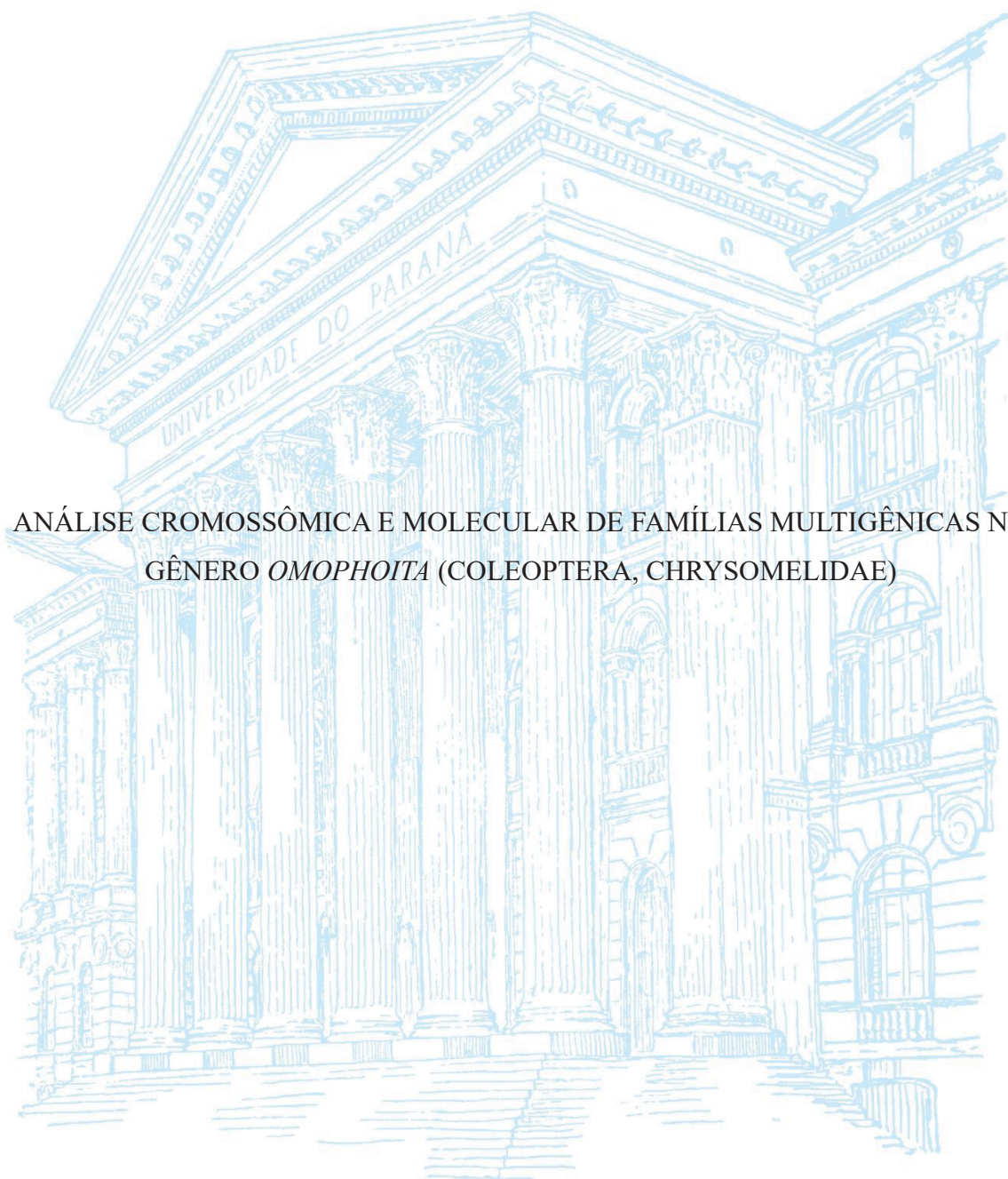


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MICHELE ANDRESSA VIER WOLSKI



ANÁLISE CROMOSSÔMICA E MOLECULAR DE FAMÍLIAS MULTIGÊNICAS NO
GÊNERO *OMOPHOITA* (COLEOPTERA, CHRYSOMELIDAE)

CURITIBA

2018

MICHELE ANDRESSA VIER WOLSKI

ANÁLISE CROMOSSÔMICA E MOLECULAR DE FAMÍLIAS MULTIGÊNICAS NO
GÊNERO *OMOPHOITA* (COLEOPTERA, CHRYSOMELIDAE)

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

Orientador: Prof Dr. Marcelo Ricardo Vicari
Co-orientadora: Prof. Dra. Mara Cristina De Almeida

CURITIBA

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Carla Fabiane Rasmussen – CRB/9-940).

Wolski, Michele Andressa Vier.

Análise cromossômica e molecular de famílias multigênicas no gênero *Omophoita* (Coleoptera, Chrysomelidae). / Michele Andressa Vier Wolski. – Curitiba, 2018.

115 f. : il. ; 30cm.

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. Chrysomelidae. 2. Coleoptera. 3. Cromossomos. 4. Genes. 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.) 595.7648



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

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 **MICHELE ANDRESSA VIER WOLSKI** intitulada: **Análise cromossômica e molecular de famílias multigênicas no gênero *Omophoita* (Coleoptera: Chrysomilidae)**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVADO 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, 23 de Março de 2018.


MARCELO RICARDO VICARI
Presidente da Banca Examinadora


RAFAEL BUENO NOLETO
Avaliador Externo


MARA CRISTINA ALMEIDA
Avaliador Externo


CESAR MARTINS
Avaliador Externo


DANIEL PACHECO BRUSCHI
Avaliador Externo


MICHELLE ORANE SCHEMBERGER
Avaliador Externo

A minha mãe Elisete, meu pai Aldemir e ao meu
môzi Alain, com amor eu dedico.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar à Deus por todas as minhas conquistas e aprendizagens durante os meus 29 anos de vida, e por me permitir chegar ao término deste doutorado com um pouco de sanidade.

A todos meus familiares, em especial a minha mãe Elisete Vier, pelos conselhos, preocupação, afeto e interesse em meu trabalho e ao meu pai Aldemir Wolski, pela efetiva contribuição na minha formação, por me fazer de exemplo para meus irmãos e pela expectativa em me ver como uma profissional de qualidade.

Ao meu grande amor Alain, meu companheiro para todas as horas, seja me ajudando com técnicas laboratoriais, traduções ou consolando meu desespero, obrigada por me manter firme, otimista e por tornar meus dias mais felizes.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari, pela amizade e por aceitar a empreitada de orientar um trabalho que tem como organismos modelo, espécies que fogem de sua expertise, e mesmo assim o fez de uma maneira incrível, só comprovando suas qualidades como pesquisador e orientador, as quais eu admiro.

À minha co-orientadora Prof^a. Dr^a. Mara Cristina de Almeida, a quem eu devo maior parte da minha formação na citogenética, obrigada por sua disponibilidade, confiança e pela forma carinhosa com que sempre me tratou.

Ao Laboratório de Genética Evolutiva- LabGEV (UEPG), agradeço aos professores, Prof. Dr. Mateus Henrique Santos e Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni, ao técnico Miguel Airton Carvalho e a todos os alunos, pelo respeito, cordialidade e por disponibilizar o uso da estrutura necessária para a elaboração desta tese.

Ao Chromosome Biology: Structure & Function LAB- CBSFLab (UEPG), sou grata a todos pelo companheirismo, colaboração na realização de técnicas e pelos momentos de descontração. Em especial a Prof^a. Dr^a. Viviane Nogaroto, pela amizade e por sempre estar disposta a ajudar. E a minha amiga Caroline Regina, por compartilhar momentos de alegria, preocupações, desopontamentos e esperança, admiro sua paixão pelo que faz, e por isso acredito muito no seu potencial, obrigada pela meiguice e sinceridade de sempre.

À banca de avaliação Prof. Dr. Daniel Pacheco Bruschi- UFPR, Prof. Dr. César Martins- UNESP Botucatu, Prof^a. Dr^a. Michelle Orane Schemberger- UEPG e Prof. Dr. Rafael Bueno Noleto- UNESPAR União da Vitória, pela disponibilidade e por contribuírem com o enriquecimento desta tese.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná e a

Universidade Estadual de Ponta Grosso pelo suporte.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida, ao CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e a Fundação Araucária, pelo financiamento da pesquisa.

A todos que de maneira direta ou indireta contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa, meus sinceros agradecimentos.

“And I try, oh, my God, do I try
I try all the time
In this institution
And I pray, oh, my God, do I pray
I pray every single day
For a revolution”

(What’s up, Linda Perry, 1992)

RESUMO

A subfamília Alticinae além de possuir a maior biodiversidade entre os Chrysomelidae apresentam características cariotípicas muito interessantes quanto à variação do número diploide, do sistema de determinação sexual e irregularidades meióticas. *Omophoita* é o gênero mais estudado citogeneticamente entre os pertencentes à subtribo Oedionychina, e a maior parte dos exemplares possuem cariótipo uniforme com $2n=22,10II+X+Y$. Os cromossomos sexuais são gigantes e assinápticos durante a meiose, podendo ser considerados altamente derivados, o que faz desse grupo um interessante modelo para estudos evolutivos. O estudo com técnicas mais refinadas e o mapeamento de famílias multigênicas é recente em Coleoptera, e entre os Alticinae, apenas três espécies foram estudadas neste âmbito. Com isso o objetivo deste trabalho foi caracterizar molecularmente e avaliar a dispersão e a diferenciação cariotípica proporcionadas pelas famílias multigênicas em *Omophoita*. Para isto, quatro espécies (*O. octoguttata*, *O. personata*, *O. magniguttis* e *O. sexnotata*) foram utilizadas para a caracterização de sequências do 5S rDNA, H1, H3, H4, U1 snDNA e U2 snDNA a partir do DNA genômico. Ainda, para o 5S rDNA, sequências do cDNA e de cromossomos isolados via microdissecção foram obtidas. Estas sequências das famílias multigênicas foram utilizadas para a produção de sondas e localização *in situ* em *Omophoita*. Cópias do 5S rDNA, H1, H3, H4, U1 snDNA e U2 snDNA com alta similaridade a outros eucariotos foram determinadas. Além destas, sequências das famílias multigênicas com SNPs, Indels, pseudogenes, invasão por elementos transponíveis (*AmnSINE1* no 5S rDNA, *LINE L1-9* na histona H1, *SINEU-1A* em U1 snDNA e LTR *DIRS-1* em U2 snDNA) também foi observado em *O. sexnotata*. A localização *in situ* detectou um par cromossômico portador de sintenia dos 5S e 18S rDNAs em *O. octoguttata* e *O. personata*, dois pares portadores da sintenia dos rDNAs em *O. magniguttis* e em *O. sexnotata*, um par com sintenia dos rDNAs, além de sítios 5S rDNA em todos os demais autossomos. Para explicar a homogeneidade *versus* heterogeneidade das sequências de 5S rDNA no genoma de *O. sexnotata* o modelo misto entre *concerted evolution* e *birth and death* foi proposto. Na localização *in situ* das sequências de H1, H3, H4, U1 snDNA e U2 snDNA, inúmeras marcações foram detectadas, em cromossomos autossômicos e sexuais nos cariótipos das quatro espécies estudadas, além disso estes genes ocorrem isolados ou em sintenia. A ocorrência de *double-strand breaks* (DSBs), reparo por recombinação não homóloga e, também a dispersão mediada por elementos transponíveis foram propostos como mecanismos que podem ter auxiliado na dispersão destas famílias gênicas, abrindo uma perspectiva para futuras análises da provável origem de retropseudogenes ou de genes tecido específicos funcionais em *Omophoita*. Em conclusão, relatamos um alto nível de duplicação e dispersão das famílias multigênicas proporcionando variação genômica e diferenciação cariotípica no grupo.

Palavras-chave: Elementos transponíveis. Evolução cariotípica. FISH. Genes co-localizados. Pseudogenes.

ABSTRACT

Alticinae subfamily is the most diverse group among Chrysomelidae, the analysed species so far present interesting karyotypic features as variation of diploid number, sexual system determination and meiotic irregularities. *Omophoita* is the most cytogenetically studied genus among the members of Oedionychina subtribe, and most of individuals show an uniform karyotype $2n= 22,10II+X+Y$. The sexual chromosomes are giants and asynaptics during meiosis, being considered highly derived, which makes this group an interesting model for evolutionary studies. The study with more refined techniques and the mapping of multigenic families is recent in Coleoptera. Among the Alticinae, only three species have been studied in this field. The objective of the present study was to characterize molecularly and to evaluate the dispersion and karyotypic differentiation provided by multigenic families in *Omophoita*. Four species were used as model (*O. octoguttata*, *O. personata*, *O. magniguttis* e *O. sexnotata*) in order to characterize 5S rDNA, H1, H3, H4, U1 snDNA and U2 snDNA sequences from genome DNA. Furthermore, for 5S rDNA, sequences of cDNA and isolated chromosomes (via microdissection) were obtained. These sequences of multigenic families were used as probes for *in situ* location in *Omophoita*. Copies of 5S rDNA, H1, H3, H4, U1 snDNA and U2 snDNA sequences with a high similarity to other eukaryotes were determined. In addition, in *O. sexnotata* were also observed sequences of multigenic families with SNPs, Indels, pseudogenes, invasion by transposable elements (*AmnSINE1* in 5S rDNA, *LINE L1-9* in histone H1, *SINEU-1A* in U1 snDNA and LTR *DIRS-1* in U2 snDNA). *In situ* localization detected a chromosomal pair bearing 5S and 18S rDNAs in *O. octoguttata* and *O. personata*, two pairs harboring the synteny of rDNAs in *O. magniguttis* and *O. sexnotata*, a pair with synteny of the rDNAs, in addition to 5S rDNA sites in all other autosomes. To explain the homogeneity versus heterogeneity of 5S rDNA sequences in *O. sexnotata* genome the mixed model of concerted evolution and birth and death was proposed. The localization of H1, H3, H4, U1 snDNA and U2 snDNA sequences detected numerous markers in autosomal and sexual chromosomes in the karyotypes of the four species, these genes occur singly or in synteny. The occurrence of double-strand breaks (DSBs), non-homologous recombination repair and dispersion mediated by transposable elements were proposed as mechanisms that may have helped in the dispersion of these genic families, creating a perspective to future analyzes of a probable origin of retropseudogenes and functional tissue-specific genes in *Omophoita*. In conclusion, we report a high level of duplication and dispersion of multigenic families providing genomic variation and karyotype differentiation in this group.

Key words: Transposable elements. Karyotype evolution. FISH. Co-located genes. Pseudogenes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

MATERIAL E MÉTODOS

- Figura 1 Espécies de *Omophoita* analisadas: (A) *O. magniguttis* fêmea; (B) *O. octoguttata* macho; (C) *O. personata*, macho; (D) *O. sexnotata*, macho. Barra em A e B = 0,7 centímetros em C e D = 1,0 centímetros. Figura retirada e modificada de Almeida et al. (2009)..... 34

CAPÍTULO I

- Figura 1 Alinhamento das sequências de 5S rDNA obtidas a partir do DNA genômico. a) 219 a 221 pb das sequências de 5S rDNA de *O. sexnotata*, b) 209 a 212 pb das sequências de 5S rDNA de *O. octoguttata*. NTS em cinza: TATA-like (amarelo), GC box (azul), Citosina - 1 (rosa); 5S rDNA em verde claro: Box A (azul claro), elemento intermediário (IE) (bordo), Box C (laranja), poli T (violeta)..... 58
- Figura 2 Sequências de 5S rRNA obtidas de *O. sexnotata*, a) Alinhamento da sequência de cDNA com as sequências do DNA genômico, b) Alinhamento da sequência de cDNA com as sequências de 5S rDNA do cromossomo 7. Box A (azul claro), elemento intermediário (IE) (bordo), Box C (laranja).... 57
- Figura 3 Agrupamento por máxima-verossimilhança (MV) das sequências de 5S rDNA obtidas de *O. sexnotata* a partir do DNA genômico, de cada cromossomo e a partir do cDNA, de *O. octoguttata* e de espécies de Coleoptera depositadas no GenBank, utilizando o modelo de substituição nucleotídica Kimura 2-parâmetros. Bootstrap com 1000 interações; Grupo externo: *Drosophila melanogaster*..... 58
- Figura 4 Células de *O. octoguttata* em metáfase I, com $2n = 10II + X + y$, submetidas a dupla FISH com sondas de 5S rDNA (vermelho) e sondas de 18S rDNA (verde), contracoradas com DAPI (azul), mostrando a presença dos cístrons de 5S (setas) em um bivalente autossômico (a) e a localização do cístron de 45S (b - setas), onde são co-localizados (c). d) e e) Fiber-FISH mostrando que os sítios co-localizados são interespaçados. Escala = 10µm..... 59
- Figura 5 Células meióticas de *O. personata* (a, b, c, g, h) e *O. magniguttis* (d, e, f, i, j), submetidas a FISH com sonda de 5S rDNA (vermelho) e 18S (verde) contracoradas com DAPI (azul). a) metáfase II, com $n = 10 + y$, mostrando o cístron de 5S (setas) associado com um autossomo. b) a localização do cístron de 45S (seta). c) Sobreposição das imagens mostrando a co-localização dos cístrons ribossômicos (setas). d) e e) metáfase espermatogonial, com $2n = 22 = 20 + X + y$, mostrando os cístrons de 5S (setas) e 45S (setas) associados a quatro cromossomos. f) Sobreposição das imagens mostrando a co-localização dos cístrons (setas). g), h), i) e j)

	Fiber-FISH mostrando que os sítios co-localizados são interespaçados nas duas espécies. Escala = 10µm.....	60
Figura 6	Metáfase espermatogonial de <i>O. sexnotata</i> com 2n= 22 cromossomos submetidos a FISH com sonda de 5S rDNA (vermelho) contracorada com DAPI (azul). a) mapeamento do 5S em todos os cromossomos autossômicos. b) Localização do cístron de 45S em um par (seta). c) Sobreposição das imagens, mostrando a co-localização dos cístrons ribossomais em um par (setas). d) e e) Fiber-FISH mostrando que os sítios co-localizados são interespaçados. f) e g) Fibra com apenas o cluster 5S rDNA. Escala = 10 µm.....	61
MS. 1	Sequências do 5S rDNA obtidas a partir de cada cromossomo de <i>O. sexnotata</i> . 5S rDNA (verde claro); A box (azul claro); elemento intermediário (IE) (bordo); C box (laranja); poli T (violeta); Retropseudogene 5S derivado de <i>Cavia porcellus</i> (cromossomo 4 e X- amarelo); TE: <i>DNA9-48B</i> (cromossomo 9- amarelo); Retrotransposon: <i>AmnSINEIO</i> (cromossomo Y- amarelo).....	62

CAPÍTULO II

Figura 1	Representação esquemática das sequências parciais do gene da histona H1, U1 snDNA e U2 snDNA em <i>O. sexnotata</i> , em destaque, segmento interno com identidade à elemento transponível.....	77
Figura 2	Células meióticas de <i>O. octoguttata</i> , com 2n=10II+X+y, submetidas a FISH (a-e), contracoradas com DAPI (azul) e hibridizadas com as sondas: (a) de histona H1 (verde) (b) de histona H3 (vermelho). (c) de histona H4 (vermelho). (d) de U1 snDNA (vermelho). (e) de U2 snDNA (verde). Dupla FISH (f-i) combinando as sondas: (f) de histonas H1 (verde) e H3 (vermelho). (g) de histonas H1 (verde) e H4 (vermelho). (h) de H3 (vermelho) e U2 (verde). (i) de U1 (vermelho) e U2 (verde) snDNA. Barra = 10 µm.....	78
Figura 3	Células espermatogoniais de <i>O. personata</i> macho, com 2n=10II+X+y, submetidas a FISH (a-e), contracoradas com DAPI (azul) e hibridada com as sondas: (a) de histona H1 (verde). (b) de histona H3 (vermelho). (c) de histona H4 (vermelho). (d) de U1 snDNA (vermelho). (e) de U2 snDNA (verde). Dupla FISH (f-i) combinando as sondas: (f) histonas H1 (verde) e H3 (vermelho). (g) histonas H1 (verde) e H4 (vermelho). (h) histona H3 (vermelho) e U2 (verde). (i) de U1 (vermelho) e U2 (verde) snDNA. Barra = 10 µm.....	79
Figura 4	Células meióticas de <i>O. magneguttis</i> submetidas a FISH (a-e), contracoradas com DAPI (azul) e hibridada com as sondas: (a) de histona H1 (verde). (b) de histona H3 (vermelho). (c) de histona H4 (vermelho). (d) de U1 snDNA (vermelho). (e) de U2 snDNA (verde). Dupla FISH (f-i) combinando as sondas: (f) das histonas H1 (verde) e H3 (vermelho). (g) das histonas H1	

(verde) e H4 (vermelho). (h) da histona H3 (vermelho) e U2 (verde). (i) de U1 (vermelho) e U2 (verde) snDNA. Barra = 10 µm..... 80

Figura 5 Metáfases espermatogoniais de *O. sexnotata* machos com 2n=10II+X+y, submetidas a FISH (a-e), contracoradas com DAPI (azul) e hibridada com as sondas: (a) de histona H1 (verde). (b) de histona H3 (vermelho). (c) da histona H4 (vermelho). (d) de U1 snDNA (vermelho). (e) de U2 snDNA (verde). Dupla FISH (f-i) combinando as sondas: (f) das histonas H1 (verde) e H3 (vermelho). (g) das histonas H1 (verde) e H4 (vermelho). (h) da histona H3 (vermelho) e U2 (verde). (i) de U1 (vermelho) e U2 (verde) snDNA. Barra = 10 µm..... 81

MS. 1 Ideograma mostrando o mapeamento cromossômico do cluster histônico e snDNAs nos cariótipos de todas as espécies de *Omophoita* (a) *O. octoguttata* (b) *O. personata* (c) *O. magniguttis* (d) *O. sexnotata*..... 82

LISTA DE TABELAS

MATERIAL E MÉTODOS

Tabela 1	Relação de <i>primers</i> utilizados nas amplificações das sequências do 5S rDNA de histonas H1, H3, H4 e U1 snDNA e U2 snDNA.....	36
----------	--	----

CAPÍTULO II

Tabela 1	Relação de <i>primers</i> utilizados nas amplificações das sequências de histonas H1, H3, H4 e U1 snDNA e U2 snDNA.....	68
----------	---	----

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLA

°C - Graus Celsius;

μL - Microlitro;

μM – Micrômetro;

2n – número diploide;

11-dUTP - Digoxigenin -11-2'-deoxyuridine 5'-triphosphate tetralithium salt;

16-dUTP - Biotin-16-2'-deoxyuridine-5'-triphosphate;

18S rRNA - Ácido Ribonucleico ribossomal 18S;

45S rRNA - Ácido Ribonucleico ribossomal 45S;

5S rRNA - Ácido Ribonucleico ribossomal 5S;

7SL RNA - Ácido ribonucleico 7SL de reconhecimento de sinal;

pb - Par de base;

cDNA - DNA complementar;

CTAB - Brometo de cetiltrimetilamônio;

DIRS-1 - *Dictyostelium discoideum* transposon;

DNAs - Ácido Desoxiribonucleico;

dNTP - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados;

DSBs - *Double-Strand Breaks*;

EBR - *Evolutionary Breakpoint Region*;

FISH - Hibridação *in situ* fluorescente;

gr - gramas;

GIRINST - *Genetic Information Research Institute*;

H1 - histona H1;

H2A - histona H2A;

H2B - histona H2B;

H3 - histona H3;

H4 - histona H4;

ICRs - Regiões de controle internos;

IE - Elemento intermediário;

IGS - Espaçador intergênico;

Indels - Inserção e deleção nucleotídica;

ITS - Espaçador Interno Transcrito;

KH₂PO₄ - Fosfato de monopotássio;

L - litro;

LINE - *Long Interspaced Nuclear Element*;

LTR - *Long Terminal Repeat*;

MgCl₂ - Cloreto de Magnésio;

Min - minuto;

Na₂HPO₄ - fosfato dissódico;

NaCl - Cloreto de sódio;

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*;

ng - nanogramas;

NOR - Região Organizadora de Nucléolo;

NTS - Espaçador Não Transcrito;

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase;

pM - picomol;

rDNA - DNA ribossomal;

RNA - Ácido Ribonucleico;

rRNA - RNA ribossomal;

RTE - Elemento Retrotransponível;

s - Segundo;

S - Sul;

SINE - *Short Interspaced Nuclear Element*;

SNPs - *Single Nucleotide Polymorphisms*;

snRNA - Pequeno RNA nuclear;

SSC – Citrato de Sódio Salino;

TE - Elemento Transponível;

tRNA - RNA transportador;

U snRNA - Pequeno RNA nuclear U;

U1 snRNA - Pequeno RNA nuclear U1;

U2 snRNA - Pequeno RNA nuclear U2;

U4 snRNA - Pequeno RNA nuclear U4;

U5- snRNA - Pequeno RNA nuclear U5;

U6- snRNA - Pequeno RNA nuclear U6;

W – Oeste.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
1.1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
1.1.1	Aspectos Gerais Da Ordem Coleoptera.....	20
1.1.2	Citogenética de Coleoptera.....	22
1.1.2.1	Citogenética de Alticinae.....	24
1.1.3	Heterocromatina e DNA Repetitivo em Alticinae.....	25
1.1.3.1	Sequências repetidas <i>in tandem</i>	26
1.1.3.2	Sequências repetidas dispersas.....	30
1.2	JUSTIFICATIVA	32
2	OBJETIVOS.....	33
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3.1	MATERIAL BIOLÓGICO.....	34
3.2	MÉTODOS.....	35
3.2.1	Citogenética Convencional.....	35
3.2.2	Análise Molecular.....	35
3.2.2.1	Microdissecção dos cromossomos de <i>O. sexnotata</i>	35
3.2.2.2	Extração de DNA genômico.....	35
3.2.2.3	Extração de RNA.....	36
3.2.2.4	Amplificação das sequências.....	36
3.2.2.5	Obtenção das sequências de rDNA 5S.....	37
3.2.2.6	Análise das sequências.....	37
3.2.2.7	Agrupamento filogenético das sequências de 5S rDNA.....	38
3.2.2.8	Síntese de sondas.....	38
3.2.3	Citogenética Molecular.....	39
3.2.3.1	Hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH).....	39
3.2.3.2	Fiber FISH.....	39
3.2.3.3	Análise cromossômica.....	39
4	RESULTADOS.....	40
4.1	CAPÍTULO I: Dispersão de sequências 5S DNA ribossomal nos cromossomos de <i>Omophoita</i> (Coleoptera: Chrysomelidae): mecanismos de <i>concerted evolution</i> e <i>birth and death</i>	41
	Resumo.....	42
	Abstract.....	43
4.1.1	Introdução.....	44
4.1.2	Material e Métodos.....	46
4.1.3	Resultados.....	49
4.1.4	Discussão.....	51
4.1.5	Agradecimentos.....	55
4.1.6	Referências.....	55
4.1.7	Figuras.....	56

4.1.8	Material suplementar.....	62
4.2	CAPITULO II: Intensa dispersão de histonas e U snDNAs associadas à elementos transponíveis nos cariótipos de <i>Omophoita</i> (Coleoptera, Chrysomelidae).....	63
	Resumo.....	64
	Abstract.....	65
4.2.1	Introdução.....	66
4.2.2	Material e Métodos.....	68
4.2.3	Resultados.....	70
4.2.4	Discussão.....	73
4.2.5	Agradecimentos.....	77
4.2.6	Referências.....	77
4.2.7	Figuras.....	77
4.2.8	Material suplementar.....	82
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	83
	REFERÊNCIAS.....	84
	APÊNDICE 1- REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR), PARA AMPLIFICAÇÃO DO 5S rDNA.....	101
	APÊNDICE 2- REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA AMPLIFICAÇÃO DAS HISTONAS H1, H3 E H4.....	102
	APÊNDICE 3- REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA AMPLIFICAÇÃO DOS U1 E U2 snDNAs.....	103
	APÊNDICE 4- MARCAÇÃO DA SONDA DO 5S rDNA POR PCR.....	104
	ANEXO 1- CITOGENÉTICA CONVENCIONAL.....	105
	ANEXO 2- AMPLIFICAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS CROMOSSÔMICAS MICRODISSECTADAS VIA KIT <i>Genomeplex Single Cell, whole genome amplification-4</i> (WGA 4).....	106
	ANEXO 3- EXTRAÇÃO DE DNA SEGUNDO MURRAY; THOMPSON (1980), COM MODIFICAÇÕES.....	107
	ANEXO 4- PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE RNA COM TriZol® (Invitrogen).....	108
	ANEXO 5- CONVERSÃO EM cDNA PELO KIT <i>First Strand cDNA Synthesis</i> (GE Healthcare).....	109
	ANEXO 6- PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DA PCR PELO KIT GE Healthcare – <i>Illustra GFX PCR DNA</i>	110
	ANEXO 7-CLONAGEM.....	111
	ANEXO 8- MARCAÇÃO DE SONDAS POR <i>NICK Translation, Kit Labeling System</i> (Invitrogen).....	113
	ANEXO 9- HIBRIDAÇÃO <i>in situ</i> FLUORESCENTE (FISH) (PINKEL et al., 1986).....	114

1 INTRODUÇÃO

A classe Insecta possui muitas ordens, no entanto, cinco delas se destacam por alta riqueza de espécies, sendo elas Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera e Hemiptera. A ordem Hymenoptera tem mais de 115.000 espécies descritas, Diptera e Lepidoptera têm em torno de 150.000 espécies descritas cada uma, e Hemiptera possui quase 100.000. Coleoptera é a maior e mais diversa entre elas (GULLAN; CRANSTON, 2010), com aproximadamente 358.000 espécies agrupadas em 25.500 gêneros descritos taxonomicamente (COSTA, 2003).

A ordem Coleoptera agrupa as subordens Archostemata, Adephaga, Myxophaga e Polyphaga (GILLOT, 2005). A subordem Polyphaga inclui a grande diversidade da ordem (GRIMALDI; ENGEL, 2006) e nesta encontra-se a família Chrysomelidae, a qual inclui 15 subfamílias (VANIN; IDE, 2002; GILLOT, 2005). Dentre essas subfamílias, Alticinae possui o maior número de espécies na Região Neotropical (BORROR; DeLONG'S, 2005), com cerca de 290 espécies analisadas do ponto de vista citogenético, destacando características cromossômicas como: irregularidades no tamanho, morfologia dos cromossomos sexuais e variação do número diploide (VIRKKI; SANTIAGO-BLAY, 1996; SMITH; VIRKKI, 1978; VIRKKI, 1967, 1968, 1970, 1988b; PETITPIERRE, 1988, 2006; VIRKKI et al., 1991; ALMEIDA et al., 2009).

Os DNAs repetitivos compõem uma grande quantidade dos genomas eucarióticos, sendo responsáveis pela ampla variação de sequências e número de cópias de DNA, podendo estar arrançados *in tandem* ou de maneira dispersa (SUMNER, 2003), constituindo distintas famílias que podem ser codificantes ou não (GREGORY, 2005). As famílias multigênicas são ditas codificantes (algumas delas apenas transcritas) e caracterizadas como um grupo de genes que descende de um gene ancestral comum e, desta forma, possuem sequências de DNA similares em estrutura e função (NEI; ROONEY, 2005). Dentre essas famílias, as mais estudadas são: a) a família do rDNA (DNA ribossomal) a qual está dividida nas unidades transcricionais maior (45S) e menor (5S), b) genes codificadores das proteínas histônicas e, c) pequenos RNAs nucleares (snRNA).

Os estudos existentes com as famílias multigênicas em Coleoptera têm como foco principal a localização das sequências nos cromossomos (CABRAL-DE-MELLO et al., 2010, 2011 b, c; GOLL et al., 2015). Em mamíferos e peixes, principalmente, as sequências das famílias multigênicas têm sido utilizadas como marcadores genéticos e citogenéticos em estudos evolutivos, para o estudo da variação intraespecífica, evolução do genoma e para a

reconstrução filogenética (SUZUKI et al., 1994; QIN et al., 2015). Neste contexto, considerando que os genes de rDNA, histonas, e U snDNA podem apresentar localização variável (MENEZES DE CARVALHO et al., 2015), estudos envolvendo a caracterização destas sequências em Coleoptera podem ser úteis na compreensão das relações evolutivas e no entendimento dos mecanismos geradores da variabilidade cariotípica no grupo.

1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1.1 Aspectos Gerais da Ordem Coleoptera

Coleoptera constitui quase um quarto de todas as formas de vida conhecidas na Terra e é a maior e mais diversificada ordem da classe Insecta, tanto em número de espécies quanto em tipos de ambientes que podem ser explorados (RILEY et al., 2002; GULLAN; CRANSTON, 2010). A ordem Coleoptera corresponde a cerca de 40% do total de insetos e 30% dos animais, constituindo a maior ordem do Reino Animal (LAWRENCE; BRITTON, 1994). Para a região Neotropical estão registrados 6.703 gêneros e 72.476 espécies de besouros, das quais aproximadamente 30.000 são descritas para o Brasil (COSTA, 2000).

Registros fósseis e análises moleculares apontam que os coleópteros se diversificaram durante, ou antes, do Cretáceo (WANG et al., 2013). Este foi um período importante para a evolução dos besouros, incluindo o declínio dos Archostemata, o sucesso ecológico dos Adephaga e as primeiras aparições e divergências de algumas grandes linhagens de Polyphaga (PONOMARENKO, 2002). Nesses milhões de anos de evolução, os besouros foram encontrados nos mais diversos nichos ecológicos, estando ausentes apenas em ambientes marinhos (MOORE, 2003). Ocorrem em quase toda a parte vegetativa, e em algumas árvores, podem ser encontrados desde sua casca até as flores, folhas, raízes, mesmo nas partes subterrâneas e no interior de galhas (GULLAN; CRANSTON, 2010). Os coleópteros apresentam maior abundância populacional nos períodos de temperaturas elevadas (28°C) e menores precipitações. Estes parâmetros podem interferir no seu ciclo biológico, exercendo uma importante influência sobre a dinâmica populacional (PETRONI, 2008).

Os coleópteros estão entre os mais importantes polinizadores de plantas com flores e foram os primeiros insetos polinizadores das angiospermas (COSTA, 2000; THIEN et al., 2009). É proposto que a diversificação existente nesta ordem de insetos foi conduzida, em boa parte, por co-evolução com angiospermas basais (FARRELL, 1998; WANG et al., 2013). Uma das razões do sucesso da ordem e de sua diversidade está relacionada a um

conjunto de adaptações, como o desenvolvimento dos élitros e outras estruturas que permitiram a exploração de novos habitats e hábitos alimentares (GRIMALDI; ENGEL, 2006; GULLAN; CRANSTON, 2010).

O conhecimento taxonômico sobre os Coleoptera é alvo de discussão e dúvidas sobre a identificação e agrupamento de seus representantes. Algumas famílias com representantes de importância econômica são mais estudadas do que outras igualmente importantes e diversificadas. Esse fato, aliado à enorme diversidade de coleópteros, aumenta a dificuldade para a obtenção de classificações consistentes e estabelecimento das relações filogenéticas (VANIN; IDE, 2002). A monofilia das quatro subordens que compõem Coleoptera é consenso entre a maioria dos autores, pelo menos quando somente as formas viventes são consideradas (HANSEN, 1997). Seus representantes são agrupados em 4 subordens: Archostemata, Adephaga, Myxophaga e Polyphaga (GILLOT, 2005).

Polyphaga é o clado mais diversificado, com mais de 90% das espécies conhecidas dos coleópteros (VANIN; IDE, 2002). Esta subordem agrupa 88 famílias e possui a maior diversidade de espécies, tanto morfológica quanto biológica (VANIN; IDE, 2002). Dentre os Polyphaga encontra-se Chrysomelidae, a qual inclui 2.600 gêneros e 40.000 espécies, agrupadas em 15 subfamílias (COSTA, 2000; GILLOT, 2005; VANIN; IDE, 2002). Os Chrysomelidae são geralmente besouros de tamanho pequeno a médio com corpo de forma oval-alongada, onde os indivíduos adultos geralmente consomem folhas ou elementos florais (RILEY et al., 2002). (WANG et al., 2013) e todas as principais subfamílias de Chrysomelidae se originaram antes do início do Cambriano (KERGOAT et al., 2011 ; WANG et al., 2013).

Alticinae possui o maior número de espécies na Região Neotropical com cerca de 240 gêneros e 8.000 espécies descritas (BORROR; DeLONG'S, 2005; NADEIN, 2013). Quanto sua distribuição, ocorrem desde a região sul dos Estados Unidos até o sul do Chile. Existe um ponto de divergência consensual sobre a relação sistemática da subfamília Alticinae com Galerucinae. Alguns autores relacionam Alticinae como grupo irmão de Galerucinae, colocando Alticinae dentro de Galerucinae, onde ela passa a ser considerada tribo Alticini. Esta relação é a mais aceita atualmente, sendo reforçada por estudos moleculares, que estabelece uma monofilia recíproca entre Alticinae e Galerucinae (REID, 1995; GÓMEZ-ZURITA et al., 2008; GE et al., 2012). No entanto, essa classificação ainda é alvo de investigação.

Os espécimes pertencentes à Alticinae são popularmente designados na literatura como "fleabeetles", isto é, besouros semelhantes a pulgas, devido a habilidade de dar grandes saltos.

Possuem uma estrutura modificada no fêmur posterior que dentre outras autopomorfias os distinguem dos demais grupos (BORROR; DeLONG'S, 2005). Estudos ecológicos das espécies de Alticinae mostraram que a relação mimética é muito frequente, principalmente no gênero *Omophoita* (DEL-CLARO, 2004). Nestes casos, o mimetismo estaria relacionado com a coloração aposemática e/ou com sua palatabilidade (DEL-CLARO, 2004). Os alticinaes também são potenciais indicadores biológicos, uma vez que são encontrados com maior abundância em áreas degradadas, de sucessão primária e de borda (LINZMEIER et al., 2006).

1.1.2 Citogenética de Coleoptera

Os estudos citogenéticos na ordem Coleoptera são escassos, pouco mais de 3.000 espécies tiveram seus cariótipos analisados, com descrição de número diploide, morfologia cromossômica e mecanismo de determinação sexual (SMITH; VIRKKI, 1978; VIDAL, 1984; VIRKKI; SANTIAGO-BLAY, 1993; MOURA et al., 2003; KARAGYAN et al., 2004; ALMEIDA et al., 2000, 2009; SCHENEIDER et al., 2002, 2007). O pequeno número de estudos neste grupo se deve principalmente ao pequeno tamanho de seus cromossomos e a diferenças nas fases de maturação da espermatogênese, o que dificulta a análise de algumas espécies (SMITH; VIRKKI, 1978). Deve-se ressaltar que as análises citogenéticas têm sido, em grande parte, realizadas na meiose de machos, devido à dificuldade de obtenção dos cromossomos mitóticos metafásicos (PETITPIERRE, 1996).

Segundo Smith; Virkki (1978) e Petitpierre (1996) o cariótipo de Coleoptera é formado principalmente por cromossomos metacêntricos de tamanho médio ou pequeno, apresentando em metáfases mitóticas tamanhos entre 0,5 e 6,5 μm . O menor número diploide descrito para Ordem foi de $2n=4$, em *Chalcolepidius zonatus* (FERREIRA et al., 1984) e o maior $2n=64$, em *Ditomus capito* (SERRANO, 1981) e *Disonycha bicarinata* (VIRKKI, 1988a).

A fórmula cromossômica considerada comum para Coleoptera foi originalmente postulada por Smith (1950) como sendo $2n= 20= 9\text{II}+\text{Xyp}$ nos machos, adotando Xy para designar o sistema cromossômico de determinação sexual heterogamético, e o “p” para representar o tipo de associação meiótica do par sexual, o qual foi originalmente comparado a um paraquedas por Stevens em 1906 (SMITH; VIRKKI, 1978). Os mecanismos cromossômicos de determinação do sexo em Coleoptera são variáveis, podendo ser classificados em aquiasmáticos, como é o caso dos sistemas Xyp, Xnyp/nXyp, Xyc, X0 e X1+X2, ou quiasmáticos, como o neoXY, Xy, Xyr, X1X2Y e XY1Y2 (SMITH; VIRKKI,

1978).

O segundo sistema cromossômico de determinação sexual mais encontrado em Coleoptera é o XO, ocorrendo em 14% das espécies (SMITH; VIRKKI, 1978; YADAV et al., 1985). A origem deste sistema ocorre por perda do cromossomo yp. Esta derivação pode ocorrer devido à heterocromatinização ou degeneração desse cromossomo (DUTRILLAUX; DUTRILLAUX, 2009; JOHN; SHAW, 1967; WHITE, 1973).

Em Coleoptera, rearranjos cromossômicos do tipo fusões, fissões, inversões e translocações têm sido observados. Estes rearranjos têm contribuído para o processo de diferenciação cariotípica dos autossomos e cromossomos sexuais nas diversas famílias, tais como Buprestidae (KARAGYAN; KUZNETSOVA, 2000), Chrysomelidae (GÓMEZ-ZURITA et al., 2004), Cicindelidae (GALIÁN et al., 2002), Elateridae (FERREIRA et al., 1984; SCHNEIDER et al., 2007), Scarabaeidae (BIONE et al., 2005; CABRAL-DE-MELLO et al., 2008) e Tenebrionidae (PONS, 2004) dentre outras.

A grande maioria das espécies estudadas pertence às subordens Adephaga e Polyphaga (SMITH; VIRKKI, 1978). Nas subordens Archostemata e Myxophaga, os estudos citogenéticos são encontrados em apenas três espécies, sendo uma pertencente à Myxophaga, *Ytu zeus*, $2n=18+Xy$ (MESA; FONTANETTI, 1985), e duas a Archostemata, *Micromalthus debilis*, com número diploide $2n=20$ nas fêmeas, e $2n=10$ nos machos, e *Distocupes varians*, $2n=19+X0$ (SMITH; VIRKKI, 1978; GALIÁN; LAWRENCE, 1993).

Na subordem Adephaga, a característica cromossômica comum é a presença de grande número de cromossomos e as análises citogenéticas se concentram nas famílias Cicindelidae e Carabidae (SMITH; VIRKKI, 1978; MARTINEZ-NAVARRO et al., 2004). A variação do número cromossômico detectada em Adephaga é grande, com o menor número de cromossomos igual a $2n=12$ em *Craspedophorus angulatus*, e o maior com $2n=80$ em *Graphipterus serrator* (SMITH; VIRKKI, 1978; MARTINEZ-NAVARRO et al., 2004).

Dentro de Polyphaga os estudos relacionados à evolução cromossômica estão concentrados nas famílias Buprestidae (KARAGYAN et al., 2004), Chrysomelidae (SCHNEIDER et al., 2002; PETITPIERRE; ELGUETA, 2006; ALMEIDA et al., 2009), Tenebrionidae (ALMEIDA et al., 2000; PONS, 2004; GOLL et al., 2013), Elateridae (SCHNEIDER et al., 2007) e Scarabaeidae (BIONE et al., 2005). Dos cariótipos estudados o número diploide $2n=20$ aparece com maior frequência, bem como, sistema de determinação sexual Xy_p e cromossomos com dois braços, sugerindo ser condição ancestral para esse táxon (SMITH; VIRKKI, 1978; VIRKKI et al., 1991). Em Chrysomelidae uma grande variação quanto ao número cromossômico e aos tipos de sistemas de determinação sexual foi descrita.

O maior número diploide observado foi $2n=64$, em *Disonycha bicarinata* e o menor foi $2n=6$, em *Homoschema latitarsum* (SMITH; VIRKKI, 1978; VIRKKI, 1988a; VIRKKI; SANTIAGO-BLAY, 1996).

A fórmula cromossômica considerada ancestral para Chrysomelidae é de $2n=24=22+Xy$. As divergências cariotípicas observadas podem ter derivado ao longo do tempo, por redução mediadas por fusões ou, aumento do número autossômico por fissões cêntricas seguidas de inversões pericêntricas. Quanto ao sistema de determinação sexual, permanece o Xyp original ou o cromossomo yp é perdido (VIRKKI, 1988b; SMITH; VIRKKI, 1978).

1.1.2.1 Citogenética de Alticinae

Os representantes da subfamília Alticinae apresentam o complemento cromossômico e o comportamento dos cromossomos sexuais diferentes da maioria dos Coleoptera (SMITH; VIRKKI, 1978; VIRKKI, 1963). O cariótipo ancestral dos Polyphaga ($2n=20=9II+Xyp$) foi descrito somente em duas espécies de Alticinae, *Parasyphaea* sp. (Alticini) e *Chaetocnema chlorophana* (Chaetocnemini) (PETITPIERRE et al., 1988; SMITH; VIRKKI, 1978). Na maioria das espécies de Alticinae o emparelhamento dos cromossomos sexuais é tardio ou inexistente, além disso, os cromossomos sexuais possuem diferentes orientações no fuso metafásico, com segregação pré ou pós-reducional. Somando-se a isso podem variar no tamanho e morfologia em espécies relacionadas, sugerindo uma formação recente (VIRKKI, 1963, 1964, 1967; PETITPIERRE, 2006; ALMEIDA et. al., 2009).

Petitpierre (1988, 2006) e Virkki (1970) descreveram que os números cromossômicos mais frequentes em Alticinae são 11 ou 12 pares, com amplitude de variação do $2n$ na família de $2n=6=2II+neoXY$ em *Homoschema latitarsum* até $2n=64=30II+X1y+X2X3$ em *Disonycha bicarinata*. Vários autores propuseram que esse aumento no número diploide pode ter ocorrido por fissões cêntricas ou variações no conteúdo de DNA nuclear (PETITPIERRE, 1988; PETITPIERRE et al., 1993; VIRKKI, 1988a).

Até o presente momento os estudos na tribo Oedionychini indicam algumas características cariotípicas únicas, como o tamanho dos cromossomos sexuais, que são considerados gigantes e com comportamento atípico durante a meiose, porém com segregação regular (VIRKKI, 1968; SMITH; VIRKKI, 1978; ALMEIDA, 2009).

Na subtribo Oedionychina, as espécies possuem cromossomos sexuais de tamanho extremamente grande e assinápticos durante a meiose, número diploide igual a 22, fórmula

meiótica $10\text{II}+\text{X}+\text{y}$, como é o caso das espécies do gênero *Omophoita*. A variabilidade morfológica dos cromossomos autossômicos observados sempre envolve a ocorrência de cromossomos metacêntricos e acrocêntricos, o que parece ser uma característica dessa subtribo (SMITH; VIRKKI, 1978; VIRKKI, 1988b, 1989; PETITPIERRE et al., 1988; SEGARRA; PETITPIERRE, 1990; VIRKKI et al., 1991; VIRKKI; SANTIAGO-BLAY, 1993).

Almeida et al. (2009) descreveram citogeneticamente quatro espécies do gênero *Omophoita* (*Omophoita magniguttis*, *Omophoita octoguttata*, *Omophoita personata* e *Omophoita sexnotata*), sendo observado $2n=22=20+\text{X}+\text{y}$ e fórmula meiótica, $10\text{II}+\text{X}+\text{y}$, semelhantes à outras espécies do mesmo gênero e espécies relacionadas (SMITH; VIRKKI, 1978; PETITPIERRE et al., 1988; VIRKKI et al., 1991; VIRKKI; SANTIAGO-BLAY, 1993). A morfologia dos autossomos nestas espécies foi variável, oriundas de inversões pericêntricas, como por exemplo, apenas acrocêntricos em *O. magniguttis* e *O. octoguttata*, metacêntricos em *O. personata* e, predominantemente metacêntricos em *O. sexnotata* (ALMEIDA et al., 2009). Em todas essas espécies os cromossomos sexuais são metacêntricos (ALMEIDA et al., 2009).

1.1.3 Heterocromatina e DNA Repetitivo em Alticinae

Os estudos sobre localização da heterocromatina constitutiva em Coleoptera mostram uma ocorrência preferencial de banda C na região centromérica, podendo ocorrer também nas regiões intersticiais e teloméricas de todos os cromossomos autossômicos. Porém, regiões teloméricas heterocromáticas são menos frequentes. Nos cromossomos sexuais, a presença de heterocromatina constitutiva é variável, de acordo com o grau de diferenciação cromossômica da espécie, podendo ocorrer somente na região pericentromérica, ao longo de todo o comprimento cromossômico, ou ainda ser ausente como no cromossomo y_p , o qual não mostra a presença de heterocromatina (ALMEIDA et al., 2000; ROZEK et al., 2004).

Para Alticinae, estudos sobre a ocorrência de heterocromatina foram realizados em somente sete espécies (VIRKKI, 1983; ALMEIDA et al., 2006, 2009). Virkki (1983) observou a ocorrência de bandas C pericentroméricas em todos os cromossomos do complemento e adicionais nos cromossomos sexuais, variando em número, posição e intensidade de marcação nos cromossomos de *Omophoita annularis*, *O. personata*, *O. octoguttata* e *Alagoasa januararia*. Padrões pericentroméricos também foram descritos em

estudos com espécies de *Omophoita* por Almeida et al. (2009), observados em bivalentes autossômicos e cromossomos sexuais de *O. magniguttis* e *O. sexnotata*.

A localização da Região Organizadora de Nucléolo (RON) tem sido analisada em apenas 190 espécies de Coleoptera das subordens Adephaga e Polyphaga (SCHNEIDER et al., 2007). Em Coleoptera a RON geralmente é encontrada em pares autossômicos e/ou nos cromossomos sexuais. Nas subordens mais estudadas, Adephaga e Polyphaga, a RON em autossomos foi descrita em 82% e 63% das espécies, respectivamente (para revisão ver Schneider et al., 2007). Segundo esses autores, a presença das RONS exclusivamente em pares autossômicos poderia ser representativa de uma condição ancestral e/ou uma situação mais estável, e as localizações em autossomos e cromossomos sexuais ou somente sexuais poderia ser uma condição derivada.

Grandes rearranjos cromossômicos estruturais, como deleções, duplicações, translocações e inversões são muitas vezes associadas com regiões heterocromáticas compostas de DNA repetitivo, e que frequentemente aparecem nas fronteiras entre heterocromatina e eucromatina (BADAEVA et al., 2007; CHEN et al., 2010; BARROS et al., 2017). A ampla variação de sequências e de número de cópias de DNA dos genomas eucarióticos tem sido atribuída a diferentes quantidades de DNAs repetitivos nos diversos genomas, que apresentam ampla variabilidade, constituindo distintas famílias que podem representar grande parte da quantidade de DNA das células (CHARLESWORTH et. al., 1994; GREGORY, 2005). Basicamente, os DNAs repetitivos podem ser classificados como sequências codificantes ou não-codificantes, ainda podem estar organizados *in tandem* (DNAs satélites, minissatélites, microsatélites e algumas famílias multigênicas) ou dispersos nos genomas (transposons e retrotransposons), sendo os elementos de transposição e os DNAs satélites os DNAs repetitivos mais abundantes em eucariotos (MEŠTROVIĆ et. al., 2015). Estes, são discutidos mais detalhadamente nas próximas seções.

As espécies estudadas de *Omophoita* apresentam sequências repetitivas distribuídas em todos os autossomos e cromossomos sexuais, demonstrando que a heterocromatina das espécies é em grande parte composta por DNA repetitivo (MELLO et al., 2014).

1.1.3.1 Sequências repetidas *in tandem*

As sequências repetidas *in tandem* não transcritas são classificadas em três sub-grupos de acordo com o tamanho do seu fragmento e número de repetições (LEVINSON; GUTMAN,

1987): (i) as sequências satélites apresentam cerca de 100 a 300 pares de base (pb) de comprimento e podem variar de 1.000 a mais de 1.000 000 cópias (DNA altamente repetido) de uma sequência básica que ocorre em um ou em alguns locos nos cromossomos (TIMBERLAKWE, 1978; WALSH, 2001); (ii) os minissatélites ou sequências com número variável de repetições (VNTR, *variable number of tandem repeats*) são repetições de aproximadamente 10 a 60 pb (DNA moderadamente repetido), encontrados em diferentes *loci* no genoma e nos telômeros (JEFFREYS et al., 1985) e; (iii) os microssatélites que são repetições mais curtas (1 a 5 pb), com número de repetições variável de alguns poucos a centenas de cópias por loco e com números de locos extremamente abundantes nos genomas (WEBER; MAY, 1989).

Alguns estudos realizados em Coleoptera evidenciam a composição de bases, a localização e a evolução de DNA satélites (DNA sat). Estes trabalhos revelaram os DNAs satélite como componente prevalente, constituindo aproximadamente 50% do DNA genômico e em grande parte presentes dentro de blocos heterocromáticos. Essas sequências satélites são compostas de uma única sequência de DNA repetitivo que são agrupados *in tandem* e quase sempre espécie-específicos (JUAN et al., 1993a, b; UGARKOVIC et al., 1996; PONS et al., 1997; LORITE et al., 2000, 2002; PONS et al., 2002; PONS, 2004; MRAVINAC; PLOHL, 2007; WANG et al., 2008). Sequências de DNA sat foram estudadas em poucas espécies de Chrysomelidae, *Chrysolina americana* Linnaeus 1758, *Xanthogaleruca luteola* Müller 1766 e *Chrysolina carnifex* Fabricius 1792. Nestas espécies os monômeros de DNA satélites são constituídos por cerca de 59% de A+T, com repetições internas diretas e invertidas, estão localizados na região pericentromérica na maior parte ou em todos os bivalentes meióticos, coincidindo com a região de blocos heterocromáticos (LORITE et al., 2000, 2002; PALOMEQUE et al., 2005). Até o presente momento, não existem registros sobre o estudo de DNA sat em espécies de Alticinae.

Os minissatélites, apesar de não apresentarem uma definição padronizada, têm se mostrado como uma importante ferramenta em estudos genéticos devido a sua dinâmica evolutiva (MARTINS, 2007). Da mesma forma, poucos são os organismos com mapeamento físico de microssatélites (HATANAKA et al., 2002).

As famílias multigênicas compreendem uma importante classe dos DNAs repetitivos, que transcrevem para um RNA funcional nos genomas e, cada uma das famílias possui um grupo de sequências de DNA (genes) com notável similaridade estrutural e funcional, sendo descendentes de um gene ancestral comum (NEI; ROONEY, 2005). São compostas de centenas ou milhares de cópias de sequências, que transcrevem importantes moléculas

(LONG; DAVID, 1980; PENDÁS et al., 1994) como os RNA ribossomais (rRNA), genes de histonas e pequenos RNAs nucleares (snRNA), que quando mapeados citogenicamente, revelam sítios localizados em um loco cromossômico ou dispersos em alguns cromossomos (CABRERO; CAMACHO, 2008).

Os genes de RNAs ribossomais são representados pelo rDNA maior, 45S e o rDNA menor, o 5S. O cluster do 45S rDNA corresponde a região organizadora de nucléolos (RON), é transcrito pela RNA polimerase I, processado e parcialmente montado para formar as subunidades ribossômicas no nucléolo (LONG; DAVID, 1980). O 45S rDNA consiste de unidade repetitiva de três genes ou regiões correspondentes aos rRNA ribossomais (18S, 5,8S e 28S) separadas por espaçadores transcritos internos (ITS1 e ITS2) e um espaçador intergênico (IGS) separando os clusters. A unidade repetitiva do 5S rDNA é sintetizada em outro lugar do genoma e entra no nucléolo para participar da montagem da subunidade ribossomal maior (LONG; DAVID, 1980). Este cluster consiste de aproximadamente 120 pares de base (pb) separadas por um espaçador não transcrito (NTS), que contem regiões envolvidas na expressão do gene de rRNA, como, sequência TATA-like e sequências de oligonucleotídeos repetidas (BUENO et al., 2016). O NTS é altamente variável em tamanho e sequência nucleotídica entre as espécies (LONG; DAVID, 1980; MARTINS; GALLETI Jr., 2001; PENDÁS et. al., 1994), parecendo estar sujeito a rápida evolução (REBORDINOS et. al., 2013).

Em Coleoptera, igualmente a outros insetos, o mapeamento de genes ribossomais foi realizado em poucas espécies. Os primeiros trabalhos em Scarabaeidae e Tenebrionidae mostraram que a localização desses genes são muito variáveis, podendo ser encontrado em apenas um par ou vários pares do complemento cromossômico (GALIÁN et al., 1995; DE LA RÚA et al., 1996; PROENÇA et al., 2002a, b; BIONE et al., 2005; CABRAL-DE-MELLO et al., 2010, 2011 b, c; OLIVEIRA et al., 2012; GOLL et al., 2015). Segundo Cabral-de-Mello et al. (2010, 2011 b, c) a condição ancestral para Coleoptera seria a presença de apenas um par cromossômico portador dos genes 45S e 5S e em sintenia. Para Alticinae apenas o cluster ribossomal 45S foi descrito para três espécies de *Omophoita*, destes *O. octoguttata* e *O. personata* possuem um par portador do cluster, e em *O. magniguttis* dois pares com a marcação do 45S rDNA (ALMEIDA et al., 2010).

A família multigênica que codifica as proteínas histônicas desempenha um importante papel na organização estrutural da cromatina, no empacotamento do DNA em nucleossomos e também na regulação da expressão gênica em eucariotos (SELLOS et al., 1990; CSINK; HENIKOFF, 1998; CHIODA et al., 2002). Em insetos as histonas agrupam-se em um

quarteto na maioria dos estudos (H1, H2A, H3 e H4) ou são organizadas no quinteto (H1, H2A, H2B, H3 e H4), como demonstrado para algumas espécies de Curculionidae (NAGODA et al., 2005; ROEHRDANZ et al., 2010). Estudos sobre a localização cromossômica de histonas mostram que, em geral, estas sequências apresentam localização cromossômica conservada em organismos relacionados. O estudo em 14 espécies de Scarabaeinae e Tenebrionidae (*Lagria villosa*) com histona mostrou a conservação destes clusters em um bivalente (Cabral-de-Mello et al., 2010, 2011 b, c; GOL et al., 2015).

A família multigênica U snDNA é composta de pequenos genes codificantes de RNAs que compõem a maquinaria do spliceosomo e está estreitamente envolvida no processo de splicing (SASHITAL et al., 2007). Esta família é composta de pequenos genes codificantes de RNAs ricos em uridina (GREEN, 1989; RIO, 1992; WEST, 2012) e podem ser subdivididas em 5 tipos, incluindo U1, U2, U4, U5 e U6 (VALADKHAN, 2005). No que se refere ao mapeamento das sequências U1 e U2 snDNA, embora altamente adequados para utilização como sondas FISH, pouco tem sido explorado em insetos e diferentes outros grupos (QIN et al., 2015). O mapeamento físico das sequências U snDNA em diferentes organismos como gafanhotos, crustáceos e peixes, evidenciou que estas sequências podem ser ligadas à outras famílias multigênicas (ANJOS et al., 2015; PELLICCIA et al., 2001; MANCHADO et al., 2006). Adicionalmente, estes genes podem apresentar padrões distintos de organização cromossômica (ÚBEDA-MANZANARO et al., 2010; MERLO et al., 2012; BARDELLA et al., 2016), podem estar presentes em cromossomos sexuais (UTSUNOMIA et al., 2014) ou em cromossomos supranumerários (BUENO et al., 2013).

A duplicação gênica é considerada um processo essencial na diversificação e com potencial para adaptações biológicas. O processo de acúmulo de genes duplicados (especialmente via erro de recombinação homóloga e duplicações genômicas) e a divergência evolutiva entre as cópias explica a existência de famílias multigênicas (WENDEL, 2000; BENNETZEN, 2002; KELLIS et al., 2004). Este processo evolutivo explica, pelo menos em parte, o formato atual dos genomas eucarióticos com a ocorrência de uma parcela dos genes em múltiplas cópias (LESPINET et al., 2002; LYNCH, 2002).

Os processos evolutivos que atuam em famílias multigênicas foram alvo de controvérsia. Antes da década de 1970 o paradigma evolutivo de famílias multigênicas era o das hemoglobinas e mioglobina, que divergiram gradualmente conforme os genes duplicados adquiriram novas funções. Este modelo de evolução foi chamado de evolução divergente (*divergent evolution*) (INGRAM, 1961).

Pesquisas em *Xenopus* durante a década de 1970 mostraram que seus rDNAs ocorriam em um grande número de cópias *in tandem* e que as sequências de nucleotídeos intergênicas eram mais similares dentro de uma espécie do que entre duas espécies relacionadas. Estas observações não podiam ser explicadas pelo modelo de evolução divergente, portanto um novo modelo foi criado chamado de evolução orquestrada (*concerted evolution*) que leva à homogeneização das sequências gênicas e intergênicas dos rDNAs (BROWN et al., 1972).

Enquanto muitos autores propuseram que a maioria das famílias multigênicas evoluía por evolução em concerto (HOOD et al., 1975; OHTA, 1981), outro modelo foi proposto, chamado nascimento-e-morte (*birth-and-death*). Neste modelo novos genes são criados por duplicação gênica, alguns destes são mantidos no genoma e outros são eliminados ou se tornam pseudogenes através do acúmulo de mutações *non-sense* (Nei e Hughes, 1992). O modelo de nascimento-e-morte consegue explicar o surgimento de novas funções e mostrou-se aplicável à maioria das famílias multigênicas (OTA; NEI, 1994; ZHANG et al., 1998).

Atualmente a evolução de famílias de rDNAs é entendida como um misto de seleção purificadora e evolução em concerto (NEI; ROONEY, 2005). Entretanto, nos últimos dez anos um modelo de evolução mista, que envolve o nascimento-e-morte e a evolução em concerto têm sido descritos para genes ribossomais (FREIRE et al., 2010; ÚBEDA-MANZANARO et al., 2010; PINHAL et al., 2011; MERLO et al., 2013; BUENO et al., 2016; LIU et al., 2017; BARDELLA; CABRAL-DE-MELLO, 2018). Do mesmo modo, algumas famílias gênicas altamente conservadas como a das ubiquitinas e histonas, evoluem pelo modelo de nascimento-e-morte e seu alto grau de conservação se deve primariamente à seleção purificadora ao invés de evolução em concerto (OTA; NEI, 1994; ZHANG et al., 1998). Desta forma, a organização e o mapeamento das famílias multigênicas, tornam-se úteis marcadores citogenéticos e podem elucidar a variação do cariótipo e organização genômica em diversos grupos de eucariotos (ALMEIDA et al., 2010).

1.1.3.2 Sequências repetitivas dispersas

Os elementos de repetição dispersos, também conhecidos como elementos de transposição (TEs), são sequências que podem estar repetidas milhares de vezes no genoma, porém arranjadas de forma dispersa (SUMMER, 2003). Os TEs compreendem dois tipos de elementos denominados Retrotransposons e Transposons de DNA (FESCHOTTE, 2004). Sua classificação é de acordo com sua organização estrutural e mecanismo de transposição. O

primeiro tipo inclui os Retrotransposons ou elementos de classe I que transpõem via transcrição reversa do seu RNA. Estes são copiados em duas fases, eles são transcritos a partir do DNA para o RNA e o RNA produzido é então reversamente transcrito para DNA através da enzima transcriptase reversa, este DNA copiado é então inserido numa nova posição no genoma (WICKER et al., 2007). O segundo tipo inclui os Transposons ou elementos de classe II que se movimentam pelo genoma através de cópias, diretamente de um local a outro do seu DNA. Neste processo as transposições são catalisadas por diversas enzimas transposases. As transposases fazem cortes coesivos no DNA, resultando em uma cadeia simples 5' ou 3' de DNA cortado, que é então ligado a uma nova região no genoma. Este processo envolve a atividade enzimática da DNA polimerase para preenchimento da região complementar na fita cortada e de uma DNA ligase, que liga a região fosfodiéster do DNA cortado na nova região a ser inserida no DNA (WICKER et al., 2007). Existem também os denominados Transposons replicativos, os quais realizam uma cópia de sua estrutura em outra posição do genoma (WICKER et al., 2007).

Os TEs são também classificados quanto à autonomia para a realização da transposição, sendo chamados de autônomos quando são capazes de produzir todas as proteínas necessárias para a transposição, e elementos não autônomos, que não codificam proteínas. Neste último caso, podem “emprestar” as funções enzimáticas necessárias de elementos autônomos presentes nas mesmas células para realizar sua transposição no genoma (FESCHOTTE et al., 2002)

Atualmente muitos estudos associam a presença de TEs com famílias multigênicas. Em Ortoptera essa associação foi descrita como provável causa da dispersão cromossômica de algumas famílias multigênicas, a exemplo da U1 snDNA, H3 e 5S rDNA (CABRAL-de-MELLO et al., 2011a; OLIVEIRA et al., 2011; BUENO et al., 2013; ANJOS et al., 2015; BUENO et al., 2016).

Ainda sobre a interação de TEs com as famílias multigênicas, uma classe única de *Short Interspersed Nuclear Element* (SINEs), derivada da fusão de um gene 5S rDNA e um *Long Interspaced Nuclear Element* (LINE) foi identificada, mostrando que o 5S rRNA e os retroelementos podem interagir (KAPITONOV; JURKA, 2003). Para as histonas, a presença de pseudogenes foi associada a invasão de elementos transponíveis (CHILDS et al., 1981) que forma histonas variantes, e estas, estariam livres para divergir em sequência e na temporalidade da expressão. Além disso, Kojima (2015) descreveu três novos tipos de SINEs (SINEU-1, SINEU-2 e SINEU-3) derivados do U1 ou U2 snRNA. Assim, as sequências de U1 e U2 podem se comportar como TEs, dando origem a grandes famílias de pseudogenes

(MARZ et al., 2008; WEINER et al., 1986).

De fato, os TEs representam uma grande porção do genoma eucariótico e são considerados um reservatório dinâmico de sequências responsáveis pela evolução estrutural e funcional de muitos genes, agindo na epigenética e no recrutamento de fatores de remodelação da cromatina e estrutura do cromossomo (APARICIO et al., 2002, VOLFF et al., 2003, BÖHNE et al., 2008).

1.2 JUSTIFICATIVA

O uso de elementos repetitivos de DNA tem se mostrado uma ferramenta esclarecedora para diversas questões, desde o entendimento da estrutura de diferentes regiões cromossômicas até análises relacionadas à diversificação gênica e cariotípica levando a evolução dos genomas eucarióticos. Estas ferramentas também são utilizadas como marcadores genéticos e citogenéticos em estudos da variação intraespecífica e reconstruções filogenéticas. Entretanto, na ordem Coleoptera há pouquíssimos estudos sobre as famílias multigênicas, sendo estes relacionados ao mapeamento físico. A caracterização molecular destes genes em Alticinae é inexistente.

Considerando a pequena fração de espécies brasileiras analisadas citogeneticamente quando comparado ao enorme número de espécies identificadas, que possuem características cariotípicas muito variáveis, como número diploide, tipos de sistema de determinação sexual e o tamanho dos cromossomos sexuais, os representantes da subfamília Alticinae são muito interessantes para estudos evolutivos. Além disso, os representantes da subtribo Oedionychina têm cromossomos sexuais muito maiores em tamanho quando comparados às outras espécies. Assim, análises que poderiam explicar o aumento destes cromossomos e a evolução genômica nestas espécies são de grande importância.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi a compreensão dos mecanismos de dispersão genômica e de diferenciação cariotípica proporcionado pelas famílias gênicas de 5S rDNA, histonas e U snRNA. Para isso, foi realizada a caracterização molecular do gene 5S rDNA de *Omophoita sexnotata* e *Omophoita octoguttata* e sua localização cromossômica. Adicionalmente, uma análise de obtenção das sequências e sua localização *in situ* das famílias multigênicas de histonas e U snRNAs foi também realizada.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Mapear os cístrons de rDNA 18S e 5S nos cromossomos de *O. octoguttata*, *O. sexnotata*, *O. personata*, e *O. magneguttis*;
- Avaliar a homogeneidade *versus* heterogeneidade de cópias do 5S rDNA nos genomas de *O. octoguttata*, e *O. sexnotata*.
- Caracterizar as sequências de histonas e de U snDNAs em *O. sexnotata*.
- Compreender a distribuição cromossômica de famílias gênicas de histonas e de U snDNAs em quatro espécies do gênero *Omophoita*.
- Determinar os mecanismos envolvidos na dispersão cromossômica das famílias gênicas de rDNA, Histonas, e U snDNA no gênero *Omophoita*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Os espécimes utilizados no estudo foram machos adultos pertencentes ao gênero *Omophoita* Chevrolat, 1837 (Figura 1), coletados nas cidades de Ponta Grossa, Paraná (S 25° 07'10" e W 49°56'24") e Nonoai, Rio Grande do Sul (S 27° 23'25" e W 52°44'10").

Para as preparações citogenéticas foram utilizadas as gônadas de *Omophoita octoguttata* Fabricius, 1775 (22 machos), *Omophoita personata* Illiger, 1807 (14 machos), *Omophoita magnigutis* Bechyné, 1955 (11 machos) e *Omophoita sexnotata* Harold, 1876 (45 machos). Para a extração do DNA genômico foram utilizadas a cabeça, o pronoto e o terceiro par de pernas de *O. octoguttata* e *O. sexnotata*, estocados em álcool 98%. Para a extração do RNA foi utilizada a gônada de *O. sexnotata*, estocada em RNAlater. As determinações taxonômicas das espécies de *Omophoita* foram realizadas pelo pesquisador Carlos Campaner do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo.

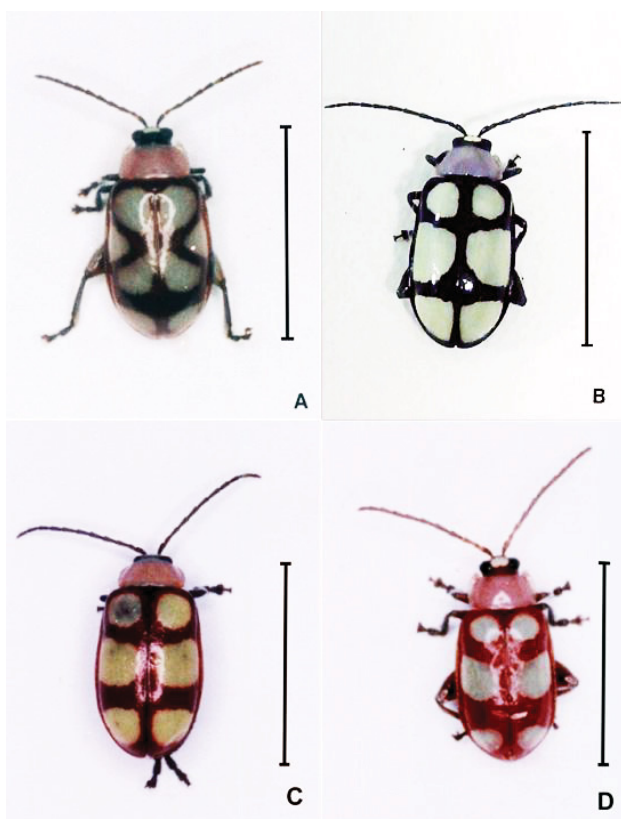


Figura 1- Espécies de *Omophoita* analisadas: (A) *O. magnigutis* fêmea; (B) *O. octoguttata* macho; (C) *O. personata*, macho; (D) *O. sexnotata*, macho. Barra em A e B = 0,7 centímetros em C e D = 1,0 centímetros. Figura retirada e modificada de Almeida et al. (2009).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Citogenética Convencional

As preparações citológicas para o estudo dos cromossomos mitóticos e meióticos foram obtidas de testículos de indivíduos adultos. Os animais foram dissecados em solução fisiológica para insetos de acordo com a técnica descrita por Almeida et al. (2000). As gônadas foram colocadas em uma placa de Petri contendo solução hipotônica (água de torneira), durante 5 minutos. Em seguida transferida para uma placa de Petri contendo fixador Carnoy I (metanol – ácido acético, na proporção 3:1), durante 30 minutos. Posteriormente as gônadas foram maceradas sobre uma lâmina, juntamente com uma gota de ácido acético 60%. Na sequência as lâminas foram secas em uma placa de metal a temperatura de 35^o a 40^o C (Anexo 1a). As lâminas foram coradas convencionalmente, com solução de Giemsa 3%, por 12 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida lavadas em água destilada e secas ao ar (Anexo 1b).

3.2.2 Análise Molecular

3.2.2.1 Microdissecção dos cromossomos de *O. sexnotata*

Os dez bivalentes autossômicos e os cromossomos sexuais X e y de *O. sexnotata* foram microdissectados individualmente a partir de preparações citogenéticas com o auxílio de agulhas de vidro de 0,7 µm, em microscópio invertido (Olympus IX 51) equipado com micromanipulador mecânico (Narishigue). Cada cromossomo foi colocado separadamente em microtubo tubo e, posteriormente foram amplificados com uso do kit Single Cell 4 - Whole Genome Amplification (WGA 4 – Sigma Aldrich) de acordo com as recomendações do fabricante (Anexo 2).

3.2.2.2 Extração de DNA genômico

A extração de DNA genômico dos exemplares de *O. octogutta* e *O. sexnotata* foi realizada segundo a técnica de método de Murray e Thompson (1980) (Anexo 3), com adição de um passo inicial que consiste em macerar a cabeça e o pronoto em nitrogênio líquido.

3.2.2.3 Extração de RNA

O RNA total foi isolado utilizando TRIZOL (Invitrogen), a partir das gônadas dos indivíduos machos de *O. sexnotata* de acordo com as recomendações do fabricante (Anexo 4). Após isolado o RNA total foi convertido a DNA complementar com uso do kit First Strand cDNA Synthesis (GE Healthcare), como recomendado pelo fabricante (Anexo 5).

3.2.2.4 Amplificação das sequências

A amplificação das sequências do 5S rDNA, das histonas H1, H3, H4 e U1 snDNA e U2 snDNA foram realizadas com *primers* descritos na literatura ou desenhados neste estudo a partir da homologia das sequências de espécies relacionadas, obtidas no GenBank (Tabela 1).

Para a amplificação do 5S rDNA a partir do DNA genômico de *O. octoguttata* e *O. sexnotata* foram utilizados os *primers* 5Sa/5Sb. Para a amplificação do 5S rDNA de cada cromossomo microdissectado e do cDNA de *O. sexnotata* foram sintetizados os *primers* 5S_F/5S_R. As amplificações das sequências de histonas e U snDNA foram realizadas a partir do DNA genômico de *O. sexnotata*.

Tabela 1- Relação de *primers* utilizados nas amplificações das sequências do 5S rDNA de histonas H1, H3, H4 e U1 snDNA e U2 snDNA.

Gene	Primer Forward/Reverse	Referência
rRNA 5S	5Sa 5' -TACGCCCGATCTCGTCCGATC-3' 5Sb 5' -CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC-3'	Pendás et al., 1994
rRNA 5S	5S_F 5' -AACGNCCATANCACGCTGNA-3' 5S_R 5' -AGCGGTCNCNCATCNANGTAC-3'	Presente estudo
Histona H1	5' -TGGTGSTTCTKCTCTTCAAGC-3' 5' -GMTGGTTYCTTASCSTTTT-3'	Presente estudo
Histona H3	5' -CGYAARTCNACYGGWGGWGNAA-3' 5' -TDGCRCAAYARRTTNGTRTCY-3'	Goll et al. (2015)
Histona H4	5' -GGYGGBGTSAAARCGTATCT-3' 5' -GGCGTAGACCACGTCCAT-3'	Presente estudo
snRNA U1	5' -CTTACCTGGCGTRGRGGWY-3' 5' -CAKTCCCRRTACCAAAAATT-3'	Cabral-de-Mello et al. (2012)
snRNA U2	5' -ATCGCTTCTCGGCCTTATG-3' 5' -TCCCGGCGGTACTGCAATA-3'	Bueno et al. (2013)

As reações de amplificação do 5S rDNA foram compostas por 3,75 mM de cloreto de magnésio, 1x tampão da reação (200 mM Tris, pH 8.4, 500 mM KCl) e 1 unidade de cromossomo ou 20 ng de DNA genômico, além de, 0,2 µM de cada *primer*, 0,2 mM de dNTPs e 1 U de Taq DNA Polimerase. O programa da reação de amplificação consistiu de desnaturação inicial por 5 min a 94 °C, 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 56 °C por 1 min, 72 °C

por 2 min e, extensão final a 72 °C por 5 min (Apêndice 1).

As reações de amplificação das histonas H1, H3 e H4 foram compostas por 100-200 ng de DNA genômico, 0,2 µM de MgCl₂, 1x tampão de reação, 0,2 µM de dNTP, 0,5 pM de *primer Forward*, 0,5 pM de *primer Reverse* e 1,5 U de Taq DNA Polymerase (Invitrogen). O programa da reação de amplificação consistiu de desnaturação inicial por 5 min a 95 °C, 35 ciclos de 95 °C por 1 min, 60 °C por 45 s, 72 °C por 1 min e, extensão final a 72 °C por 7 min (Apêndice 2).

As amplificações dos U1 e U2 snDNAs foram compostas por 40-100 ng de DNA genômico, 0,2 µM de MgCl₂, 1x tampão de reação, 0,2 µM de dNTP, 1 pM de *primer Forward*, 1 pM de *primer Reverse* e 1 U de Taq DNA Polymerase (Invitrogen). O programa da reação de amplificação consistiu de desnaturação inicial por 5 min a 95 °C, 30 ciclos de 95 °C por 45 s, 62 °C por 45 s, 72 °C por 1 min e 20 s e, extensão final a 72 °C por 7 min. (Apêndice 3).

3.2.2.5 Obtenção das sequências de rDNA 5S

Os produtos da amplificação do 5S rDNA, das histonas H1, H3, H4, U1 e U2 snDNA foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 1% corados com gelred Biotium® (1:1000), e purificados pelo Kit Illustra GFX PCR DNA and GelBand Purification (GE Healthcare) (Anexo 6).

Os produtos purificados do 5S rDNA genômico de *O. octoguttata* e *O. sexnotata*, de cada cromossomo e do cDNA de *O. sexnotata* foram ligados ao vetor pGEM (Promega®) e transformados na bactéria *Escherichia coli* DH5α (Gibco GBRL®). Colônias bacterianas recombinantes foram isoladas e a purificação do DNA plasmidial de aproximadamente 10 colônias de cada placa, baseou-se no método de lise alcalina (Anexo 7).

Os plasmídeos recombinantes e os produtos purificados da PCR das histonas e U snDNAs foram submetidos ao sequenciamento nucleotídico ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), utilizando os *primers* para as regiões flangeadoras do vetor plasmidial, ou para cada gene específico.

3.2.2.6 Análise das sequências

As sequências nucleotídicas obtidas foram analisadas e editadas com o auxílio do software Geneious 8.1.9 (KEARSE et al., 2012) e posteriormente submetidas a uma análise de

identidade utilizando os bancos de dados *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), presente no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) e CENSOR presente no *Genetic Information Research Institute* (GIRINST) (<http://www.girinst.org/censor/index.php>), para a identificação de similaridade entre genes de outros organismos.

Em adição, as sequências genômicas do 5S rDNA foram analisadas quanto à presença das regiões TATA-Like, GC box, Box A, elemento intermediário, Box C, poli – T, de acordo com Venkateswarlu et al. (1991).

3.2.2.7 Agrupamento filogenético das sequências de 5S rDNA

Um agrupamento das sequências de 5S rDNA obtidas neste trabalho a partir do DNA genômico de *O. octoguttata* e *O. sexnotata*; de cada cromossomo; e do cDNA de *O. sexnotata*, foi realizado utilizando o modelo de substituição nucleotídica Kimura 2-parâmetros + G (KIMURA, 1980) no programa MEGA 5.0 (TAMURA et al., 2011). Para esse agrupamento usou-se o método de máxima-verossimilhança (MV) e o suporte dos ramos foi estimado pelo método de *bootstrap* com 1000 interações. A espécie *Drosophila melanogaster* (NR 001670.2) foi utilizada como grupo externo. Para enriquecer a análise, sequências de 5S rDNA de espécies de Coleoptera depositadas no GenBank foram incluídas (KX858924.1, KC614565.1, X83208.1, XR_002707738.1, XR_002707737.1, XR_002707736.1).

3.2.2.8 Síntese de sondas

A sequência correspondente ao 5S rDNA de *O. octoguttata* foi marcada como sonda por PCR, utilizando os *primers* 5S_F/5S_R desenhados para este trabalho, com a incorporação de digoxigenina 11-dUTP (Roche Applied Science) (Apêndice 4). A sonda de rDNA 18S de *O. octoguttata* foi obtida por PCR marcado com o emprego de biotina 16-dUTP (Roche Applied Science), de acordo com o procedimento descrito por Almeida et al. (2010).

As sequências das histonas H1, H3, H4 e dos U1 e U2 snDNA, obtidas neste estudo, foram marcadas usando o Kit *Nick Translation System* (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante (Anexo 8). As sequências H3, H4 e U1 snDNA foram sintetizadas com a incorporação do nucleotídeo digoxigenina 11-dUTP (Roche Applied Science). Por sua vez, as sequências H1 e U2 snDNA foram marcadas com emprego da biotina 16-dUTP (Roche Applied Science).

3.2.3 Citogenética Molecular

3.2.3.1 Hibridação *in situ* fluorescente (FISH)

A hibridação *in situ* fluorescente (FISH) foi realizada em condições de estrigência próxima à 77% (2,5 ng/ μ L de sonda, 50% formamida, 2xSSC e 10% sulfato dextrano por 18h a 37°C), de acordo com o método descrito por Pinkel et al. (1986), com algumas modificações (Anexo 9).

O reconhecimento do sinal de fluorescência para sondas biotiniladas foi realizado usando estreptavidina *Alexa Fluor 488* (Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) e para sondas com digoxigenina foi utilizado o composto anti digoxigenina rodamina (Roche Applied Science). Os cromossomos foram contracorados com 0,2 μ g mL⁻¹ of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) em meio de montagem Vectashield (Vector, Burlingame, CA, USA).

3.2.3.2 Fiber FISH

Para a visualização da co-localização das sequências dos 5S rDNA e 18S rDNA foi utilizada a técnica de Fiber-FISH de acordo com as modificações propostas por Barros et al. (2011). As lâminas foram lavadas com tampão salino fosfatado (PBS) por dois minutos a temperatura ambiente e em seguida secas. As mesmas foram colocadas em posição horizontal e na sequência foi adicionada uma solução de 200 μ L de hidróxido de sódio (NaOH) 0,2 M diluída em álcool 30% em um dos cantos da lâmina. Posteriormente foi realizado um esfregaço contínuo sobre a preparação a partir do topo para baixo com o auxílio de outra lâmina, de tal forma a cobrir toda a superfície. Em seguida 500 μ L de etanol 100% foi imediatamente aplicado na lâmina que foi mantida inclinada até completa evaporação.

3.2.3.3 Análise cromossômica

As melhores células mitóticas e meióticas foram fotografadas em microscópio de epifluorescência Olympus BX41 com objetiva 100X de imersão, com filtros específicos e captura de imagem digital em tempo real com câmera CCD DP-71 (Olympus).

4 RESULTADOS

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

4.1 CAPÍTULO I

Dispersão de sequências 5S DNA ribossomal nos cromossomos de *Omophoita* (Coleoptera: Chrysomelidae): mecanismos de *concerted evolution* e *birth and death*

4.2 CAPÍTULO II

Intensa dispersão de histonas e U snDNAs associadas à elementos transponíveis nos cariótipos de *Omophoita* (Coleoptera, Chrysomelidae)

4.1 CAPÍTULO I

**Dispersão de sequências 5S DNA ribossomal nos cromossomos de *Omophoita*
(Coleoptera: Chrysomelidae): mecanismos de *concerted evolution* e *birth and death***

Resumo

A organização e o mapeamento das famílias ribossomais podem elucidar a variação do cariótipo e a organização genômica em diversos grupos de eucariotos. Neste estudo foram avaliados a heterogeneidade de cópias do 5S rDNA, sua dinâmica evolutiva nos genomas de *Omophoita octoguttata* e *Omophoita sexnotata* e sua dispersão cariotípica em quatro espécies do gênero. Para isto, sequências do 5S rDNA foram caracterizadas a partir do DNA genômico, cDNA e de cromossomos isolados via microdissecção. Cópias do 5S rDNA com alta similaridade à outras fontes de eucariotos, além de sequências com SNPs, Indels, pseudogenes e com invasão de elementos transponíveis foram determinadas em *O. sexnotata*. A localização *in situ* detectou um par cromossômico portador de sintenia dos 5S e 18S rDNAs em *O. octoguttata* e *O. personata*, dois pares portadores da sintenia dos rDNAs em *O. magnigutis* e, em *O. sexnotata*, um par com sintenia dos rDNAs, além de sítios 5S rDNA em todos demais autossomos. O modelo misto de *concerted evolution* e *birth and death* foi utilizado para explicar a homogeneidade *versus* heterogeneidade de sequências 5S rDNA no genoma de *O. sexnotata*. Sequências isoladas a partir dos cromossomos sexuais de *O. sexnotata* apresentaram segmentos similares ao 5S rDNA fusionados a partes do elemento transponível *AmnSINE1*. *Double-strand breaks*, reparo por recombinação não homóloga e também a dispersão mediada por elementos transponíveis foram discutidos como mecanismos que podem ter auxiliado na dispersão desta família gênica. Em conclusão, relatamos um alto nível de duplicação e dispersão de 5S rDNA proporcionando variação genômica e diferenciação cariotípica em *Omophoita*.

Palavras-chave: DNA repetitivo. Elementos transponíveis. Evolução cariotípica. Pseudogenes.

Abstract

Organization and mapping of ribosomal multigenic families can help elucidate karyotype variations and genomic organizations in several eukaryotic groups. In the current study, the heterogeneity of copies of 5S ribosomal DNA (rDNA) and its evolutionary dynamics in the genomes of *Omophoita octoguttata* and *O. sexnotata* were evaluated, as well as its karyotypic dispersion in four species of this genus. For this purpose, 5S rDNA sequences were characterized from genomic DNA, complementary DNA (cDNA), and isolated chromosomes using microdissection. Copies of 5S rDNA with a high similarity to those from other eukaryotic sources, in addition to sequences with single-nucleotide polymorphisms (SNPs), indels, pseudogenes, and invasion of transposable elements (TEs), were determined in *O. sexnotata*. *In situ* localization detected a chromosomal pair bearing syntenic 5S and 18S rDNAs in *O. octoguttata* and *O. personata*, two pairs harboring rDNA synteny in *O. magnigutis*, and a pair with syntenic rDNAs in *O. sexnotata*, in addition to 5S rDNA sites in all other autosomes. A model featuring a mixture of mechanisms of concerted evolution and birth and death was used in order to explain the homogeneity versus heterogeneity of 5S rDNA sequences in the genome of *O. sexnotata*. Sequences isolated from *O. sexnotata* sex chromosomes showed some segments similar to 5S rDNA, fused to parts of the TE *AmnSINE1*. Double-strand breaks (DSBs) and repairs by nonhomologous recombination and dispersion mediated by TEs were discussed as mechanisms that may have supported the dispersal of this gene family. In conclusion, we report a high level of duplication and dispersion of 5S rDNA, providing genomic variation and karyotype differentiation in *Omophoita*.

Keywords: Karyotype evolution. Multigene family. Pseudogene. Repeat DNA. Transposable element.

4.1.1 Introdução

Os DNAs repetitivos apresentam uma ampla variabilidade dentro dos genomas eucarióticos e compõem grande parte da quantidade de DNA das células (CHARLESWORTH et al., 1994; GREGORY, 2005). Estes são categorizados conforme seu conteúdo estrutural e função em famílias multigênicas, DNAs satélites e elementos transponíveis (SUMNER, 2003). Além disso, sabe-se que os DNAs repetitivos exercem uma série de funções estruturais e regulatórias (SUMNER, 2003; FESCHOTTE, 2008). Adicionalmente, devido ao grande número de cópias parálogas de cada família verificou-se que estes participam de eventos evolutivos de remodelagem genômica e diferenciação cariotípica (KIDWELL; LISCH, 1997; GOLL et al., 2015; BARROS et al., 2017; BARDELLA; CABRAL-de-MELLO, 2018; GLUGOSKI et al., 2018). Entre os DNAs repetitivos, as famílias multigênicas que transcrevem para os RNAs ribossomais (5S rRNA e 45S rRNA) apresentam cópias variantes (CABRERO; CAMACHO, 2008; REBORDINOS et al., 2013; BELLAVIA et al., 2016), inúmeras delas não funcionais ou pseudogenes (ROGERS; BENDICH, 1987; DOUET; TOURMENTE, 2007; CIGANDA; WILLIAMS, 2011) e podem se envolver em rearranjos cromossômicos (CAZAUX et al., 2011; BARROS et al., 2017; GLUGOSKI et al., 2018) ou dispersar em inúmeros sítios no cariótipo (SYMONOVÁ et al., 2013; BARDELLA; CABRAL-de-MELLO, 2018).

O cluster do 45S rDNA corresponde a região responsável pela organização do nucléolo (RON) e consiste de unidade repetitiva de três regiões codificadoras (18S, 5,8S e 28S), as quais são separadas por espaçadores transcritos internos (ITS1 e ITS2) e por um espaçador intergênico (IGS) entre as unidades (LONG; DAVID, 1980). Este cluster é transcrito pela RNA polimerase I, processado e parcialmente montado para formar as subunidades ribossômicas no nucléolo (LONG; DAVID, 1980). Podem estar em sítios cromossômicos sintênicos a outras famílias gênicas, mas geralmente compõem uma região cromossômica com apenas cópias do 45S rDNA (CABRAL-de-MELLO et al., 2011c; GOLL et al., 2015).

O 5S rDNA é transcrito pela RNA polimerase III a partir de um cluster composto por apenas esta cópia gênica e enviado ao nucléolo para participar da montagem da subunidade ribossomal maior (LONG; DAVID, 1980). Em vertebrados o 5S rDNA consiste de uma região transcrita conservada de 120 pb, caracterizado pela presença de regiões envolvidas no reconhecimento da RNA polimerase, como box A, elemento intermediário (IE) e box C, além da presença de um motivo poli-T no final da região transcrita (FORD, 1973; WOLFFE, 1994;

CLOIX et al., 2000). Separando cada unidade do 5S rDNA há uma sequência denominada espaçador não transcrito (do inglês *non-transcribed spacer* - NTS), esta inclui regiões envolvidas na expressão deste gene, como a TATA-like em ~ -30 pb, a região rica em G + C a aproximadamente -13 pb e a C na posição -1 (VENKATESWARLU et al., 1991).

Em inúmeros eucariotos foi demonstrado que o 5S rDNA está organizado em dois clusters de repetição *in tandem*, sendo eles o *major 5S RNA*, o qual é expresso em todos tecidos e em maior quantidade, e o *minor 5S RNA*, descrito como inativo em determinadas fases do desenvolvimento e tecidos. Estes clusters se diferenciam pelas substituições de uma ou duas bases nas sequências do 5S rRNA, o que influencia no nível de expressão deste gene (CHEN et al., 1984; MATHIEU et al., 2003; DOUET; TOURMENTE, 2007; BELLAVIA et al., 2013, 2016). Sabe-se que o 5S rDNA é altamente conservado, enquanto o NTS está sujeito a altas taxas de evolução molecular e pode conter inúmeros polimorfismos de um único nucleotídeo (do inglês *single nucleotide polymorphisms* - SNPs), inserção e deleção de nucleotídeos (Indels), sequências parciais de elementos transponíveis e sequências de oligonucleotídeos repetidos (REBORDINOS et al., 2013; BUENO et al., 2016, BARROS et al., 2017; GLUGOSKI et al., 2018). A evolução molecular do cluster do 5S rDNA (incluindo o NTS) tem sido assunto de distintos estudos e os mecanismos de diferenciação e dispersão foram atribuídos à evolução em concerto (do inglês *concerted evolution*), evolução por nascimento-e-morte (do inglês *birth and death*), além da aceitação de um modelo misto (BROWN et al., 1972; NEI et al., 1992; FREIRE et al., 2010; FUJIWARA et al., 2007; PINHAL et al., 2011).

Poucos são os estudos de caracterização molecular de sequências repetitivas em Alticinae (ALMEIDA et al., 2010) e os estudos cromossômicos no grupo se detém na organização cariotípica e na localização *in situ* de sequências repetitivas (ver, ALMEIDA et al., 2010; MELLO et al., 2014). Nesta subfamília, *Omophoita* (Oedionychini) possui organização cariotípica de $2n = 22$, fórmula meiótica de $10II+X+y$ e predominância de cromossomos metacêntricos (SMITH; VIRKKI, 1978; PETITPIERRE et al., 1988; ALMEIDA et al., 2009). Os cromossomos sexuais extremamente grandes e assinápticos durante a meiose é característica deste grupo (VIRKKI, 1968, 1970, 1988a; VIRKKI et al., 1991; ALMEIDA et al., 2009). Um estudo preliminar de localização *in situ* usando sondas geradas por reassociação cinética *Cot*-1 mostrou que os cromossomos sexuais de *Omophoita* detém acúmulo de sequências repetitivas (MELLO et al., 2014). Em adição, a localização *in situ* de marcadores cromossômicos como 18S rDNA evidenciou diferenças cariotípicas entre as espécies do gênero (ALMEIDA et al., 2010).

Neste estudo, foram caracterizadas sequências do 5S rDNA, as quais foram utilizadas juntamente com a sonda do 18S rDNA na localização cromossômica. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a homogeneidade *versus* heterogeneidade de cópias do 5S rDNA nos genomas de *O. octoguttata*, e *O. sexnotata*, a dispersão e a diferenciação cariotípica proporcionadas pelas famílias gênicas de rDNA em quatro espécies do gênero *Omophoita*.

4.1.2 Material e Métodos

Coleta e preparações cromossômicas

Foram coletados indivíduos adultos de *Omophoita octoguttata* (nove machos), *Omophoita personata* (seis machos), *Omophoita magnigutis* (cinco machos) e *Omophoita sexnotata* (30 machos) em Ponta Grossa, Paraná, Brasil (- 25°07'10'', - 49°56'24''e; - 25°07'20'', - 49°56'04''). Três indivíduos de *O. octoguttata* foram coletados em Nonoai, Rio Grande do Sul, Brasil (- 27°23' 25'', - 52°44'10''). As preparações citológicas foram feitas de acordo com a metodologia descrita por Almeida et al. (2000).

Caracterização molecular do 5S rDNA

Os DNAs genômicos de *O. octoguttata* e *O. sexnotata* foram extraídos segundo método de Murray; Thompson (1980), com adição de um passo inicial que consiste em macerar a cabeça, o pronoto e pernas em nitrogênio líquido. Além disso, os dez bivalentes autossômicos e os cromossomos sexuais X e y de *O. sexnotata* foram microdissectados individualmente a partir de preparações citogenéticas coradas convencionalmente, com solução de Giemsa 3%, com o auxílio de agulhas de vidro de 0,7 µm, em microscópio invertido (Olympus IX 51) equipado com micromanipulador mecânico (Narishigue). Cada cromossomo foi colocado separadamente em microtubo e, posteriormente, amplificado utilizando o kit *Single Cell 4 - Whole Genome Amplification* (WGA 4 – Sigma Aldrich) de acordo com as recomendações do fabricante. O RNA total foi isolado utilizando TRIZOL (Invitrogen) a partir das gônadas dos indivíduos machos de *O. sexnotata* de acordo com as recomendações do fabricante. Depois de isolado o RNA total foi convertido a DNA complementar (cDNA) com uso do kit *First Strand cDNA Synthesis* (GE Healthcare), como recomendado pelo fabricante. O cDNA foi amplificado por PCRs com os parâmetros convencionais, que estão descritos abaixo, para a amplificação do 5S rDNA, e posterior

purificação e sequenciamento.

Dois conjuntos de *primers* para a amplificação do 5S rDNA foram utilizados neste estudo. Para a amplificação do 5S rDNA a partir do DNA genômico de *O. octoguttata* e *O. sexnotata* foram utilizados os *primers* 5Sa/5Sb (5'- TACGCCCCGATCTCGTCCGATC-3' / 5'- CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC -3') (PENDÁS et al., 1994). Para a amplificação do 5S rDNA de cada cromossomo microdissectado e do cDNA foram sintetizados os *primers* (5S_F: 5' AACGNCCATANCACGCTGNA 3'; 5S_R: 5' AGCGGTCNCNCATCNANGTAC 3') a partir da homologia das sequências de espécies relacionadas, obtidas no GenBank (GQ443312, U58720, U58709 e X83208) e as sequências obtidas do DNA genômico de *O. octoguttata* e *O. sexnotata*. As reações de amplificação foram compostas por 3,75 mM de cloreto de magnésio, 1x tampão da reação (200 mM Tris, pH 8.4, 500 mM KCl) e 1 unidade de cromossomo ou 20 ng de DNA genômico, além de, 0,2 µM de cada primer, 0,2 mM de dNTPs e 1 U de Taq DNA Polimerase. O programa da reação de amplificação consistiu de desnaturação inicial por 5 min a 94 °C, 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 56 °C por 1 min, 72 °C por 2 min e, extensão final a 72 °C por 5 min.

Os produtos da amplificação do 5S rDNA genômico de *O. octoguttata* e *O. sexnotata*; de cada cromossomo e do cDNA de *O. sexnotata* foram purificados pelo Kit *Illustra GFX PCR DNA and GelBand Purification* (GE Healthcare). Os purificados foram ligados ao vetor pGEM (Promega®) e transformados na bactéria *Escherichia coli* DH5α (Gibco GBRL®). Colônias bacterianas recombinantes foram isoladas e posteriormente submetidas a mini-preparação plasmidial. Plasmídeos recombinantes foram submetidos ao sequenciamento nucleotídico *ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) utilizando os *primers* para as regiões flangeadoras do vetor plasmidial.

Análise das sequências 5S rDNA

As sequências nucleotídicas obtidas foram analisadas usando o software Geneious 8.1.9 (KEARSE et al., 2012) e posteriormente submetidas a uma análise de similaridade utilizando os bancos de dados BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e CENSOR (www.girinst.org/censor/index.php). Em adição, as sequências genômicas do 5S rDNA foram analisadas quanto à presença das regiões TATA-Like, GC box, Box A, elemento intermediário, Box C, poli – T, conforme presente em Venkateswarlu et al. (1991).

Um agrupamento das sequências de 5S rDNA obtidas neste trabalho a partir do DNA genômico de *O. octoguttata* e *O. sexnotata*; de cada cromossomo; e do cDNA de *O.*

sexnotata, foi realizado utilizando o modelo de substituição nucleotídica Kimura 2-parâmetros + G (KIMURA, 1980) no programa MEGA 5.0 (TAMURA et al., 2011). O método de máxima-verossimilhança (MV) foi utilizado e o suporte dos ramos foi estimado pelo método de *bootstrap* com 1000 interações. A espécie *Drosophila melanogaster* (NR 001670.2) foi utilizada como grupo externo. Para enriquecer a análise, sequências de 5S rDNA de espécies de Coleoptera depositadas no GenBank foram incluídas (KX858924.1, KC614565.1, X83208.1, XR_002707738.1, XR_002707737.1, XR_002707736.1).

Síntese de sondas e localização in situ

A sequência correspondente ao 5S rDNA de *O. octoguttata* foi marcada como sonda por PCR, utilizando os *primers* desenhados para este trabalho. A PCR consistiu de 40 ng DNA genômico, 0,2 µM *forward primer*, 0,2 µM *reverse primer*, 0,2 mM dATP/dCTP/dGTP, 0,14 mM dTTP, 0,06 mM digoxigenina 11-dUTP (Roche Applied Science), 1U Taq DNA Polymerase (Invitrogen®), 1,5 mM MgCl₂ e 1x tampão da reação (200 mM Tris, pH 8,4, 500 mM KCl). O ciclo de PCR utilizado foi o descrito acima. Adicionalmente, o 18S rDNA de *O. octoguttata* foi marcado com biotina 16-dUTP (Roche Applied Science), de acordo com o procedimento descrito por Almeida et al. (2010).

A hibridação *in situ* fluorescente (FISH) foi realizada em condições de estrigência próxima à 77% (2.5 ng/µL de sonda, 50% formamida, 2xSSC e 10% sulfato dextrano por 18 h a 37° C), de acordo com o método descrito por Pinkel et al. (1986). O reconhecimento do sinal de fluorescência para sondas biotinizadas foi realizado usando *streptavidin Alexa Fluor 488* (Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) e para sondas com digoxigenina foi utilizado o composto anti digoxigenina rodamina (Roche Applied Science). Os cromossomos foram contracorados com 0.2 µg mL⁻¹ of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) em meio de montagem Vectashield (Vector, Burlingame, CA, USA). Para a visualização da co-localização das sequências dos 5S rDNA e 18S rDNA foi aplicada a técnica de Fiber-FISH de acordo com as modificações propostas por Barros et al. (2011).

4.1.3 Resultados

Caracterização das sequências 5S rDNA

As sequências de 5S rDNA obtidas de seis clones do DNA genômico de *O. sexnotata* (GenBank: MG944736 à MG944741) apresentaram um tamanho de 219 a 221 pb e identidade média de 94% com a região do gene ribossomal 5S das seguintes espécies: *Plectorhinchus mediterraneus*, *Hypostomus boulengeri* e *Symphysodon* sp. (GenBank: JN850642.1, KT943722.1, KP715274.1, respectivamente). Esta sequência detém 120 pb de região transcrita, NTS de ~ 100 pb, promotor interno composto de box A (46 – 54 pb), elemento intermediário (IE), box C (77 – 87 pb), um poli T (*downstream* à região transcrita), uma região TATA-like (- 28 a - 22 pb), um GC box (- 11 a - 9 pb) e a Citosina - 1 (Figura 1a).

As sequências do 5S rDNA obtidas de quatro clones do DNA genômico de *O. octoguttata* (GenBank: MG944742 à MG944745) apresentaram identidade média de 98% com a região do gene ribossomal 5S de *Channa orientalis* e *Pleuronectes platessa* (GenBank: KM052147.1 e HQ681115.1, respectivamente), variaram de 209 a 212 pb, região transcrita correspondente a 120 pb, NTS 90 - 91 pb, promotor interno composto de box A (46 – 54 pb), elemento intermediário (IE), box C (77 – 87 pb), poli T (*downstream* à região transcrita) uma região TATA-like (- 31 a - 26 pb), um GC box (- 6 a - 4 pb) e a Citosina - 1 (Figura 1b).

Os resultados do sequenciamento do 5S rDNA obtido a partir dos cromossomos 3, 4, 5, 6 e 8 de *O. sexnotata* apresentaram sequências com similaridade média de 83,6% às cópias do 5S rDNA genômico e uma maior conservação dos elementos estruturais do 5S rDNA. Por outro lado, as sequências dos cromossomos 1, 2, 7, 9, 10 e X, apesar de possuírem similaridade média de 75% em relação ao 5S rDNA genômico, não apresentaram todas as regiões transcrpcionais conservadas. Além destas, sequências com similaridade ao retropseudogene 5S derivado de *Cavia porcellus* (92% de similaridade) foram obtidas a partir dos cromossomos 4 e X. Adicionalmente, parte da sequência 5S rDNA do cromossomo 9 apresentou similaridade com do elemento transponível *DNA9-48B*. A sequência do 5S rDNA obtida do cromossomo Y possui 98% de similaridade com as cópias genômicas, as quais estão subdivididas em dois fragmentos que flanqueiam partes de um retrotransposon SINE3: *AmnSINE1*. As sequências de 5S rDNA obtidas de cada cromossomo, foram depositadas no GenBank sob os números de acesso MG944747 à MG944768 (Material suplementar 1). As cópias do 5S rRNA obtidas a partir do cDNA (GenBank: MG944746) apresentaram similaridade com as sequências de 5S rDNA obtidas do DNA genômico (98%) (Figura 2 a) e

do cromossomo 7 (86,5%) (Figura 2 b).

Agrupamento das sequências 5S rDNA

A árvore de agrupamento das sequências de 5S rDNA utilizando o método de máxima verossimilhança apresentou quatro ramos, formando os seguintes agrupamentos: (i) o primeiro clado com 54% de *bootstrap*, foi agrupado em dois ramos; um composto por 5S rDNA de *Lagria villosa*, *Dichotomius semisquamosus*, *Drosophila melanogaster*, *Harpalus rufipes*, *Onthophagus taurusi* e *O. octoguttata*, além das sequências genômicas, do cDNA e do cromossomo 7 de *O. sexnotata*, e o outro ramo, com as sequências dos cromossomos X e Y, (ii) o segundo clado com 84% de *bootstrap*, agrupou sequências de *O. octoguttata* obtida do genbank e dos cromossomos 9 e 10, (iii) o terceiro clado contém a sequência de 5S rDNA do cromossomo 2, (iv) este quarto clado com 86% de *bootstrap*, foi agrupado em três ramos, um com a sequência do cromossomo 4, outro com as sequências dos cromossomos 1 e 3 e, um terceiro contendo as sequências dos cromossomos 5, 6 e 8 (Figura 3).

Localização in situ

A análise de células meióticas das quatro espécies do gênero *Omophoita* submetidas a dupla FISH com sondas do 5S rDNA e 18S rDNA mostrou a presença de um cluster associado a um par autossômico em *O. octoguttata* (Figura 4 a, b, c) e também em *O. personata* (Figura 5 a, b, c). Em *O. magnigutis* foram localizados dois pares autossômicos contendo clusters sintênicos dos 5S rDNA e 18S rDNA (Figura 5 d, e, f). Em adição, a dupla FISH com sondas 5S rDNA e 18S rDNA em *O. sexnotata* localizou um cluster sintênico na região proximal do braço curto de um par autossômico, além de clusters proximais nos braços curto de todos os demais autossomos, contendo apenas cópias 5S rDNA (Figura 6 a, b, c).

A localização do 5S rDNA e 18S rDNA na fibra cromatínica demonstrou que estas sequências estão co-localizadas e interespaçadas nos genomas de *O. octoguttata*, *O. personata* e *O. magnigutis* (Figuras 4 d, e; 5 g, h; 5 i, j, respectivamente). Em *O. sexnotata*, a Fiber-FISH detectou fibras com sequências 5S rDNA e 18S rDNA interespaçadas (Figura 6 d, e), além de fibras contendo apenas o cluster 5S rDNA (Figura 6 f, g).

4.1.4 Discussão

A subfamília Alticinae de Coleoptera possui poucos estudos moleculares utilizando sequências de DNA associados a diferenciação dos cariótipos. Neste estudo, a caracterização das sequências genômicas do 5S rDNA de *O. octoguttata* e *O. sexnotata* demonstraram alta similaridade com o 5S rDNA de outras fontes de eucariotos. Em adição, a análise destas sequências de *Omophoita* demonstrou que o 5S rDNA apresenta todas as regiões consenso necessárias para o reconhecimento e transcrição pela RNA polimerase III dando origem a um 5S rRNA de 120 nt, conforme descrito em Cloix et al. (2002). Estes 5S rDNA genômicos de *O. octoguttata* e *O. sexnotata* detêm regiões de controle interno (ICRs) compostas de um box A, do elemento intermediário, do box C e, um finalizador contendo quatro ou mais timinas necessárias para sinal de término da transcrição. Além disso, os NTSs dos 5S rDNA genômicos de *O. octoguttata* e *O. sexnotata* apresentaram uma curta sequência TATA-Like em ~ -30 , uma região GC rica em ~ -13 e, a citosina -1 como sequências consenso indicativas de cópias funcionais desta família multigênica, assim como demonstrado em outros organismos (VENKATESWARLU et al., 1991; CLOIX et al., 2000; PAULE; WHITE, 2000, BARROS et al., 2017). Adicionalmente, corroborando a função destas cópias 5S rRNA, as sequências obtidas a partir do cDNA demonstraram alta similaridade com a região codificadora do 5S rDNA de *O. sexnotata* e outras espécies depositadas no genebank.

Com base em nossos dados, cópias do 5S rDNA dispersaram pelos autossomos e cromossomos sexuais de *O. sexnotata* a partir do par cromossômico portador do sítio sintênico dos 5S e 45S rDNAs. São evidências para esta inferência a localização de apenas um cromossomo portador destes rDNAs sintênicos nos genomas de *O. octoguttata* e *O. personata*. Os resultados do agrupamento de verossimilhança das sequências 5S rDNA corroboram esta hipótese e aproximam o cromossomo 7 de *O. sexnotata* como provável homeólogo ao cromossomo portador da sintenia 5S e 45S rDNAs de *O. octoguttata* e *O. personata*. A partir deste cromossomo, inúmeras transposições espalharam esta família gênica pelos autossomos e cromossomos sexuais. A análise do agrupamento de verossimilhança das sequências 5S rDNA e, as sequências com alta degeneração molecular do 5S rDNA demonstraram também que as sequências dos cromossomos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 e 9 de *O. sexnotata* seguiram caminhos evolutivos diferentes. Essa heterogeneidade de sequências 5S rDNA em diferentes sítios cromossômicos também foi visualizada em diferentes eucariotos (da SILVA et al., 2011; REBORDINOS et al., 2013; BUENO et al., 2016, BARROS et al., 2017; BARDELLA; CABRAL-de-MELLO, 2018; GLUGOSKI et al., 2018)

A dispersão de famílias multigênicas em regiões cromossômicas subterminais é um evento descrito para eucariotos (KELLIS et al., 2003). Em *O. magnitutis* a localização *in situ* dos 5S e 18S rDNAs demonstraram a dispersão destes clusters sintênico para um segundo sítio autossômico. Porém, em *O. sexnotata*, um único sítio sintênico dos 5S e 18S rDNAs foi mantido no genoma, além da ampla dispersão de cópias do 5S rDNA por todos os cromossomos do complemento. A análise das sequências obtidas de cada cromossomo de *O. sexnotata* demonstrou uma heterogeneidade de cópias 5S rDNA, algumas com alta identidade molecular às cópias funcionais, outras com inúmeros SNPs, Indels, invasão de elementos transponíveis (TEs) parciais e degeneração molecular. As cópias com alta similaridade entre os diferentes sítios 5S rDNA indicam o processo de *concerted evolution* (BROWN et al., 1972). Neste modelo, todos os membros de uma família gênica evoluem preferencialmente de forma orquestrada e não independentemente. Uma mutação que ocorre em uma repetição se espalha por repetidas ocorrências de *crossover* desigual ou conversão de gênica (BROWN et al., 1972; NEI; ROONEY, 2005).

Em adição, cópias defectivas, não funcionais, pseudogenes do 5S rDNA ocorrem nos genomas de fungos e peixes (CIGANDA; WILLIAMS, 2011; BARROS et al., 2017; GLUGOSKI et al., 2018) e a presença de inúmeras cópias diferentes com alta degeneração molecular em *O. sexnotata* indicam a presença de pseudogenes e a ocorrência do evento de *birth and death* dos DNAs repetitivos para esta família gênica. Neste modelo, novos genes são gerados por duplicação gênica, e alguns genes duplicados são mantidos no genoma por um longo período, enquanto outros são deletados ou se tornam não funcionais por mutações deletérias (NEI et al., 1992; NEI; ROONEY, 2005). Por outro lado, a presença de sequências com alta similaridade ao 5S rDNA funcional distribuídas pelos autossomos em adição a inúmeras cópias pseudogenes diferentes em cada autossomo são evidências para a ocorrência do modelo misto de *concerted evolution* e *birth and death* (FREIRE et al., 2010; ÚBEDA-MANZANARO et al., 2010; PINHAL et al., 2011; MERLO et al., 2013; BUENO et al., 2016; BARDELLA; CABRAL-de-MELLO, 2018; LIU et al., 2017) no genoma de *O. sexnotata*.

Tradicionalmente, dois mecanismos são propostos para carrear cópias de DNAs repetitivos nos genomas. O primeiro envolve *double-strand breaks* (DSBs) e o reparo pelo mecanismo de recombinação não homóloga. Transposições de sequências repetitivas associadas a blocos heterocromáticos entre cromossomos não homólogos foram descritos em inúmeros genomas (CHEN et al., 1989; VALGUIRSDOTTIR, 1990; ELDER; TURNER, 1995; VICARI et al., 2008; BARROS et al., 2017; GLUGOSKI et al., 2018). *Omophoita sexnotata* possui blocos heterocromáticos na região pericentromérica dos autossomos

(ALMEIDA et al., 2009). Nesta via, a organização em bouquet no início da prófase I (DERNBURG et al., 1995) e a localização das bandas de heterocromatina em posição equidistante em relação ao centrômero segundo o modelo proposto por Schweizer; Loidl (1987), facilitariam a proximidade de sítios de cópias de DNA paralogas. DSBs nestas regiões e a disposição das fibras cromossômicas com cópias paralogas forneceriam o substrato para a recombinação não homóloga e desta forma, poderiam dispersar cópias do 5S rDNA entre os cromossomos de *O. sexnotata* durante o reparo do DNA. Trabalhos envolvendo a organização genômica em eucariotos apontam que, trocas de sequências não homólogas e duplicações de regiões subteloméricas, especialmente quando envolvem expansão de famílias multigênicas em regiões subterminais, são comumente identificadas (ver KELLIS et al., 2003).

No segundo mecanismo é proposto que a dispersão de sequências de DNA possa ser consequência de eventos de transposição, quando repetições *in tandem* são transpostas por carona de elementos móveis, como visto em outros organismos (WILDER; HOLLOCHER, 2001; LÓPEZ-GIRÁLDEZ et al., 2006; COATES et al., 2009; ZIEMNICZAK et al., 2014; PUCCI et al., 2016). A detecção de partes de TEs (*DNA9-48B* e *AmnSINE1*) invadidas em sequências do 5S/NTS de *O. sexnotata* indicam que este mecanismo pode ter auxiliado na dispersão de cópias não funcionais desta família gênica. O Retrotransposon *AmnSINE1* é originado de uma estrutura quimérica entre um 5S rDNA e um SINE derivado de tRNA, portando os boxes de transcrição para a polimerase III (KAPITONOV; JURKA, 2003; NISHIHARA et al., 2006; GOGOLEVSKY et al., 2009). Retroelementos *AmnSINE1* são identificados com altos níveis de conservação, sugerindo que podem ser exaptados para funcionar em genomas de vertebrados, entretanto sua função é desconhecida (NISHIHARA et al., 2006; LONGO, 2015).

No entanto, a invasão do TE pode ter ocorrido no cluster do 5S rDNA, gerando pseudogenes e, não necessariamente, ter atuado na dispersão da família gênica no genoma. A verificação de partes de TEs no NTS do 5S rDNA é comumente atribuído a pseudogenização (da SILVA et al., 2011; REBORDINOS et al., 2013; GLUGOSKI et al., 2018). Em Gymnotiformes, da Silva et al. (2011) verificaram partes do *Tc1-like* transposon no NTS em inúmeros sítios cromossômicos do 5S rDNA e propuseram a dispersão auxiliada pelo movimento do TE. Glugoski et al. (2018) verificaram em um genoma de cascudos (peixe) inúmeros sítios que possuíam cópias 5S rDNA funcionais ao lado de cópias pseudogenes rDNA 5S com parte do TE *hAT*. Nesta espécie foi proposto que a invasão do TE *hAT* gerou a pseudogenização e um *evolutionary breakpoint region* (EBR) no clusters 5S rDNA, promovendo DSBs e dispersão de cópias no genoma (Glugoski et al., 2018).

Em *O. sexnotata* é provável que algumas cópias do 5S rDNA possam ter dispersado junto com TEs no genoma, principalmente nos cromossomos sexuais onde cópias 5S rDNA foram amplificadas, mas a localização *in situ* não detectou cluster. No entanto, a localização dos sítios 5S rDNA equidistantes em relação ao centrômero corroboram para a recombinação não homóloga e dispersão do 5S rDNA entre os autossomos. A localização *in situ* de um único sítio de 5S rDNA nos genomas de Coleoptera é a situação mais comumente verificada (CABRAL-de-MELLO et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2012; GOLL et al., 2015). Esta é a primeira descrição da localização *in situ* do 5S rDNA em Chrysomelidae e, a verificação de um par autossômico portador da sintenia das famílias gênicas de rDNA em *O. octoguttata* e *O. personata* é a provável condição ancestral da característica no gênero *Omophoita*. Nesta via, a presença de um segundo par com sintenia dos rDNAs em *O. magniguttis* e, a intensa dispersão de sítios 5S rDNA em *O. sexnotata* são características derivadas no grupo. Múltiplos sítios com marcações de 5S rDNA foram descritos como características derivadas para outros insetos, como em Orthoptera e Heteroptera (CABRAL-de-MELLO et al., 2011a; OLIVEIRA et al., 2012; BARDELLA; CABRAL-de-MELLO, 2018).

A Fiber-Fish demonstrou que as famílias gênicas de rDNA estão interespaçadas na fibra da cromatina das quatro espécies analisadas. Essa é uma característica não usual para as famílias gênicas, uma vez que utilizam maquinaria transcricional de RNA polimerases diferentes. Entretanto, genes ativos de famílias gênicas que utilizam RNA polimerases diferentes já foram detectados nestes tipos de associação cromatínica (ROEHRDANZ et al., 2010). Em Coleoptera já foram verificadas condições de sintenia de famílias gênicas em estudos que localizaram *in situ* o 5S rDNA e a histona H3 (CABRAL-de-MELLO et al., 2010, 2011b), 45S rDNA e histona H3 (ROEHRDANZ et al., 2010), além da disposição sintênica de três famílias gênicas: 5S rDNA, 45S rDNA e histonas (CABRAL-de-MELLO et al., 2011c; GOLL et al., 2015). Ainda, a visualização de fibras cromatínicas contendo apenas o 5S rDNA demonstram que apenas esta família gênica foi envolvida na dispersão de sítios no genoma de *O. sexnotata*.

Em conclusão, os dados obtidos neste estudo evidenciaram um alto nível de duplicação e dispersão de genes 5S rDNA em *O. sexnotata*. Estes sítios podem ter dispersado em *concerted evolution*, embora algumas sequências possam ter seguido caminhos evolutivos diferentes (*birth and death*) e, portanto, estão de acordo com o modelo misto de dispersão das famílias gênicas nos genomas. A localização *in situ* das famílias gênicas de rDNA nos genomas de quatro espécies de *Omophoita* demonstraram uma dinâmica de diferenciação cariotípica proporcionada pela movimentação dos DNAs repetitivos.

4.1.5 Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado pelo 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), e Fundação Araucária (Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná). Os autores são agradecem ao especialista Carlos Campaner pela assistência na identificação das espécies.

4.1.6 Referências

As Referências deste capítulo se encontram organizadas em tópico no final desta tese.

4.1.7 Figuras



Figura 1- Alinhamento das sequências de 5S rDNA obtidas a partir do DNA genômico. a) 219 a 221 pb das sequências de 5S rDNA de *O. sexnotata*, b) 209 a 212 pb das sequências de 5S rDNA de *O. octoguttata*. NTS em cinza: TATA-like (amarelo), GC box (azul), Citosina - 1 (rosa); 5S rDNA em verde claro: Box A (azul claro), elemento intermediário (IE) (bordo), Box C (laranja), poli T (violeta). Software Gencious 8.1.9.



Figura 2- Sequências de 5S rRNA obtidas de *O. sexnotata*. a) Alinhamento da sequência de cDNA com as sequências do DNA genômico, b) Alinhamento da sequência de cDNA com as sequências de 5S rDNA do cromossomo 7. Box A (azul claro), elemento intermediário (IE) (bordo), Box C (laranja). Software Geneious 8.1.9.

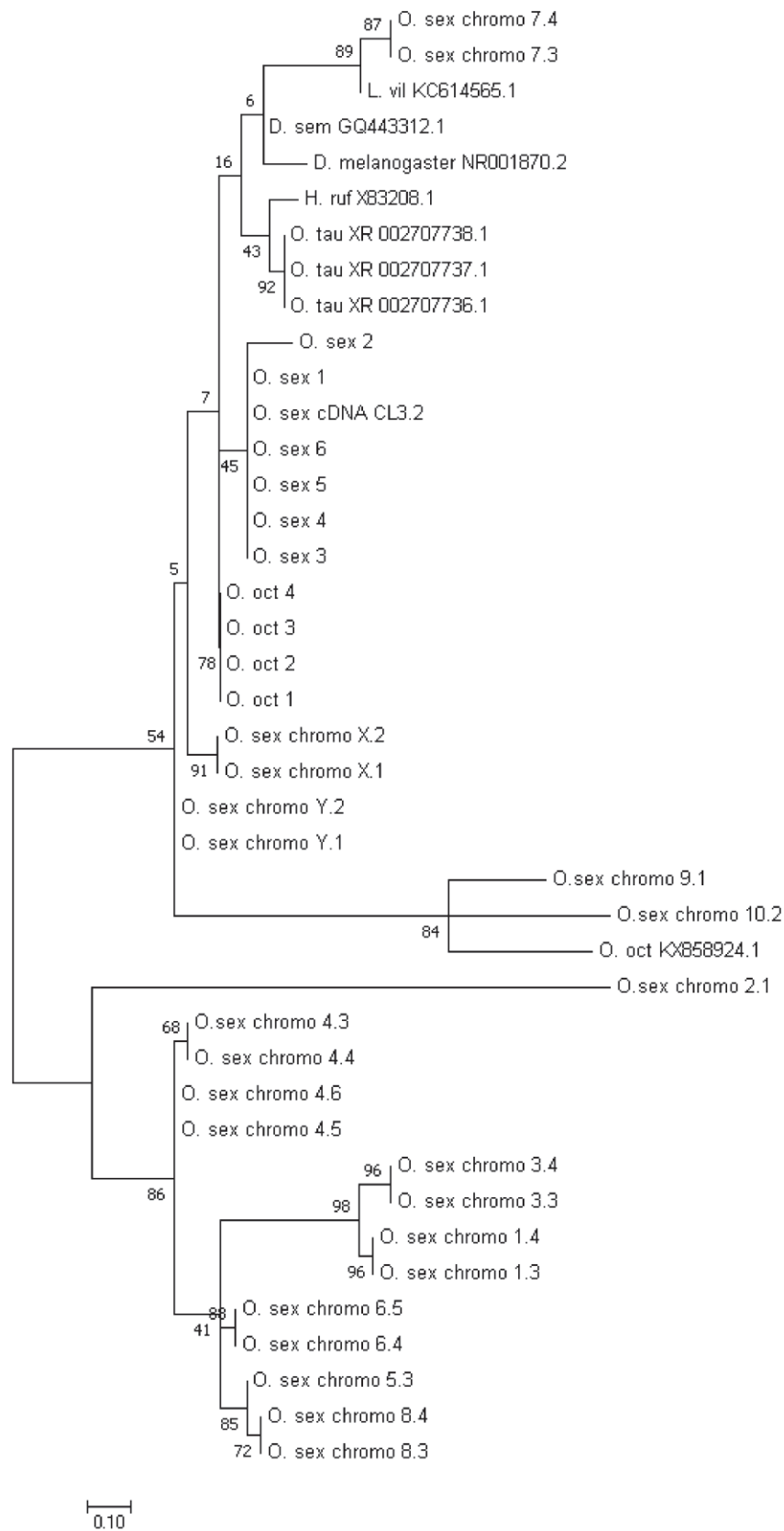


Figura 3- Agrupamento por máxima-verossimilhança (MV) das seqüências de 5S rDNA obtidas de *O. sexnotata* a partir do DNA genômico, de cada cromossomo e a partir do cDNA, de *O. octoguttata* e de espécies de Coleoptera depositadas no GenBank, utilizando o modelo de substituição nucleotídica Kimura 2-parâmetros. Bootstrap com 1000 interações; Grupo externo: *Drosophila melanogaster*.

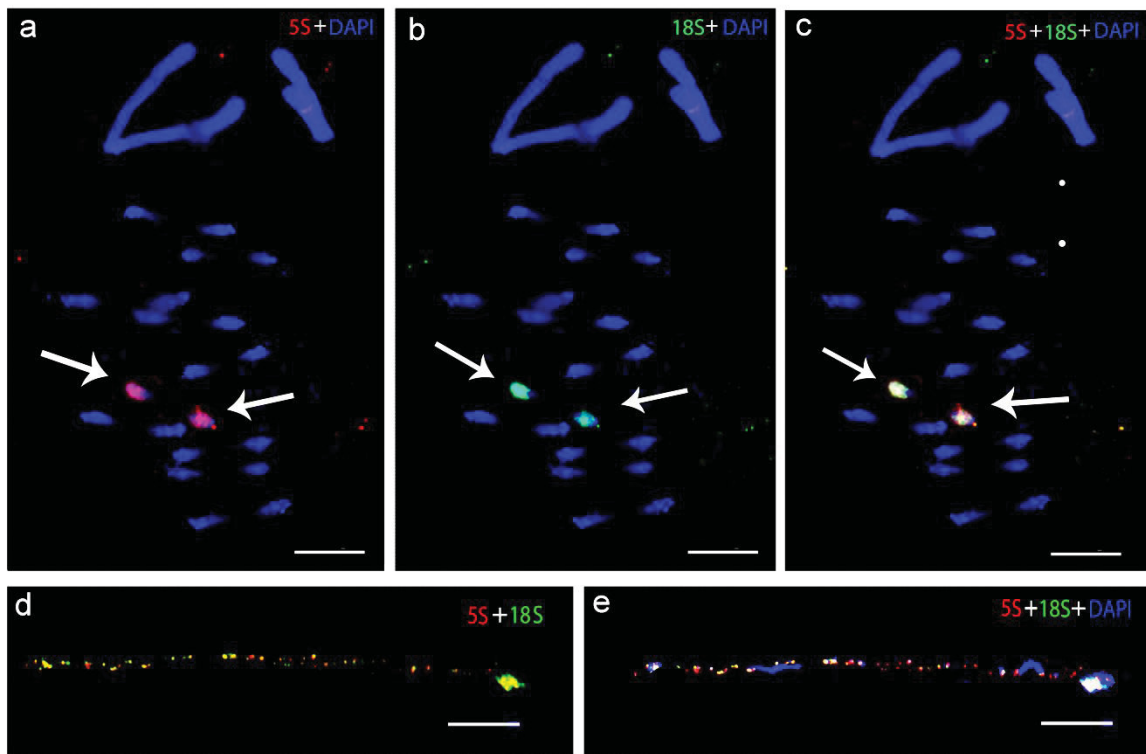


Figura 4- Células de *O. octoguttata* em metáfase I, com $2n=10II+X+y$, submetidas a double FISH com sondas de 5S rDNA (vermelho) e sondas de 18S (verde), contracoradas com DAPI (azul), mostrando a presença dos cístrons de 5S (setas) em um bivalente autossômico (a) e a localização do cístron de 45S (b - setas), onde são co-localizados (c). d) e e) Fiber-FISH mostrando que os sítios co-localizados são interespaçados. Escala = 10 μ m.

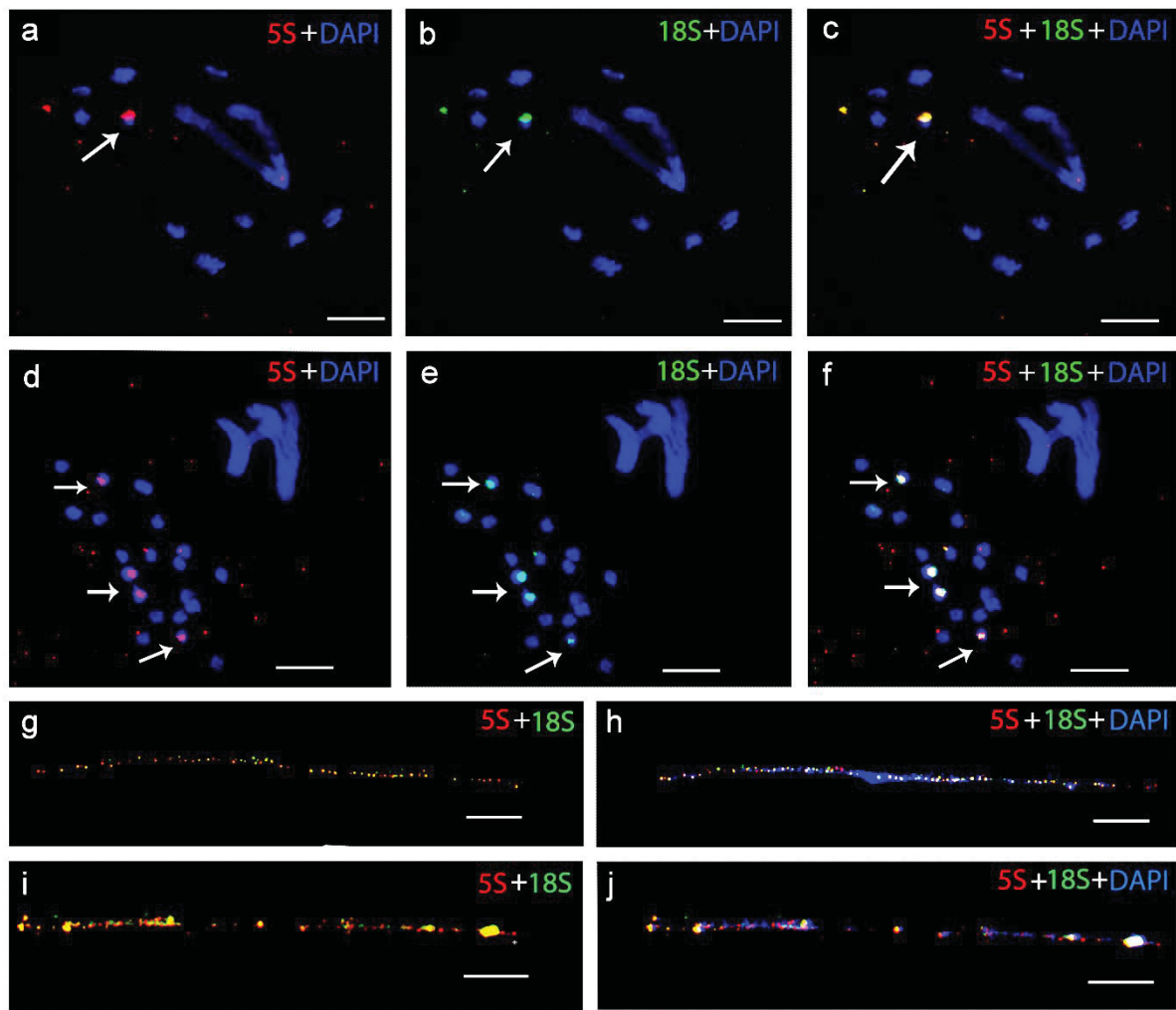


Figura 5- Células meióticas de *O. personata* (a, b, c, g, h) e *O. magniguttis* (d, e, f, i, j), submetidas a FISH com sonda do 5S rDNA (vermelho) e 18S (verde) contracoradas com DAPI (azul). a) metáfase II, com $n=10+y$, mostrando o cístron de 5S (setas) associado com um autossomo. b) a localização do cístron de 45S (seta). c) Sobreposição das imagens mostrando a co-localização dos cístrons ribossomais (setas). d) e e) metáfase espermatogonial, com $2n=22=20+X+y$, mostrando os cístrons de 5S (setas) e 45S (setas) associados a quatro cromossomos f) Sobreposição das imagens mostrando a co-localização dos cístrons (setas). g), h), i) e j) Fiber-FISH mostrando que os sítios co-localizados são inter espaçados nas duas espécies. Escala = $10\mu m$.

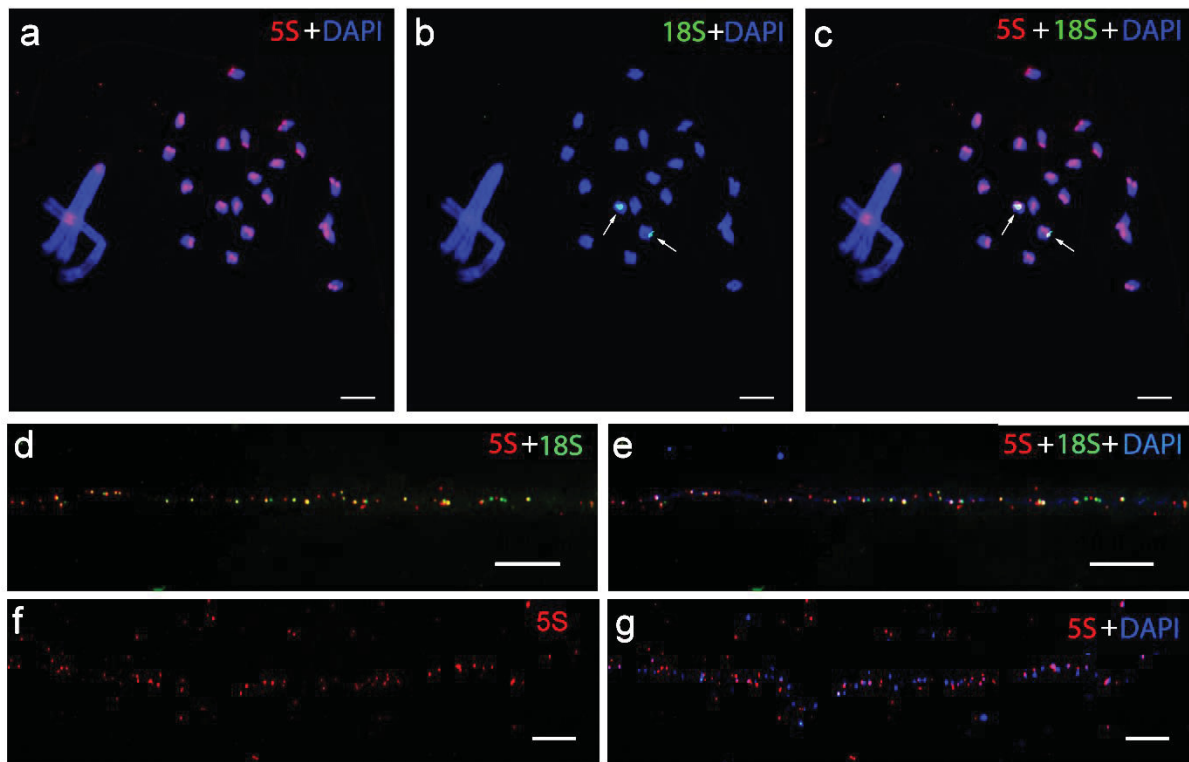
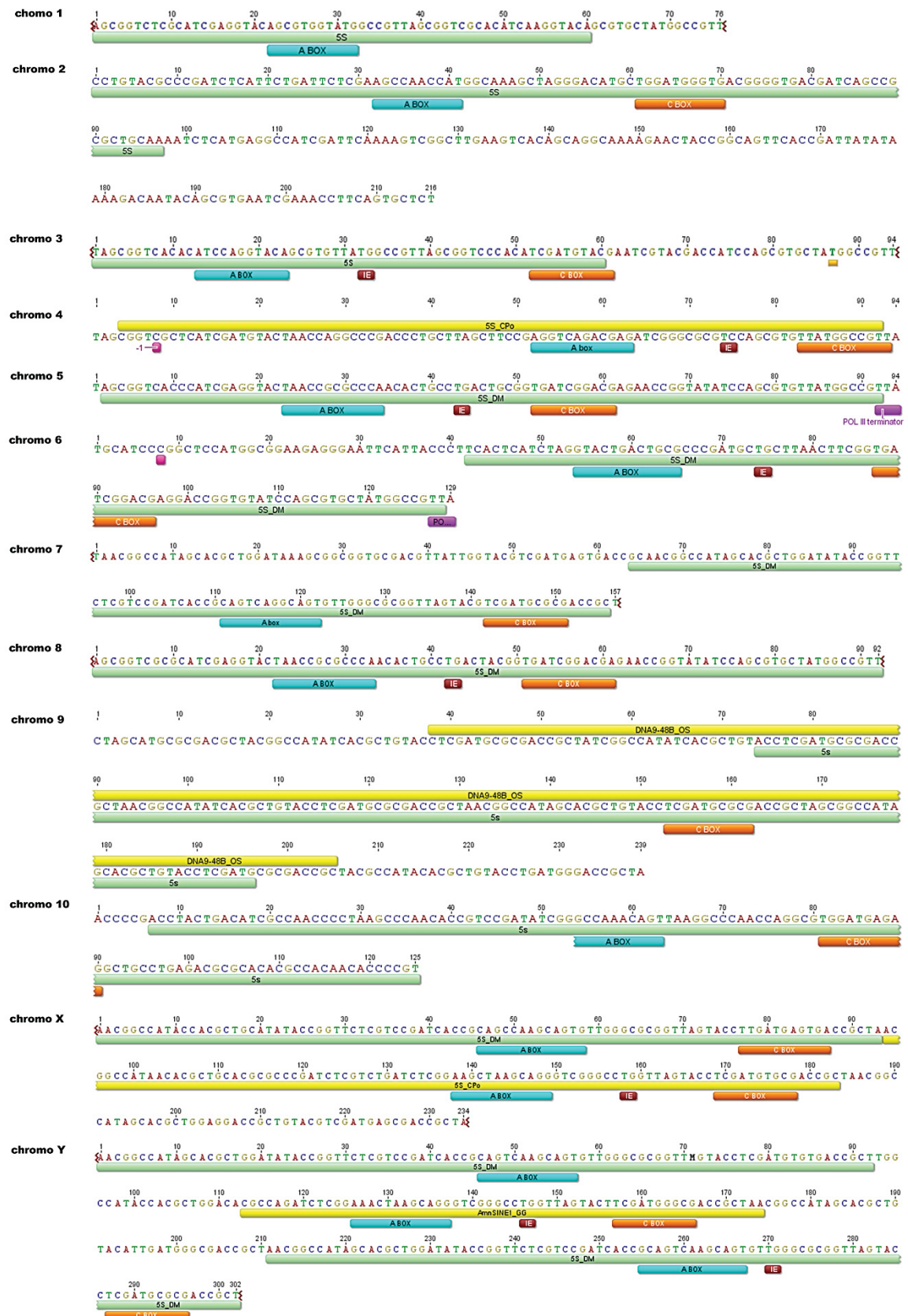


Figura 6- Metáfase espermatogonial de *O. sexnotata* com $2n=22$ cromossomos submetidos a FISH com sonda de 5S rDNA (vermelho) contraincorada com DAPI (azul). a) mapeamento do 5S em todos os cromossomos autossômicos. b) Localização do cístron de 45S em um par (seta). c) Sobreposição das imagens, mostrando a co-localização dos cístrons ribossomais em um par (setas). d) e e) Fiber-FISH mostrando que os sítios co-localizados são interespçados. f) e g) fibra com apenas o cluster 5S rDNA. Escala = 10 μm .

4.1.8 Material suplementar



MS 1- Sequências do 5S rDNA obtidas a partir de cada cromossomo de *O. sexnotata*. 5S rDNA (verde claro); A box (azul claro); elemento intermediário (IE) (bordo); C box (laranja); poli T (violeta); Retropseudogene 5S derivado de *Cavia porcellus* (cromossomo 4 e X- amarelo); TE: *DNA9-48B* (cromossomo 9- amarelo); Retrotransposon: *AmnSINE10* (cromossomo Y- amarelo).

4.2 CAPÍTULO II

**Intensa dispersão de histonas e U snDNA associadas à elementos transponíveis nos
cariótipos de *Omophoita* (Coleoptera, Chrysomelidae)**

Resumo

A família multigênica que codifica as histonas é exclusiva dos eucariotos. Essas proteínas organizam o nucleossomo e possuem um importante papel em eventos de modificação da cromatina e controle da expressão gênica. A família multigênica *U small nuclear RNA* (*U snRNA*) é composta de pequenos genes codificantes de RNAs que compõem a maquinaria do spliceossomo. Embora adequados para utilização como sondas de localização *in situ*, pouco tem sido explorado em insetos. Neste estudo, quatro espécies de *Omophoita*: *O. octoguttata*, *O. personata*, *O. magniguttis* e *O. sexnotata* foram utilizadas para a caracterização de sequências histônicas e dos U1 e U2 snDNAs e, posterior localização *in situ* buscando compreender a dispersão das cópias parálogas destas famílias gênicas nestes genomas. As sequências parciais dos genes *H1*, *H3*, *H4*, *U1 snRNA* e *U2 snRNA* foram determinadas para *O. sexnotata*. A análise das sequências permitiu determinar a invasão de partes de elementos transponíveis às famílias multigênicas: H1 (invasão do LINE *LI-9*); U1 snDNA (invasão do *SINEU-1A*); U2 snDNA (invasão do LTR *DIRS-1*). A localização *in situ* destas sequências resultou em inúmeras marcações das sondas H1, H3, H4, U1 snDNA e U2 snDNA nos cariótipos das quatro espécies estudadas, incluindo os autossomos e cromossomos sexuais. Os dados obtidos mostraram que os genes estudados ocorrem isolados ou em sintenia para as cinco sequências nas quatro espécies. Foram observadas variações citomoleculares destas famílias gênicas nos cariótipos de *Omophoita*, gerando variação cromossômica microestrutural, muito provavelmente devido a invasão de segmentos de elementos transponíveis. A dispersão de cópias parálogas das famílias gênicas associadas aos elementos transponíveis foi discutida e abre perspectiva para análise da provável origem de retropseudogenes ou de genes tecido específicos funcionais para H1, H3, H4, U1 snDNA e U2 snDNA em *Omophoita*.

Palavras-chave: Famílias multigênicas. FISH. Genes co-localizados. Pseudogenes. Retrotransposons.

Abstract

The multigene family that codifies histones is exclusive of eukaryotes. These proteins organize the nucleosome and play an important role in chromatin modification and gene expression control. The *U* small nuclear RNA (*U snRNA*) multigene family is composed of small genes of RNA encoding for spliceosome machinery. In this study, four species of the *Omophoita* genus (*O. octoguttata*, *O. personata*, *O. magniguttis*, and *O. sexnotata*) were used for characterizing and locating *in situ* histone sequences and U1 and U2 snDNAs, with the aim of assessing the dispersion of paralogue copies of these gene families. The sequence analysis allowed the determination of the invasion of parts of transposable elements into multigene families: H1 (long interspersed nuclear element *L1-9* invasion), U1 snDNA [short interspersed nuclear element derived from *U1 snRNA* (*SINEU*)-*1A* invasion], and U2 snDNA (*LTR DIRS-1* invasion). *In situ* localization resulted in several markings of H1, H3, H4, and U1 and U2 probes in the karyotypes of all four species, including the autosomes and sex chromosomes. Obtained data shows that genes occur isolated or syntenic for the five sequences in all the four species. The cytomolecular variation of these gene families in the *Omophoita* karyotypes generating microstructural variation in the chromosomes, are likely due to invasion of transposable elements. The dispersion of paralogous copies of multigene families associated with transposable elements are discussed and offers a perspective for analysis of a probable origin of retropseudogenes or tissue-specific functional genes to H1, H3, H4, and U1 and U2 snDNAs in *Omophoita*.

Keywords: Co-localized genes. FISH. Multigene families. Pseudogene. Retrotransposon.

4.2.1 Introdução

A citogenética molecular procura a identificação de marcadores cromossômicos que auxiliem no entendimento da evolução cariotípica nas diversas espécies. Os DNAs repetitivos compõem uma grande quantidade dos genomas eucarióticos, podendo estar arranjados de maneira dispersa ou *in tandem* (SUMNER, 2003). As famílias multigênicas são grupos de genes que descendem de um gene ancestral comum apresentando, portanto, sequências de DNA e funções similares (NEI; ROONEY, 2005). As proteínas histônicas que são codificadas por uma família multigênica, desempenham um importante papel na organização estrutural da cromatina, no empacotamento do DNA em nucleossomo e também na regulação da expressão gênica em eucariotos (SELLOS et al., 1990; CSINK; HENIKOFF, 1998; CHIODA et al., 2002). As sequências das histonas podem estar organizadas com um número variável de cópias, em um cluster de repetição *in tandem*, espaçadas por sequências de DNA não-codificante, distribuídos individualmente no genoma ou, ainda, arranjados por combinação aleatória dos genes, como genes funcionais ou pseudogenes (LIFTON et al., 1977; CHILDS et al., 1981; ENGEL; DODGSON, 1981; RUBERTI et al., 1982; CABRAL-de-MELLO et al., 2010).

As sequências histônicas são extremamente conservadas, cada uma das classes é subdividida em tipos não alélicos variantes, gerando assim subtipos de histonas, os quais são codificados por genes de cópia única que apresentam variação estrutural (DOENECKE et al., 1997). Em insetos as histonas estão agrupadas em um quarteto (H1, H2A, H3 e H4), encontrado em *Drosophila americana*, ou são organizadas no quinteto (H1, H2A, H2B, H3 e H4), como demonstrado para algumas espécies de Curculionidae (NAGODA et al., 2005; ROEHRDANZ et al., 2010). Na classe Insecta, algumas sequências de histonas já foram localizadas *in situ*, como em Hemiptera (NOVOTNÁ et al., 2011; BARDELLA et al., 2016), Coleoptera (CABRAL-de-MELLO et al., 2010, 2011b, c; GOLL et al., 2015) e Orthoptera (CABRERO et al., 2009; CABRAL-de-MELLO et al., 2011a; OLIVEIRA et al., 2011).

Além das histonas, outros marcadores moleculares vêm sendo utilizados na identificação de sítios cromossômicos, a exemplo dos pequenos DNA nucleares snDNA – *small nuclear DNA* - (UTSUNOMIA et al., 2014; ANJOS et al., 2015; BARDELLA et al., 2016). Nos eucariotos, a família multigênica U snDNA está estreitamente envolvida no processo de *splicing* (SASHITAL et al., 2007). Esta família é composta de pequenos genes codificantes de RNAs ricos em uridina (GREEN, 1989; RIO, 1992; WEST, 2012). O complexo macromolecular responsável por esse processo, chamado spliceossomo, é composto

por um conjunto de mais de 300 proteínas associadas com os U snRNAs, incluindo U1, U2, U4, U5 e U6 (VALADKHAN, 2005; WEST, 2012).

Devido a sua grande importância para a célula, os genes U snRNA constituem uma classe distinta e conservada e, já foram mapeados citogeneticamente em diferentes organismos (LUND et al., 1983; BARZOTTI et al., 2003; MANCHADO et al., 2006; ÚBEDA-MANZANARO et al., 2010; CABRAL-de-MELLO et al., 2012; BARDELLA et al., 2016). Estes estudos indicaram a conservação do número e posição dos clusters, com sítios restritos a um ou poucos pares cromossômicos e, por vezes, ligados a outras famílias multigênicas (PELLICCIA et al., 2001; MANCHADO et al., 2006; VIERNA et al., 2011; ANJOS et al., 2015) ou, ainda, localizados em cromossomos sexuais (UTSUNOMIA et al., 2014), ou em cromossomos supranumerários (BUENO et al., 2013; ANJOS et al., 2015; MENEZES de CARVALHO et al., 2015).

Os indivíduos pertencentes a subtribo Oedionychina tem como característica contrastante a presença de cromossomos sexuais extremamente grandes e assinápticos (VIRKKI, 1968, 1970, 1988a; SMITH; VIRKKI, 1978; VIRKKI et al., 1991). O gênero *Omophoita*, Oedionychina, possui 19 espécies analisadas citogeneticamente na região Neotropical (VIRKKI, 1967, 1970, 1973, 1976, 1983, 1986; SMITH; VIRKKI, 1978; PETITPIERRE et al., 1988; VIRKKI et al., 1991; VIRKKI, SANTIAGO-BLAY, 1996; ALMEIDA et al., 2009). A maior parte dos exemplares analisados (16 espécies) possui cariótipo uniforme com $2n = 22$ cromossomos e fórmula meiótica $2n = 10II+X+y$, com predominância de cromossomos metacêntricos (SMITH; VIRKKI, 1978; PETITPIERRE et al., 1988; ALMEIDA et al., 2009). Poucos são os estudos de citogenética molecular no grupo, os quais evidenciaram a localização do gene ribossomal 18S em autossomos (ALMEIDA et al., 2010), além dos DNAs repetitivos compartilhados entre os cromossomos sexuais e os autossomos nos cariótipos de *Omophoita* (MELLO et al., 2014). Neste contexto, o objetivo deste estudo foi compreender a distribuição cromossômica de famílias gênicas em *Omophoita* a partir da caracterização e localização *in situ* de histonas e de U snDNAs em quatro espécies do gênero.

4.2.2 Material e Métodos

Coleta e preparações cromossômicas

Os espécimes utilizados no estudo foram machos adultos pertencentes a *Omophoita* Chevrolat 1837 (10 indivíduos de *O. octoguttata*, 8 de *O. personata*, 6 de *O. magniguttis* e 15 de *O. sexnotata*), coletados na cidade de Ponta Grossa, Paraná, Brazil (25°07'10" S e 49°56'24" W). As determinações taxonômicas das espécies de *Omophoita* foram realizadas pelo pesquisador Carlos Campaner do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo. As preparações citológicas para o estudo dos cromossomos foram obtidas a partir das gônadas de indivíduos adultos, dissecados em solução fisiológica para insetos e processados segundo metodologia descrita por Almeida et al. (2000).

Obtenção e caracterização das sequências

O DNA genômico de *O. sexnotata* foi extraído segundo método CTAB de Murray; Thompson (1980), com adição de um passo inicial que consiste em macerar a cabeça, o pronoto e pernas em nitrogênio líquido. A amplificação das sequências parciais das histonas H1, H3, H4 e U1 snDNA e U2 snDNA foram realizadas com *primers* descritos na literatura ou desenhados neste estudo a partir da homologia das sequências de espécies relacionadas, obtidas no GenBank (Tabela 1).

Tabela 1- Relação de *primers* utilizados nas amplificações das sequências de histonas H1, H3, H4 e U1 snDNA e U2 snDNA.

Gene	Primer Forward/Reverse	Referência
Histona H1	5' -TGGTGSTTCTKCTCTTCAAGC-3' 5' -GMTGGTTYCTTASCSTTTT-3'	Presente estudo
Histona H3	5' -CGYAARTCNACYGGWGGWGNAA-3' 5' -TDGCRCAAYARRTTNGTRTCY-3'	Goll et al. (2015)
Histona H4	5' -GGYGBGTSAAACGTATCT-3' 5' -GGCGTAGACCACGTCCAT-3'	Presente estudo
snRNA U1	5' -CTTACCTGGCGTRGRGGWY-3' 5' -CAKTCCCRCTACCAAAAATT-3'	Cabral-de-Mello et al. (2012)
snRNA U2	5' -ATCGCTTCTCGGCCTTATG-3' 5' -TCCCGGCGGTACTGCAATA-3'	Bueno et al. (2013)

As reações de amplificação das histonas foram compostas por 100-200 ng de DNA genômico, 0,2 µM de MgCl₂, 1x tampão de reação, 0,2 µM de dNTP, 0,5 pM de *primer Forward*, 0,5 pM de *primer Reverse* e 1,5 U de Taq DNA Polymerase (Invitrogen). O

programa da reação de amplificação consistiu de desnaturação inicial por 5 min a 95 °C, 35 ciclos de 95 °C por 1 min, 60 °C por 45 s, 72 °C por 1 min e, extensão final a 72 °C por 7 min. As amplificações dos U1 e U2 snDNAs foram compostas por 40-100 ng de DNA genômico, 0,2 µM de MgCl₂, 1x tampão de reação, 0,2 µM de dNTP, 1 pM de *primer Forward*, 1 pM de *primer Reverse* e 1 U de Taq DNA Polymerase (Invitrogen). O programa da reação de amplificação consistiu de desnaturação inicial por 5 min a 95 °C, 30 ciclos de 95 °C por 45 s, 62 °C por 45 s, 72 °C por 1 min e 20 s e, extensão final a 72 °C por 7 min.

Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose 1%, purificados pelo Kit Illustra GFX PCR DNA and GelBand Purification (GE Healthcare). Após a purificação, os produtos da PCR foram submetidos ao sequenciamento nucleotídico utilizando o equipamento ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). As sequências obtidas foram analisadas e editadas com o auxílio do programa Geneious 8.1.9 e submetidas ao software *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), presente no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) e ao software CENSOR presente no *Genetic Information Research Institute* (GIRINST) (<http://www.girinst.org/censor/index.php>), para a identificação de similaridade entre genes de outros organismos.

Localização in situ

As sequências de H1, H3, H4 e U1 snDNA, U2 snDNA obtidas neste estudo foram marcadas usando o Kit Nick Translation System (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante. As sequências H3, H4 e U1 snDNA obtidas foram sintetizadas com a incorporação do nucleotídeo digoxigenina 11-dUTP (Roche Applied Science). Por sua vez, as sequências H1 e U2 snDNA foram sintetizadas em sondas com emprego da biotina 16-dUTP (Roche Applied Science).

A hibridação *in situ* fluorescente (FISH) foi realizada em condições de estrigência próxima a 77% (2,5 ng/µL de sonda, 50% formamida, 2xSSC e 10% sulfato dextrano por 18 h a 37° C), de acordo com o método descrito por Pinkel et al. (1986). O reconhecimento do sinal de fluorescência para sondas biotiniladas foi realizado usando estreptavidina *Alexa Fluor 488* (Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) e para sondas com digoxigenina foi utilizado o composto anti digoxigenina rodamina (Roche Applied Science). Os cromossomos foram contracorados com 0,2 µg mL⁻¹ of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) em meio de montagem Vectashield (Vector, Burlingame, CA, USA).

4.2.3 Resultados

Sequenciamento nucleotídico

O resultado do sequenciamento nucleotídico do produto de amplificação parcial do gene H1 de *O. sexnotata* (GenBank: MF677973) retornou uma sequência de 481 pb, a qual evidenciou similaridade média de 73% com o gene H1 de *Chironomus tentans*, *C. pallidivittatus*, *Drosophila ficusphila* e *Tribolium castaneum* (GenBank: L29105.1; L29106.1; XM_017200891.1; XM_008197576.2). Na base de dados CENSOR, um segmento interno (289 – 348 pb) dessa sequência, apresentou 77% de similaridade com a região 4135 - 4194 pb do elemento transponível *L1-9_LCh* de *Latimeria chalumnae* (Figura 1a).

O sequenciamento nucleotídico da amplificação parcial do gene H3 de *O. sexnotata* (GenBank: MF677974) retornou 319 pb com similaridade média de 83% com a sequência parcial da H3 de *Homotomidae* sp., *Orectogyrus discors* e *Stictonectes rufulus* (GenBank: JN797372.1; JX477906.1; KF575377.1). O resultado do sequenciamento parcial (431 pb) da H4 de *O. sexnotata* (GenBank: MF677975) mostrou similaridade média de 85 % com as sequências parciais da H4 de *Critomerus iliacus*, *Lybaeba* sp. e *Trigonopterus* sp. (GenBank: HG940132.1; KP762759.1; LN884919.1). Na base de dados Censor as sequências parciais das histonas H3 e H4 não retornaram similaridade com elementos transponíveis.

Os resultados obtidos com o sequenciamento nucleotídico do U1 snDNA de *O. sexnotata* (GenBank: MF677971) retornaram 158 pb, os quais apresentaram 82% de similaridade média com a sequência parcial de U1 snDNA de *Proasellus coxalis*, *Rhammatocerus brasiliensis* e *Ronderosia bergi* (GenBank: AY198214.1; KC896793.1; KP213281.1). A análise no CENSOR mostrou que um segmento interno (22 – 112 pb) do U1 snDNA de *O. sexnotata* possui 81% de similaridade a região 40 - 100 pb do retrotransposon *SINEU-1A_Croc* de *Crocodylidae* (Figura 1b).

O sequenciamento nucleotídico do U2 snDNA de *O. sexnotata* (GenBank: MF677972) retornou 184 pb com similaridade média de 75% ao gene U2 snDNA de *Bombyx mori*, *Craterostigma tasmanianus*, *Drosophila grimshawi* e *Ronderosia bergi* (GenBank: AF368455.1; AF110882.1; XR_047396.1; KP213284.1). Na análise da base de dados Censor, um segmento interno (103-182 pb) do U2 snDNA apresentou 70% de similaridade com a região 2723 – 2805 pb do retrotransposon *DIRS-1d_Lch* de *Latimeria chalumnae* (Figura 1c).

Mapeamento cromossômico

As sequências obtidas dos genes em estudo foram utilizadas para localização *in situ* em quatro espécies de *Omophoita*: *O. octoguttata*, *O. personata*, *O. magniguttis* e *O. sexnotata*. Em *O. octoguttata* a FISH com sonda H1 mostrou sinais na região centromérica da maioria dos bivalentes autossômicos, na região intersticial de ambos os braços do cromossomo X e intersticial no braço longo do Y (Figura 2a). As sondas H3, U1 e U2 snDNA hibridaram na região centromérica da maioria dos bivalentes autossômicos. Além disso, as sondas U1 snDNA e U2 snDNA mostraram marcações intersticiais em vários braços cromossômicos (Figura 2b, d, e). Nos cromossomos sexuais a sonda H3 mostrou marcações na região centromérica e intersticial em ambos os braços do cromossomo X. O cromossomo Y apresenta marcações na região intersticial do braço longo e terminal do braço curto (Figura 2b, f, h). A sonda U1 snDNA mostrou marcações centroméricas, intersticial no braço longo e terminal no braço curto do cromossomo X, marcações terminais no braço curto do cromossomo Y (Figura 2d, i). A sonda U2 snDNA mostrou marcações centroméricas e intersticiais em ambos os braços do cromossomo X e terminal no braço longo do cromossomo Y (Figura 2e, h, i). A localização *in situ* da H4 evidenciou sítios centroméricos em todos os bivalentes autossômicos. Nos cromossomos sexuais a sonda H4 evidenciou marcações intersticiais e terminais em ambos os braços cromossômicos do X e do Y, além de marcações centroméricas no Y (Figura 2c, g).

Os resultados obtidos com a dupla FISH, combinando as sondas H1+H4, H1+H3, H3+U2 e U2+U1, mostraram sinais isolados, no entanto, a maior parte dos sinais foram sintênicos e co-localizados na maioria dos bivalentes autossômicos entre a maior parte das sondas (Figura 2f, g, h, i), (MS1 a). As sondas H3, U1 e U2 foram sintênicas na região centromérica do X (Figura 2h, i) (MS1 a).

A FISH com sondas H1 em *O. personata* evidenciou marcações centroméricas em 2 pares autossômicos, além de 1 par com marcações centroméricas, intersticial no braço longo e terminal no braço curto. A sonda H1 hibridou na região centromérica, intersticial e terminal de ambos os braços do cromossomo X e proximal e terminal do Y (Figura 3a, f, g). A sonda H3 mostrou clusters em seis autossomos e nas regiões proximais e terminais do braço curto e longo dos cromossomos X e Y (Figura 3b, f, h). A sonda H4 hibridou na região centromérica da maioria dos autossomos, sendo que um par mostra marcações adicionais na região terminal do braço curto e em todo o braço longo. O cromossomo X mostra marcações na região pericentromérica e terminal de ambos os braços. O cromossomo Y possui marcações

centromérica e terminal no braço longo (Figura 3c, g). A sonda U1 snDNA mostrou marcações centroméricas em 10 cromossomos autossômicos e 1 par evidenciou marcações adicionais ao longo de todo o braço longo. O cromossomo X possui marcações na região centromérica e o cromossomo Y possui marcações intersticiais em um dos braços (Figura 3d, i). A sonda U2 snDNA hibridou em 10 cromossomos autossômicos na região centromérica e mostrou marcações espalhadas ao longo do braço longo em um par de autossomo. O cromossomo X mostra marcações ao longo dos dois braços cromossômicos e o Y marcações dispersas no braço curto (Figura 3e, h, i).

As marcações obtidas com a dupla FISH, utilizando as sondas combinadas, mostraram sinais isolados, no entanto, a maior parte dos sinais evidenciaram sintenia e co-localização destas na região centromérica da maioria dos autossomos e nos cromossomos sexuais. Adicionalmente, um par autossômico mostra estes clusters sintênicos e co-localizados na região terminal do braço curto e disperso no braço longo (Figura 3f, g, h, i), (MS1 b).

A hibridação *in situ* com as sequências histônicas em *O. magniguttis* evidenciou marcações centroméricas na maioria dos autossomos, sendo estas sintênicas e co-localizadas (Figura 4a, b, c, f, g). O cromossomo X mostra marcações centroméricas e sintênicas com as sondas H1 e H3. O cromossomo Y possui marcações na região intersticial do braço curto com as sondas H1 e H4 (Figura 4a, b, c, f, g). A sonda U1 snDNA apresentou marcações centroméricas em 3 bivalentes autossômicos e na região centromérica e intersticial do braço curto do cromossomo X. Adicionalmente, esta sonda mostrou marcações centroméricas e intersticial nos dois braços do Y (Figura 4d, i). A sonda U2 snDNA evidenciou marcações centroméricas na maioria dos bivalentes autossômicos, na região centromérica e terminal do X, em ambos os braços. No cromossomo Y, a sonda U2 snDNA mostra marcações dispersas no braço curto (Figura 4e, h, i).

A dupla FISH com as sondas U1 e U2 snDNA mostrou sintenia e co-localização na região centromérica na maioria dos autossomos, porém um bivalente marcou somente com a sonda U2. Os cromossomos sexuais mostram essas duas sequências em sintenia (Figura 4d, e, i). As marcações com a dupla FISH, utilizando todas as sondas mostraram sintenia e co-localização destas na região centromérica da maioria dos autossomos e nos cromossomos sexuais (Figura 4f, g, h, i), (MS1 c).

A localização *in situ* da sequência H1 em *O. sexnotata* evidenciou marcações centroméricas em quatro pares autossômicos, além de marcações intersticial e terminal em ambos os braços cromossômicos do X. No cromossomo Y a sequência H1 hibridou na região pericentromérica, intersticial do braço curto e terminal nos dois braços (Figura 5a). A

hibridação *in situ* com a sonda H3 mostrou sítios centroméricos na maioria dos bivalentes autossômicos. No cromossomo X, a sonda H3 evidenciou marcações intersticiais nos dois braços e no Y as marcações foram centroméricas e terminais (Figura 5b). A sonda H4 hibridou na região centromérica da maioria dos autossomos, na região centromérica e intersticial do cromossomo X e centromérica, terminal do braço curto e intersticial do braço longo do Y (Figura 5c). A sonda U1 snDNA evidenciou sítios na região centroméricas da maioria dos autossomos, na região centromérica e terminal em ambos os braços dos cromossomos sexuais (Figura 5d). A sonda U2 snDNA mostrou marcações na região centromérica na maioria dos autossomos, intersticial e distal do X e centromérica e terminal do Y (Figura 5e). As marcações com a dupla FISH utilizando todas essas sondas mostraram sentença e co-localização destas na região centromérica da maioria dos autossomos e nos cromossomos sexuais, no entanto, sítios cromossômicos de sequências individuais também foram localizados (Figura 5f, g, h, i), (MS1 d).

4.2.4 Discussão

Os cromossomos de eucariontes são complexos quanto à estrutura e composição de diferentes classes de DNA. A organização e a distribuição do cluster das histonas, por exemplo, em unidades de repetições *in tandem* ou em sequências dispersas e a presença de pseudogenes de histonas, são consideradas variáveis dentre os genomas já estudados (HEINTZ et al., 1981; BRAASTAD et al., 2004; ROEHRDANZ et al., 2010). Da mesma maneira as espécies de *Omophoita* aqui estudadas mostraram intensa dispersão de cópias de histonas e dos U1 e U2 snDNAs nos genomas. Essa dispersão de histonas e U snDNAs é divergente em relação aos estudos já realizados em Insecta, os quais geralmente evidenciaram a localização em um ou poucos sítios cromossômicos (CABRERO et al., 2009; BARDELLA et al., 2016). Nas quatro espécies analisadas as sequências de histonas e U1 e U2 snDNAs estão espalhadas em quase todos os cromossomos dos cariótipos e, o provável motivo da dispersão destes sítios é a associação ou invasão de elementos transponíveis (TEs) nestas famílias gênicas.

A sequência parcial da histona H1 isolada de *O. sexnotata* apresenta um segmento interno com invasão de parte do elemento retrotransponível (RTE) *L1-9* LCh da ordem LINE (*Long Interspersed Nuclear Element*), superfamília L1. Este RTE, quando autônomo, possui duas ORFs (*Open Reading Frames*) que codificam para uma endonuclease e uma transcriptase reversa (NEIDHARDT et al., 2000; KUCHEN et al., 2004). Este RTE é

caracterizado por ser silenciado epigeneticamente por meio da metilação e modificações das histonas (HUBER et al., 2007). A hipometilação deste RTE é considerada um indutor dos elementos L1, gerando inúmeras retrotransposições na linhagem evolutiva (HUBER et al., 2007). Em *Omophoita*, a dispersão do cluster histônico, ou parte dele, pode ser associada ao efeito carona destas sequências durante a retrotransposição do RTE L1. Estas retrotransposições podem ter gerado inúmeras cópias e sítios cromossômicos de retropseudogenes H1, ou, parte dos sinais de hibridação visualizados nos cariótipos pode ser resultado do mapeamento do L1. Desta forma, a ocorrência de genes H1 funcionais espalhados em sítios distintos do cluster principal pelos genomas aqui estudados não pode ser descartada. A localização *in situ* da H1 é aqui descrito pela primeira vez em Coleoptera.

Segundo Childs et al. (1981) em relação as histonas, a presença de genes distintos do cluster principal foi associada a elementos transponíveis devido sua possibilidade de saltar nos genomas e, estes genes transpostos estariam livres para divergir em sequências e na temporalidade da expressão. De fato, os TEs representam uma grande porção do genoma eucariótico e são considerados um reservatório dinâmico de sequências responsáveis pela evolução estrutural e funcional de inúmeros genes, agindo na epigenética, no recrutamento de fatores de remodelação da cromatina e na estrutura do cromossomo (APARICIO et al., 2002; VOLFF et al., 2003; BÖHNE et al., 2008).

Estudos sobre a localização cromossômica de histonas H3 e H4 em Insecta mostraram que, em geral, estas sequências apresentam localização cromossômica conservada em organismos relacionados, como observado em Scarabaeinae e Tenebrionidae (CABRAL-de-MELLO et al., 2010, 2011b, c; GOLL et al., 2015), Acrididae (CABRAL-de-MELLO et al., 2011a), Tortricidae (ŠÍCHOVÁ et al., 2013) e Aphididae (MANDRIOLI; MANICARDI, 2013). Estes genes também já foram localizados no cromossomo X do afídeo *Diuraphis noxia* (NOVOTNÁ et al., 2011). A ocorrência de um bivalente autossômico portador da histona H4 representa a condição ancestral putativa para este gene em Hemiptera (BARDELLA et al., 2016). Segundo Cabrero et al. (2009) a conservação da localização cromossômica para os sítios histônicos H3 e H4 é devido a forte seleção purificadora atuando no nível cromossômico.

A análise das sequências dos genes H3 e H4 de *O. octoguttata*, *O. personata*, *O. magniguttis* e *O. sexnotata* não mostrou inserção de TEs, mas tiveram uma intensa dispersão entre os cromossomos, incluindo os sexuais. Esta dispersão cromossômica dos sítios histônicos contrasta fortemente com o padrão observado em outros animais que possuem apenas um *locus* ou, poucos *loci* de histonas (CABRERO et al., 2009; CABRAL-de-MELLO

et al., 2010, 2011a, b, c; MANDRIOLI; MANICARDI, 2013; SÍCHOVÁ et al., 2013; GOLL et al., 2015; BARDELLA et al., 2016). Em adição, a dispersão cromossômica de sequências histônicas foi observada em Acrididae para a H3 (OLIVEIRA et al., 2011; BUENO et al., 2013; PALACIOS-GIMENEZ et al., 2013). Assim como os autores sugeriram ter ocorrido em Acrididae, é possível que a intensa dispersão das histonas em *Omophoita* ocorreu por carona durante as retrotransposições de TEs ou outras famílias gênicas, como H3 e 5S rDNA as quais são sintênicas em algumas espécies de Coleoptera e Orthoptera (CABRAL-de-MELLO et al., 2011c; OLIVEIRA et al., 2011).

Em relação aos sítios U1 e U2 snDNA, a ocorrência de sinais de hibridização localizados em dois ou um único par autossômico parece ser uma característica conservada para a maioria dos insetos, com poucas variações observadas (BUENO et al., 2013). Entretanto, em *O. octoguttata*, *O. personata*, *O. magniguttis* e *O. sexnotata* foi observado alta distribuição das sequências de U1 e U2 snDNA pelo complemento cromossômico. A família gênica dos U snDNAs é descrita por apresentar associação ou invasão com TEs (KOJIMA; FUJIWARA, 2004; KOHANY et al., 2006) e ainda assim manter localização cromossômica em um ou poucos sítios (CROSS; REBORDINOS, 2005; MANCHADO et al., 2006; ÚBEDA-MANZANARO et al., 2010).

O sequenciamento do U1 snDNA de *O. sexnotata* mostrou um segmento interno com similaridade ao *SINEU-1* (*Short Interspaced Nuclear Element U1 snRNA derivated*) descrito por Kojima (2015). Os SINEs são *non-LTR retrotransposons* onde, em sua maioria, tem a região 5' derivada de uma destas três classes de genes: 7SL RNA, tRNA ou 5S rRNA (DEWANNIEUX et al., 2003). Recentemente, Kojima (2015) descreveu três novos tipos de SINEs (*SINEU-1*, *SINEU-2* e *SINEU-3*) derivados do U1 ou U2 snDNA em genomas crocodilianos. O segmento interno do U1 snDNA de *O. sexnotata* apresenta identidade ao *SINEU-1* e, possivelmente, a atividade retrotransponível auxiliou na dispersão destas sequências nos cromossomos de *Omophoita*. Em adição, o U2 snDNA de *O. sexnotata* apresentou um segmento final com identidade ao RTE *DIRS-1d_Lch*. Esse RTE *DIRS-1* consiste em uma sequência de 4,8 kb flanqueada por longas repetições terminais invertidas não idênticas (CAPELLO et al., 1984). Os genes *U2 snRNA* apresentam, na maioria dos casos, segmentos em sua região 3' com identidade a elementos transponíveis, a exemplo do elemento *Tx1*, chamado Keno (KOJIMA; FUJIWARA, 2004; KOHANY et al., 2006) e Utopia (*U TwO snRNA gene Preferentially Inserting-or-Associating element*), os quais são inseridos preferencialmente dentro de um sítio específico do U2 snDNA (KOJIMA; JURKA, 2015). Para *O. sexnotata*, a visualização do elemento RTE *DIRS-1* no segmento 3', similar aos

segmentos Keno e Utopia podem representar uma provável alteração estrutural/funcional da molécula do U2 snDNA.

As sequências de U1 e U2 snDNA podem também se comportar como TEs, dando origem a grandes famílias de pseudogenes (WEINER et al., 1986; MARZ et al., 2008; KOJIMA, 2015). Algumas famílias de pseudogenes são de fato RNAs não codificantes derivados de elementos transponíveis (BERNSTEIN et al., 1985). Entretanto, outros estudos mostraram que cópias parálogas do U1 snDNA possuem a capacidade de dar origem à RNAs funcionalmente distintos, os quais são diferencialmente expressos e apresentam funções teciduais em fases do desenvolvimento específicas (SIERRA-MONTES et al., 2005; KYRIAKOPOULO et al., 2006; MATYLLA-KULINSKA et al., 2014). Os inúmeros U1 e U2 snDNAs de *Omophoita* mapeados *in situ* podem corresponder à retropseudogenes, mas a ocorrência de genes derivados com funções tecido específicas não pode ser descartada.

A localização *in situ* dos genes *U1* e *U2 snRNA* foi descrita para poucas espécies de Insecta. Na maioria dos estudos, essas famílias gênicas ocorrem em um ou poucos sítios nos autossomos (BUENO et al., 2013; PALACIOS-GIMENEZ et al., 2013; ANJOS et al., 2015; BARDELLA et al., 2016), nos cromossomos sexuais (PALACIOS-GIMENEZ et al., 2013) ou ainda em cromossomos B (BUENO et al., 2013). Uma extensa variação no número e posição cromossômica dos genes snDNAs foi visualizada apenas para a família Acrididae (ANJOS et al., 2015). Igualmente, em *Omophoita*, a dispersão dos sítios snDNAs é intensa e, em alguns casos, co-localizados aos genes de histona. A associação, destas famílias gênicas, aliada à sua invasão por elementos transponíveis pode explicar a ampla variação de sítios encontrados nos cromossomos do gênero.

O presente estudo mostra uma ampla dispersão de famílias gênicas de histonas e U snDNAs em espécies de *Omophoita*, as quais apresentam segmentos parciais de elementos transponíveis e, em alguns casos estão co-localizados em sítios cromossômicos. A ampla dispersão destas famílias gênicas provavelmente corresponde à inúmeros eventos de transposições de TEs que invadiram as famílias gênicas. Esses eventos de dispersão podem ter ocorrido também em outros gêneros de Alticinae, uma vez, os DNAs repetitivos terem uma ampla distribuição nos cromossomos das espécies de *Omophoita* (MELLO et al., 2014). Esse grande número de cópias parálogas de histonas e snDNAs podem corresponder à retropseudogenes, mas a provável ocorrência de cópias funcionais com expressão tecido específicas abre uma nova possibilidade de investigação em Coleoptera. Nossos resultados demonstraram que embora as espécies do gênero *Omophoita* apresentem um cariótipo uniforme, variações microestruturais devido a movimentação de elementos transponíveis e

famílias gênicas nos cromossomos atuaram na diversificação cariotípica do grupo.

4.2.5 Agradecimentos

Este estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Secretaria de Ciência e Tecnologia do Estado do Paraná (SETI) e Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná (Fundação Araucária). Os autores são agradecem ao especialista Carlos Campaner pela assistência na identificação das espécies.

4.2.6 Referências

As Referências deste capítulo se encontram em tópico específico no final desta tese.

4.2.7 Figuras

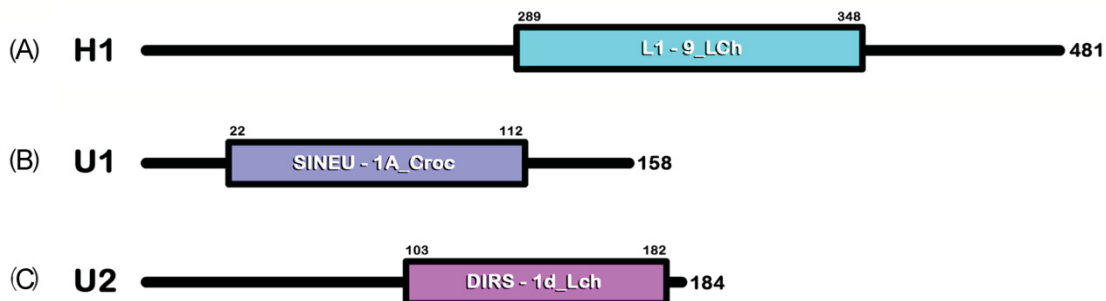


Figura 1- Representação esquemática das sequências parciais do gene da histona H1, U1 snDNA e U2 snDNA em *O. sexnotata*, em destaque, segmento interno com identidade à elemento transponível.

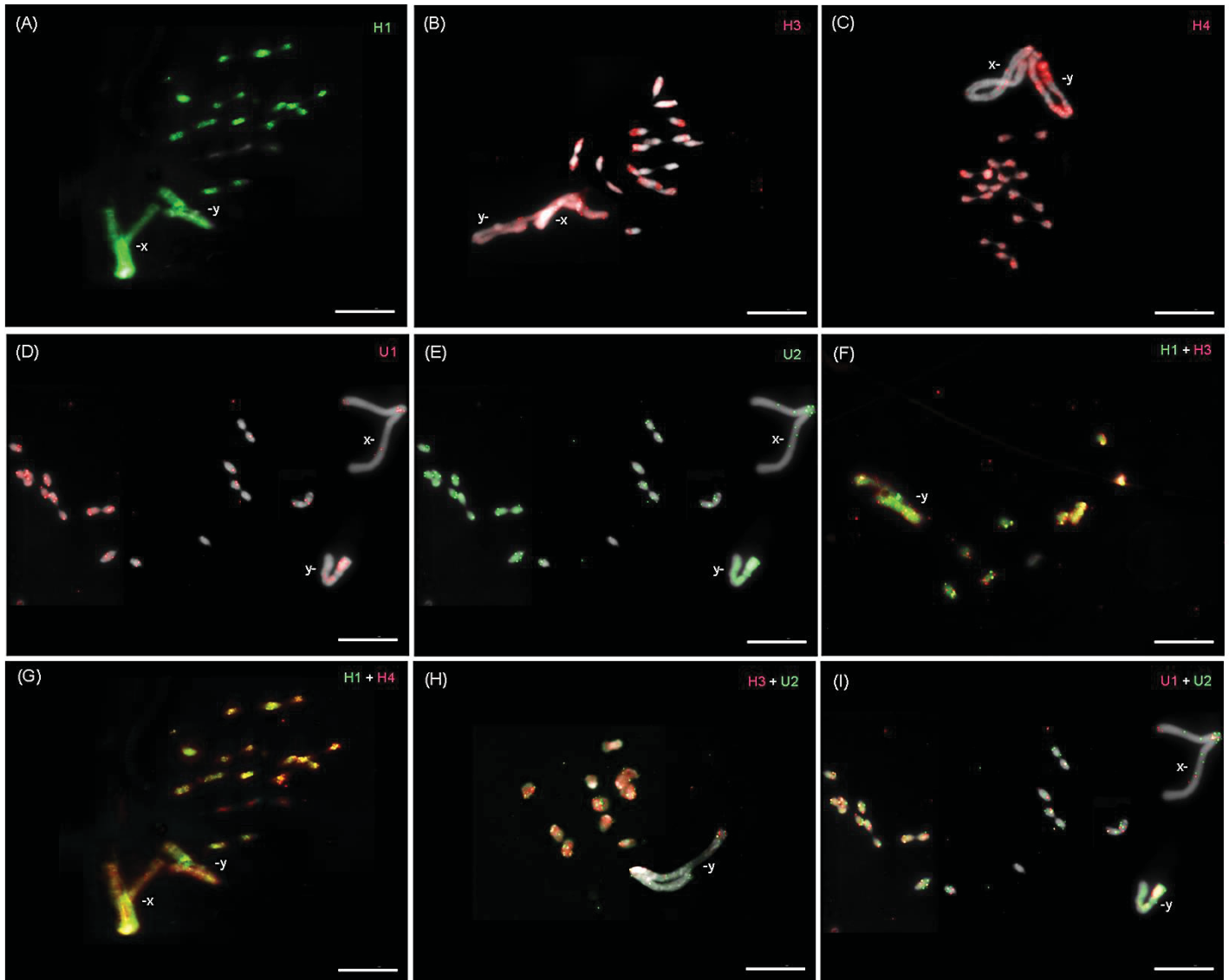


Figura 2- Células meióticas de *O. octoguttata*, com $2n=10II+X+y$, submetidas a FISH (a-e), contracoloradas com DAPI (azul) e hibridadas com as sondas: (a) de histona H1 (verde) (b) de histona H3 (vermelho). (c) de histona H4 (vermelho). (d) de U1 snDNA (vermelho). (e) de U2 snDNA (verde). Dupla FISH (f-i) combinando as sondas: (f) de histonas H1 (verde) e H3 (vermelho). (g) de histonas H1 (verde) e H4 (vermelho). (h) de H3 (vermelho) e U2 (verde). (i) de U1 (vermelho) e U2 (verde) snDNA. Barra = 10 μm .

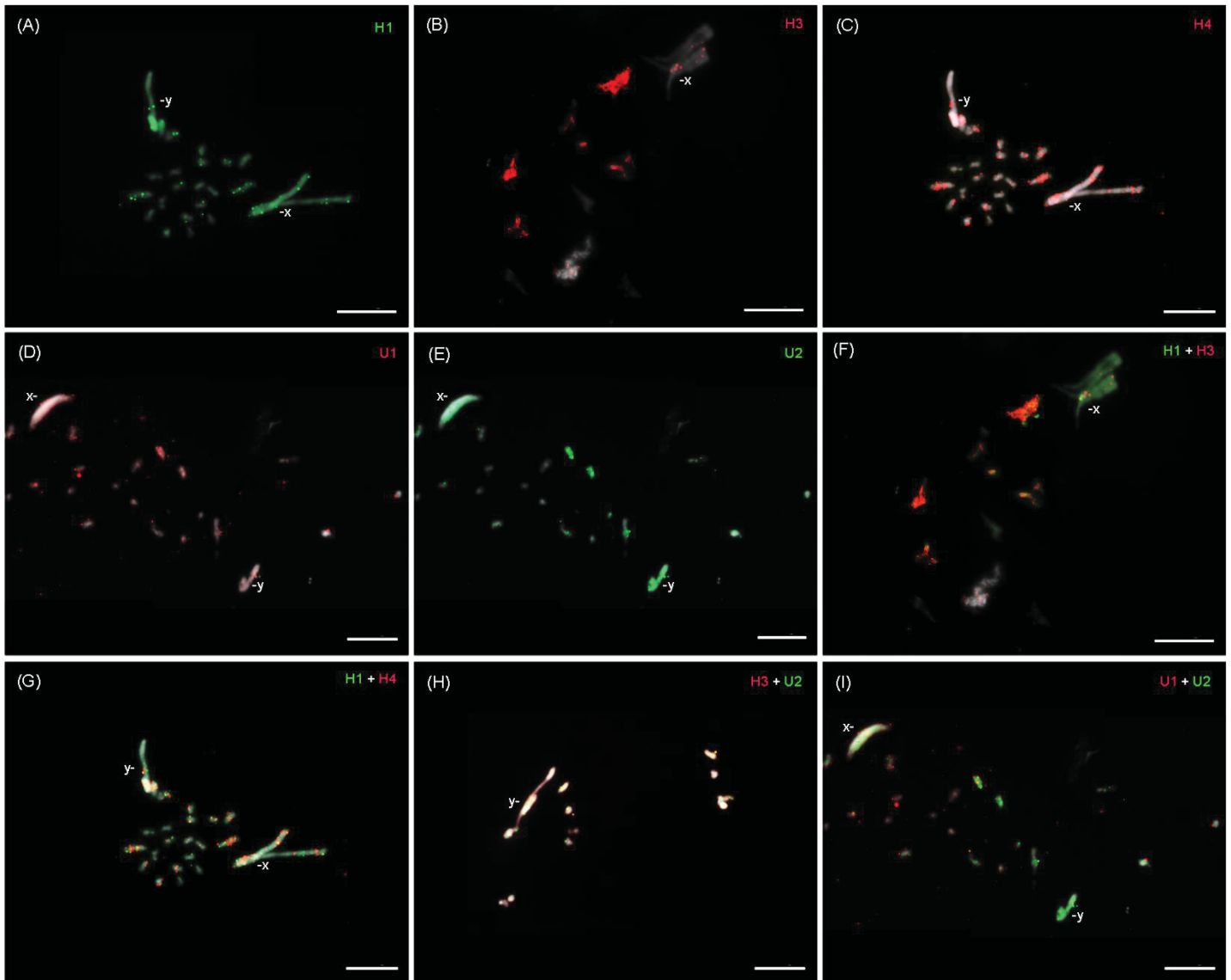


Figura 3- Células espermatogoniais de *O. personata* macho, com $2n=10II+X+y$, submetidas a FISH (a-e), contracoradas com DAPI (azul) e hibridada com as sondas: (a) de histona H1 (verde). (b) de histona H3 (vermelho). (c) de histona H4 (vermelho). (d) de U1 snDNA (vermelho). (e) de U2 snDNA (verde). Dupla FISH (f-i) combinando as sondas: (f) histonas H1 (verde) e H3 (vermelho). (g) histonas H1 (verde) e H4 (vermelho). (h) histona H3 (vermelho) e U2 (verde). (i) de U1 (vermelho) e U2 (verde) snDNA. Barra = 10 μ m.

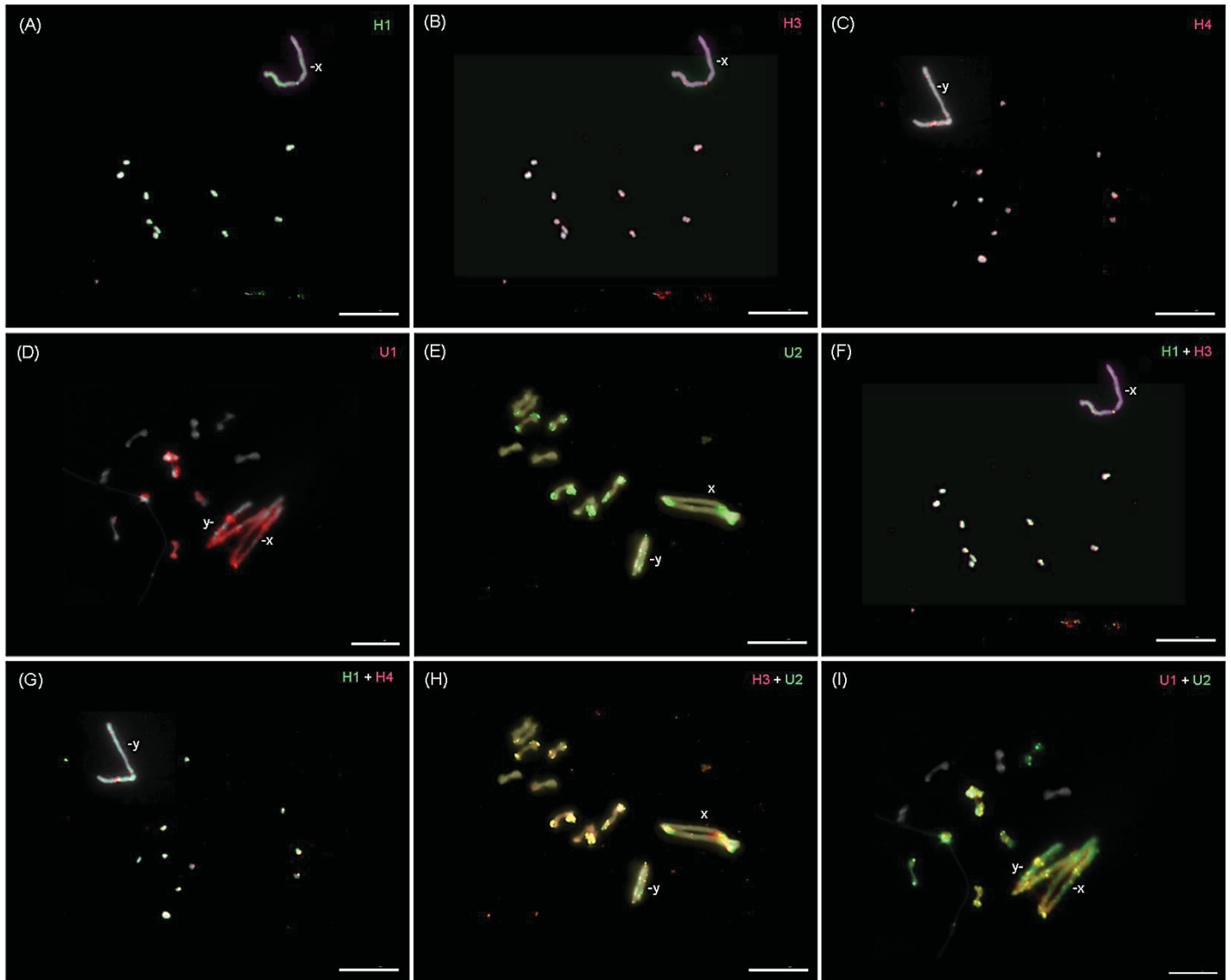


Figura 4- Células meióticas de *O. magneguttis* submetidas a FISH (a-e), contracoradas com DAPI (azul) e hibridada com as sondas: (a) de histona H1 (verde). (b) de histona H3 (vermelho). (c) de histona H4 (vermelho). (d) de U1 snDNA (vermelho). (e) de U2 snDNA (verde). Dupla FISH (f-i) combinando as sondas: (f) das histonas H1 (verde) e H3 (vermelho). (g) das histonas H1 (verde) e H4 (vermelho). (h) da histona H3 (vermelho) e U2 (verde). (i) de U1 (vermelho) e U2 (verde) snDNA. Barra = 10 μ m.

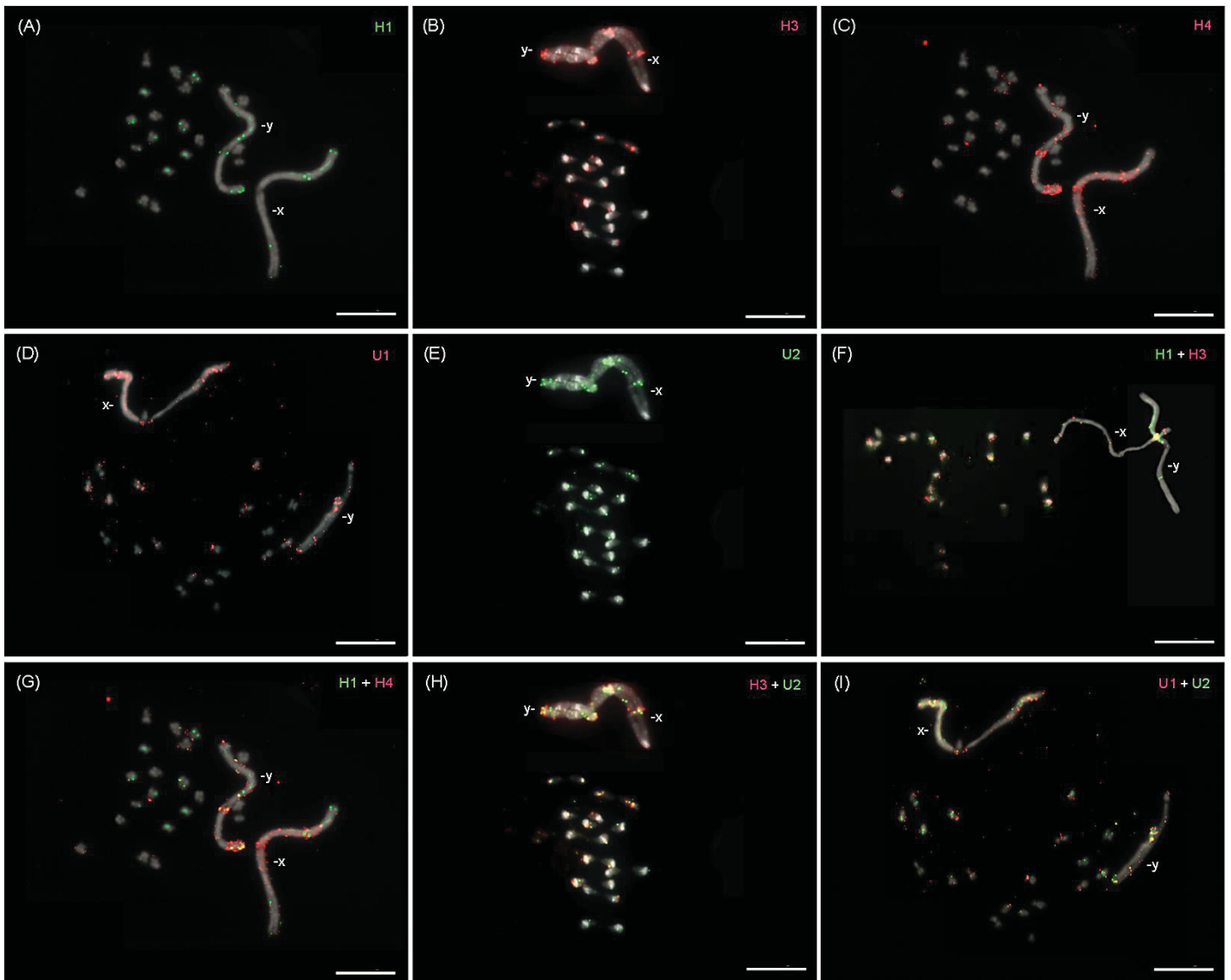
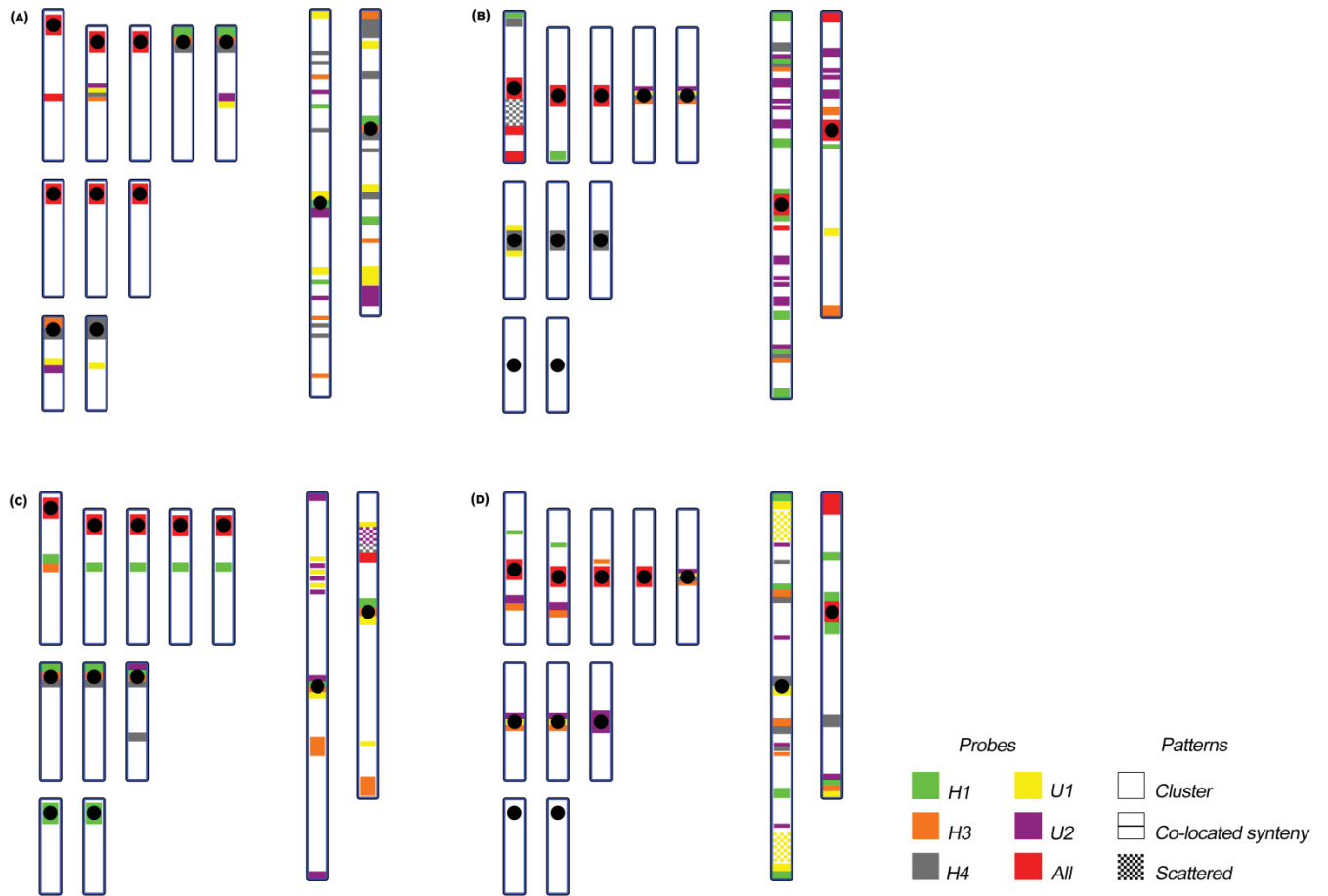


Figura 5- Metáfases espermatogoniais de *O. sexnotata* machos com $2n=10II+X+y$, submetidas a FISH (a-e), contracoradas com DAPI (azul) e hibridada com as sondas: (a) de histona H1 (verde). (b) de histona H3 (vermelho). (c) da histona H4 (vermelho). (d) de U1 snDNA (vermelho). (e) de U2 snDNA (verde). Dupla FISH (f-i) combinando as sondas: (f) das histonas H1 (verde) e H3 (vermelho). (g) das histonas H1 (verde) e H4 (vermelho). (h) da histona H3 (vermelho) e U2 (verde). (i) de U1 (vermelho) e U2 (verde) snDNA. Barra = 10 μ m.

4.2.8 Material suplementar



MS 1- Ideograma mostrando o mapeamento cromossômico do cluster histônico e snDNAs nos cariótipos de todas as espécies de *Omophoita* (a) *O. octoguttata* (b) *O. personata* (c) *O. magniguttis* (d) *O. sexnotata*.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos resultados demonstraram que embora as espécies do gênero *Omophoita* apresentem um cariótipo uniforme, variações microestruturais devido à movimentação de DNAs repetitivos nos cromossomos, atuaram na diversificação e na dinâmica de diferenciação cariotípica do gênero.

Um alto nível de duplicação e dispersão de genes 5S rDNA em *O. sexnotata* foi observado, sendo a homogeneidade *versus* a heterogeneidade de sequências 5S rDNA no genoma, explicada por um modelo misto de dispersão das famílias gênicas nos genomas (*concerted evolution / birth and death*).

Esta é a primeira descrição da localização *in situ* do 5S rDNA em Chrysomelidae e, a verificação de um par autossômico portador da sintenia das famílias gênicas de rDNA em *O. octoguttata* e *O. personata* é a provável condição ancestral da característica no gênero *Omophoita*. Nesta via, a presença de um segundo par com sintenia dos rDNAs em *O. magniguttis* e, a intensa dispersão de sítios 5S rDNA em *O. sexnotata* são características derivadas no grupo. A dispersão desta família gênica pode ter ocorrido com o auxílio de mecanismos como *Double strand breaks* e reparo por recombinação não homóloga, ou também a dispersão mediada por elementos transponíveis uma vez que os cromossomos de *O. sexnotata* apresentaram segmentos similares ao 5S rDNA fusionados a partes de elementos transponíveis.

Uma ampla dispersão de famílias gênicas de histonas e U snDNAs também foi encontrada em espécies de *Omophoita*, as quais em alguns casos estão co-localizados em sítios cromossômicos. As sequências de histona H1 e os U1, U2 snDNAs apresentam segmentos parciais de elementos transponíveis fusionados a elas, este fato é aqui descrito como a provável causa da ampla dispersão, a qual corresponde à inúmeros eventos de transposições de TEs que invadiram estas famílias gênicas.

Em conclusão, a localização *in situ* das famílias gênicas de rDNA, histonas e U snDNAs aqui estudadas nos genomas de quatro espécies de *Omophoita* demonstraram uma dinâmica de diferenciação cariotípica proporcionada pela movimentação dos DNAs repetitivos e esse grande número de cópias parálogas, podem corresponder à retropseudogenes, mas a provável ocorrência de cópias funcionais com expressão tecido específicas abre uma nova possibilidade de investigação em Coleoptera.

REFERÊNCIAS

- 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 standart staining, C-bands, NOR and synaptonemal complex microspreading techniques. **Hereditas** v.133, p. 147-157, 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** v. 29, p. 475-481, 2006.
- ALMEIDA, M. C.; CAMPANER, C.; CELLA, D. M. Cytogenetic of four *Omophoita* species (Coleoptera, Chrysomelidae, Alticinae): A comparative analysis using mitotic and meiotic cells submitted to the standard staining and C-banding technique. **Micron**, v.40, n. 5-6, p. 586-596, 2009.
- ALMEIDA, M. C.; 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** v. 41, p. 729-734, 2010.
- ANJOS, A.; RUIZ-RUANO, F. J.; CAMACHO, J. P. M.; LORETO, V.; CABRERO, J.; de SOUZA, M. J.; CABRAL-de-MELLO, D. C. U1 snDNA clusters in grasshoppers: chromosomal dynamics and genomic organization. **Heredity** v. 114, p. 207-219, 2015.
- APARICIO, S.; CHAPMAN, J.; STUPKA, E.; PUTNAM, N.; CHIA, J. M.; DEHAL, P.; CHRISTOFFELS, A.; RASH, S.; HOON, S.; SMIT, A. et al. Whole-genome shotgun assembly and analysis of the genome of *Fugu rubripes*. **Science** v. 297, p.1301-1310, 2002.
- 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** v. 50, p. 907-926, 2007.
- BARDELLA, V. B.; FERNANDES, J. A. M.; CABRAL-de-MELLO, D. C. Chromosomal evolutionary dynamics of four multigene families in Coreidae and Pentatomidae (Heteroptera) true bugs. **Mol Genet Genomics** v. 291, p. 1919–1925, 2016.
- BARDELLA, V. B.; CABRAL-de-MELLO, D. C. Uncovering the molecular organization of unusual highly scattered 5S rDNA: The case of *Chariesterus armatus* (Heteroptera). **Gene** v. 646, p. 153-158, 2018.
- BARROS, A. V.; SCZEPANSKI, T. S.; CABRERO, J.; CAMACHO, J. P. M.; VICARI, M. R.; ARTONI, R. F. Fiber FISH reveals different patterns of high-resolution physical mapping for repetitive DNA in fish. **Aquaculture** v. 322, p. 47-50, 2011.
- 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** v. 608, p. 20-27, 2017.
- BARZOTTI, R.; PELLICCIA, F.; ROCCHI, A. Identification and characterization of the *U1 small nuclear RNA genes* from two crustacean isopod species. **Chromosome Res.** v. 11, p.

365-373, 2003.

BELLAVIA, D.; DIMARCO, E.; NASELLI, F.; CARADONNA, F. DNA-methylation dependent regulation of embryo-specific 5S ribosomal DNA cluster transcription in adult tissues of sea urchin *Paracentrotus lividus*. **Genomics** v. 102, n. 4, p. 397-402, 2013.

BELLAVIA, D.; DIMARCO, E.; CARADONNA, F. Characterization of three different clusters of 18S-26S ribosomal DNA genes in the sea urchin *P. lividus*: Genetic and epigenetic regulation synchronous to 5S rDNA. **Gene** v. 580, n. 2, p. 118-124, 2016.

BENNETZEN, J. The rice genome. Opening the door to comparative plant biology. **Science** v. 296, p. 60-63, 2002.

BERNSTEIN, L. B.; MANSER, T.; WEINER, A. M. Human *U1 small nuclear RNA genes*: extensive conservation of flanking sequences suggests cycles of gene amplification and transposition. **Mol Cell Biol** v. 5, p. 2159-2171, 1985.

BIONE, E.; CAMPAROTO, M. L.; SIMÕES, Z. L. P. A study of the constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions of *Isocopris inhiata* and *Diabrostis mimas* (Coleoptera: Scarabaeidae, Scarabaeinae) using C-banding, AgNO₃ staining and FISH techniques. **Genet Mol Biol** v. 28, p. 111-116, 2005.

BÖHNE, A.; BRUNET, F.; GALIANA-ARNOUX, D.; SCHULTHEIS, C.; VOLFF, J. N. Transposable elements as drivers of genomic and biological diversity in vertebrates. **Chromosome Res** v. 16, p. 203-215, 2008.

BORROR, D. J.; DELONG, D. M. **Introduction to the Study of Insects**. 7. ed. Thomson Brooks/ Cole, p. 864, 2005.

BRAASTAD, C. D.; HOVHANNISYAN, H.; VAN WIJNEN, A. J.; STEIN, J. L.; STEIN, G. S. Functional characterization of a human histone gene cluster duplication. **Gene** v. 342, p. 35-40, 2004.

BROWN, D. D.; WENSINK, P. C.; JORDAN, E. A comparison of the ribosomal DNA's of *Xenopus laevis* and *Xenopus mulleri*: the evolution of tandem genes. **J Mol Biol**. v. 63, n.1, p. 57-73, 1972.

BUENO, D.; PALACIOS-GIMENEZ, O. M.; CABRAL-de-MELLO, D. C. Chromosomal mapping of repetitive DNAs in *Abracris flavolineata* reveal possible ancestry for the B chromosome and surprisingly H3 histone spreading. **PLoS ONE** v. 8, n. 6, p. e66532, 2013.

BUENO, D.; PALACIOS-GIMENEZ, O. M.; MARTÍ, D. A.; MARIGUELA, T. C.; CABRAL-de-MELLO, D. C. The 5S rDNA in two *Abracris* grasshoppers (Ommatolampidinae: Acrididae): molecular and chromosomal organization. **Mol Genet Genomics** (Print) v. 291, n. 4, p. 1607-1613, 2016.

CABRAL-DE-MELLO, D. C.; OLIVEIRA, S. G.; RAMOS, I. C.; MOURA, R. D. C. Karyotype differentiation patterns in species of the subfamily Scarabaeinae (Scarabaeidae, Coleoptera). **Micron**, v. 39, n. 8, p. 1243-1250, 2008.

CABRAL-de-MELLO, D. C. ; MOURA, R. C. ; MARTINS, C. Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the beetle *Dichotomius geminatus* provides the first evidence for an

association of 5S rRNA and histone H3 genes in insects, and repetitive DNA similarity between the B chromosome and A complement. **Heredity** v. 104, p. 393-400, 2010.

CABRAL-de-MELLO, D. C.; CABRERO, J.; LOPEZ-LEON, M. D.; CAMACHO, J. P. M. Evolutionary dynamics of 5S rDNA location in acridid grasshoppers and its relationship with H3 histone gene and 45S rDNA location. **Genetica** v.139, p. 921-931, 2011a.

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 Genome Res** v. 134, p. 127-135, 2011b.

CABRAL-de-MELLO, D. C.; OLIVEIRA, S. G.; MOURA, R. C.; MARTINS, C. Chromosomal organization of the 18S and 5S rRNAs and histone H3 genes in Scarabaeinae coleopterans: insights into the evolutionary dynamics of multigene families and heterochromatin. **BMC Genetics** v. 12, p. 88, 2011c.

CABRAL-de-MELLO, D. C.; VALENTE, G. T.; NAKAJIMA, R. T.; MARTINS, C. Genomic organization and comparative chromosome mapping of the *U1 snRNA* gene in cichlid fish, with an emphasis in *Oreochromis niloticus*. **Chromosome Res.** v. 20, p. 279-292, 2012.

CABRERO, J.; CAMACHO, J. P. M. Location and expression of ribosomal RNA genes in grasshoppers: Abundance of silent and cryptic loci. **Chromosome Res** v. 16, n.4, p. 595-607, 2008.

CABRERO, J.; LÓPEZ-LEÓN, M. D.; TERUEL, M.; CAMACHO, J. P. M. Chromosome mapping of H3 and H4 histone gene clusters in 35 species of acridid grasshoppers. **Chromosome Res.** v. 17, n. 3, p. 397-404, 2009.

CAPPELLO, J.; COHEN, S. M.; LODISH, H. F. *Dictyostelium* transposable element *DIRS-I* preferentially inserts into *DIRS-I* sequences. **Mol. Cell. Biol.** v. 4, n. 10, p. 2207-2213, 1984.

CAZAUX, B.; CATALAN, J.; VEYRUNES, F.; DOUZERY, E. J.; BRITTON-DAVIDIAN, J. Are ribosomal DNA clusters rearrangement hotspots? A case study in the genus *Mus* (Rodentia, Muridae). **BMC Evol. Biol.** v. 11, n. 1, p. 124, 2011.

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

CHEN, J. M.; COOPER, D. N.; FEREC, C.; KEHRER-SAWATZKI, H.; PATRINOS, G. P. Genomic rearrangements in inherited disease and cancer. *Semin. Cancer Biol.* v. 20, p. 222-233, 2010.

CHEN, M. W.; ANNE, J.; VOLCKAERT, G.; HUYSMANS, E.; VANDENBERGHE, A.; DE WACHTER, R. The nucleotide sequences of the 5 S rRNAs of seven molds and a yeast and their use in studying ascomycete phylogeny. **Nucleic Acids. Res.** v. 12, p. 4881-4892, 1984.

CHEN, Z. Q.; LIN, C. C.; HODGETTS, R. B. Cloning and characterization of a tandemly repeated DNA sequence in the crane family (Gruidae). **Genome** v. 32, p. 646-654, 1989.

CHILDS, G.; MAXSON, R.; COHN, R. H.; KEDES, L. Orphans: dispersed genetic elements derived from tandem repetitive genes of eucaryotes. **Cell** v. 23, p. 651-663, 1981.

CHIODA, M.; ESKELAND, R.; THOMPSON, E. M. Histone gene complement, variant expression, and mRNA processing in a urochordate *Oikopleura dioica* that undergoes extensive polyploidization. **Mol Biol Evol** v. 19, p. 2247-2260, 2002.

CIGANDA, M.; WILLIAMS, N. Eukaryotic 5S rRNA biogenesis. Wiley Interdiscip. **Rev. RNA** v. 2, p. 523-533, 2011.

CLOIX, C.; TUTOIS, S.; MATHIEU, O.; CUVILLIER, C.; ESPAGNOL, M.C.; PICARD, G.; TOURMENTE, S. Analysis of 5S rDNA arrays in *Arabidopsis thaliana*: physical mapping and chromosome-specific polymorphisms. **Genome Res** v. 10, p. 679-690, 2000.

CLOIX, C.; TUTOIS, S.; YUKAWA, Y.; MATHIEU, O.; CUVILLIER, C.; ESPAGNOL, M. C.; TOURMENTE, S. Analysis of the 5S RNA pool in *Arabidopsis thaliana*: RNAs are heterogeneous and only two of the genomic 5S loci produce mature 5S RNA. **Genome Res.** v. 12, p. 132-144, 2002.

COATES, B. S.; SUMERFORD, D. V.; HELLMICH, I. I. R. L.; LEWIS, L. C. Repetitive genomic elements in a european corn borer, *Ostrinia nubilalis*, bacterial artificial chromosome library were indicated by bacterial artificial chromosome end sequencing and development of sequence tag site markers: Implications for Lepidopteran genomic research. **Genome** v. 52, p. 57-67, 2009.

COSTA, C. Estado de Conocimiento de lo Coleoptera Neotropicales. **Pribes**, Zaragoza, v. 1, p. 99-114, 2000.

COSTA, C. Estado de conocimiento de los Coleoptera neotropicales. **Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa (Versión Eletronica)** 32. 2003. Disponível em: < <http://www.sea-entomologia.org/aracnet/11/01/index.htm> > acessado em: jan 2018.

CROSS, I.; REBORDINOS, L. 5S rDNA and *U2 snRNA* are linked in the genome of *Crassostrea angulata* and *Crassostrea gigas* oysters: does the (CT)_n·(GA)_n microsatellite stabilize this novel linkage of large tandem arrays? **Genome** v. 48, n. 6, p. 1116-1119, 2005.

CSINK, A. K.; HENIKOFF, S. Something from nothing: the evolution and utility of satellite repeats. **Trends Genet** v. 14, p. 200-204, 1998.

da SILVA, M.; MATOSO, D. A.; VICARI, M. R.; ALMEIDA, M. C.; MARGARIDO, V. P.; ARTONI, R. F. Physical mapping of 5S in two species of knifefishes: *Gymnotus pantanal* and *Gymnotus paraguensis* (Gymnotiformes). **Cytogenet Genome Res.** v. 34, p. 303-307, 2011.

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** v. 34, p. 95-101, 1996.

DEL-CLARO, K. **Comportamento Animal - Uma introdução à ecologia comportamental**. Jundiaí SP: Distribuidora / Editora - Livraria Conceito, 2004.

DERNBURG, A. F.; SEDAT, J. W.; CANDE, W. Z.; BASS, H. W. Cytology of telomeres. **Cold Spring Harbor M** v. 29, p. 295-338, 1995.

DEWANNIEUX, M.; ESNault, C.; HEIDMANN, T. LINE-mediated retrotransposition of marked *Alu* sequences. **Nat Genet** v. 35, p. 41-48, 2003.

DOENECKE, D.; ALBIG, W.; BODE, C.; DRABENT, B.; FRANKE, K.; GAVENIS, K.; WITT, O. Histones: genetic diversity and tissue-specific gene expression. **Histochem Cell Biol** v. 107, n. 1, p. 1-10, 1997.

DOUET, J.; TOURMENTE, S. Transcription of the 5S rRNA heterochromatic genes is epigenetically controlled in *Arabidopsis thaliana* and *Xenopus laevis*. **Heredity** v. 99, p. 5-13, 2007.

DUTRILLAUX, A. M.; DUTRILLAUX, B. Sex chromosome rearrangements in Polyphaga beetles. **Sexual Development**, v.3, p.43-54, 2009.

ELDER, Jr. J. F.; TURNER, B. J. Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes. **Q. Rev. Biol.** v. 70, n. 3, p. 297-320, 1995.

ENGEL, J. D.; DODGSON, J. B. Histone genes are clustered but not tandemly repeated in the chicken genome. **P Natl Acad Sci USA** v. 78, p. 2856-2860, 1981.

FARRELL, B. D. "In ordinate fondness" explained: why are there so many beetles? **Science** v. 281, p. 555-559, 1998.

FERREIRA, A.; CELLA, D.; TARDIVO, J.R.; VIRKKI, N. Two pairs of chromosomes: A new low record for Coleoptera. **Revista Brasileira de Genética**, v.7, p.231-39, 1984.

FESCHOTTE, C.; ZHANG, X.; WESSLER, S. R. Miniature inverted repeat transposable elements and their relationships to established DNA transposons. In: CRAIG NL, CRAIGIE R, GELLERT M, LAMBOWITZ AM (eds) **Mobile DNA II**. ASM Press, Washington, D.C., pp 1147-1157, 2002.

FESCHOTTE, C. M. New superfamily of DNA transposons identified in diverse animal genomes and related to bacterial IS1016 insertion sequences. **Molecular Biology and Evolution** v. 21, n. 9, p. 1769-1780, 2004.

FESCHOTTE, C. Transposable elements and the evolution of regulatory networks. **Nature Rev. Genet.** v. 9, n. 5, p. 397, 2008.

FORD, P. J.; SOUTHERN, E. M. Different sequences for 5S RNA in kidney cells and ovaries of *Xenopus laevis*. **Nature New Biol.** v. 241, n. 105, p. 7, 1973.

FREIRE, R.; ARIAS, A.; ÍNSUA, A. M.; MÉNDEZ, J.; EIRÍN-LÓPEZ, J. M. Evolutionary dynamics of the 5s rDNA gene family in the *Mussel mytilus*: mixed effects of birth-and-death and concerted evolution. **J Mol Evol** v. 70, n. 5, p. 413-426, 2010.

FUJIWARA, A.; FUJIWARA, M.; NISHIDA-UMEHARA, C.; ABE, S.; MASAOKA, T. Characterization of Japanese flounder karyotype by chromosome bandings and fluorescence in situ hybridization with DNA markers. **Genetica** v. 131, n. 3, p. 267-274, 2007.

GALIÁN, J.; LAWRENCE, J. F. First karyotypic data on a cupedid beetle (Coleoptera: Archostemata) showing achiasmatic meiosis. **Entomological news (USA)**, 1993.

GALIÁN, J.; SERRANO, J.; DE LA RÚA, P.; PETITPIERRE, E.; JUAN, C. Localization and activity of rDNA genes in tiger beetles (Coleoptera: Cicindelidae). **Heredity** v. 74, p. 524-530, 1995.

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

GE, D.; GÓMEZ-ZURITA, J.; CHESTERS, D.; YANG, X.; VOGLER, A. P. Suprageneric systematics of flea beetles (Chrysomelidae: Alticinae) inferred from multilocus sequence data. **Mol. Phylogenet. Evol.** v. 62, p. 793-805, 2012.

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** v. 650, p. 49-50, 2018.

GOGOLEVSKY, K. P.; VASSETZKY, N. S.; KRAMEROV, D. A. 5S rRNA-derived and tRNA-derived SINES in fruit bats. **Genomics** v. 93, p. 494-500, 2009.

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 Xyp sex chromosomes. **Cytogenet Genome Res.** v. 139, n. 1, p. 29-35, 2013.

GOLL, L. G.; MATIELLO, R. R.; ARTONI, R. F.; VICARI, M. R.; NOGAROTO, V.; BARROS, A. V.; ALMEIDA, M. C. High-resolution physical chromosome mapping of multigene families in *Lagria villosa* (Tenebrionidae): Occurrence of interspersed ribosomal genes in coleoptera. **Cytogenet Genome Res** (Printed ed.) v. 146, p. 64-70, 2015.

GÓMEZ-ZURITA, J.; PONS, J.; PETITPIERRE, E. The evolutionary origin of a novel karyotype in *Timarcha* (Coleoptera, Chrysomelidae) and general trends of chromosome evolution in the genus. **J. Zoo. Systematic. Evol. Res.** v.42, p.332-341, 2004.

GÓMEZ-ZURITA, J.; HUNT, T.; KOPLIKU, F.; VOGLER, A. P. Recalibrated tree of leaf beetles (Chrysomelidae) indicates independent diversification of angiosperms and their insect herbivores. **PLoS ONE** v. 2, p. e360, 2008.

GREEN, M. R. Pre-mRNA processing and mRNA nuclear export. **Curr Opin Cell Biol** v. 1, p. 519-525, 1989.

GREGORY, T. R. Genome size evolution in animals. In Gregory, T.R. (Ed.). **The evolution of the genome**. Elsevier p. 3-87, 2005.

GRIMALDI, D.; ENGEL, M. S. Evolution of the insects. New York: **Cambridge University Press** p. 755, 2006.

GULLAN, P.J.; CRANSTON P. The insects. An outline of entomology, 4ed., **Wiley**, p. 4 2010.

HANSEN, M. Phylogeny and classification of the staphyliniform beetles families (Coleoptera). **Biologiske Skrifter**, DetKongelige Danske Videnskabernes Selskab, v. 48, p. 1-339, 1997.

HATANAKA, T.; GALETTI, Jr., P. M. Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). **Genetica** v. 122, p. 239-244, 2004.

HEINTZ, N.; ZERNIK, M.; ROEDER, R. G. The structure of the human histone genes: clustered but not tandemly repeated. **Cell** v. 24, p. 661-668, 1981.

HOOD, L.; CAMPBELL, J. H.; ELGIN, S. C. The organization, expression, and evolution of antibody genes and other multigene families. **Annu Rev Genet.** v. 9, p. 305-53, 1975.

HUBER, L. C.; BROCK, M.; HEMMATAZAD, H.; GIGER, O. T.; MORITZ, F.; TRENMANN, M.; et. al. Histone deacetylase/acetylase activity in total synovial tissue derived from *rheumatoid arthritis* and *osteoarthritis patients*. **Arthritis Rheum** v. 56, p. 1087-93, 2007.

INGRAM, V. M. Gene evolution and the haemoglobins. **Nature** v. 189, p. 704-8, 1961.

JEFFREYS, A. J.; WILSON, V.; THEIN, S. L. Hypervariable minisatellite regions in human DNA. **Nature** v. 314, p. 67-74, 1985.

JOHN, B.; SHAW, D. D. Karyotype variation in dermestid beetles. **Chromosoma**, v.20, p.371-85, 1967.

JUAN, C.; PONS, J.; PETITPIERRE, E. Localization of tandemly repeated DNA sequences in beetle chromosomes by fluorescent *in situ* hybridization. **Chromosome Res** v. 1, p. 167-174, 1993a.

JUAN, C.; VAZQUEZ, P.; RUBIO, J. M.; PETITPIERRE, E.; HEWITT, G. M. Presence of highly repetitive DNA sequences in *Tribolium* flour-beetles. **Heredity** v. 70, p. 1-8, 1993b.

KAPITONOV, V. V.; JURKA, J. A novel class of SINE elements derived from 5S rRNA. **Mol Biol Evol.** v. 20, p. 694-702, 2003.

KARAGYAN, G. A.; KUZNETSOVA, V. G. Chromosome number and sex chromosome system in buprestid beetles (Coleoptera, Buprestidae). **Entom Review** v. 80, p. 96-106, 2000.

KARAGYAN, G.; KUZNETSOVA, V. G.; LACHOWSKA, D. New cytogenetic data on Armanian buprestids (Coleoptera, Buprestidae) with a discussion of karyotype variation within the family. **Fol Biol (Kraków)** v. 52, p. 151-158, 2004.

KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONES-HAVAS, S.; CHEUNG, M.; STURROCK, S.; BUXTON, S.; COOPER, A.; MARKOWITZ, S.; DURAN, C.; THIERER, T.; ASHTON, B.; MENTJES, P.; DRUMMOND, A. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics** v. 28, n.12, p. 1647-1649, 2012.

KELLIS, M.; PATTERSON, N.; ENDRIZZI, M.; BIRREN, B.; LANDER, E. S. Sequencing and comparison of yeast species to identify genes and regulatory elements. **Nature** v. 423, p. 241-254, 2003.

KELLIS, M.; BIRREN, B. W.; LANDER, E. S. Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Nature** v. 428, p. 617-624, 2004.

KERGOAT, G. J.; LERU, B. P.; GENSON, G.; CRUAUD, C.; COULOUX, A.; DELOBEL, A. Phylogenetics, species boundaries, and timing of resource tracking in a highly specialized group of seed beetles (Coleoptera: Chrysomelidae, Bruchinae). **Mol. Phylogenet. Evol.** v. 59,

p. 746-760, 2011.

KIDWELL, M.G.; LISCH, D. Transposable elements as sources of variation in animals and plants. **P. Natl. Acad. Sci. USA** v. 94, p. 7704-7711, 1997.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **J Mol Evol** v. 16, p. 111-120, 1980.

KOHANY, O.; GENTLES, A. J.; HANKUS, L.; JURKA, J. Annotation, submission and screening of repetitive elements in Repbase: repbase Submitter and Censor. **BMC Bioinformatics** v. 7, p. 474, 2006.

KOJIMA, K. K.; FUJIWARA, H. Crossgenome screening of novel sequence- specific non-LTR retrotransposons: various multicopy RNA genes and microsatellites are selected as targets. **Mol. Biol. Evol.** v. 21, p. 207-217, 2004.

KOJIMA, K. K. A new class of SINEs with snRNA gene-derived heads. **Genome Biol Evol** v. 7, n. 6, p. 1702-1712, 2015.

KOJIMA, K. K.; JURKA, J. Ancient origin of the *U2 small nuclear RNA* gene-targeting non LTR retrotransposons *Utopia*. **PLoS ONE** v. 10, n. 11, p. e0140084, 2015.

KUCHEN, S.; SEEMAYER, C. A.; RETHAGE, J.; VON KNOCH, R.; KUENZLER, P.; BEAT, A. M.; et. al. The L1 retroelement-related p40 protein induces p38 δ MAP kinase. **Autoimmunity** v. 37, p. 57-65, 2004.

KYRIAKOPOULOU, C.; LARSSON, P.; LIU, L.; SCHUSTER, J.; SODERBOM, F.; KIRSEBOM, L. A.; VIRTANEN, A. *U1-like snRNAs* lacking complementarity to canonical 5' splice sites. **RNA** v. 12, p. 1603-1611, 2006.

LESPINET, O.; WOLF, Y. I.; KOONIN, E. V.; ARAVIND, L. The role of lineage-specific gene family expansion in the evolution of eukaryotes. **Genome Res.** v. 12, n. 17, p. 1048-1059, 2002.

LEVINSON, G.; GUTMAN, G. A. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. **Mol. Biol. Evol.** v. 4, p. 203-221, 1987.

LIFTON, R. P.; GOLDBERG, M. L.; KARP, R. W.; HOGNESS, D. S.; The organization of the histone genes in *Drosophila melanogaster*: Functional and evolutionary implications. **Cold. Spring. Harb. SYM** v. 42, p. 1047-1051, 1977.

LINZMEIER, A. M.; RIBEIRO-COSTA, C. S.; MARINONI, R. C. Fauna de Alticini (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. [online]** v.50, n.1, p. 101-109, 2006.

LIU, T.; SONG, M.; XIA, Y.; ZENG, X. A. A tandemly arranged pattern of two 5S rDNA arrays in *Amolops mantzorum* (Anura, Ranidae). **Cytogenet. Genome. Res.** v. 151, n. 3, p. 161-170, 2017.

LONG, E. O.; DAWID, I. B. Repeated genes in eukaryotes. **Annu. Rev. Biochem.** v. 49, p. 727-764, 1980.

LONGO, M. S.; BROWN, J. D.; ZHANG, C.; O'NEILL, M. J.; O'NEILL, R. J. Identification of a recently active mammalian SINE derived from ribosomal RNA. **Genome Biol. Evol.** v. 7, n. 3, p. 775-788, 2015.

LÓPEZ-GIRÁLDEZ, F.; ANDRÉS, O.; DOMINGO-ROURA, X.; BOSCH, M. Analyses of carnivore microsatellites and their intimate association with tRNA-derived SINEs. **BMC genomics** v. 7, n. 1, p. 269, 2006.

LORITE, P.; PALOMEQUE, T.; GARNERÍ, I.; PETITPIERRE, E. Characterization and chromosome location of satellite DNA in the leaf beetle *Chrysolina americana* (Coleoptera, Chrysomelidae). **Genetica** v. 110, p. 143-150, 2000.

LORITE, P.; CARRILLO, J. A.; GARNERÍ, 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.** v. 98, p. 302-307, 2002.

LUND, E.; BOSTOCK, C.; ROBERTSON, M.; CHRISTIE, S.; MITCHEN, J. L.; DAHLBERG, J. E. *U1 small nuclear RNA genes* are located on human chromosome 1 and are expressed in mouse-human hybrid cells. **Mol. Cell. Biol.** v. 3, p. 2211-2220, 1983.

LYNCH, M. Gene duplication and evolution. **Science** v. 297, n. 5583, p. 945-947, 2002.

MANCHADO, M.; ZUASTI, E.; CROSS, I.; MERLO, A.; INFANTE, C.; REBORDINOS, L. Molecular characterization and chromosomal mapping of the 5S rRNA gene in *Solea senegalensis*: a new linkage to the *U1*, *U2*, and *U5 small nuclear RNA* genes. **Genome** v. 49, p. 79-86, 2006.

MANDRIOLI, M.; MANICARDI, G. C. Chromosomal mapping reveals a dynamic organization of the histone genes in aphids (Hemiptera: Aphididae). **Entomología** v. 1, p. e2,1-9, 2013.

MARTÍNEZ-NAVARRO, E. M.; SERRANO, J.; GALIÁN, J. Chromosome evolution in ground beetles: localization of the rDNA loci in the tribe Harpalini (Coleoptera, Carabidae) **J. Zool. Syst. Evol. Res.** v. 42, p. 38-43, 2004

MARTINS, C.; GALETTI, Jr. P. M. Two 5S rDNA arrays in Neotropical fish species: is it a general rule for fishes? **Genetica** v. 111, p. 439-446, 2001.

MARTINS, C. **Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome.** In: Pisano, E.; Ozouf-Costaz, C.; Foresti, F.; Kapoor, B.G. (eds). Fish Cytogenetics. Science Publisher, Inc., USA, 2007.

MARZ, M.; KIRSTEN, T.; STADLER, P. F. Evolution of spliceosomal snRNA genes in metazoan animals. **J. Mol. Evol.** v. 7, p. 594-607, 2008.

MATHIEU, O.; JASENCAKOVA, Z.; VAILLANT, I.; GENDREL, A. V.; COLOT, V.; SCHUBERT, I.; TOURMENTE, S. Changes in 5S rDNA chromatin organization and transcription during heterochromatin establishment in *Arabidopsis*. **Plant Cell.** v. 15, p. 2929-2939, 2003.

MATYLLA-KULINSKA, K.; TAFER, H.; WEISS, A.; SCHROEDER, R. Functional repeat-

derived RNAs often originate from retrotransposon-propagated ncRNAs. **WIREs RNA** v. 5, p. 591-600, 2014.

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). **Ital. J. Zool.** v. 81, p. 16-24, 2014.

MENEZES-de-CARVALHO, N. Z.; PALACIOS-GIMENEZ, O. M.; MILANI, D.; CABRAL-de-MELLO, D. C. High similarity of U2 snDNA sequence between A and B chromosomes in the grasshopper *Abracris flavolineata*. **Mol. Genet. Genomics** v. 290, p. 1787-1792, 2015.

MERLO, M. A.; CROSS, I.; PALAZÓN, J. L.; ÚBEDA-MANZANARO, M.; SARASQUETE, C.; REBORDINOS, L. Evidence for 5S rDNA horizontal transfer in the toadfish *Halobatrachus didactylus* (Schneider, 1801) based on the analysis of three multigene families. **BMC. Evol. Biol.** v. 12, p. 201, 2012.

MERLO, M. A.; CROSS, I.; MANCHADO, M.; CÁRDENAS, S.; REBORDINOS, L. The 5S rDNA high dynamism in *Diplodus sargus* is a transposon-mediated mechanism. Comparison with other multigene families and Sparidae species. **J. Mol. Evol.** v. 76, n. 3, p. 83-97, 2013.

MESA, A.; FONTANETTI, C. S. The chromosomes of a primitive species of beetle: *Ytu Zeus* (Coleoptera, Mysophaga, Torridincolidae). **Proc. Acad. Nat. Sic. Philadelphia** v. 137, p. 102-105, 1985.

MEŠTROVIĆ, N.; MRVINAC, B.; PAVLEK, M.; VOJVODA-ZELJKO, T.; ŠATOVIĆ, E.; PLOHL, M. Structural and functional liaisons between transposable elements and satellite DNAs. **Chromosome Res.** v. 23, n. 3, p. 583-596, 2015.

MOORE, J. **Uma introdução aos invertebrados**. Ed. Santos, São Paulo. 2003.

MOURA, R. C.; SOUZA, M. J.; MELO, N. F.; LIRA-NETO, A. C. Karyotypic characterization of representatives from Melolonthinae (Coleoptera, Scarabaeidae): Karyotypic analysis, banding and fluorescent *in situ* hybridization (FISH). **Hereditas** v. 138, p. 200-206, 2003.

MRVINAC, B.; PLOHL, M. Satellite DNA junctions identify the potential origin of new repetitive elements in the beetle *Tribolium madens*. **Gene** v. 394, p. 45-52, 2007.

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

NADEIN, K. S. Catalogue of Alticini genera of the world (Coleoptera: Chrysomelidae). **Beetles and Coleopterists website**. Zoological Institute, Saint-Petersburg, 2013. Disponível em: <<https://www.zin.ru/animalia/coleoptera/eng/alticini.htm>>. Acessado em: jan 2018.

NAGODA, N.; FUKUDA, A.; NAKASHIMA, Y.; MATSUO, Y. Molecular characterization and evolution of the repeating units of histone genes in *Drosophila americana*: coexistence of quartet and quintet units in a genome. **Insect Mol. Biol.** v. 14, p. 713-717, 2005.

NEI, M.; HUGHES, A. L. Balanced polymorphism and evolution by the birth-and-death process in the MHC loci. In: Tsuji K, Aizawa M, Sasazuki T, editors. **11th Histocompatibility**

Workshop and Conference. Oxford Univ. Press; Oxford, UK, v. 2, p. 27-38, 1992.

NEI, M.; ROONEY, A. P. Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. **Annu. Rev. Genet** v. 39, p. 121-152, 2005.

NEIDHART, M.; RETHAGE, J.; KUCHEN, S.; KUNZLER, P.; CROWL, R. M.; BILLINGHAM, M. E.; et. al. Retrotransposable L1 elements expressed in rheumatoid arthritis synovial tissue: association with genomic DNA hypomethylation and influence on gene expression. **Arthritis Rheum** v. 43, p. 2634-47, 2000.

NISHIHARA, H.; SMIT, A. F. A.; OKADA, N. Functional noncoding sequences derived from SINEs in the mammalian genome. **Genome Res.** v. 16, p. 864-874, 2006.

NOVOTNÁ, J.; HAVELKA, J.; STARÝ, P.; KOUTECKÝ, P.; VÍTKOVÁ, M. Karyotype analysis of the Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Kurdjumov) (Hemiptera: Aphididae) reveals a large X chromosome with rRNA and histone gene families. **Genetica** v. 139, p. 281-289, 2011.

OHTA, T. Further study on the genetic correlation between members of a multigene family. **Genetics** v. 99, n. 3-4, p. 555-571, 1981.

OLIVEIRA, N. L.; CABRAL-de-MELLO, D. C.; ROCHA, M. F.; LORETO, V.; MARTINS C.; MOURA, R. C. Chromosomal mapping of rDNAs and H3 histone sequences in the grasshopper *rhamatocerus brasiliensis* (acrididae, gomphocerinae): extensive chromosomal dispersion and co-localization of 5S rDNA/H3 histone clusters in the A complement and B chromosome. **Mol. Cytogenet** v. 10, p. 4-24, 2011.

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 RNAr gene clusters in *Coprophanaeus* beetles (Coleoptera, Scarabaeidae). **Cytogenet Genome Res.** v. 138, p. 46-55, 2012.

OTA, T.; NEI, M. Divergent evolution and evolution by the birth-and-death process in the immunoglobulin VH gene family. **Mol Biol Evol.** v. 11, p. 469-82, 1994.

PALACIOS-GIMENEZ, O. M.; CASTILLO, E. R.; MARTÍ DA, CABRAL-DEMELLO, D. C. Tracking the evolution of sex chromosome systems in Melanoplinae grasshoppers through chromosomal mapping of repetitive DNA sequences. **BMC Evol. Biol.** v. 13, p. 167, 2013.

PALOMEQUE, T.; LÓPEZ, M. M.; CARRILO, J. A.; LORITE, P. Characterization and evolutionary dynamics of a complex family of satellite DNA in the leaf beetle *Chrysolina carnifex* (Coleoptera, Chrysomelidae). **Chromosome Res.** v. 13, p. 795-807, 2005.

PAULE, M. R.; WHITE, R. J. Survey and summary transcription by RNA polymerases I and III. **Nucleic Acids. Res.** v. 28, p. 1283-1298, 2000.

PELLICCIA, F.; BARZOTTI, R.; BUCCIARELLI, E.; ROCCHI, A. 5S ribosomal and *U1 small nuclear RNA* genes: a new linkage type in the genome of a crustacean that has three different tandemly repeated units containing 5S ribosomal DNA sequences. **Genome** v. 44, p. 331-335, 2001.

PENDÁS, A. M.; MORAN, P.; FREIJE, J. P.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Chromosomal

mapping and nucleotide sequence of two tandem repeats of Atlantic salmon 5S rDNA. **Cytogenet Genome Res.** v. 67, p. 31-36, 1994.

PETITPIERRE, E. Cytogenetics, cytotaxonomy and genetics of Chrysomelidae. In: Jolivet P, Petitpierre E, Hsiao TS (ed) **Biology of the Chrysomelidae**. Netherlands: Kluwer Acad. Publ. Dordrecht cap. 9 p.131-159, 1988.

PETITPIERRE, E. Molecular cytogenetics and taxonomy of insects, with particular reference to the Coleoptera. **International Journal of Insect Morphology and Embryology** v. 25, n. 1-2, p. 115-133, 1996.

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

PETITPIERRE, E.; ELGUETA, M. A cytogenetic study of three Chilean species of Chrysomelinae (Coleoptera, Chrysomelidae). **Folia biologica** (Kraków) v. 54, n. 3-4, p. 87-91, 2006.

PETITPIERRE, E.; SEGARRA, C.; JUAN, C. Genome size and chromosomal evolution in leaf Beetles (Coleoptera: Chrysomelidae). **Hereditas**, v.119, p. 1-6, 1993.

PETRONI, D. M. **Diversidade de famílias de Coleoptera em diferentes fragmentos florestais no município de Londrina, PR.** (Dissertação de Mestrado), Universidade Estadual de Londrina, Londrina, p.61, 2008.

PINHAL, D.; YOSHIMURA, T. S.; ARAKI, C. S.; MARTINS, C. The 5S rDNA family evolves through concerted and birth-and-death evolution in fish genomes: an example from freshwater stingrays. **BMC Evol. Biology** v. 11, p. 151, 2011.

PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **P. Natl. Acad. Sci. USA** v. 83, p. 2934-2938, 1986.

PONOMARENKO, A.G. "Superorder Scarabaeide a Laicharting, 1781. Order Coleoptera Linné, 1758. The beetles," In: RASNITSYN A. P.; QUICKE D. L. J. (Eds) **History of insects**. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, p. 164-176, 2002.

PONS, J. Evolution of diploid chromosome number, sex-determining systems, and heterochromatin in western mediterranean and canarian species of the genus *Pimelia* (Coleoptera: Tenebrionidae). **J. Zool. Syst. Evol. Res.** v. 42, p. 81-85, 2004.

PONS, J.; BRUVO, B.; JUAN, C.; PETITPIERRE, E.; PLOL, M.; UGARKOVIC, D. Conservation of satellite DNA in species of the genus *Pimelia* (Tenebrionidae, Coleoptera). **Gene** v. 205, p. 183-190, 1997.

PONS, J.; PETITPIERRE, E.; JUAN, C. Evolutionary dynamics of satellite DNA family PIM357 of the genus *Pimelia* (Tenebrionidae, Coleoptera). **Mol. Bio. Evol.** v. 19, p. 1329-1340, 2002.

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** v. 137, p. 202-207, 2002a.

- PROENÇA, S. J. R.; SERRANO, A. R. M.; COLLARES-PEREIRA, M. J. Cytogenetic variability in genus *Odontocheila* (Coleoptera, Cicindelidae): karyotypes, C-banding, NORs and localization of ribosomal genes of *O. confuse* and *O. nodicornis*. **Genetica** v. 114, p. 237-245, 2002b.
- PUCCI, M. B.; BARBOSA, P.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M. C.; ARTONI, R. F.; SCACCHETTI, P. C.; PANSONATO-ALVES, J. C.; FORESTI, F.; MOREIRA-FILHO, O.; VICARI, M. R. Chromosomal spreading of microsatellites and (TTAGGG)_n sequences in the *Characidium zebra* and *C. gomesi* genomes (Characiformes: Crenuchidae). **Cytogenet. Genome Res.** v. 149, n. 3, p. 182-190, 2016.
- QIN, Q.; WANG, J.; WANG, Y.; LIU, Y.; Liu, S. J. Organization and variation analysis of 5S rDNA in gynogenetic off spring of *Carassius auratus* red var. (♀) × *Megalobrama amblycephala* (♂). **BMC Genetics** v.16, p. 26, 2015.
- REBORDINOS, L.; CROSS, I.; MERLO, A.; High evolutionary dynamism in 5S rDNA of fish: state of the art. **Cytogenet Genome Res.** v. 141, p. 1-11, 2013.
- REID, C.A.M. A cladistic analysis of subfamilial relationships in the Chrysomelidae *sensu lato* (Chrysomeloidea). In: PAKALUK, J.; SLIPINSKI, S. (Eds.), Biology, Phylogeny and Classification of Coleoptera: Papers Celebrating the 80th Birthday of Roy A. Crowson. **Muzeum i Instytut Zoologii Pan**, Warszawa, p. 1559-1631, 1995.
- RILEY, E. G.; CLARK, S. M.; FLOWERS, R. W.; GILBERT, A. J.; Chrysomelidae Latreille 1802. **American beetles** v. 2, p. 617-691, 2002.
- RIO, D. C. RNA processing. **Curr. Opin. Cell. Biol.** v. 4, p. 444-452, 1992.
- ROEHRDANZ, R.; HEILMANN, L.; SENECHAL, P.; SEARS, S.; EVENSON, P. Histone and ribosomal RNA repetitive gene clusters of the boll weevil are linked in a tandem array. **Insect Mol. Biol.** v. 19, p. 463-471, 2010.
- ROGERS, S. O.; BENDICH, A. J. Ribosomal RNA genes in plants: variability in copy number and in the intergenic spacer. **Plant Mol. Biol.** v. 9, p. 509-520, 1987.
- 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** v. 140, p. 1-10, 2004.
- RUBERTI, I.; FRAGAPANE, P.; PIERANDREI-AMALDI, P.; BECCARI, E.; AMALDI, F.; BOZZONI, I. Characterization of histone genes isolated from *Xenopus laevis* and *Xenopus tropicalis* genomic libraries. **Nucleic. Acids. Res.** v. 10, p. 1544-1550, 1982.
- SASHITAL, D. G.; VENDITTI, V.; ANGERS, C. G.; CORNILESCU, G.; BUTCHER, S. E. Structure and thermodynamics of a conserved *U2 snRNA* domain from yeast and human. **RNA** v. 13, p. 328-338, 2007.
- SCHNEIDER, M. C.; ARTONI, R. F.; ALMEDIA, M. C. Cytogenetic analysis of 3 populations of *Diabrotica speciosa* (Chrysomelidae, Galerucinae): Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions. **Cytologia**, v. 67, n. 3, p. 281-287, 2002.
- SCHNEIDER, M. C.; ROSA, S. P.; ALMEIDA, M. C.; COSTA, C.; CELLA, D. M.

Chromosomal similarities and differences among four Neotropical Elateridae (Conoderini and Pyrophorini) and other related species, with comments on the NOR patterns in Coleoptera. **J. Zool. Systematic Evol. Res.** v. 45, p. 308-316, 2007.

SCHWEIZER, D.; LOIDL, J. A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C-band patterns. In: **Chromosomes today**. Springer, Dordrecht, p. 61-74, 1987.

SEGARRA, C.; PETITPIERRE, E. Chromosomal survey in three genera of Alticinae (Coleoptera, Chrysomelidae). **Cytobios** v. 64, p. 169-174, 1990.

SELLOS, D.; KRAWETZ, S. A.; DIXON, G. H. Organization and complete nucleotide sequence of the core-histone-gene cluster of the annelid *Platynereis dumerilii*. **Eur J Biochem** v. 190, p. 21-29, 1990.

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

ŠÍCHOVÁ, J.; NGUYEN, P.; DALÍKOVÁ, M.; MAREC, F. Chromosomal evolution in tortricid moths: conserved karyotypes with diverged features. **PLoS One** v. 8, n. 5, p. e64520, 2013.

SIERRA-MONTES, J. M.; PEREIRA-SIMON, S.; SMAIL, S. S.; HERRERA, R. J. The silk moth *Bombyx mori* *U1* and *U2 snRNA* variants are differentially expressed. **Gene** v. 352, p. 127-136, 2005.

SMITH, S. G.; VIRKKI, N. Coleoptera. In: JOHN, B. (Ed.), **Animal Cytogenetic**. Gebru der Borntraeger, Berlin, Stuttgart, v. 3, Insecta 5, p. 366, 1978.

SMITH, S.G. The cyto-taxonomy of Coleoptera. **The Canadian Entomologist**, v. 82, p. 58-68, 1950.

SUMNER, A. T. Euchromatin and the longitudinal differentiation of chromosomes. **Chromosomes: organization and function**, North Berwick, UK. p. 117-132, 2003.

SUZUKI, H.; MORIWAKI, K.; SAKURAI, S. Sequences and evolutionary analysis of mouse 5S rDNAs. **Mol. Biol. Evol.** v.11, p.704, 1994.

SYMONOVÁ, R.; MAJTÁNOVÁ, S.; SEMBER, A.; STAAKS, G. B.; BOHLEN, J.; FREYHOF, J.; RÁBOVA, M.; RÁB, P. Genome differentiation in a species pair of coregonine fishes: an extremely rapid speciation driven by stress-activated retrotransposons mediating extensive ribosomal DNA multiplications. **BCM Evol. Biol.** v. 13, p. 1-11, 2013.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Mol. Biol. Evol.** v. 28, p. 2731-2739, 2011.

THIEN, L. B.; BERNHARDT, P.; DEVAL, M. S.; CHEN, Z. D.; LUO, Y. B.; FAN, J. H. et al. Pollination biology of basal angiosperms (ANITA grade). **Am. J. Bot.** v. 96, p. 166-182, 2009.

TIMBERLAKWE, E. Low repetitive DNA content in *Aspergillus nidulans*. **Science** v. 202, p. 973- 975, 1978.

- ÚBEDA-MANZANARO, M.; MERLO, M. A.; PALAZÓN, J. L.; CROSS, I.; SARASQUETE, C.; REBORDINOS, L. Chromosomal mapping of the major and minor ribosomal genes, (GATA) n and *U2 snRNA* gene by double-colour FISH in species of the Batrachoididae family. **Genetica** v. 138, n. 7, p. 787-794, 2010.
- UGARKOVIĆ, D.; DURAJLIJA, S.; PLOHL, M. Evolution of *Tribolium madens* (Insecta, Coleoptera) satellite DNA through DNA inversion and insertion. **J. Mol. Evol.** v. 42, p. 350-358, 1996.
- UTSUNOMIA, R.; SCACCHETTI, P. C.; PANSONATO-ALVES, J. C.; FORESTI, C. O. F. Comparative chromosome mapping of *U2 snRNA* and 5S rRNA genes in *Gymnotus* species (Gymnotiformes, Gymnotidae): Evolutionary dynamics and sex chromosome linkage in *G. pantanal*. **Cytogenet Genome Res.** v. 142, p. 286-292, 2014.
- VAIO, E. S.; POSTIGLIONI, A. Stoline Cassidines (Coleoptera, Chrysomelidae) With X_{yp} Sex Chromosomes and a Derivative System X_{pneo} X_{neoyp} . **Can. J. Genet. Cytol.** v. 16, n. 2, p. 433-440, 1974.
- VALADKHAN, S. snRNAs as the catalysts of premRNA splicing. **Curr. Opin. Chem. Biol.** v. 9, p. 603-608, 2005.
- VALGEIRSDOTTIR, K.; TYRAVERSE, K. L.; PARDUE, M. HeT DNA: A family of mosaic repeated sequences specific for heterochromatin in *Drosophila melanogaster*. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA** v. 87, p. 7998-8002, 1990.
- VANIN A. S.; IDE S. Classificação comentada de Coleoptera. In: Costa C.; Vanin S.A.; Lobo J.M.; Melic A. (eds) **Proyecto de red Iberoamericana de biogeografía y entomología sistemática PRIBES 2002**. Sociedad Entomológica Aragonesa (SEA); Cytel, Zaragoza, p. 193-205, 2002.
- VENKATESWARLU, K.; LEE, S. W.; NAZAR, R. N. Conserved upstream sequence elements in plant 5S ribosomal RNA-encoding genes. **Gene** v. 105, p. 249-253, 1991.
- VICARI, M. R.; ARTONI, R. F.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. Colocalization of repetitive DNAs and silencing of major rRNA genes. A case report of the fish *Astyanax janae* *roensis*. **Cytogenet. Genome Res.** v. 122, n. 1, p. 67-72, 2008.
- VIDAL, O. R. Coleoptera from Argentina. **Genetica** v. 65, p. 235-239, 1984.
- VIERNA, J.; JENSEN, K. T.; MARTÍNEZ-LAGE, A.; GONZÁLEZ-TIZÓN, A. M. The linked units of 5S rDNA and U1 snDNA of razor shells (Mollusca: Bivalvia: Pharidae). **Heredity** v. 107, p. 127-142, 2011.
- VIRKKI, N. High chromosome number and giant postreductional sex chromosomes in the beetle *Walterianella venusta* SCHAUFUS (Chrysomelidae, Alticinae). **J. Agr. Univ. Puerto Rico** v. 47, p. 154-296, 1963.
- VIRKKI, N. **On the cytology of some neotropical chrysomelids (Coleoptera)**. Suomalainen tiedeakatemia, 1964.
- VIRKKI, N. Orientation and segregation of asynaptic multiple sex chromosomes in the male *Omophoita clerica* ERICHSON (Coleoptera: Alticinae). **Hereditas** v. 57, p. 278-285, 1967a.

VIRKKI, N. Regular segregation of seven asynaptic sex chromosomes in the male of *Asphaera daniela* BECHYN (Coleoptera, Alticinae). **Caryologia** v. 2, p. 47-51, 1968.

VIRKKI, N. Sex chromosomes and karyotypes of the Alticinae (Coleoptera). **Hereditas** v. 64, p. 267-282, 1970.

VIRKKI, N. Meiotic orientation and segregation of asynaptic sex chromosomes in Alticinae (Coleoptera). **Anales de La Escuela Nacional de Ciencias Biológicas XX**, p. 35-51, 1973.

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

VIRKKI, N. Banding of Oedionychina (Coleoptera: Alticinae) chromosomes C- and Ag-bands. **J. Agric. Univ. PR** v. 67, p. 221-255, 1983.

VIRKKI, N. The sex chromossomes of *Disonycha* (Coleoptera, Alticinae): Xy + nX sistemas. **Cytobios** v. 53, p. 43-55, 1988a.

VIRKKI, N. Cytotaxonomy of Alticinae. In: JOLIVET, P.; PETITPIERRE, E.; HSIAO, T.S. **Biology of the Chrysomelidae**. Netherlands: Kluwer Acad. Publ. Dordrecht, cap. 11, p. 187-203, 1988b.

VIRKKI, N. Proximal vs. distal collochores in Coleopteran chromosomes. **Hereditas** v. 110, p. 101-107, 1989.

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

VIRKKI, N.; SANTIAGO-BLAY, J. A. Treands of karyotype evolution in neotropical *Oedionychina* (Coleoptera: Chrysomelidae: Alticinae) **Hereditas** v. 119, p. 63-283, 1993.

VIRKKI, N.; SANTIAGO-BLAY, J. A. Atypical cytology in some Neotropical flea beetles (Coleoptera: Chrysomelidae: Alticinae: Oedionychina) from one of the most intense natural radiation sites known, Morro do Ferro (Brazil). **Cytobios** v. 85, p. 167-184, 1996.

VOLFF, J. N.; BOUNEAU, L. M.; OZOUF-COSTAZ, C.; FISCHER, C. Diversity of retrotransposable elements in compact putterfish genomes. **Trends Genet** v. 19, n. 12, p. 674-678, 2003.

WALSH, J.B. **Genome Evolution: Overview**. Enciclop. of life sciences, 2001.

WANG, B.; ZHANG, H.; JARZEMBOWSKI, E. Early Cretaceous angiosperms and beetle evolution. **Front Plant Sci.** v. 4, p. 360, 2013.

WANG, S.; LORENZEN, M. D.; BEEMAN, R. W.; BROWN, S. J. Analysis of repetitive DNA distribution patterns in the *Tribolium castaneum* genome. **Genome Biol.** v. 9, p. 1-14, 2008.

WEBER, J. L.; MAY, P. E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. **Am. J. Hum. Genet.** v. 44, n. 3, p. 388, 1989.

WEINER, A. M.; DEININGER, P. L.; EFSTRATIADIS, A. Nonviral retroposons: genes, pseudogenes, and transposable elements generated by the reverse flow of genetic information. **Annu. Rev. Biochem** v. 55, p. 631-661, 1986.

WENDEL, J. F. Genome evolution in polyploids. **Plant Mol. Biol.** v. 42, n. 1, p. 225-249, 2000.

WEST, S. The increasing functional repertoire of *UI snRNA*. **Biochem Soc. T.** v. 40, p. 846-849, 2012.

WHITE, M. J. D. **Animal Cytology and Evolution**. London: Willian Clowes e Sons, p. 916 1973.

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. **Nat Rev Genet** v. 8, p. 973-982, 2007.

WILDER, J.; HOLLOCHER, H. Mobile elements and the genesis of microsatellites in dipterans. **Mol. Biol. Evol.** v. 18, p. 384-392, 2001.

WOLFFE, A. P. The role of transcription factors, chromatin structure and DNA replication in 5S RNA gene regulation. **J. Cell. Sci.** v. 107, p. 2055-2063, 1994.

YADAV, J. S.; KONDAL, K.; YADAV, A. S. Karyotypic notes on 12 species of Carabid beetles (Caraboidea: Adephaga) from Haryana. **Zool. Anz.** v. 215, n. 5-6, p. 338-47, 1985.

ZHANG, J.; ROSENBERG, H. F.; NEI, M. Positive Darwinian selection after gene duplication in primate ribonuclease genes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** v. 95, p. 3708-3713, 1998.

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 repeat DNAs and W sex chromosome differentiation in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes). **Cytogenet. Genome Res.** v. 144, p. 325-332, 2014.

**APÊNDICE 1- REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR), PARA
AMPLIFICAÇÃO DO 5S rDNA**

Reagentes	Concentração de uso	Concentração final	Volume
H ₂ O	-	-	4,5 µL
Tampão	10X	1X	1 µL
MgCl ₂	50 mM	3,75 mM	0,75 µL
dNTP Mix	2 mM	0,2 mM	1 µL
Primer Forward	10 pMOL	1 pMOL	1 µL
Primer Reverse	10 pMOL	1 pMOL	1 µL
Taq Polimerase	(5 U/µL)	1 U/µL	0,2 µL
DNA	20 ng/µ	20 ng/µL	1 µL
Total			10µL

Programa:

5 minutos a 94°C	35 ciclos
1 minuto a 94°C	
1 minuto a 56°C	
1 minuto a 72°C	
5 minutos a 72°C	
4°C	

APÊNDICE 2- REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA AMPLIFICAÇÃO DAS HISTONAS H1, H3 E H4

Reagentes	Concentração de uso	Concentração final	Volume
H ₂ O	-	-	15,7 µL
Tampão	10X	1X	2,5 µL
MgCl ₂	50 mM	2 mM	1 µL
dNTP Mix	2 mM	0,2 mM	2,5 µL
Primer Forward	10 pMOL	0,5 pMOL	1 µL
Primer Reverse	10 pMOL	0, 5 pMOL	1 µL
Taq Polimerase	(5 U/µL)	1,5 U/µL	0,3 µL
DNA	40 ng/µ	40 ng/µL	1 µL
Total			25 µL

Programa:

5 minutos a 95°C	35 ciclos
1 minuto a 95°C	
45 segundos a 60°C	
1 minuto a 72°C	
7 minutos a 72°C	
4°C	

APÊNDICE 3- REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA AMPLIFICAÇÃO DOS U1 E U2 snDNAS

Reagentes	Concentração de uso	Concentração final	Volume
H ₂ O	-	-	4,5 µL
Tampão	10X	1X	1 µL
MgCl ₂	50 mM	2 mM	0,75 µL
dNTP Mix	2 mM	0,2 mM	1 µL
Primer Forward	10 pMOL	1 pMOL	1 µL
Primer Reverse	10 pMOL	1 pMOL	1 µL
Taq Polimerase	(5 U/µL)	1 U/µL	0,2 µL
DNA	40 ng/µ	40 ng/µL	1 µL
Total			10µL

Programa:

5 minutos a 95°C	30 ciclos
45 segundos a 95°C	
45 segundos a 62°C	
1 min. 20 seg. a 72°C	
7 minutos a 72°C	
4°C	

APÊNDICE 4- MARCAÇÃO DA SONDA DO 5S rDNA POR PCR

Reagentes	Concentração de uso	Concentração final	Volume
H ₂ O	-	-	16,35 µL
Tampão	10X	1X	2,5 µL
MgCl ₂	50 mM	2 mM	1 µL
dATP	2 mM	0,4 mM	0,5 µL
dGTP	2 mM	0,4 mM	0,5 µL
dCTP	2 mM	0,4 mM	0,5 µL
dTTP	2 mM	0,28 mM	0,35 µL
dUTP* digoxigenina 11-dUTP	2 mM	0,12 mM	0,3 µL
Primer Forward	10 pMOL	1 pMOL	1 µL
Primer Reverse	10 pMOL	1 pMOL	1 µL
Taq Polimerase	(5 U/µL)	1 U/µL	0,3 µL
DNA	40 ng/µ	40 ng/µL	1 µL
Total			25µL

Programa:

5 minutos a 94°C	35 ciclos
1 minuto a 94°C	
1 minuto a 56°C	
1 minuto a 72°C	
5 minutos a 72°C	
4°C	

ANEXO 1- CITOGENÉTICA CONVENCIONAL

a- Metodologia para obtenção dos cromossomos a partir de gônadas segundo Almeida; Zacaro; Cella (2000).

1. Dissecar o animal em solução fisiológica para insetos, retirar a gônada e transferi-la para uma placa de Petri contendo solução hipotônica (água de torneira), durante 5 minutos;
2. Fixar o órgão em Carnoy I (metanol-ácido acético na proporção 3:1), durante 30 minutos;
3. Macerar o órgão sobre uma placa de metal à temperatura média de 35° a 40°C.

b- Coloração Convencional Segundo Giemsa

Para análise das preparações citogenéticas as lâminas foram coradas, à temperatura ambiente, durante 10 minutos, com uma solução contendo 47 ml de água destilada, 1,5 ml de solução comercial de Giemsa (Merck) e 1,5 ml de tampão fosfato pH 6.8; então foram lavadas em água destilada e secas ao ar.

**ANEXO 2- AMPLIFICAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS CROMOSSÔMICAS
MICRODISSECTADAS VIA KIT *Genomeplex Single Cell, whole genome amplification-4*
(WGA 4)**

- Lise e fragmentação do Cromossomo

- 1- Isolar o cromossomo em um micro-tubo de 200µL;
- 2-Adicionar 9 µLde água no cromossomo;
- 3- Preparar a solução de fragmentação adicionando 2 µLde proteinase K e 32 µL de 10X *Single Cell Lysis e Fragmentation Buffer*;
- 4- Centrifugação do Tampão Lise;
- 5- Adicionar 1µL do tampão lise ao material e Misturar;
- 6- Aquecer a 99°C por quatro minutos;
- 7- Colocar no gelo e uma leve centrifugação.

- Preparação da Biblioteca

- 8- Adicionar 2 µL de *IX Library Preparation Buffer* para cada amostra;
- 9- Adicionar 1 µL de solução estabilizadora e misturar;
- 10- Aquecer à 95°C por dois minutos;
- 11- Deixar no gelo por um minuto, centrifugar e recolocar no gelo por mais um minuto;
- 12- Adicionar 1 µL de *Librari preparation enzyme*, misturar e centrifugar;
- 13- Em um termociclador incubar a solução por:
 - 16°C por 20 min
 - 24°C por 20 min
 - 37°C por 20 min
 - 75°C por 5 min
 - 4°C
- 14- Ao retirar do termociclador e centrifugar. Esta reação pode ser armazenada à -20°C por no Maximo três dias.

- Amplificação

- 15- Adicionar na reação 7,5µL de 10X *Amplification Master Mix*, 48,5µL de água, 5,0µL de *WGA DNA Polimerase*;
- 16- Misturar e centrifugar;
- 17- No termociclador incubar à 95°C por 3 min para a desnaturação, após por 25 ciclos de 30 seg à 94°C; 5 min à 65°C e à 4°C final;
- 18- Ao termino estocar à -20°C para posterior análise e purificação.

ANEXO 3- EXTRAÇÃO DE DNA SEGUNDO MURRAY; THOMPSON (1980), COM MODIFICAÇÕES

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)

Guardar o tampão de extração em temperatura ambiente.

1. Em um tubo de 1,5mL colocar 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. Colocar a 50°C por 10 horas (overnight) ou até que o tecido esteja totalmente digerido;
3. Adicionar 10µL de RNase (10mg/mL);
4. Colocar a 37°C, em banho-Maria, por 2 horas;
5. Adicionar 600µL de clorofórmio;
6. Inverter os tubos suavemente durante 5 minutos;
7. Centrifugar a 8.000 rpm por 5 min a 4°C;
8. Retirar sobrenadante e transferir para um novo tubo;
9. Adicionar 600 µL de etanol 100% gelado e deixar a -20°C por 2 horas;
10. Centrifugar a 14.000 rpm por 15 min a 4°C.
11. Descartar o sobrenadante;
12. Lavar o pellet com 200µL de etanol 70% gelado;
13. Centrifugar por 3 min a 10.000 rpm a 4 °C;
14. Descartar o sobrenadante;
15. Lavar o pellet com 200 µL de etanol 100% gelado;
16. Centrifugar por 3 min a 10.000 rpm a 4 °C;
17. Descartar o sobrenadante;
18. Deixar secar na estufa a 37°C;
19. Ressuspender em 40µL de água mili-Q ou TE.

ANEXO 4- PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE RNA COM TriZol® (Invitrogen)

1. Adicionar em tubo de 1.5mL:
 - 1mL de TriZol
 - amostra a ser extraído o RNA
 - Homogenizar o tecido (vortex ou bisturi)
2. Adicionar 0.2mL de clorofórmio para cada 1mL de TriZOL. Vortexar vigorosamente por 15 seg. até obter uma solução rósea de aspecto leitoso.
3. Incubar a 25°C por 15 mim.
4. Centrifugar a 12.000g a 4°C por 15 minutos.

- Isolamento do RNA

5. Observar as 3 fases da solução: a primeira, aquosa, contém o RNA; a interfase branca e leitosa contém principalmente DNA e a fase inferior rósea contém predominantemente proteínas. Separar a fase aquosa para um novo tubo de 1.5mL.
6. Adicionar a cada tubo 500 µl de isopropanol.
7. Inverter o tubo 3x.
8. Incubar por 15 minutos a -20°C. Neste ponto, o procedimento pode ser interrompido por até 24 horas, desde que as amostras sejam mantidas nesta temperatura.
9. Centrifugar a 12.000g a 4°C por 10 minutos. Após este processo, pode ser possível visualizar o pellet de RNA.
10. Desprezar o sobrenadante em descarte comum, com o cuidado de não descartar o pellet, e ressuspender com 1 mL de etanol 75%, gelado preferencialmente. Vortexar vigorosamente por 30 seg.
11. Centrifugar a 7.500g a 4°C por 5 minutos. OBS.: Os passos 10 e 11 devem ser repetidos até a obtenção de um pellet branco ou preferencialmente transparente (aproximadamente 4x).
12. Desprezar o sobrenadante em descarte comum e deixar os tubos secando invertidos sobre papel filtro ou toalha dentro da capela do fluxo laminar até o máximo de 10 minutos. Após este tempo, provavelmente o pellet não se dissolverá mais.
13. Ressuspender o pellet em 20µl de água Milli-Q estéril.
14. Dissolver o pellet e incubar por 10 min. a 60°C.
15. Estocar a -80°C até o momento de uso.

ATENÇÃO: Durante todo o procedimento, os tubos são mantidos em gelo picado.

ANEXO 5- CONVERSÃO EM cDNA PELO KIT *First Strand cDNA Synthesis* (GE Healthcare)

1. Aquecer o RNA extraído por 10 min. a 65°C.
2. Incubar em gelo por 1 min.
3. Adicionar em um microtubo de 200 µl:
 - 20 µl de RNA
 - 11 µl de Tampão- *buffer bulk first strand*
 - 1 µl de DTT
 - 1 µl de primer
4. Incubar por 1 hora a 37°C.
15. Estocar a -20°C até o momento de uso.

ANEXO 6- PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DA PCR PELO KIT GE Healthcare –***Illustra GFX PCR DNA***

A purificação seguiu o protocolo do Kit Illustra GFX PCR DNA and GelBand Purification (GE Healthcare). O protocolo consistiu na:

1. Adição de 500µl de capture buffer type3 à 100 µl de amostra (10 µg).
2. Centrifugação por 30 segundos a 16.000 rcf.
3. Coleta do líquido do fundo do tubo que contém a amostra e transferência para a *microSpin Collumn*.
4. Centrifugar por 30 segundos a 16.000 rcf.
5. Descartar todo o conteúdo do tubo coletor, mantendo a microSpin Collumn.
6. Adicionar 500µl de Wash buffer type1 e centrifugar por 30 segundos a 16.000 rcf.
7. Descartar o conteúdo do tubo coletor e centrifugar novamente por 20 segundos a 16.000 rcf.
8. Transferir a microSpin Collumn para um microtubo novo e deixar evaporar o álcool a 70°C por 3 minutos.
9. Adicionar 25µl do tampão type 6 a 70°C, e aguardar por 1 minuto
10. Centrifugar por 1 minutos a 16.000 rcf.
11. Estocar a – 20 °C.

ANEXO 7- CLONAGEM

Transformação:

- 1- Tirar a bactéria competente do -80°C e deixar em gelo;
- 2- Adicionar 1-10 µl de plasmídeo (fechado ou produto de ligação) à bactéria competente;
- 3- Deixar 10 minutos no gelo;
- 4- Deixar em banho-maria 42°C por 90 segundos;
- 5- Deixar 1 minuto no gelo;
- 6- Adicionar 800 µl de LB líquido;
- 7- Deixar por 1 hora a 37°C;

Plaquarear:

- 8- Derreter LB ágar e 2 fazer placas com 20 ml de ágar + antibiótico de interesse
- 9- (Opcional!) Uso de plasmídeos com diferenciação de colônias azul/branco: utilizando a alça de Drigalsky, espalhar sobre a placa 50 µl de IPTG (200 mM) e 40 µl de X-GAL (0,2%).
- 10- Centrifugar a cultura de bactérias por 2 minutos a 5000 rpm, descartar 600 µl de meio e mexer para dissolver o pellet formado e espalhar com a alça de Drigalsky sobre a placa;
- 11- Deixar placa na estufa 37°C overnight;
- 12- Crescidas as colônias bacterianas, vedar as placas com parafilm e deixá-las na geladeira 4°C.

Mini preparação Plasmidial

Solução I:

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

Solução II:

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

Solução III:

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

PRÉ-INÓCULO: Picar uma colônia bacteriana com um palito autoclavado e fazer o pré-inóculo em 5 ml de LB líquido (adicionar antibiótico de interesse). Deixar cultura a 200 rpm overnight a 37°C.

- 1- Deixar a centrífuga a 4°C;
- 2- Depois da cultura bacteriana ter crescido por 16 horas, centrifugá-la em um eppendorf por 30 segundos em velocidade máxima;
- 3- Adicionar 400 µl da solução I e centrifugar bem;
- 4- Adicionar 400 µl da solução II e inverter o tubo até ficar viscoso;
- 5- Adicionar 400 µl da solução III e inverter o tubo;
- 6- Centrifugar por 5 minutos em velocidade máxima;
- 7- Transferir o sobrenadante para um tubo limpo e realizar uma nova centrifugação por 5 minutos em velocidade máxima;
- 8- Transferir o sobrenadante para um tubo que contenha 400 µl de isopropanol 100% e incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente;
- 9- Centrifugar por 10 minutos em velocidade máxima e descartar sobrenadante;
- 10- Adicionar 200 µl de etanol 70% gelado e centrifugar por 5 minutos; descartar o sobrenadante;
- 11- Adicionar 200 µl de etanol 100% gelado e centrifugar por 5 minutos; descartar o sobrenadante;
- 12- Secar na estufa a 37°C;
- 13- Adicionar 20 µl de água ou TE para ressuspender.

ANEXO 8- MARCAÇÃO DE SONDAS POR *NICK Translation*, *Kit Labeling System* (Invitrogen)

As reações de *nick translation* seguiram as orientações do fabricante.

1. Pipetar os seguintes componentes em tubo de 1,5 ml no gelo:

5 µl 10X dNTP Mix minus T;

1 µl dUTP* [digoxigenina 11-dUTP ou biotina 16-dUTP (Roche Applied Science)].

x µl (1 µg) de DNA ;

5 µl 10X Enzyme Mix;

x µl de água destilada para completar 45 µl;

2. Permanecer durante 1 hora a 16° C;

3. Adicionar 5 µl de Stop Buffer;

4. Adicionar 5 µl de acetato de sódio (3M) gelado;

5. Adicionar 100 µl de etanol 100% gelado;

6. Misturar invertendo o tubo; pode-se deixar overnight no freezer ou 1 hora a -80 ° C;

7. Centrifugar a 14.000 rpm durante 10 minuto;

8. Descartar o sobrenadante;

9. Deixar o tubo na estufa a 37 ° C até secar;

10. Adicionar 20 µl de H₂O destilada e autoclavada.

ANEXO 9- HIBRIDAÇÃO *in situ* FLUORESCENTE (FISH) (PINKEL et al., 1986)

Preparação das Lâminas e Hibridação

- 1- Lavar as lâminas em tampão PBS 1x durante 5 min. em temperatura ambiente;
- 2- Desidratar as lâminas em série alcoólica 70, 85 e 100%, 5 min cada;
- 3- Incubar as lâminas em 100 µl de RNase (0,4% RNase/2xSSC) a 37 C por 1h em câmara úmida com água milli-Q;
- 4- Lavar 3 x por 5 min em 2xSSC;
- 5- Lavar durante 5 min em PBS 1x.
- 6- Incubar as lâminas por 10 min em solução de pepsina 0,005% (em 10mM HCl) a 37 C;
- 7- Lavar em PBS 1x durante 5 min mexendo a temperatura ambiente;
- 8- Fixar em paraformaldeído 4% durante 10 min a temperatura ambiente;
- 9- Lavar em PBS 1x por 5 min;
- 10- Desidratar as lâminas em série alcoólicas (70,85, 100%) por 5 min cada; voltar cada álcool em seu frasco.
- 11- Simultaneamente a desidratação em série alcoólica desnaturar a solução de hibridação a 100°C por um período de 10 min e passá-la imediatamente ao gelo;
- 12- Desnaturar o DNA cromossômico com formamida 70% em 2xSSC a 70°C por 4 min;
- 13- Desidratar o material em série alcoólica 70, 85 e 100% durante 5 min cada.
- 14- Preparar uma câmara escura e úmida a 37°C;
- 15- Montar cada lâmina com 40 µl de solução de hibridação, cobrir com lamínula e deixar por 16 horas a 37°C;

Lavagens

- 16- Lavar 3 x durante 5 min em solução de 0,4xSSC + 0,3% de Triton, ambiente;

Deteção e amplificação do Sinal

- 17- Incubar as lâminas em tampão 5% NFDm/4xSSC por 15 minutos;
- 18- Lavar 2 x 5min com 2xSSC + 0,1% de Triton, ambiente;

-Deteção de sondas marcadas com biotina utilizando a streptavidina

- 19a- Incubar as lâminas com 100 µl de streptavidina FITC conjugada (2 µl streptavidina FITC conjugada /998 µl NFDm) durante 1 h em câmara úmida e escura, a temperatura

ambiente;

20a- Lavar 3 x 5min com Tween 0,5%/4xSSC, ambiente (Shaker);

21a- Desidratar em álcool 70, 85 e 100%, 5 min. cada (secar);

-Detecção de sondas marcadas com digoxigenina

19b- Incubar as lâminas com 100 µl de anti digoxigenina rodamina conjugada (5 µl Anti digoxi rodamina/995 µl NFDm) durante 1 h em câmara úmida e escura, a temperatura ambiente;

20b- Lavar 3 x 5min com Tween 0,5%/4xSSC, ambiente (Shaker);

21b- Desidratar em álcool 70, 85 e 100%, 5 min. cada (secar);

Montagem da Lâmina

22- Misturar 200 µl de antifading mais 1 µl de DAPI - 4'-6 diamidino - 2 - phenilindole (50 µg/ml).

23- Colocar 25 µl da solução e cobrir com lamínula. Guardar no escuro.