioffi MB, et al: Satellite DNA and chromosomes in Neotropical fishes: methods, applications and perspectives. *J Fish Biol* 76:1094–1116 (2010).

Wicker T, Sabot F, Hua-Van A, Bennetzen JL, Capy P, et al: A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nat Rev Genet* 8:973–982 (2007).

Yu C, Zhang J, Peterson T: Genome rearrangements in maize induced by alternative transposition of reversed Ac/Ds termini. *Genetics* 188:59 (2011).

Ziemniczak K, Traldi JB, Nogaroto V, Almeida MC, Artoni RF, et al: In situ localization of (GATA)_n and (TTAGGG)_n repeated DNAs and W sex chromosome differentiation in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes). *Cytogenet Genome Res* 144:325–332 (2014).

Župunski V, Gubenšek F, Kordis D: Evolutionary dynamics and evolutionary history in the RTE clade of non-LTR retrotransposons, *Mol Biol Evol* 18:1849–1863 (2001).

CAPÍTULO II

ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS E A DIFERENCIAÇÃO DOS CROMOSSOMOS SEXUAIS GIGANTES DE *Omophoita* (CHRYSOMELIDAE, ALTICINAE)

Artigo a ser submetido para a Biological Journal of the Linnean Society.

RESUMO

Omophoita agrupa espécies que detêm cariótipos similares com a presença de cromossomos sexuais XY gigantes e assinápticos. Contudo, pouco se sabe sobre os mecanismos genômicos que levaram ao aumento dos tamanhos dos cromossomos sexuais, sobre os mecanismos moleculares para uma correta segregação dos cromossomos X e Y assinápticos, sobre a divergência deste grupo de espécies intimamente relacionadas. Neste estudo foram obtidas sequências de elementos transponíveis (TEs) a partir do genoma de *Omophoita octoguttata* com objetivo de averiguar a diferenciação cromossômica e propor o papel dos cromossomos sexuais na especiação entre espécies do gênero *Omophoita*, *O. octoguttata*, *O. sexnotata*, *O. personata* e *O. magniguttis*. Sequências parciais dos TEs *Copia Ooc*, *Gypsy Ooc*, *Harbinger/hAT Ooc* e *Helitron Ooc* demonstraram um acúmulo extensivo nos autossomos e nos cromossomos sexuais das espécies, com diferenças interespecíficas principalmente relacionadas aos cromossomos X e Y. Este acúmulo extensivo foi discutido quanto ao aumento do tamanho genômico e do tamanho dos cromossomos sexuais em *Omophoita*. As diferenças de localização dos TEs entre os cromossomos X e Y foram discutidas quanto a possíveis mecanismos da recombinação da região específica do Y e atual condição assináptica. Neste contexto a regra de Haldane, a regra do grande efeito do X e, os “genes da especiação” presentes no X são algumas teorias para o papel dos cromossomos sexuais na evolução da incompatibilidade reprodutiva entre espécies incipientes. Os TEs apresentam um papel catalisador das mudanças genéticas espécies específicas e os dados demonstraram diferentes organizações de distribuição dos TEs na cromatina dos cromossomos X e Y de *Omophoita*. Por fim, o acúmulo incomum destes TEs nos cromossomos sexuais X, bem como suas diferenças de localização cromossômica entre as espécies abrem perspectiva de avaliação de seu papel na especiação do grupo.

Palavras-chave: DNAs repetitivos, evolução cariotípica, Regra de Haldane, Regra do grande efeito do X, segregação assináptica.

1 INTRODUÇÃO

O isolamento reprodutivo é um evento crucial para o processo de especiação e inúmeros estudos evidenciam que os cromossomos sexuais desempenham um papel central na evolução da incompatibilidade reprodutiva entre espécies incipientes (Laurie, 1997; Presgraves e Orr, 1998; Masly e Presgraves, 2007; Turner et al., 2014; Pucci et al., 2014; Filatov, 2018; Nascimento et al., 2018). A importância dos cromossomos sexuais na divergência das espécies é discutida por duas regras principais: (i) a regra de Haldane (Haldane, 1922) e, (ii) o grande efeito do X (Coyne e Orr, 1989). A regra de Haldane propõe que o sexo heterogâmico, em comparação ao sexo homogâmico, é mais propenso a exibir inviabilidade ou infertilidade em híbridos interespecíficos (Haldane, 1922; Orr, 1997). Adicionalmente a regra do grande efeito do X afirma que o cromossomo X, em comparação com os autossomos, atua mais fortemente na disfunção do híbrido (Coyne e Orr, 1989, 2004).

Na visão genética da especiação, a variação genética em alguns locos individuais ou regiões genômicas é suficiente para a ocorrência do isolamento reprodutivo (Nosil et al., 2009; Qvarnström e Bailey, 2009; Macaya-Sanz et al., 2011). Neste conceito, alguns autores sugerem que a supressão de recombinação entre os elementos do par de cromossomos sexuais favorece o acúmulo dos chamados "genes de especiação" no X ou Z (Nosil et al., 2009; Qvarnström e Bailey, 2009). No mecanismo cromossômico para a origem dos cromossomos sexuais heteromórficos, Steinemann e Steinemann (1998) propuseram que a primeira etapa da diferenciação do Y é guiada pelo acúmulo de elementos transponíveis, o qual promove supressão da recombinação na região heteromórfica. Embora ocorra a necessidade de um aprofundamento para o entendimento dos chamados "genes da especiação" (Macaya-Sanz et al., 2011), esta é uma teoria que corrobora com a proposta de que os cromossomos sexuais atuam na especiação entre genomas que divergiram recentemente (Nosil et al., 2009). Desta forma, os "genes da especiação" que divergiram nos cromossomos sexuais das linhagens gerariam incompatibilidade e atuariam na redução da introgressão genética (Nosil et al., 2009).

Os TEs apresentam alto potencial mutagênico sendo capazes de se mover e replicar contribuindo assim para alterações do tamanho, da estrutura e da diversidade dos genomas (Kidwell, 2002). Inúmeros estudos demonstraram que os

TEs acumulam nos cromossomos sexuais de diferentes espécies (Steinemann e Steinemann, 1998; Schemberger et al., 2014, 2016; Rosolen et al., 2018). Estes compreendem um vasto conjunto de sequências repetitivas dispersas nos genomas de eucariotos (Kapitonov e Jurka, 2001, 2008; Coan et al., 2018). Diante desta vasta diversidade de TEs existentes, Wicker et al. (2007) propuseram um sistema de classificação hierárquico unificado de TEs eucarióticos, projetado com base no mecanismo de transposição, similaridades de sequências e relações estruturais. A classe I foi dividida nas ordens: retrotransposons LTR, elementos DIRS, PLEs, LINEs e SINEs, os quais se transpõem através da transcrição reversa de um RNA intermediário. A classe II é constituída dos transposons de DNA, os quais se transpõem por meio de um intermediário de DNA (Wicker et al., 2007). Esta classe foi dividida em: (i) subclasse 1, ordens *TIR* e *Crypton*, caracterizados por repetições terminais invertidas (TIRs) e, (ii) subclasse 2, ordens Helitron e Polintons/Maverick (Wicker et al., 2007).

Atuando como mutadores de sequências gênicas e não gênicas, os TEs, por meio de suas transposições podem deixar impressões digitais em todas as regiões genômicas (Kidwell e Lisch, 2001; Kidwell, 2002; Schemberger et al., 2016). Estudos genômicos demonstraram que os TEs, após a fase de invasão, tendem a ser silenciados e sofrer deterioração de suas estruturas moleculares ao longo das gerações (Fernández-Medina et al., 2012; Lowe e Haussler, 2012). Toda esta atividade de transposição dos TEs gera mutações no genoma que podem permanecer neutras ou, atuarem na inativação de alelos e, desta forma ser prejudicial (Kidwell e Lisch 2001). Em outra via, a transposição dos TEs fornece “matéria bruta” de DNA em outros sítios genômicos, os quais podem proporcionar a criação de novos genes, gerar novas sequências regulatórias da atividade gênica, novos sítios de splice, sítios de poliadenilação, RNAs não codificadores, entre outros (Miller et al., 1997; Feschotte, 2008; Lowe e Haussler, 2012; Souza et al., 2013).

A participação de TEs também é bem documentada na arquitetura cromossômica de muitas espécies, onde estudos indicam que os TEs induziram rearranjos cromossômicos, como translocações, duplicações, inversões, deleções e, desta forma, contribuíram para a diversificação e para o aumento do tamanho dos genomas (Montiel et al., 2012; Lisch, 2013; Xavier et al., 2014; Amorim et al., 2018; Glugoski et al., 2018). Montiel et al. (2012) demonstraram acúmulos intensos dos TEs Mariner, RTE e Gypsy no genoma de *Eyprepocnemis plorans* (Orthoptera). Em

Omophoita (Coleoptera), Rosolen et al. (2018) verificaram acúmulo dos elementos RTE e Mariner no genoma de três espécies, com distribuição vasta na extensão dos seus cromossomos sexuais.

Em Oedionychina (Coleoptera) as espécies de *Omophoita* possuem características singulares relacionadas ao cariótipo com $2n=22$ cromossomos e fórmula meiótica $10II+X+Y$ e, ao tamanho gigante de seus cromossomos sexuais X e Y, os quais são assinápticos e com segregação regular durante a meiose (Smith e Virkki, 1978; Virkki et al., 1991; Virkki e Santiago-Blay, 1993; 1998; Almeida et al., 2009, 2010). Os cromossomos sexuais gigantes de *Omophoita* demonstraram ser enriquecidos por acúmulos de DNAs repetitivos (Mello et al., 2014) entre estes os TEs *Tc1/Mariner-Ooc parcial* e *RTE-Ooc parcial* (Rosolen et al., 2018). Estes estudos recentes demonstraram que os DNAs repetitivos atuaram na expansão do tamanho dos genomas, mas ainda pouco é conhecido quanto às diferenças da localização cromossômica e tipos de TEs que diversificaram a estrutura genômica e dos cromossomos sexuais gigantes de *Omophoita*. Neste estudo foram obtidas sequências de elementos transponíveis (TEs) a partir do genoma de *Omophoita octoguttata* com objetivo de averiguar a diferenciação cromossômica e propor o papel dos cromossomos sexuais na especiação dentro do gênero *Omophoita*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 PREPARAÇÃO DE CROMOSSOMOS MEIÓTICOS E EXTRAÇÃO DO DNA

Foram obtidas preparações cromossômicas meióticas de machos adultos das espécies *Omophoita octoguttata* (17 indivíduos), *Omophoita sexnotata* (16 indivíduos), *Omophoita personata* (13 indivíduos) e *Omophoita magniguttis* (9 indivíduos). As quatro espécies foram capturadas em uma mesma área na região sul do Brasil ($25^{\circ}07'10''S$ e $49^{\circ}56'24''W$). Todos os exemplares foram identificados pelo Dr. Carlos Campaner no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo. Os animais foram dissecados em solução fisiológica para insetos e, para a obtenção das preparações citológicas foram utilizadas gônadas de exemplares adultos segundo a metodologia descrita por Almeida et al. (2000) com as modificações incluídas em Rosolen et al. (2018). O DNA genômico foi extraído de espécimes de *Omophoita octoguttata* pelo protocolo de Murray e Thompson (1980), com

modificações, onde a cabeça, o pronoto e o fêmur foram macerados com nitrogênio líquido.

2.2 AMPLIFICAÇÃO CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DE TES

A amplificação dos TEs foi realizada por reação em cadeia da polimerase (PCR) a partir do DNA da espécie *O. octoguttata*. Neste estudo foram sintetizados quatro conjuntos de primers para a amplificação parcial dos TEs Copia, Gypsy, Harbinger e Helitron (Tabela 1). Inicialmente foram utilizados os primers dos TEs de *Apareiodon* sp. (Schemberger et al., submetido para publicação). Após sequenciamento dos produtos de PCR, primers específicos para estes TEs de *O. octoguttata* (Tabela 1) foram sintetizados utilizando o programa Primer3plus software (Untergasser e Nijveen, 2007).

As reações de PCR individuais consistiram de: 40 ng de DNA genômico, 0,2 µM do *primer*, 0,4 mM de desoxinucleotídeos trifosfatos (dNTPs), 1× Taq tampão de reação (200 mM Tris, pH 8.4, 500 mM KCl), 2 mM MgCl₂ e 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen). Os parâmetros da amplificação foram: desnaturação inicial 5 min a 94 °C, 35 ciclos de três passos (1 min a 94 °C, 45 segundos a ~55 °C e 1 min e 30 segundos a 72 °C) e extensão final de 5 min a 72 °C. A melhor temperatura de emparelhamento para cada conjunto de primer está descrita na tabela 1.

Os produtos das PCRs foram separados em eletroforese em gel de agarose 1%, posteriormente as bandas foram recortadas e purificadas utilizando o PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare), segundo as instruções do fabricante. As sequências purificadas foram então ligadas ao plasmídeo pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega) e transformadas em células da bactéria *Escherichia coli* DH5α CaCl₂ competentes. As colônias bacterianas com plasmídeos recombinantes foram extraídas por meio de mini-preparação plasmidial por kit (GE Healthcare) e estes submetidos ao sequenciamento automático do DNA utilizando o ABI-PRISM Genetic Analyzer (Applied Biosystems) utilizando *primers* para o vetor.

2.3 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS

As sequências nucleotídicas obtidas foram identificadas por similaridade genética, submetidas à buscas online no software CENSOR, presente no Genetic

Information Research Institute (GIRINST) disponível em: <http://www.girinst.org/censor/index.php> (Kohany et al., 2006). Para a identificação dos domínios proteicos foram pesquisadas as matrizes abertas de leitura (do inglês - *open reading frames* - ORFs) das sequências de TEs no banco de dados do Blastx do NCBI (Altschul et al., 1997) e *matching Pfam families* (<http://pfam.sanger.ac.uk>) (El-Gebali et al., 2019).

2.4 HIBRIDAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH)

Após a confirmação da identidade, as sequências Copia, Gypsy, Harbinger/Hat e Helitron foram sintetizadas como sondas para a utilização em experimentos de localização *in situ*. Estas sequências foram marcadas com digoxigenina-11-dUTP utilizando o Kit Dig-Nick Translation Mix (Roche Applied Science) ou biotina-16-dUTP utilizando o Kit Biotin-Nick Translation Mix (Roche Applied Science). As FISHs foram realizadas segundo Pinkel et al. (1986) com modificações. As condições de hibridação foram de alta estrigência (2.5 ng/μL da sonda, 50 % formamida, 2×SSC, 10 % sulfato dextrano, pH 7.0–7.2, a 42 °C por 16h). A detecção de sinal foi realizada utilizando o anticorpo anti-digoxigenina rodamina, fab fragments (Roche Applied Science) para sondas com digoxigenina e, streptavidin alexa fluor 488 para sondas biotiniladas. Os cromossomos foram contra corados com 0,2 μg/mL de 4', 6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) em meio de montagem Vectashield (Vector, Burlingame, CA) e analisados em microscópio de campo claro e epifluorescência Olympus BX41. As imagens foram capturadas com auxílio da câmera CCD Olympus DP-71 (12 Mp). Com o conjunto de imagens foram construídos ideogramas representativos para demonstrar a localização de cada TE nos cromossomos sexuais X e Y das espécies *O. octoguttata*, *O. sexnotata*, *O. personata* e *O. magniguttis*.

3 RESULTADOS

3.1 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS PARCIAIS DOS TES

A sequência de DNA obtida a partir da amplificação do conjunto de primers para o elemento Copia retornou 716 pb com um segmento interno de 81 pb (586-

667) com 72.84% similaridade ao retrotransposon LTR *Copia-26_CQ-I* de *Culex quinquefasciatus* (Figura 1a). Este elemento de *Omophoita octoguttata* foi denominado neste estudo de *Copia Ooc parcial* (Figura 1a). A análise desta sequência nas bases de dados Blastx e Pfam não retornou similaridade para sequência de aminoácidos.

A sequência da amplificação Gypsy retornou 664 pb com um segmento de 591 pb (38-628) com 67.51% de similaridade ao retrotransposon LTR *Gypsy39_AG* de *Anopheles gambiae* (Figura 1b), aqui denominado de *Gypsy Ooc parcial*. A parte final desta sequência de DNA (fase de leitura 3: 351-629 Blastx e 342-629 Pfam) apresentou similaridade em torno de 70% com a parte inicial para a enzima Transcriptase Reversa *RT_LTR* e *RVT_1* para várias fontes de invertebrados (Figura 1b).

O conjunto de primers para a amplificação do transposon Harbinger retornou um segmento de DNA com 882 pb. A análise desta sequência no banco de dados Girinst demonstrou dois segmentos internos com similaridade aos TEs: o primeiro segmento com 77 pb (24-101) com 75.34% de similaridade ao TE *HARB-1_TA* de *Triticum aestivum* e, um segundo segmento com 121 pb (601-722) com 70.91% de similaridade ao TE *hAT-N7B_Crp* de *Crocodylus porosus* (Figura 1c). Esta sequência com similaridade aos dois transposons de DNA foi aqui denominada de *Harb/hAT Ooc parcial* (Figura 1c). A análise desta sequência nas bases de dados Blastx e Pfam não retornou similaridade para sequência de aminoácidos.

Por último, a análise do sequenciamento da amplificação Helitron na base de dados Girinst, com a opção *force translated search*, demonstrou dois segmentos com similaridade ao DNA transposon *Helitron*, 89 pb (10-99) com 39.78% de similaridade ao *Helitron-1_BTa* de *Bemisia tabacae* e, 182 pb (100-282) com 55.74% de similaridade ao *Helitron-1_PM* de *Petromyzon marinus* (Figura 1d). A análise da sequência no Blastx retornou 63.96% de similaridade a um domínio proteico truncado para a enzima *Helicase PIF1* (segmento 100-276 pb) do TE Helitron de *Orchesella cincta* (Figura 1d). Neste estudo, a sequência recuperada foi denominada *Helitron Ooc parcial*.

3.2 LOCALIZAÇÃO *IN SITU*

A análise citogenética das células meióticas nas quatro espécies de *Omophoita* mostraram $2n=10II+X+Y$, cromossomos sexuais gigantes e assinápticos, com segregação regular (Figuras 2 e 3), conforme já descrito em Almeida et al. (2009). As sondas *Copia Ooc* e *Gypsy Ooc* mostraram marcações intersticiais na maioria dos autossomos, além de uma intensa distribuição por quase toda a extensão do cromossomo X e, marcações diferenciais nos cromossomos Y das quatro espécies (Figura 2 e 3).

A sonda *Copia Ooc* mostrou marcações espalhados ao longo de todo o cromossomo X nas espécies *O. octoguttata* (Figuras 2A e 4A), *O. sexnotata* (Figuras 2C e 4E), *O. personata* (Figuras 2E e 4I). Em *O. magniguttis*, além de mostrar marcações espalhadas ao longo de todo o cromossomo X, o elemento *Copia Ooc* mostrou uma marcação forte no final de um dos braços (Figuras 2G e 4M). No cromossomo Y a sonda *Copia Ooc* mostrou diferenças de localização cromossômica entre as quatro espécies analisadas. Em *O. octoguttata* as marcações *Copia Ooc* no cromossomo Y foram visualizadas na região pericentromérica, além de acúmulos na região terminal dos dois braços cromossômicos (Figuras 2A e 4A). O cromossomo Y de *O. sexnotata* mostrou diferentes regiões com acúmulos do elemento *Copia Ooc*: um acúmulo fraco nas regiões proximais seguido de acúmulo intenso na região intersticial de ambos os braços, além de diferentes regiões de acúmulo subterminais e terminais nos braços longo e curto (Figuras 2C e 4E).

Na espécie *O. personata* a sonda *Copia Ooc* mostrou acúmulos no cromossomo Y nas regiões terminais dos braços longo e curto, além de sinais fracos na região pericentromérica e na região intersticial do braço longo (Figuras 2E e 4I). O cromossomo Y de *O. magniguttis* mostrou acúmulo *Copia Ooc* na região pericentromérica, um acúmulo forte na região intersticial do braço curto, duas regiões de acúmulo intersticiais no braço longo, além de um acúmulo terminal no braço longo (Figuras 2G e 4M).

A localização cromossômica da sonda *Gypsy Ooc* nas quatro espécies mostrou distribuição dispersa ao longo de praticamente toda a extensão do cromossomo X, porém com menor acúmulo em regiões quando comparado ao elemento *Copia Ooc* (Figura 2). Nas espécies *O. octoguttata*, *O. sexnotata* e *O. personata* a sequência *Gypsy Ooc* foi localizada praticamente em toda a extensão

do X a exceção de uma pequena região centromérica, além de uma marcação final em um dos braços para *O. octoguttata* (Figuras 2B, D, F e 4B, F, J).

Em *O. magniguttis* o elemento *Gypsy Ooc* foi localizado de maneira mais dispersa no cromossomo X, com acúmulos nas regiões intersticiais, além de um acúmulo na região terminal de um dos braços (Figuras 2H e 4N). O cromossomo Y de *O. octoguttata* possui acúmulos de *Gypsy Ooc* na região pericentromérica, na região intersticial no braço longo, além e das regiões terminais de ambos os braços cromossômicos (Figuras 2B e 4B).

Omophoita sexnotata apresentou localização da sequência *Gypsy Ooc* no cromossomo Y na sua região pericentromérica, acúmulos fortes nas regiões proximais, além de marcações terminais do braço curto e uma extensa região no braço longo com dispersão de *Gypsy Ooc* (Figuras 2D e 4F). Em *O. personata* o cromossomo Y apresentou *Gypsy Ooc* acumulado em duas regiões (terminal e subterminal) do braço curto, além de três regiões de acúmulo na região intersticial do braço longo (Figuras 2F e 4J). Em *O. magniguttis* a sequência *Gypsy Ooc* foi localizada mais forte em duas regiões intersticiais do braço curto, além da presença de cópias dispersas na região terminal do braço curto, na região proximal e na região terminal do braço longo (Figuras 2H e 4N).

A localização *in situ* da sequência *HARB/hAT Ooc* nas quatro espécies de *Omophoita* também evidenciou acúmulos em quase todos dos autossomos, dispersos por toda a extensão dos cromossomos X, além de sinais diferenciais para os cromossomos Y (Figura 3). Os cromossomos X das quatro espécies evidenciaram sequências *HARB/hAT Ooc* dispersas por toda sua extensão, como pequenas regiões de acúmulos mais fortes em *O. octoguttata* e *O. personata* (Figuras 3 e 4).

Em relação ao cromossomo Y, em *O. octoguttata* foram detectadas cópias *HARB/hAT Ooc* dispersas na região pericentromérica, nas regiões subterminais dos braços curto e longo, além de um sítio de acúmulo na região intersticial do braço longo e nas regiões terminais de ambos os braços (Figuras 3A e 4C). O cromossomo Y de *O. sexnotata* tem segmentos dispersos de *HARB/hAT Ooc* na região pericentromérica e em ambas as regiões terminais, além de acúmulos fortes intersticiais e extensos nos dois braços (Figuras 3C e 4G). Em *O. personata* o cromossomo Y tem quatro regiões onde foi observado sequências *HARB/hAT Ooc* dispersas, no braço longo e no braço curto (Figuras 3E e 4K). Em *O. magniguttis* o

cromossomo Y apresenta regiões no braço curto com acúmulos das sequências *HARB/hAT Ooc*, além de uma região de acúmulo no braço longo (Figuras 3G e 4O).

A FISH com a sonda *Helitron Ooc* evidenciou que este TE também está disperso na maioria dos autossomos nas quatro espécies avaliadas (Figura 3). O cromossomo X das quatro espécies de *Omophoita* avaliadas demonstram as sequências *Helitron Ooc* dispersas por toda a sua extensão e, com menor número de cópias para a região pericentromérica (Figuras 3 e 4D, H, L, P). Além disto, o cromossomo X de *O. magniguttis* detém menor número de cópias *Helitron Ooc* quando comparado as outras três espécies (Figuras 3H e 4P).

O cromossomo Y de *O. octoguttata* mostrou sequências *Helitron Ooc* dispersas por toda sua extensão (Figuras 3B e 4D). Em *O. sexnotata* o cromossomo Y possui regiões de acúmulo *Helitron Ooc* nas regiões intersticiais dos dois braços cromossômicos e na região terminal do braço curto, além de segmentos contendo cópias dispersas em regiões subterminais de ambos os braços cromossômicos (Figuras 3D e 4H). Em *O. personata* foi observado sítios dispersos de *Helitron Ooc* em quatro regiões no braço longo e em uma região no braço curto do cromossomo Y (Figuras 3F e 4L). Não foi possível detectar o elemento *Helitron Ooc* em células meióticas contendo o cromossomo Y de *O. magniguttis*.

4 DISCUSSÃO

Estudos de composição e distribuição de TEs despertam grande interesse para o entendimento da estrutura e função genômica (Kidwell, 2002). A estrutura cariotípica das quatro espécies de *Omophoita* (*O. octoguttata*, *O. sexnotata*, *O. personata* e *O. magniguttis*) utilizadas neste estudo foi descrita anteriormente por Virkki, 1983 e Almeida et al. (2009). Nestes trabalhos foi demonstrado, a partir da análise das células meióticas que estas espécies detinham organização cariotípica similar de $2n=10II+X+Y$ e, cromossomos sexuais X e Y gigantes, e assinápticos com segregação regular. Contudo, pouco se sabe sobre a composição e distribuição de DNAs repetitivos neste gênero de Coleoptera o primeiro trabalho foi de Mello et al., (2014). Em um estudo cromossômico posterior, Rosolen et al. (2018) localizaram *in situ* sequências dos TEs Tc1-Mariner e RTE nos cromossomos de três espécies de *Omophoita* e verificaram um grande acúmulo destas sequências no genoma, com diferenças interespecíficas, as quais possivelmente atuaram no processo de

diferenciação dos cromossomos sexuais e aumento do tamanho dos cromossomos sexuais e por consequência nos genomas. Neste estudo, com a localização das sequências *Copia Ooc parcial*, *Gypsy Ooc parcial*, *Harbinger/Hat Ooc parcial* e *Helitron Ooc parcial* também é possível verificar um grande acúmulo destes transposons e retrotransposons nos cromossomos de *Omophoita*, os quais também atuaram na expansão do tamanho cromossômico e do genoma.

Todas as sequências de TEs obtidas neste estudo (*Copia Ooc parcial*, *Gypsy Ooc parcial*, *Harbinger/Hat Ooc parcial* e *Helitron Ooc parcial*) são cópias defectivas presentes no genoma de *O. octoguttata* e compartilhada com as outras espécies analisadas. Os TEs são descritos por apresentar um "ciclo de vida" no genoma (Kidwell e Lisch, 2001). Neste ciclo, após o surgimento os TEs têm uma fase curta de invasão/propagação no genoma, um estágio de maturidade onde apresentam um equilíbrio entre a amplificação e perda de cópias e, a senescência, onde os elementos autônomos são perdidos e, as sequências não autônomas deterioram e permanecem neutras ou divergem em função nos genomas (Kidwell e Lisch, 2001). Cópias não funcionais, não autônomas e com alto índice de degeneração mutacional são frequentes nos genomas de eucariotos (Kidwell e Lisch, 2001; Fernández-Medina et al., 2012; Schemberger et al., 2014, 2016; Primo et al., 2018; Rosolen et al., 2018).

O número de cópias autônomas de um determinado TE é extremamente baixo, por vezes inexistente em inúmeras espécies (Muñoz-López e García-Pérez, 2010). Neste estudo, foram identificadas cópias com alto índice de degeneração mutacional, o que é reflexo de uma provável fase de senescência para os TEs *Copia*, *Gypsy*, *Harbinger/hAT* e *Helitron* em *Omophoita*. Essa alta degeneração mutacional visualizada nas sequências dificulta a obtenção de longos segmentos de similaridade genética para os TEs conhecidos em bancos de dados, principalmente em organismos sem genomas organizados e/ou, sem genomas de referência em espécies relacionadas filogeneticamente, como é o caso de *Omophoita*.

Apesar do alto índice de degeneração mutacional dos TEs obtidos, como esperado para as inúmeras cópias de TEs paralogas que estão senescentes nos genomas (Kidwell e Lisch, 2001), estas sequências são úteis em experimentos de localização cromossômica e estudos de diferenciação cariotípica. Embora a estrutura cariotípica similar das espécies de *Omophoita* estudadas (Almeida et al., 2009), as diferenças observadas para o acúmulo de TEs nos cromossomos sexuais

gigantes de *O. octoguttata*, *O. sexnotata*, *O. personata* e *O. magniguttis* corroboram com as propostas que os TEs podem atuar na origem da restrição da recombinação dos cromossomos sexuais, conforme proposto em inúmeros grupos (Steinemann e Steinemann, 1998; Charlesworth et al., 2005; Schemberger et al., submetido para publicação).

Contudo, atualmente os cromossomos sexuais XY de *Omophoita* são completamente assinápticos. Em outros grupos com cromossomos assinápticos foi demonstrado que estes cromossomos demandam de uma complexa maquinaria proteica para a segregação regular (De La Fuente et al., 2007). Pouco se sabe sobre a estrutura da cromatina e tipos de sequências de DNA presentes em cromossomos sexuais assinápticos de *Omophoita* (Almeida et al., 2009; Mello et al., 2014; Goll et al., 2018; Rosolen et al., 2018). No entanto, os dados obtidos abrem perspectivas de uma possível influência do grande número de cópias de TEs de diferentes tipos (como os elementos Tc1-Mariner, RTE, Copia, Gypsy, Harbinger/hAT e Helitron) na diferenciação entre os cromossomos X e Y e perda de homologia neste grupo de Coleoptera.

A maioria dos TEs está presente nos genomas em heterocromatinas onde encontrariam regiões menos propensas a seleção purificadora (Biémont et al., 1997). Contudo, TEs presentes em eucromatinas foram descritos a ocupar regiões internas aos genes, em suas regiões regulatórias ou em regiões intergênicas (Biémont et al., 1997). A comparação das regiões heterocromáticas dos cromossomos de *Omophoita* (Almeida et al., 2009; Mello et al., 2014) com a localização *in situ* dos elementos Copia, Gypsy, Harbinger/hAT e Helitron, deste estudo, demonstraram que os maiores acúmulos dos TEs são em regiões heterocromáticas dos autossomos e dos cromossomos sexuais X e Y. Contudo, um grande número de cópias destes TEs também foram detectadas dispersas nas regiões eucromáticas, principalmente para os cromossomos X e Y.

Montiel et al. (2012) descreveram que genomas gigantes detêm regiões eucromáticas potencialmente toleráveis a inserções de TEs. Em genomas gigantes os TEs teriam um maior tamanho de cromatina contendo regiões de espaçadores intergênicos, pseudogenes e sequências repetitivas para as suas inserções e, estas regiões estariam menos sujeitas a seleção purificadora (Montiel et al., 2012). Outros estudos demonstraram que TEs podem ter suas inserções de cópias facilitadas em eucromatinas, as quais têm cromatina em menor nível de compactação (Dietrich et

al., 2002; Liu et al., 2009). Toda a vasta inserção de TEs visualizada neste estudo corrobora com a proposta de intenso acúmulo de TEs e o aumento do tamanho dos cromossomos sexuais e genoma das espécies de *Omophoita* (Rosolen et al., 2018). Em outra via é possível inferir que estes TEs dispersos em regiões eucromáticas poderiam atuar na diversificação e/ou origem de genes ou sequências regulatórias nestas espécies, como proposto em vários grupos (Feschotte, 2008; Lowe e Haussler, 2012; Souza et al., 2013).

Uma questão intrigante na biologia evolutiva é a atuação dos cromossomos sexuais na especiação (Orr, 1997; Presgraves e Orr, 1998; Coyne e Orr, 1989, 2004; Pucci et al., 2014; Filatov, 2018; Nascimento et al., 2018). O conjunto de dados cromossômicos obtidos neste estudo e àqueles de Rosolen et al. (2018) permitem distinguir diferenças para a localização dos TEs nos cromossomos sexuais gigantes das quatro espécies de *Omophoita* e, estas entre outras poderiam ter contribuído na origem da diferenciação entre as linhagens e geração da incompatibilidade reprodutiva. Em um estudo cladístico utilizando dois marcadores moleculares para espécies de *Oedionychina* foi demonstrado que *O. octoguttata* e *O. personata* são intimamente relacionadas (Duckett e Kjer, 2003). Embora estudos mais densos de distância genética são necessários, neste grupo é possível inferir que *O. octoguttata*, *O. sexnotata*, *O. personata* e *O. magniguttis* são intimamente relacionadas, com as principais diferenças cromossômicas atreladas à diversificação dos cromossomos sexuais.

Uma comparação mais detalhada para a distribuição dos TEs nos cromossomos sexuais de *O. octoguttata*, *O. sexnotata*, *O. personata* e *O. magniguttis* demonstra diferentes regiões estruturais para a cromatina, especialmente no cromossomo Y. É conhecido que os TEs acumulam dando origem a regiões de restrição de recombinação nos cromossomos sexuais heteromórficos Y ou W (Steinemann e Steinemann, 1998, 2005; Dimitri et al. 2003; Charlesworth et al., 2005; Kaiser e Bachtrog, 2010; Sigman et al., 2016; Schemberger et al., submetido para publicação). Contudo, não é comum a visualização de um intenso acúmulo de TEs na diferenciação dos cromossomos sexuais X ou Z, como observado para os cromossomos X destas quatro espécies de *Omophoita*.

É conhecido também que a invasão dos TEs pode alterar o tamanho, o conteúdo gênico e a expressão dos genes contidos nos cromossomos sexuais (Chalopin et al., 2015) e/ou criar novos genes e promover alteração de rotas de

regulação gênica nos genomas (Feschotte e Pritham, 2007; Feschote, 2008; Fedoroff, 2012). A grande quantidade de TEs em regiões eucromáticas nas quatro espécies de *Omophoita* estudadas pode ter desencadeado uma série de mutações gênicas espécie-específicas, especialmente nos cromossomos X. Este cenário é congruente com a regra de Haldane, com a regra do grande efeito do X e, com a proposta dos “genes da especiação” para a diversificação de linhagens incipientes (Haldane, 1922; Coyne e Orr, 1989; Qvarnström e Bailey, 2009). Nestas propostas o evento chave para a especiação é a diversificação de regiões ou genes presentes nos cromossomos X de linhagens próximas (Haldane, 1922; Coyne e Orr, 1989; Qvarnström e Bailey, 2009). Os nossos dados para a distribuição dos TEs nos genomas de *O. octoguttata*, *O. sexnotata*, *O. personata* e *O. magniguttis* demonstraram que estes podem ter sido os catalisadores de uma série de mudanças genômicas, especialmente nos cromossomos sexuais X e Y. Segundo Fedoroff (2012), a mobilização dos TEs promovem uma reestruturação ativa do genomas e, estas mudanças podem atuar na especiação. Estes dados abrem perspectiva para a avaliação genômica deste intenso acúmulo de TEs nos cromossomos sexuais e sua provável modificação de genes, bem como se esta invasão de TEs influenciou na redução da introgressão gênica durante a divergência de espécies.

Os resultados de localização *in situ* observados com as sequências *Copia Ooc parcial*, *Gypsy Ooc parcial*, *Harbinger/hAT Ooc parcial* e *Helitron Ooc parcial* mostraram que os TEs tiveram grande invasão nos genomas de *O. octoguttata*, *O. sexnotata*, *O. personata* e *O. magniguttis*. Estas cópias parálogas de TEs devem estar senescentes nos genomas devido à alta degeneração mutacional das sequências obtidas. Nosso estudo adiciona novos dados para a proposta de que a movimentação e plasticidade dos TEs influenciaram no aumento do tamanho dos cromossomos sexuais e por consequência dos genomas de *Omophoita*, bem como, que os TEs tiveram grande participação na diversificação dos cromossomos sexuais gigantes destas espécies (Rosolen et al., 2018). Os resultados demonstraram também acúmulos diferenciais dos TEs entre as quatro espécies, principalmente para a composição do cromossomo Y quando comparada ao X. Esse achado indica que os TEs têm se inserido/movimentado de maneira desigual na diferenciação do X e Y das linhagens evolutivas estudadas e, que estas diferenças podem ter contribuído para a ausência de homologia entre os membros do par de cromossomos sexuais, os quais atualmente são assinápticos. Em última análise, o

número excessivo de cópias TEs nos cromossomos X das quatro espécies abre perspectiva de análise do papel catalisador dos TEs na modificação de genes envolvidos na especiação em *Omophoita*. Além disso, comparações da presença/ausência dessas sequências de TEs em espécies relacionadas e mais basais com sexuais que mantêm homologia e são sinápticos poderiam elucidar os mecanismos dos cromossomos sexuais.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho teve o apoio do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Finance Code 001), Secretaria de Ciência e Tecnologia do Estado do Paraná (SETI-PR) e Fundação Araucária (Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná). Os autores agradecem ao especialista Carlos Campaner pela ajuda na identificação das espécies.

Tabela 1. Sequências dos primers e dados da PCR dos TEs utilizados neste estudo com DNA de *Omophoita octoguttata*.

TE	Sequência do primer	Amplicon esperado	Temperatura de Anelamento
Copia	Fw 5'-TTTCCCTCATTGTGATACAGCG-3'	~800 pb	59° C
	Rv 5'-GGTTCTGGACCTTGGAGATGA-3'		
Gypsy	Fw 5'-ATGATCCATACCCTGCTGAT-3'	~700 pb	56° C
	Rv 5'-ATGATCCAGACCCAACAGAA-3'		
Harbinger	Fw 5'-TTCAGGTTTCATCTTGGGATTGGG-3'	~1000 pb	61° C
	Rv 5'-AGTACTCTTGGGTGCCCTCG-3'		
Helitron	Fw 5'-CTCTATAGAATTTGGTGACTCTAGA-3'	~400 pb	58° C
	Rv 5'-TTAGGAGACCCACAGAATAGT-3'		

Obs. Os primers inicialmente utilizados foram os desenhados para TEs da biblioteca de DNAs repetitivos de *Apareiodon* sp. (Schemberger et al., submetido para publicação). Posteriormente a amplificação e sequenciamento de DNA, os primers acima foram desenhados especificamente para *Omophoita*.

Tabela 2. Sumário dos dados obtidos para a similaridade genética dos TEs obtidos de *Omophoita octoguttata*.

TE	Tamanho	Segmento similar à TE	Similaridade no Girinst	Similaridade no Pfam e BlastX
Copia Ooc parcial	716 pb	81 pb (586-667 pb)	72.8% Copia-26_CQ-I de <i>Culex quinquefasciatus</i>	-
Gypsy Ooc parcial	644 pb	591 pb (38-628 pb)	67.5% GYPSY39_AG de <i>Anopheles gambiae</i>	70% RT_LTR e RVT_1
HARB/ hAT Ooc parcial	882 pb	77 pb (24-101 pb) e 121 pb (601-722 pb)	75% HARB-1_TA de <i>Triticum aestivum</i> 70% hAT-N7B_Crp de <i>Crocodylus porosus</i>	-
Helitron Ooc parcial	327 pb	89 pb (10-99 pb) e 182 pb (100-282 pb)	39.7% Helitron-1_BTa de <i>Bemisia tabaci</i> 55.7% Helitron-1_PM de <i>Petromyzon marinus</i>	63.96% Helicase PIF1

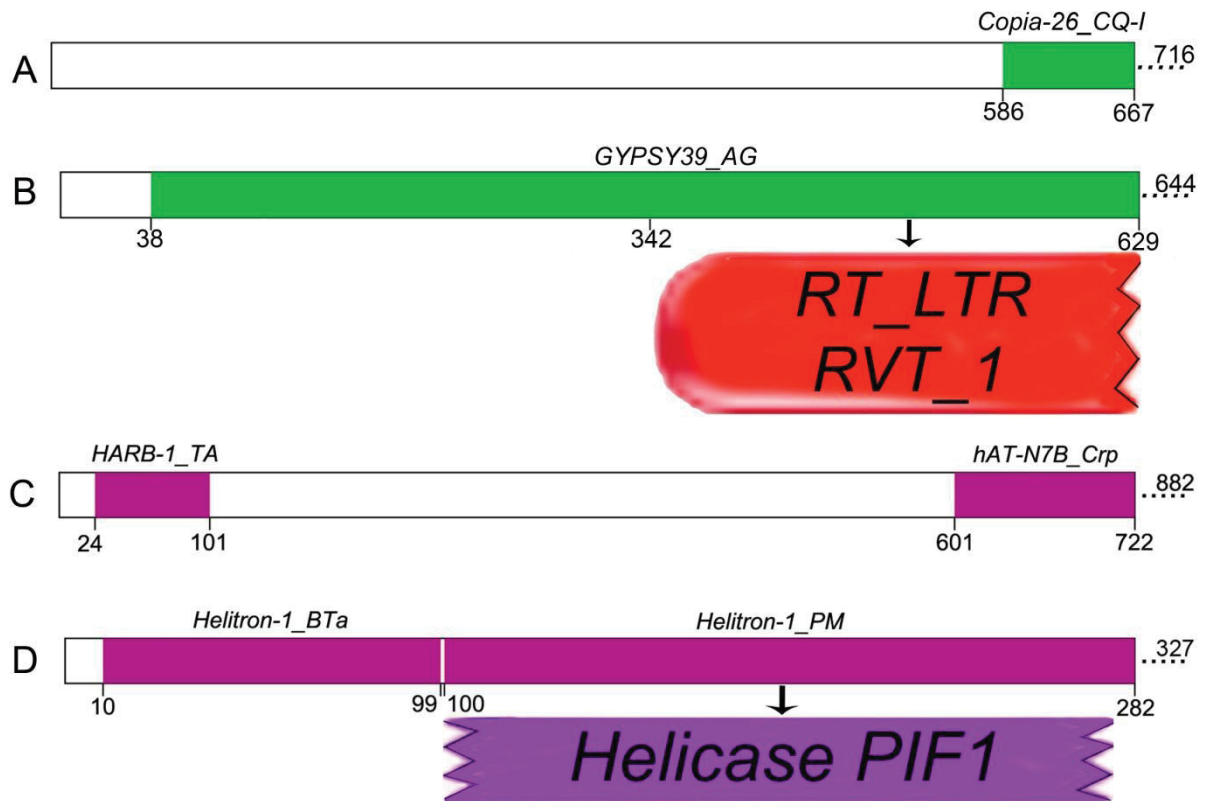


Figura 1. Representação das sequências parciais dos elementos transponíveis obtidas de *Omophoita octoguttata*. A sequência A tem 716 pb e um segmento de 81 pb com similaridade ao TE Retrotransposon LTR *Copia-26_CQ-I*; A sequência B tem 644 pb e um segmento de 591 pb com similaridade ao Retrotransposon LTR *GYPSY39_AG*, esta sequência contém um domínio proteico truncado para a enzima Transcriptase Reversa *RT_LTR* e *RVT_1* entre os segmentos 342 a 629 pb. A sequência C tem 882 pb e dois fragmentos com similaridade à DNA transposons, 77 pb relacionado ao TE *HARB-1_TA* e 121 pb ao *hAT-N7B_Crp*; A sequência D tem 327 pb e dois segmentos lado a lado com similaridade ao DNA transposon *Helitron*, 89 pb ao *Helitron-1_BTa* e 182 pb ao *Helitron-1_PM*, esta sequência contém um domínio proteico truncado para a enzima *Helicase PIF1* entre os segmentos 100 a 282 pb.

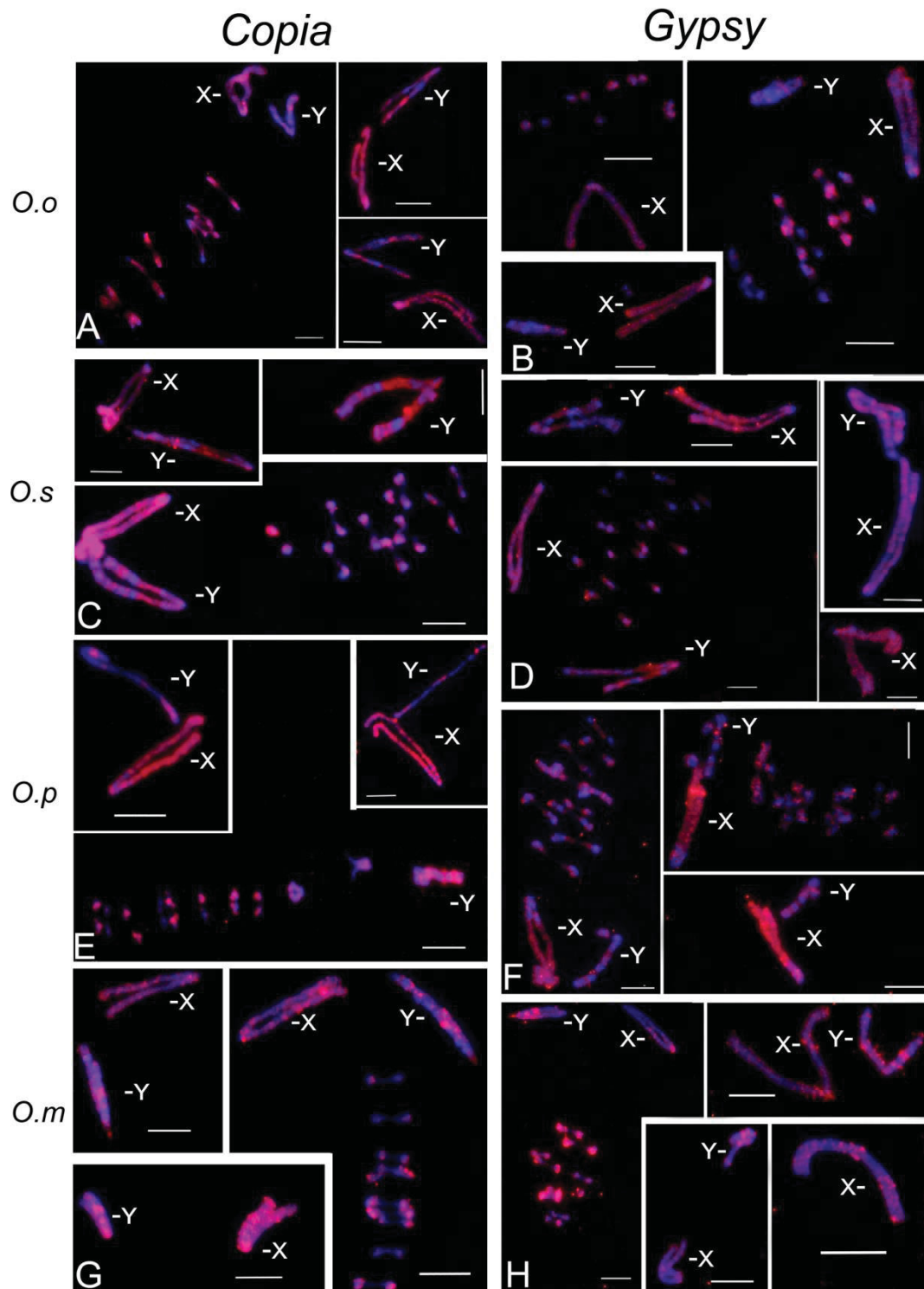


Figura 2. Células meióticas das espécies de *Omophoita* submetidas à FISH com sondas dos Retrotransposons LTRs: *Copia Ooc parcial* e *Gypsy Ooc parcial* respectivamente. *O.o* = *O. octoguttata* (A-B); *O.s* = *O. sexnotata* (C-D); *O.p* = *O. personata* (E-F) e, *O.m* = *O. magniguttis* (G-H). Barra = 10 μ M.

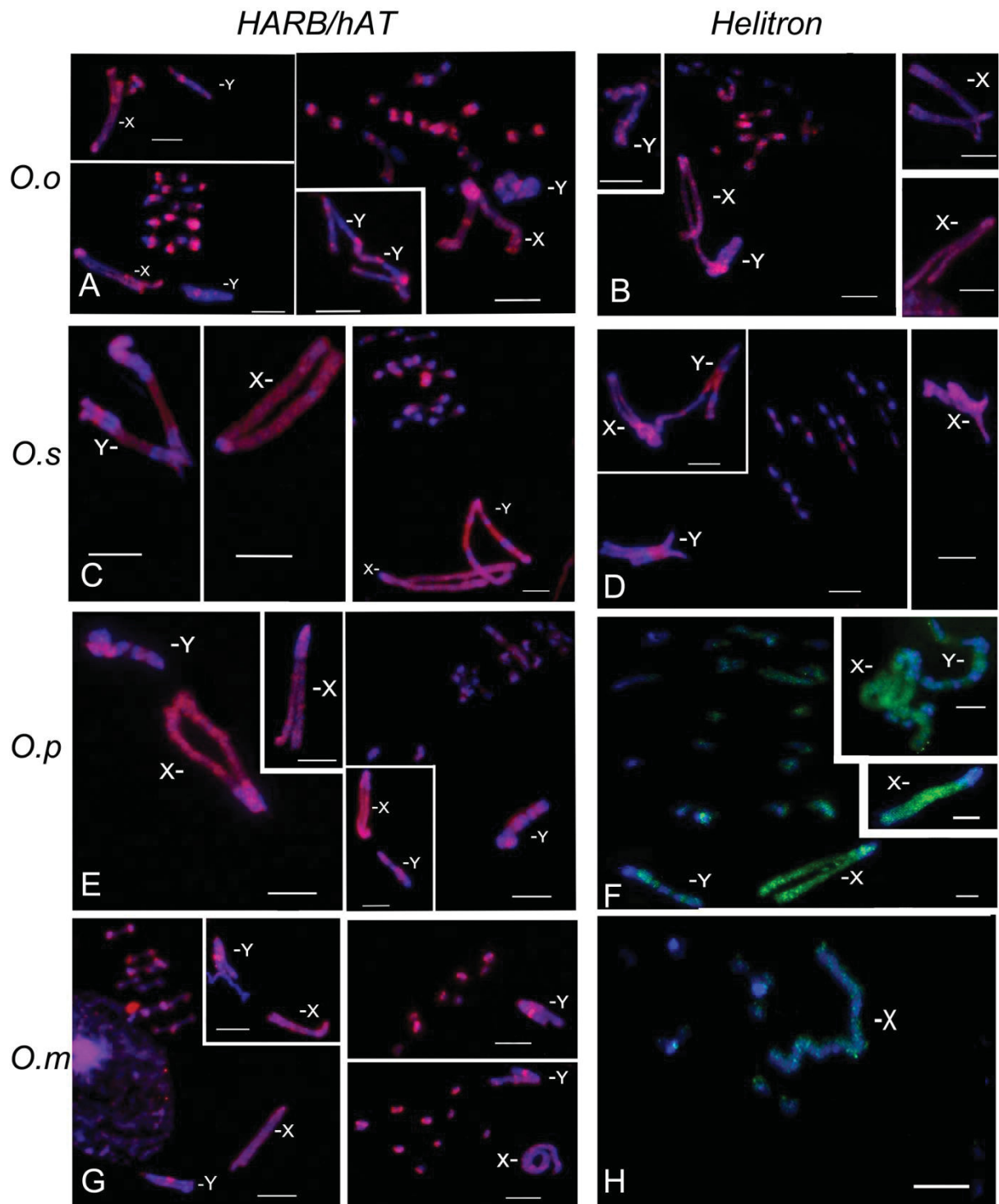


Figura 3. Células meióticas das espécies de *Omophoita* submetidas à FISH com sondas dos transposons de DNA *HARB/hAT Ooc parcial* e *Helitron Ooc parcial* respectivamente. *O.o* = *O. octoguttata* (A-B); *O.s* = *O. sexnotata* (C-D); *O.p* = *O. personata* (E-F) e, *O.m* = *O. magniguttis* (G-H). Barra = 10 μ M.

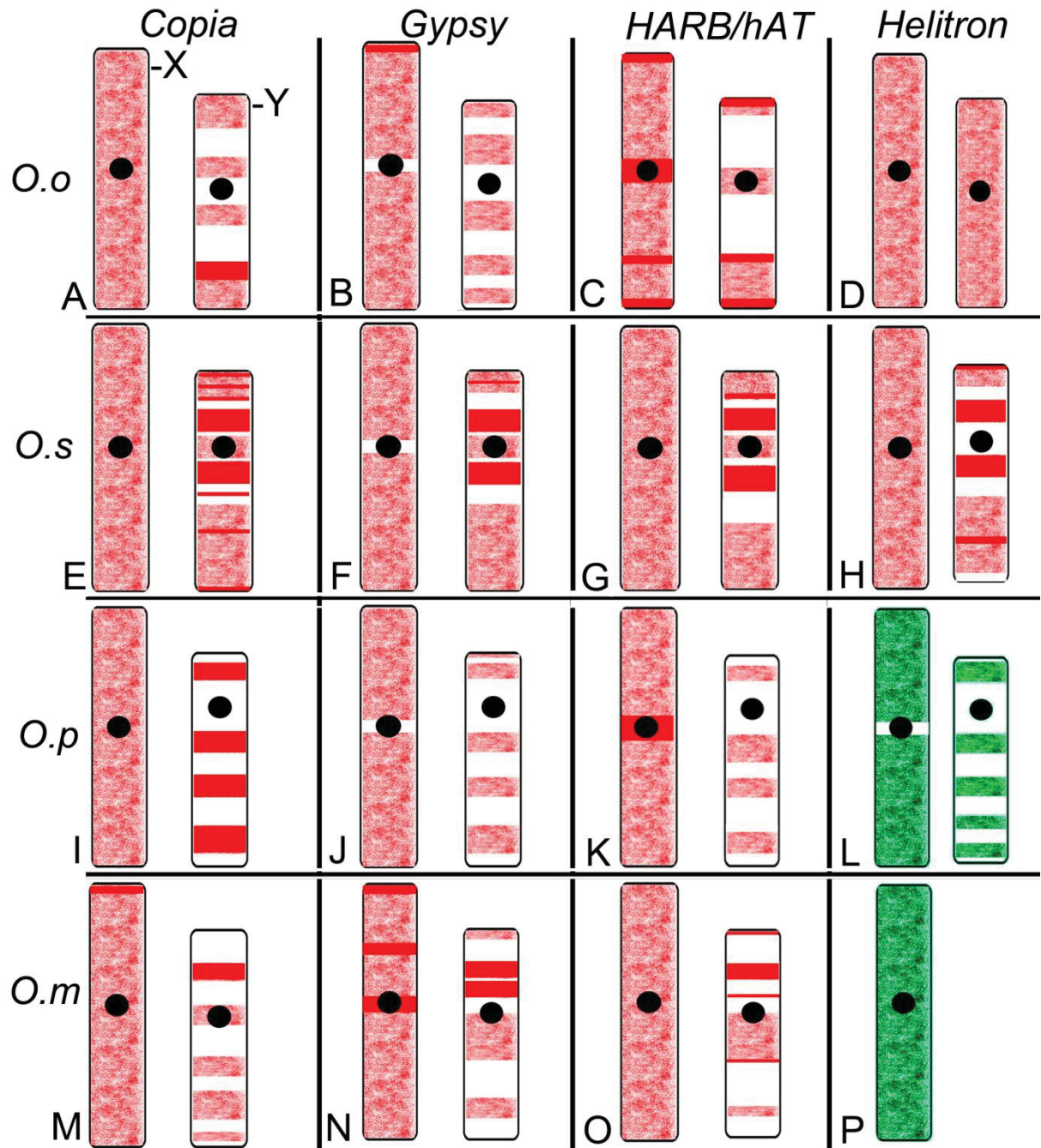


Figura 4. Ideogramas representativos dos cromossomos sexuais X Y com a localização dos TEs Copia, Gypsy, HARB/hAT e Helitron (cores vermelho ou verde) nas espécies: *O.o* = *O. octoguttata* (A-D); *O.s* = *O. sexnotata* (E-H); *O.p* = *O. personata* (I-L) e , *O.m* = *O. magniguttis* (M-P). Os círculos pretos correspondem a região centromérica.

REFERÊNCIAS

As referências utilizadas neste artigo se encontram ao final da tese.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados observados neste estudo mostraram que houve grande invasão de elementos transponíveis nos genomas das espécies *Omophoita octoguttata*, *Omophoita sexnotata*, *Omophoita personata* e *Omophoita magniguttis*. Os TEs *Tc1-Mariner*, *RTE Ooc*, *Gypsy Ooc*, *Copia Ooc*, *HARB/hAT Ooc* e *Helitron Ooc* foram obtidos e caracterizados, e as hibridações *in situ* mostraram acúmulos intensos destes TEs em todos os autossomos e, principalmente nos cromossomos sexuais. Devido a este intenso número de cópias parálogas foi sugerido que os TEs participaram doando sequências para a composição do tamanho gigante dos cromossomos sexuais X e Y dessas espécies de *Omophoita*, bem como do aumento do tamanho do genoma nesta subtribo Oedionychina.

Essas abundâncias de TEs nas espécies podem ter sido influenciados por diversos fatores, entre eles a transferência horizontal de TEs planta-inseto, principalmente relacionado aos Retrotransposons LTR, o que reforça a ideia de que os TEs são uma importante força motriz evolutiva que molda o genoma de insetos.

Os nossos dados permitiram caracterizar somente cópias não autônomas de TEs, com alto índice de degeneração molecular. Os resultados das hibridações *in situ* mostraram acúmulos tanto nas regiões heterocromáticas como em regiões eucromáticas, indicando que esses TEs possam estar atuando em modificações de regiões gênicas, bem como interferindo na regulação da atividade de genes.

Os acúmulos de TEs em heterocromatinas podem estar relacionados à metilação do DNA e de histonas como forma de defesa de suas invasões. Esses processos de heterocromatinização poderiam estar relacionados também na diferenciação, origem e expansão do tamanho dos cromossomos sexuais.

Além disso, os acúmulos diferenciais de TEs nos cromossomos sexuais entre as espécies destacam que estes elementos têm se movimentado nos genomas de maneira diferencial nas diferentes linhagens evolutivas. Desta forma, podem ter estado presentes na especiação do grupo, pois a mobilização de TEs promove reestruturação ativa dos genomas, como é o que parece ter acontecido entre as quatro espécies de *Omophoita* analisadas. Os resultados dos acúmulos foram diferenciais, principalmente para o cromossomo Y, podendo ter contribuído em grande escala para sua falta de homologia com o X, levando-os a serem assinápticos na meiose. Em outra via, a grande quantidade de TEs nos

cromossomos X em pontos diferenciais entre as quatro espécies estudadas podem ter modificado regiões gênicas. Essas modificações de genes dos cromossomos X corroboram com a regra de Haldane, regra do grande efeito do X e dos “genes da especiação” nos cromossomos sexuais para a evolução da incompatibilidade reprodutiva entre espécies incipientes.

Por fim, é possível afirmar que os TEs tiveram grande papel na reorganização cromossômica nas quatro espécies de *Omophoita*, principalmente relacionadas aos autossomos e cromossomos sexuais. Provavelmente esses elementos, devido a sua mobilidade e plasticidade nos genomas expandiram os cromossomos X e Y ao longo do tempo na subtribo Oedionychina, promovendo a diferenciação deste grupo.

REFERÊNCIAS

- ABAD, J. P.; PABLOS, B.; OSOEGAWA, K.; JONG, P. J.; MARTÍN-GALLARDO, A.; Villasant A. TAHRE, a Novel Telomeric Retrotransposon from *Drosophila melanogaster*, Reveals the Origin of *Drosophila* Telomeres. **Mol Biol Evol**, Oxford v. 2, n. 9, p.1620-1624, sep. 2004.
- AKSENOVA, A. Y.; MIRKIN, S. M. At the Beginning of the End and in the Middle of the Beginning: Structure and Maintenance of Telomeric DNA Repeats and Interstitial Telomeric Sequences. **Genes**, Basel v. 10, n. 2, p. 118. fev. 2019.
- ALMEIDA, M. C.; ZACARO, A. A.; CELLA, D. M. Cytogenetic analysis of *Epicauta atomaria* (Meloidae) and *Palembus dermestoides* (Tenebrionidae) with Xy p sex determination system using standard staining, C-bands, NOR and synaptonemal complex microspreading techniques. **Hereditas**, London, v. 133, n. 2, p.147–157, dec. 2000.
- ALMEIDA, M. C.; CAMPANER, C.; CELLA, D.M. Karyotype characterization, constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions of *Paranaita opima* (Coleoptera, Chrysomelidae, Alticinae). **Genet Mol Biol**, São Paulo, v. 29, n. 3, p. 475-481, jan. 2006.
- 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**, New York, v. 40, n. 5-6, p. 586–596, mar. 2009.
- ALMEIDA, M. C.; GOLL, L.G.; ARTONI, R.F.; NOGAROTO, V., MATIELLO, R.R.; VICARI, M.R. Physical mapping of 18S rDNA cistron in species of the *Omophoita* genus (Coleoptera, Alticinae) using fluorescent in situ hybridization. **Micron**, New York, vol. 41, n. 7, p.729-34, oct. 2010.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z. et al. Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res**, London, v. 25, n. 17, p. 3389– 3402, sep. 1997.
- AMORIM, I. C. et al . Characterization and chromosomal mapping of the DgmarMITE transposon in populations of *Dichotomius* (Luederwaldtinia) sericeus species complex (Coleoptera: Scarabaeidae). **Genet. Mol. Biol.**, São Paulo, v. 41, n. 2, p. 419-425, Jun. 2018.
- ARNETT, R. H.; THOMAS, M. C.; SKELLEY, P. E.; FRANK, J. J. **American Beetles. Polyphaga: Scarabaeoidea through Curculionoidea**. vol 2. CRC Press, Boca Raton, CA, 2002. p. 861.
- BADAEVA, E. D.; DEDKOVA, O. S.; GAY, G.; PUKHALSKYI, V. A.; ZELENIN, A. V.; BERBARD, S.; BERBARD, M. Chromosomal rearrangements in wheat: their types and distribution. **Genome**. New York, v. 50, n. 10, p. 907–926, oct. 2007.

- BARBOSA, P.; PUCCI, M. B.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M. C.; ARTONI, R. F.; VICARI, M. R. Karyotype analysis of three species of *Corydoras* (Siluriformes: Callichthyidae) from southern Brazil: rearranged karyotypes and cytotaxonomy. **Neotrop Ichthyol**, Maringá, v. 15, n. 1, p. e160056, Apr. 2017.
- BARROS, A. V.; WOLSKI, M. A. V.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M. C.; MOREIRA-FILHO, O. VICARI, M. R. Fragile sites, dysfunctional telomere and chromosome fusions: what is 5S rDNA role? **Gene**, Amsterdam, v. 608, p. 20–27, apr. 2017.
- BELYAYEV, A. Bursts of transposable elements as an evolutionary driving force. **J Evol Biol**, Basel, v. 27, n. 12, p. 2573–2584, dec. 2014.
- BIÉMONT, C.; VIEIRA, C.; HOOGLAND, C.; CIZERON, G.; LOEVENBRUCK, C.; ARNAULT, C.; CARANTE, J. P. Maintenance of transposable element copy number in natural populations of *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. **Genetica**, s'-Gravenhage, v. 100, n. 1-3, p. 161-166, feb. 1997.
- BIÉMONT, C.; VIEIRA, C. Junk DNA as an evolutionary force. **Nature**, London v. 443, n. 7111, p. 521–524, oct. 2006.
- BIONE, E.; CAMPAROTO, M. L.; SIMÕES, Z. L. P. A study of the constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions of *Isocopriss inhiata* and *Diabrostis mimas* (Coleoptera: Scarabaeidae, Scarabaeinae) using C-banding, AgNO₃ staining and FISH techniques. **Genet Mol Biol**, São Paulo, v. 28 n. 1 p. 111–116, mar. 2005.
- BOLZÁN, A. D. “Interstitial Telomeric Sequences in Vertebrate Chromosomes: Origin, Function, Instability and Evolution”. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 773, p. 51–65 jul. 2017.
- BORROR, D. J.; DeLONG, D. M. Introdução ao estudo dos insetos. São Paulo: **Edgard Blücher Ltda**, 1988. p. 653.
- BRELIH, S.; DÖBERL, M.; DROVENIK, B.; PIRNAT, A. Gradivo za favno hroščev (Coleoptera) Slovenije. Prispevek. Polyphaga: Chrysomeloidea (Phytophaga): Chrysomelidae: Alticinae. Materialien zur Käferfauna (Coleoptera) Beitrag: Polyphaga: Chrysomeloidea (Phytophaga): Chrysomelidae: Alticinae. **Slovenian: Scopolia**. 2003, p.1–279.
- BUSSIEK, M.; HOISCHEN, C.; DIEKMANN, S.; BENNINK, M. L. Sequence-specific physical properties of African green monkey alpha-satellite DNA contribute to centromeric heterochromatin formation. **Journal of Structural Biology**, Amsterdam, v. 167, n. 1, p. 36-46, jul. 2009.
- 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**, Basingstoke, v. 104, n. 4, p. 393-400, sep. 2010.

- CABRAL-DE-MELLO, D. C.; MOURA, R. C.; MARTINS, C. Cytogenetic Mapping of rRNAs and Histone H3 Genes in 14 Species of *Dichotomius* (Coleoptera, Scarabaeidae, Scarabaeinae) Beetles. **Cytogenet Gen Res**, Basel, v. 134, n. 2, p. 127–135, may. 2011.
- CÁCERES, M.; RANZ, J. M.; BARBADILLA, A.; LONG, M.; RUIZ, A. Generation of a widespread *Drosophila* inversion by a transposable element. **Science**, Washington, ano 16, v. 285, n. 5426, p. 415–418, jul. 1999.
- CAPINERA, J. L. Capinera Encyclopedia of Entomology (second ed.), vols. 1–4 The Netherlands. **Springer Dordrecht**, 2008, p. 4346,
- CASALS F, CÁCERES M, RUIZ A: The Foldback -like transposon Galileo is involved in the generation of two different natural chromosomal inversions of *Drosophila buzzatii* . **Mol Biol Evol**, Oxford 20:674–685, 2003.
- CHALOPIN. D.; VOLFF, J. N.; GALIANA, D.; ANDERSON, J. L.; SCHARTL, M. Transposable elements and early evolution of sex chromosomes in fish. **Chromosome Res**, Oxford, v. 23, n. 3, p. 545–560, sep. 2015.
- CHARLESWORTH, B.; et al. The Evolutionary Dynamics of Repetitive DNA in Eukaryotes. **Nature**, London, v. 371, n. 6494, p. 215–20, sep. 1994.
- CHARLESWORTH, D.; et al. Steps in the Evolution of Heteromorphic Sex Chromosomes”. **Heredity**, Basingstoke, v. 95, n. 2, p. 118–28, aug. 2005.
- CHEN, J. M.; COOPER, D. N.; FEREC, C.; KEHRER-SAWATZKI, H.; PATRINOS, G. P. Genomic rearrangements in inherited disease and cancer. **Semin. Cancer Biol**, Philadelphia, v. 20, n. 4, p. 222–233, aug. 2010.
- COAN, R.; MARTINS, C. Structural and functional analysis of transposable elements focusing on B chromosomes of the cichlid fish *Astatotilapia latifasciata*. **Genes**, Basel, v. 9, p. 269–287, may. 2018.
- COSTA, C.; VANIN, S.A.; CASARI-CHEN, S.A. Larvas de Coleoptera do Brasil. São Paulo, **Museo de Zoologia, USP**, Brasil, 1988, p. 282.
- COSTA, L. P. The historical bridge between the Amazon and the Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. **Journal of Biogeography**, Oxford, v. 30, p. 71–86, jan. 2003.
- COSTA, J. N. M.; SALLET, L. A. P.; SOUZA, F. F.; GAMA, F. C.; TEIXEIRA, C. A. D. Crisomelídeos associados às culturas do feijão comum (*Phaseolus vulgaris* (L.) e melancia (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum & Nakail) em Rondônia. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Rondonia ISSN**, 2006, p. 13.
- COYNE, J. A.; ORR, H. A. The two rules of speciation. IN D. OTTE, & J. ENDLER (EDS.), Speciation and its consequences. **Sunderland, MA: Sinauer Associates**, 1989, p. 180–207.

- COYNE, J. A.; ORR, H. A. Speciation. Sunderland, MA: **Sinauer Associates**, 2004, p. 545.
- DE LA FUENTE, R. et al. Meiotic Pairing and Segregation of Achiasmate Sex Chromosomes in Eutherian Mammals: The Role of SYCP3 Protein. **PLoS Genetics**, San Francisco, v. 3, n. 11, p. e198, nov. 2007.
- DE LA RÚA, P.; SERRANO, J.; HEWITT, G.M.; GALIÁN, J. Physical mapping of rDNA genes in the ground beetle *Carabus* and related genera (Carabidae: Coleoptera). **J Zool Syst Evol Res**, Blackwell v. 34, n. 2, p. 95-101, jun. 1996.
- DIETRICH, C. R.; CUI, F.; PACKILA, M. L.; LI, J.; ASHLOCK, D. A.; NIKOLAU, B. J.; SCHNABLE, P. S. Maize Mu transposons are targeted to the 5' untranslated region of the gl8 gene and sequences flanking Mu target-site duplications exhibit nonrandom nucleotide composition throughout the genome. **Genetics**, Baltimore v. 160, n. 2, p. 697–716, feb. 2002.
- DIMITRI, P.; JUKANOVIC, N.; ARCA, B. Colonization of heterochromatic genes by transposable elements in *Drosophila*. **Mol Biol Evol**, Oxford, v. 20, n. 4, p. 503–512, apr. 2003.
- DOAK, T. G.; DOERDER, F. P.; JAHN, C. L.; HERRICK, G. A proposed superfamily of transposase genes: transposon-like elements in ciliated protozoa and a common “D35E” motif. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, v. 91, n. 3, p. 942–946, feb. 1994.
- DOSDALL, L. M.; MASON, P. G. Key pests and parasitoids of oilseed rape or canola in North America and the importance of parasitoids in integrated management. In: Williams IH, editor. Biocontrol-based integrated management of oilseed rape pests. **Dordrecht: Springer**, 2010, p. 167–213.
- DUCKETT, C. N.; KJER, K. Cladistic analysis of the Oedionychines of southern Brazil (Ga-lerucinae: Alticini) based on two molecular markers. In: Furth D (Ed.) Special topics in leaf beetle biology. Proceedings of the Fifth International Symposium on the Chrysomelidae. **Pensoft Publishers, So.a**, 2003, p.117–132.
- EICHLER, E. E.; SANKOFF, D. Structural dynamics of eukaryotic chromosome evolution. **Science**, New York, ano 8, v. 301, n. 5634, p. 793-797, aug. 2003.
- ELDER, J.F.; TURNER, B.J. Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes **Q Rev Biol**, Chicago, vol. 70, n. 3, p. 297–320, sep.1995.
- EL-GEBALI, S.; MISTRY, J.; BATEMAN, A.; EDDY, S. R.; LUCIANI, A.; POTTER, S. C.; QURESHI, M.; RICHARDSON, L. J.; SALAZAR, G. A.; SMART, A.; SONNHAMMER, E. L. L.; HIRSH, L.; PALADIN, L.; PIOVESAN, D.; TOSATTO, S. C. E.; FINN, R. D. The Pfam protein families database in 2019. **Nucleic Acids Research**, London, v. 47, n. D1, p. D427-D432, jan. 2019.
- ELLEGREN, H. Microsatellites: Simple sequences with complex evolution. **Nature Rev Genet**, London, v. 5, n. 6, p. 435–445, jun. 2004.

- EVANS, A. L.; MENA, P. A.; MCALLISTER, B. F. Positive selection near an inversion breakpoint on the neo-X chromosome of *Drosophila americana*. **Genetics**, s'-Gravenhage, v. 177, n. 3, p.1303–1319, nov. 2007.
- FEDOROFF, N. V. Transposable elements, epigenetics and genome evolution. **Science**, New York, v. 338, n. 6108, p. 758–67, nov. 2012.
- FERNÁNDEZ-MEDINA, R. D.; RIBEIRO, J. M. C.; CARARETO, C. M. A.; VELASQUE, L.; STRUCHINER, C. J. Losing identity: structural diversity of transposable elements belonging to different classes in the genome of *Anopheles gambiae*. **BioMed Central Genomics**, London, v. 13, n. 1, p. 272-286, jun. 2012.
- FERREIRA, A.; CELLA, D. TARDIVO, J.R.; VIRKKI, N. Two pairs of chromosomes: A new low record for Coleoptera. **Revista Brasileira de Genética**, Rio de Janeiro, v. 7, n. 2, p. 231-39, jan. 1984.
- FESCHOTTE, C. New superfamily of DNA transposons identified in diverse animal genomes and related to bacterial IS1016 insertion sequences. **Mol. Biol. and Evol**, Oxford, v. 21, n. 9, p.1769-1780, jun. 2004.
- FESCHOTTE, C.; PRITHAM, E. J. DNA Transposons and the Evolution of Eukaryotic Genomes. **Annual Review of Genetics**, Arlington, v. 41, n. 1, p. 331-68, dec. 2007.
- FESCHOTTE, C. The contribution of transposable elements to the evolution of regulatory networks. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 9, n. 5, p. 397-405, may. 2008.
- FILATOV, D. A. The Two 'Rules of Speciation' in Species with Young Sex Chromosomes. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 27, n. 19, p. 3799–810, oct. 2018.
- FINN, R. D.; MISTRY, J.; TATE, J.; COGILL, P.; HEGER, A.; POLLINGTON, J. E. The Pfamprotein familie database. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 38 n. 1, p. D211-D222, jan, 2010.
- GALÍAN, J.; SERRANO, J.; DE LA RÚA, P.; PETITPIERRE, E.; JUAN, C. Localization and activity of rDNA genes in tiger beetles (Coleoptera: Cicindelidae). **Heredity**, Basingstoke, v. 74, n. 5, p. 524-530, may. 1995.
- GALIÁN, J.; HOGAN, J. E.; VOGLER , A. P. The Origin of Multiple Sex c hromosomes in Tiger Beetles, **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 19, n. 10, p. 1792-1796, oct. 2002.
- GARRIDO-RAMOS, M. A. Satellite DNA in Plants: More than Just Rubbish. **Cytogenet. Genome Res**, Basel, v. 146, n. 2, p. 153–170, jul. 2015.
- GARRIDO-RAMOS, M. A. Satellite DNA: An Evolving Topic. **Genes**, Basel, vol. 8, n. 9, p. 230, set. 2017.

- GILLOTT, C. Entomology, Dordrecht: **Springer**, 2005, p. 831.
- GLUGOSKI, L.; GIULIANO-CAETANO, L.; MOREIRA-FILHO, O.; VICARI, M. R.; NOGAROTO, V. Co-located hAT transposable element and 5S rDNA in an interstitial telomeric sequence suggest the formation of Robertsonian fusion in armored catfish. **Gene**, Amsterdam, v. 15, n. 650, p. 49-54, apr. 2018.
- GOLL, L. G.; ARTONI, R. F.; VICARI, M. R.; NOGAROTO, V.; PETITPIERRE, E.; ALMEIDA, M. C. Cytogenetic Analysis of *Lagria villosa* (Coleoptera, Tenebrionidae): Emphasis on the Mechanism of Association of the Xy p Sex Chromosomes. **Cytogenet Genome Res**, Basel v. 139, n. 1, p. 29-35, aug. 2013.
- 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**, Basel, v. 156, n. 1, p. 56-64 jul. 2018. Crossref, doi:10.1159/000490835.
- GRAY, Y. H. M. It takes two transposons to tango-transposable-element-mediated chromosomal rearrangements. **Trends Genet**, Amsterdam, v. 16, n. 10, p. 461-468, Oct. 2000.
- GULLAN, P. J.; CRANSTON, P. The Insects: An Outline of Entomology. **3. ed. Oxford: Blackwell Publishing Ltd**, 2010, p. 491.
- HALDANE, J. B. S. Sex Ratio and Unisexual Sterility in Hybrid Animals. **Journal of Genetics**, Cambridge, v. 12, n. 2, p. 101-09, oct. 1922.
- HANRAHAN, S. J.; JOHNSTON, J. S. New genome size estimates of 134 species of arthropods. **Chromosome Res**, Oxford, v. 19, n. 6, p. 809-823, aug. 2011.
- HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, A.; RINCÓN-ARANO, H.; RECILLAS-TARGA, F.; ORTIZ, R.; VALDES-QUEZADA, C.; ECHEVERRÍA, O. M.; BENAVENTE, R.; VÁZQUEZ-NIN, G. H. Differential distribution and association of repeat DNA sequences in the lateral element of the synaptonemal complex in rat spermatocytes. **Chromosoma**, Wien, v. 117, n. 1, p. 77-87, feb. 2008.
- JEFFREYS, A. J.; WILSON, V.; THEIN, S. L. Hypervariable minisatellite regions in human DNA. **Nature**. London, v. 314, n. 6006, p. 67-74, mar. 1985.
- KAISER, V.; BACHTROG, D. Evolution of sex chromosomes in Insects. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 44, n. 1, p. 91-112, dec. 2010.
- KAPITONOV, V. V.; JURKA, J. Rolling-circle transposons in eukaryotes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 98, n.15. p. 8714-8719, Jul, 2001.
- KAPITONOV, V. V.; JURKA J. Helitrons on a Roll: Eukaryotic Rolling-Circle Transposons. **Trends in Genetics**, Amsterdam, v. 23, n.10, p. 521-29, out. 2007.

- KAPITONOV, V. V.; JURKA, J. A universal classification of eukaryotic transposable elements implemented in Repbase. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 9, n. 5, p. 411-412, may. 2008.
- KEJNOVSKY, E.; HOBZA, R.; CERMAK, T.; KUBAT, Z.; VYSKOT, B. The role of repetitive DNA in structure and evolution of sex chromosomes in plants. **Heredity**, London, v. 103, n. 6, p. 533–541, jun. 2009.
- KIDWELL, M. G, LISCH, D. R. Transposable elements and host genome evolution. **Trends Ecol Evol**, Amsterdam, v. 15, n. 9, p. 5–99, mar. 2000.
- KIDWELL, M. G.; LISCH, D. R. Perspective: transposable elements, parasitic DNA, and genome evolution. **International Journal of organic Evolution**, Hoboken, v. 55, n. 1, p. 1-24, jan. 2001.
- KIDWELL, M. G. Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. **Genetica**, s'-Gravenhage, v. 115, n. 1, p. 49-63, may. 2002.
- KIM, H., et al. Molecular Characterization of Novel Ty1-Copia-like Retrotransposons in Pear (*Pyrus Pyrifolia*). **Tree Genetics & Genomes**, Heidelberg, v. 7, n. 4, p. 845–56, ago. 2011.
- KOHANY, O.; GENTLES, A. J.; HANKUS, L.; JURKA, J. Annotation, submission and screening of repetitive elements in Repbase: RepbaseSubmitter and Censor. **Bio MedCentral Bioinformatics**. London, v. 7, n. 474, p. 1-7, oct. 2006.
- LAURIE, C. C. The weaker sex is heterogametic: 75 years of Haldane's rule. **Genetics**, Baltimore, v. 147, n. 3, p. 937-951. Nov. 1997.
- LAWRENCE, J. F.; BRITON, E. B. **Australian Beetles**. Carlton: Melbourne University Press, 1994, p. 192.
- LEWINSOHN, T. M.; PRADO, P.N.. How many species are there in Brazil? **Conservation Biology**, Washington, v. 19, n. 3, p. 619-624, june. 2005.
- LIM, J. K.; SIMMONS, M. J. Gross chromosome rearrangements mediated by transposable elements in *Drosophila melanogaster*. **Bioessays**, Cambridge, v. 16, n. 4, p. 269–275, Apr. 1994.
- LINGAFELTER, S.W. The Chrysomelidae Species Database. Systematic Entomology Laboratory, ars, usda. **National Museum of Natural History**, 2001, p. 697–716.
- 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. **Rev. Bras. Entomol**, Curitiba, v. 50, n. 1, p. 101-109, mar. 2006.
- LISCH, D. How Important Are Transposons for Plant Evolution? **Nature, Reviews Genetics**, London, v. 14, n. 1, p. 49–61, jan. 2013.

- LIU, S.; YEH, C. T.; JI, T.; YING, K.; WU, H.; TANG, H. M.; FU, Y.; NETTLETON, D.; SCHNABLE, P. S. Mu transposon insertion sites and meiotic recombination events co-localize with epigenetic marks for open chromatin across the maize genome. **PLoS Genet**, San Francisco v. 5, n. 11, p. e1000733, nov. 2009.
- LÖNNIG, W., E., SAEDLER, H. Chromosome rearrangements and transposable elements. **Annu Ver Genet**, Palo Alto, v. 36, n. 1, p. 389–410, jun. 2002.
- LORITE, P.; PALOMEQUE, T.; GARNERÍA, I. M.; PETITPIERRE, E. Characterization and chromosome location of satellite DNA in the leaf beetle *Chrysolina americana* (Coleoptera, Chrysomelidae). **Genetica**, s'-Gravenhage, v. 110, n. 2, p.143-150, nov. 2001.
- LORITE, P.; CARRILLO, J. A.; GARNERÍA, I.; PETITPIERRE, E.; PALOMEQUE, T. Satellite DNA in the elm leaf beetle, *Xanthogaleruca luteola* (Coleoptera, Chrysomelidae): characterization, interpopulation analysis, and chromosome location. **Cytogenet Genome Res**, Basel, v. 98, n. 4. p. 302-307, jun.2002.
- LOWE, C. B.; HAUSSLER, D. 29 mammalian genomes reveal novel exaptations of mobile elements for likely regulatory functions in the human genome. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 8, p. e43128, aug. 2012.
- MACAYA-SANZ, D. et al. Genetic Analysis of Post-Mating Reproductive Barriers in Hybridizing European Populus Species. **Heredity**, Basingstoke v. 107, n. 5, p. 478–86, nov. 2011.
- MALIK, H. S.; EICKBUSH, T. H. The RTE class of nonLTR retrotransposons is widely distributed in animals and is the origin of many SINEs. **Mol Biol Evol**, Oxford, v.15, n. 9, p. 1123–1134, sep.1998.
- MALIK, H. S.; BURKE, W. D. EICKBUSH, T. H. The age and evolution of non-LTR retrotransposable elements. **Molecular biology and evolution**, Chicago, v. 16, n. 6, p. 793-805, jun. 1999.
- MASLY, J. P.; Presgraves, D. C. “High-Resolution Genome-Wide Dissection of the Two Rules of Speciation in *Drosophila*”. **PLoS Biology**, San Francisco, v. 5, n. 9, p. e243, sep. 2007.
- MASON, J. M.; BIESSMANN, H. The unusual telomeres of *Drosophila*. **Trends Genet**. Amsterdam, v.11, n. 2, p. 58–62, feb.1995.
- MELLO, L. R. A.; TASIOR, D.; GOLL, L. G.; ARTONI, R. F.; VICARI, M. R.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M. C. Physical map of repetitive DNA and karyotype evolution in three species of the genus *Omophoita* (Coleoptera: Alticinae). **Italian Journal of Zoology**, Del Salento, v. 81, n.1, p. 16-24, jan. 2014.
- MILLER, W. J.; MCDONALD, J. F.; PINSKER, W. Molecular domestication of mobile elements. In: Capy P. (Ed.). **Evolution and Impact of Transposable Elements**. Contemporary Issues in Genetics and Evolution, v. 6, Dordrecht: Springer, 1997. p.

261-270.

- MONTIEL, E. E.; CABRERO, J.; CAMACHO, J. P. M.; LÓPEZLEÓN, M. D. Gypsy , RTE and Mariner transposable elements populate *Eyprepocnemis plorans* genome. **Genetica**, s'-Gravenhage, v. 140, n. 7-9, p. 365–374, sep. 2012.
- MUNOZ-LOPEZ, M.; GARCIA-PEREZ, J. DNA Transposons: Nature and Applications in Genomics. **Current Genomics**, Hilversum, v. 11, n. 2, p. 115–28, apr. 2010.
- MURRAY, M. G.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**. London, v. 8, n. 19, p. 4321–4326, oct. 1980.
- NASCIMENTO, V. D. do; COELHO, K. A.; NOGAROTO, V.; DE ALMEIDA, R. B.; ZIEMNICZAK, K.; CENTOFANTE, L.; PAVANELLI, C. S.; TORRES, R. A.; MOREIRA-FILHO, O.; VICARI, M. R. Do multiple karyomorphs and population genetics of freshwater darter characines (*Apareiodon affinis*) indicate chromosomal speciation?. **Zoologischer Anzeiger**, Berlin, v. 272, p. 93-103, jan. 2018.
- NERGADZE, S. G. et al. Insertion of Telomeric Repeats at Intrachromosomal Break Sites During Primate Evolution. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 14, n. 9, p. 1704–1710, set, 2004.
- NERGADZE, S. G., et al. Contribution of Telomerase RNA Retrotranscription to DNA Double-Strand Break Repair during Mammalian Genome Evolution. **Genome Biology**, London, v. 8, n. 12, p. R260, dec. 2007.
- NEUMANN, P. et al. Highly Abundant Pea LTR Retrotransposon Ogre Is Constitutively Transcribed and Partially Spliced. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 53, n. 3, p. 399–410, out. 2003.
- NOSIL, P. et al. Divergent Selection and Heterogeneous Genomic Divergence. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 18, n. 3, p. 375–402, fev. 2009.
- OLIVEIRA, S. G.; CABRAL-DE-MELLO, D. C.; ARCANJO, A. P.; XAVIER, C. SOUZA, M. J.; MARTINS, C.; MOURA, R. C. Heterochromatin, Sex Chromosomes and rRNA Gene Clusters in *Coprophanæus* Beetles (Coleoptera, Scarabaeidae). **Cytogenet Genome Res**, Basel, v.138, n.1, p. 46-55, sep. 2012.
- ORR, H. ALLEN. HALDANE'S RULE. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, vol. 28, n. 1, p. 195–218, nov. 1997.
- PALOMEQUE, T., et al. Characterization and evolutionary dynamics of a complex family of satellite DNA in the leaf beetle *Chrysolina carnifex* (Coleoptera, Chrysomelidae). **Chromosome Res**, Oxford, v. 13, n. 8, p. 795-807, dec. 2005.
- PARDUE, M. L. et al. *Drosophila* telomeres: new views on chromosome evolution. **Trends Genet**. Amsterdam, v. 12, n. 3, p. 48–52, feb. 1996.

- PECCOUD, J.; LOISEAU, V. CORDAUX, R. GILBERT, C. Massive horizontal transfer of transposable elements in insects. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Washington, v. 114, n. 18, p. 4721–4726, may. 2017.
- PETITPIERRE, E.; SEGARRA, C.; YADAV, J.S.; VIRKKI, N. Chromosome numbers and meioformulae of Chrysomelidae. In: Jolivet, E., Petitpierre, E., Hsiao, T.H. (Eds.), *Biology of Chrysomelidae*. **Kluwer Academic Publishers**, 1988, p. 161-186.
- PETITPIERRE, E. Molecular cytogenetics and taxonomy of insects, with particular reference to the Coleoptera. **International Journal of Insect Morphology and Embryology**. New York, v. 25, n. 1-2, p. 115-133, apr. 1996.
- PETITPIERRE, E. A new contribution to the cytogenetic knowledge of Alticinae (Coleoptera, Chrysomelidae). **Hereditas**, London, v. 143, n. 1, p. 58-61, may. 2006.
- PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 83, p. 2934-2938, may. 1986.
- PLASTERK, R. H.; IZSVÁK, Z.; IVICS, Z. Resident aliens: the Tc1/mariner superfamily of transposable elements. **Trends in genetics**, Amsterdam, v. 15, n. 8, p. 326-332, aug. 1999.
- PRESGRAVES, D. C.; ORR, H. A. Haldane's rule in taxa lacking a hemizygous X. **Science**, Washington, v. 282, n. 5390, p. 952-954, Oct. 1998.
- PRIMO, C. B.; GLUGOSKI, L.; VICARI, M. R.; NOGAROTO, V. Chromosome mapping and molecular characterization of the Tc1/Mariner Element in *Rineloricaria* (Siluriformes: Loricariidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 61, oct. 2018.
- PROENÇA, S. J. R.; SERRANO, A. R. M.; COLLARES-PEREIRA, M. J. An unusual karyotype with low chromosome number in Megacephalini, a basal group of tiger beetles (Coleoptera, Cicindelidae): cytogenetic characterisation by C-banding and location of rDNA genes. **Hereditas**, London, v. 137, n. 3, p. 202–207, dec. 2002.
- PUCCI, M. B.; BARBOSA, P.; NOGAROTO, V. ALMEIDA, M. C.; ARTONI, R. F. et al: Population differentiation and speciation in the genus *Characidium* (Characiformes: Crenuchidae): effects of reproductive and chromosomal barriers. **Biol J Linn Soc**, London, v. 111, n. 3, p. 541–553, mar. 2014.
- QVARNSTRÖM, A.; BAILEY, R. I. Speciation through Evolution of Sex-Linked Genes. **Heredity**, London, v. 102, n. 1, p. 4–15, jan. 2009.
- RILEY, E. G.; CLARK, S. M.; FLOWERS, R. W.; GILBERT, A. J. FAMILY 124. CHRYSOMELIDAE LATREILLE 1802. IN: ARNETT, R. H. JR.; THOMAS, M. C.;

- SKELLEY, P. E.; FRANK, J. H. Polyphaga: Scarabaeoidea through Curculionioidea. CRC Press LLC, Boca Raton. (eds): **American Beetles**, Florida, 2002, p. 617–691.
- 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**, Basel, v. 156, n. 4, p. 215–22, dec. 2018.
- ROZEK, M.; LACHOWSKA, D.; PETITPIERRE, E.; HOLECOVA, M. C-bands on chromosomes of 32 beetle species (Coleoptera: Elateridae, Cantharidae, Oedemeridae, Cerambycidae, Chrysomelidae and Curculionidae). **Hereditas**, London, v. 140, n. 3, p. 1–10, may. 2004.
- RUIZ-RUANO, F. J.; RUIZ-ESTÉVEZ, M.; RODRÍGUEZ-PÉREZ, J.; LÓPEZ-PINO J. L.; CABRERO, J.; CAMACHO, J. P. M. DNA amount of X and B chromosomes in the grasshoppers *Eyprepocnemis plorans* and *Locusta migratoria*. **Cytogenet Genome Res**, Basel, v. 134: n. 3, p. 120–126, mar. 2011.
- SÁNCHEZ-GUILLÉN, R. A.; CAPILLA, L.; REIG-VIADER, R.; MARTÍNEZ-PLANA, M.; PARDO-CAMACHO, C.; ANDRÉS-NIETO, M.; VENTURA, J.; RUIZ-HERRERA, A. On the origin of Robertsonian fusions in nature: evidence of telomere shortening in wild house mice. **J. Evol. Biol**, Basel, v. 28, n. 1, p. 241–249, jan. 2015.
- SCHEMBERGER, M. O.; BELLAFRONTE, E.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M. C.; SCHÜHLI, G. S.; ARTONI, R. F.; VICARI, M. R. Differentiation of repetitive DNA sites and sex chromosome systems reveal closely related group in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes). **Genetica**, s'-Gravenhage, v. 139, n. 11-12, p.1499–1508, dec. 2011.
- SCHEMBERGER, M. O.; OLIVEIRA, J. I. N.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M. C.; ARTONI, R. F.; CESTARI, M. M.; MOREIRA-FILHO, O.; VICARI, M. R. Construction and characterization of a repetitive DNA library in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes): a genomic and evolutionary approach to the degeneration of the W sex chromosome. **Zebrafish**, New York, v. 11, n. 6, p. 518–527, dec. 2014.
- SCHEMBERGER, M. O.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M. C.; ARTONI, R. F.; VALENTE, T. G.; MARTINS, C.; MOREIRA-FILHO, O.; CESTARI, M. M.; VICARI, M. R. Sequence analyses and chromosomal distribution of the Tc1/Mariner element in Parodontidae fish (Teleostei: Characiformes). **Gene**, Amstersam, v. 593, n. 2, p. 308–314, nov. 2016.
- SCHEMBERGER, M. O.; NASCIMENTO, V. D.; COAN, R.; RAMOS, E.; NOGAROTO, V.; ZIEMNICZAK, K.; VALENTE, G. T.; MARTINS, C.; MOREIRA-FILHO, O.; VICARI, M. R. DNA transposons invasion and microsatellites accumulation guide the W chromosome differentiation in a Neotropical fish genome. **Chromosoma**. Submetido à publicação.

- SCHERER, G. The origins of the Alticinae. In: Biology of Chrysomelidae. Dordrecht/ Boston/ Londres: **Kluwer Academic Publishers**, 1988, p. 115-130.
- SEENO, T. N.; Wilcox, J. A. Leaf beetle genera (Coleoptera: Chrysomelidae). **Entomography 1**: 1982, p. 1-221.
- SEGARRA, C.; PETITPIERRE, E. Chromosomal survey in three genera of Alticinae (Coleoptera, Chrysomelidae). **Cytobios**, Cambridge, v.64, n. 258-259, p.169-174, jan. 1990.
- SERRANO, J. Chromosome numbers and karyotype evolution of Caraboidea. **Genetica**, s'-Gravenhage, v.55, n. 1, p.51-60, mar. 1981.
- SIGMAN, M. J. E.; SLOTKIN, R. K. The first rule of plant transposable element silencing: location, location, location. **Plant Cell**, Rockville, v. 28, n. 2, p. 304-313, feb. 2016.
- SLIJEPCEVIC, P. Telomeres and mechanisms of Robertsonian fusion. **Chromosoma**, Wien, v. 107, n. 2, p. 136–140, may. 1998.
- SLIPINSKI, S. A., LESCHEN, R. A. B.; LAWRENCE, J. F. Order Coleoptera Linnaeus, 1758. In: Zhang, Z-Q. (Ed.), Animal biodiversity: an outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness. **Zootaxa**, 2011, p. 203–208.
- SMITH, S.G. The cyto-taxonomy of Coleoptera. **The Canadian Entomologist**, Ottawa, v. 82, n. 3, p. 58-68, mar. 1950.
- SMITH, S. G.; VIRKKI, N. Coleoptera. In: John, B. (Ed.), Animal Cytogenetic. Gebu der Borntraeger, **Berlin, Stuttgart**, 1978, p. 366.
- SOROKA, J. J.; BARTELT, R. J.; ZILKOWSKI, B. W.; COSSE, A. A. Responses of flea beetle *Phyllotreta cruciferae* to synthetic aggregation pheromone components and host plant volatiles in field trials. **J Chem Ecol**, New York, v. 31, n. 8, p. 1829–1843, aug. 2005.
- SOUZA, F. S., FRANCHINI, L. F.; RUBINSTEIN, M. Exaptation of Transposable Elements into Novel Cis-Regulatory Elements: Is the Evidence Always Strong? **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 30, n. 6, p.1239–1251, jun. 2013.
- STEINEMANN, M.; STEINEMANN, S. Enigma of Y chromosome degeneration: Neo-Y and Neo-X chromosomes of *Drosophila miranda* a model for sex chromosome evolution. **Genetica**, s'-Gravenhage, v. 102-103, n. 1-6, p. 409-420, feb, 1998.
- STEINEMANN, S.; STEINEMANN, M. Retroelements: tools for sex chromosome evolution. **Cytogenet and Genome Res**, Basel v. 110, n. 1-4, p. 134–143, jul. 2005.
- STUART, J. J.; MOCELIN, G. Cytogenetics of chromosome rearrangements in *Tribolium castaneum*. **Genome**, Ottawa, v. 38, n. 4, p. 673–680, aug. 1995.

- SUMNER, A. T. Chromosomes: organization and function. 1st edn London: **Blackwell Publishing company**, 2003, p. 1-288.
- THOMAS, J.; PRITHAM E. J. Helitrons, the Eukaryotic Rolling-Circle Transposable Elements. **Microbiology Spectrum**, Washington, vol. 3, n. 4, p. 893-919. jul. 2015.
- TIMBERLAKWE, E. Low repetitive DNA content in *Aspergillus nidulans*. **Science**, Washington, v. 202, n. 4371, p. 973- 975, dec. 1978.
- TRDAN, S.; VALIC, N.; ŽNIDARCIC, D.; VIDRIH, M.; BERGANT, K.; ZLATIC, E.; MILEVOJ, L. The role of Chinese cabbage as trap crop for flea beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) in production of white cabbage. **Sci Horticult**. Amsterdam, v. 106, n. 1, p. 12–24, aug. 2005.
- TRIBOLIUM GENOME SEQUENCING CONSORTIUM et al. The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. **Nature**, London, v. 452, n. 7190, p. 949–955, apr. 2008.
- TRIPLEHORN, C. A.; JOHNSON, N. F. Estudo dos insetos. 7. ed. São Paulo: **Cengage Learning**, 2011, p. 809.
- TURNER, L. M.; et al. Genomic Networks of Hybrid Sterility. **PLoS Genetics**, San Francisco, v. 10, n. 2, p. e1004162, fev. 2014.
- UNTERGASSER, A.; NIJVEEN, H. Primer 3Plus. 2007. Disponível em: <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>
- VICARI, M. R. et al: Satellite DNA and chromosomes in Neotropical fishes: methods, applications and perspectives. **J Fish Biol**, London, v. 76, n. 5, p. 1094– 1116, apr. 2010.
- VIRKKI, N. Rapid allocyclic changes in the centric and arm segmento f the X chromosome in the meiosis of male *Omophota superba* Weise (Coleoptera, Alticinae). **Hereditas**, London, v. 58, n. 1, p. 262-264, nov. 1967.
- VIRKKI, N. Regular segregation of seven asynaptic sex chromosomes in the male of *Asphaera daniela* Bechyné (Coleoptera, Alticinae). **Caryologia**, Firenze, v. 21, n. 2, p. 47-51, jan. 1968.
- VIRKKI, N. Sex chromosomes and karyotypes of the Alticinae (Coleoptera). **Hereditas**, London ,v. 64, n. 2, p. 267-282, may. 1970.
- VIRKKI, N. Contraction stage and formation of the distance sex bivalent in *Oedionychina* (Coleoptera, Alticinae). **Hereditas**, London, v. 71, n. 2, p. 259–288, feb. 1972.
- VIRKKI, N. Banding of *Oedionychina* (Coleoptera: Alticinae) chromosomes C- and Ag-bands. **J Agric Univ PR**, Puerto Rico, v. 67, n. 3, 221–255, nov. 1983.

- VIRKKI, N. Chromosomes in evolution of Coleoptera. In: Chromosome in evolution of eukaryotic groups. **Boca Raton**: CRC Press, 1984, p. 41-76.
- VIRKKI, N. Cytotaxonomy of Alticinae. In: Biology of Chrysomelidae. Dordrecht/ Boston/ Londres: **Kluwer Academic Publishers**, 1988a, p. 187-203.
- VIRKKI, N. The sex chromosomes of Disonychina (Coleoptera, Alticinae): $Xy + nX$ systems. **Cytobios**, Cambridge, v. 53, n. 1, p. 43–55, mar. 1988b.
- VIRKKI, N. Proximal vs. distal collochores in coleopteran chromosomes. **Hereditas**, London, v. 110, n. 2, p. 101–107, apr. 1989.
- VIRKKI, N.; SANTIAGO-BLAY, J.; CLARK, S. M. Chromosome of some Puerto Rican Disonycha and Oedionychina (Coleoptera: Chrysomelidae: Alticinae: Oedionychini). **Psyche**, Cambridge, v. 98, n. 4, p. 373-390, mar. 1991.
- VIRKKI, N.; SANTIAGO-BLAY, J. A. Trends of karyotype evolution in neotropical Oedionychina (Coleoptera: Chrysomelidae: Alticinae). **Hereditas**, London, v. 119, n. 3, p. 263-283, dec. 1993.
- WALSH, J. B. Genome Evolution: Overview. **Enciclop. of life sciences**, organizado por John Wiley & Sons, Ltd, John Wiley & Sons, Ltd, 2001, p. 1-7.
- WICKER, T.; SABOT, F.; HUA-VAN, A.; BENNETZEN, J. L.; CAPY, P.; CHALHOUB, B.; FLAVELL, A.; LEROY, P.; MORGANTE, M.; PANAUD, O.; PAUX, E.; SANMIGUEL, P.; SCHULMAN, A. H. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 8, n. 12, p. 973-982, nov. 2007.
- XAVIER, C. et al. Heterochromatin and Molecular Characterization of DsmarMITE Transposable Element in the Beetle *Dichotomius Schiffleri* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Genetica*, s'-Gravenhage v. 142, n. 6, p. 575–81, dec, 2014.
- YU, C.; ZHANG, J.; PETERSON, T. Genome rearrangements in maize induced by alternative transposition of reversed Ac/Ds termini. *Genetics*, Austin v. 188, n. 1, p. 59–67, may. 2011.
- ZIEMNICZAK, K.; TRALDI, J. B.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M. C.; ARTONI, R. F.; MOREIRA-FILHO, O.; VICARI, M. R. In situ localization of (GATA) n and (TTAGGG) n repeated DNAs and W sex chromosome differentiation in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes). **Cytogenetic and Genome Research**, Würzburg, v. 144, n. 4, p. 325-332, fev. 2014.
- ŽUPUNSKI, V.; GUBENŠEK, F. KORDIS, DUŠAN. Evolutionary Dynamics and Evolutionary History in the RTE Clade of Non-LTR Retrotransposons, **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 18, n. 10, p. 1849–1863, oct. 2001.

8 ANEXOS

8.1 CITOGENÉTICA CONVENCIONAL

Metodologia para estudo de cromossomos meióticos a partir de gônadas foi descrita por Almeida et al. (2000) e consistiu em:

1. Dissecou-se o animal em solução fisiológica para insetos, retirou-se a gônada e transferiu-a para uma placa de Petri contendo solução hipotônica, durante 5 minutos;
2. Fixou-se a gonôda em Carnoy I (metanol-ácido acético na proporção 3:1), durante 30 minutos;

Os próximos passos seguiram as modificações feitas por Rosolen et al., (2018):

3. Macerou-se a gônada fixada em lâmina com ácido acético 60%, a solução macerada foi dissociada com micropipeta sobre a lâmina;
4. Com micropipeta a solução dissociada foi gotejada a uma altura de cerca de 30 cm sobre a lâmina aquecida em placa de metal a 40 °C.

8.2. EXTRAÇÃO DE DNA

Protocolo segundo MURRAY e THOMPSON, (1980), com modificações.

Preparou-se o tampão de extração sem CTAB. Para 15 mL de solução tampão:

5mL de NaCl 5M ([] final 1M)

5mL EDTA 0,5M ([] final 0,1M)

5mL TRIS-HCl 1M pH 8.0 ([] final 0,1M)

(Guardou-se o tampão de extração em temperatura ambiente).

1. Em um tubo de 1,5mL colocou-se o tecido (cabeça, pronoto e fêmures), 180µL de tampão sem CTAB, 120µL de CTAB 5%, 15µL de proteinase K (10mg/mL) e 5µL de DTT (1M) ou 5µL de B mercaptoetanol.

2. Colocou-se a 50°C por 10 horas (overnight) ou até que o tecido estivesse totalmente digerido;
3. Adicionou-se 10µL de RNase (10mg/mL);
4. Colocou-se a 37°C, em banho-Maria, por 2 horas;
5. Adicionou-se 600µL de clorofórmio;
6. Inverteram-se os tubos suavemente durante 5 minutos;
7. Centrifugou-se a 8.000 rpm por 5 min a 4°C;
8. Retirou-se sobrenadante e o transferiu-se para um novo tubo;
9. Adicionou-se 600 µL de etanol 100% gelado e deixou-se a –20°C por 2 horas;
10. Centrifugou-se a 14.000 rpm por 15 min a 4°C.
11. Descartou-se o sobrenadante;
12. Lavou-se o pellet com 200µL de etanol 70% gelado;
13. Centrifugou-se por 3 min a 10.000 rpm a 4 °C ;
14. Descartou-se o sobrenadante;
15. Lavou-se o pellet com 200 µL de etanol 100% gelado;
16. Centrifugou-se por 3 min a 10.000 rpm a 4 °C;
17. Descartou-se o sobrenadante;
18. Deixou-se secar na estufa a 37°C;
19. Ao final ressuspendeu-se o pellet em 40µL de água mili-Q ou TE.

8.3 CLONAGEM

O primeiro passo foi a Transformação:

1. Retirou-se a bactéria competente do -80°C e deixou-se em gelo;
2. Adicionou-se 1-10 μl de plasmídeo (fechado ou produto de ligação) à bactéria competente;
3. Deixou-se 10 minutos no gelo;
4. Deixou-se em banho-maria 42°C por 90 segundos;
5. Deixou-se 1 minuto no gelo;
6. Adicionou-se 800 ml de LB Líquido;
7. Deixou-se por 1 hora a 37°C ;

O próximo passo foi o Plaqueamento:

8. Derreteu-se o LB Agar, e fizeram-se placas com 20 ml de ágar + antibiótico de interesse;
9. Com a alça de Drigalsky, espalhou-se sobre a placa 50 ml de IPTG (200 mM) e 40 ml de X- GAL (0,2%);
10. Centrifugou-se a cultura de bactérias por 2 minutos a 5000 rpm, descartou-se 800 ml de meio e mexeu-se para dissolver o pellet formado e espalhou-se com a alça de Drigalsky sobre a placa;
11. Deixou-se placa na estufa 37°C overnight;
12. Crescidas as colônias bacterianas, vedaram-se as placas com parafilm e as guardou-se na geladeira 4°C .

O próximo passo foi a Mini preparação Plasmidial, para isso fizeram-se as soluções:

Solução I:

- 60 ml de RNase (20mg/ml)
- 300 ml de Tris-HCl 1M
- 60 ml EDTA 0,5M
- 2580 ml água

Solução II:

- 600 ml de NaOH 1M
- 300 ml de SDS 10%
- 2100 ml água

Solução III:

- 1800 ml de acetato de potássio 5M
- 345 ml de ácido acético
- 855 ml água

Pré-inóculo: Picou-se uma colônia bacteriana com um palito autoclavado e fizeram-se o pré-inóculo em 5 ml de LB líquido (adicionou-se antibiótico de interesse 1 µl: 1 ml). Deixou-se a cultura a 200 rpm overnight a 37°C.

1. Deixou-se a centrífuga refrigerada a 4°C;
2. Depois da cultura bacteriana crescida overnight, centrifugou-se em um tubo de 1,5 ml por 30 segundos em velocidade máxima;
3. Adicionou-se 400 ml da solução I e vortexou-se bem;
4. Adicionou-se 400 ml da solução II e inverteu-se o tubo até ficar viscoso;
5. Adicionou-se 400 ml da solução III e inverteu-se o tubo;

6. Centrifugou-se por 5 minutos em velocidade máxima;
7. Transferiu-se o sobrenadante para um tubo limpo e realizou-se uma nova centrifugação por 5 minutos em velocidade máxima;
8. Transferiu-se o sobrenadante para um tubo que continha 400 ml de isopropanol 100% e incubou-se durante 10 minutos em temperatura ambiente;
9. Centrifugou-se por 10 minutos em velocidade máxima e descartou-se o sobrenadante;
10. Adicionou-se 200 ml de etanol 70% gelado e centrifugou-se por 5 minutos; descartou-se o sobrenadante;
11. Adicionou-se 200 ml de etanol 100% gelado e centrifugou-se por 5 minutos; descartou-se o sobrenadante;
12. Secou-se o pellet na estufa a 37°C;
13. Adicionou-se 20 ml de água ou TE e ressuspendeu-se o pellet.

8.4 HIBRIDAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH) (PINKEL, STRAUME E GRAY, 1986) com modificações

Preparação das Lâminas e Hibridação:

1. Lavou-se as lâminas em tampão PBS 1x durante 5 min. em temperatura ambiente;
2. Desidratou-se as lâminas em série alcoólica 70, 85 e 100%, 5 min cada;
3. Incubou-se as lâminas em 100 ml de RNase (0,4% RNase/2xSSC) a 37 C por 1h em câmara úmida com água milli-Q;
4. Lavou-se 3 x por 5 min em 2xSSC;
5. Lavou-se durante 5 min em PBS 1x.

6. Incubou-se as lâminas por 10 min em solução de pepsina 0,005% (em 10mM HCl) a 37 ° C ;
7. Lavou-se em PBS 1x durante 5 min (shaker) a temperatura ambiente;
8. Fixou-se em paraformaldeído 4% durante 10 min à temperatura ambiente;
9. Lavou-se em PBS 1x por 5 min;
10. Desidratou-se as lâminas em séries alcoólicas (70,85, 100 %) por 5 min cada;
11. Simultaneamente a desidratação em série alcoólica desnaturou-se a solução de hibridação a 100°C por um período de 10 min e passou-se imediatamente ao gelo;
12. Desnaturou-se as lâminas com formamida 70% em 2xSSC a 70°C por 4 min;
13. Desidratou-se o material em série alcoólica 70, 85 e 100% durante 5 min cada.
14. Preparou-se a câmara úmida a 37°C ;
15. Montou-se cada lâmina com 40 ml de solução de hibridação, cobrindo-as com lamínula e deixa-se overnight a 37°C;

Lavagens:

16. Lavou-se 4 vezes em formamida 15%/0,2xSSC pH 7.0 a 42 °C durante 5 min cada;
17. Lavou-se durante 5 min em solução de Tween 0,5%/4xSSC, ambiente;

Detecção e amplificação do Sinal

18. Incubou-se as lâminas em tampão 5% NFDm/4xSSC por 15 minutos;
19. Lavou-se 2 x 5min com Tween 0,5%/4xSSC, ambiente;
20. Incubou-se as lâminas com 90 ml de FITC (0,1 ml FITC/100 ml NFDm) durante 30 min em câmara úmida e escura, a temperatura ambiente;

21. Lavou-se 3 x 5min com Tween 0,5%/4xSSC, ambiente;
22. Incubou-se com 90 ml de anti-avidina (1 ml anti-avidina/100 ml de NFDM) durante 30 min em câmara úmida e escura, a temperatura ambiente;
23. Lavou-se 3 x 5min com Tween 0,5%/4xSSC, ambiente;
24. Incubou-se as lâminas com 90 ml de FITC (0,1 ml FITC/100 ml NFDM) durante 30 min em câmara úmida e escura, a temperatura ambiente.
25. Lavou-se 3 x 5min com Tween 0,5%/4xSSC, ambiente;
26. Incubou-se com 90 ml de anti-avidina (1 ml anti-avidina/100 ml de NFDM) durante 30 min em câmara úmida e escura, a temperatura ambiente;
27. Lavou-se 3 x 5min com Tween 0,5%/4xSSC, em temperatura ambiente ;
28. Incubou-se as lâminas com 90 ml de FITC (0,1 ml FITC/100 ml NFDM) durante 30 min em câmara úmida e escura, em temperatura ambiente;
29. Lavou-se 3 x 5min com Tween 0,5%/4xSSC, em temperatura ambiente;
30. Desidratou-se em álcool 70, 85 e 100%, 5 min. cada;

Montagem da Lâmina:

31. Misturou-se 200 µl de antifading mais 1 µl de DAPI - 4'-6 diamidino - 2 - phenilindole (50 µg/ml);
32. Colocou-se 25 µl da solução e cobriu-se com lamínula. Guardou-se no escuro.