

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

TATIANA CAROLINE MACHADO

CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* DO SATELITOMA E MITOGENOMA DE
Alagoasa pantina Bechyne, 1958 (COLEOPTERA, ALTICINI)

PONTA GROSSA
2025

TATIANA CAROLINE MACHADO

CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* DO SATELITOMA E MITOGENOMA DE
Alagoasa pantina Bechyne, 1958 (COLEOPTERA, ALTICINI)

Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas na Universidade Estadual de Ponta Grossa, em associação ampla com a Universidade Estadual do Centro-Oeste, Área de Biologia Evolutiva.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Mara Cristina de Almeida
Coorientador: Dr. Tiago Marafígia Degrandi

PONTA GROSSA

2025

M149 Machado, Tatiana Caroline
Caracterização *in silico* do satelitoma e mitogenoma de *Alagoasa pantina* bechyne, 1958 (Coleoptera, Alticini) / Tatiana Caroline Machado. Ponta Grossa, 2025.
73 f.

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

Orientadora: Profa. Dra. Mara Cristina de Almeida.
Coorientador: Prof. Dr. Tiago Marafiga Degrandi.

1. Cromossomos sexuais. 2. Dnamt. 3. Dna repetitivo. 4. NGS. I. Almeida, Mara Cristina de. II. Degrandi, Tiago Marafiga. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Biologia Evolutiva. IV.T.

CDD: 576

TATIANA CAROLINE MACHADO

CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* DO SATELITOMA E MITOGENOMA DE
Alagoasa pantina Bechyne, 1958 (COLEOPTERA, ALTICINI)

Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre na
Universidade Estadual de Ponta Grossa, área de Ciências Biológicas
Biologia Evolutiva.

Ponta Grossa, 09 de Abril de 2025.

Documento assinado digitalmente
 MARA CRISTINA DE ALMEIDA MATIELLO
Data: 07/07/2025 19:47:18-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Mara Cristina de Almeida
Presidente de Banca
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Documento assinado digitalmente
 RENATA DA ROSA
Data: 08/07/2025 07:43:04-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Renata da Rosa
Membro Titular
Universidade Estadual de Londrina

Documento assinado digitalmente
 MATEUS HENRIQUE SANTOS
Data: 08/07/2025 20:19:56-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Mateus Henrique Santos
Membro Titular
Universidade Estadual de Ponta Grossa

AGRADECIMENTOS

Gostaria de dedicar este trabalho, em primeiro lugar, à minha família, que sempre foi meu porto seguro e minha maior fonte de inspiração. À minha mãe, Teresinha de Jesus Machado, pelo incansável suporte emocional e financeiro ao longo desses seis anos, desde a graduação até o mestrado. Esta conquista não é apenas a realização de um sonho meu, mas nosso. Sou eternamente grata por tudo que você fez e continua fazendo. Você sempre foi e será uma inspiração para mim: uma mulher forte, guerreira e batalhadora, que, apesar das dificuldades, sempre deu o melhor por seus filhos. Obrigada por tudo, mãe.

Ao meu irmão, Luis Felipe Machado (*in memoriam*), que, mesmo não estando mais entre nós, continua sendo minha inspiração e minha força. Esta conquista também é sua, e dedico meu mestrado a você, meu grande irmão. Sua memória e sua alegria foram fundamentais para que eu chegasse até aqui, e você sempre estará comigo em cada passo da minha jornada.

Aos meus irmãos Laiza Raissa Machado, Arielen Machado Jaymes e Rodrigo Machado, por serem essenciais na minha vida, por todos os momentos felizes que vivemos juntos e por fazerem parte de quem eu sou hoje. Vocês me inspiram todos os dias.

Ao meu companheiro, Leonardo Mulinari, por estar ao meu lado em todos os momentos, compartilhando risadas e desafios. Te amo e sou grata por todo o apoio e carinho que você me dedicou.

À minha orientadora, Professora Mara Cristina de Almeida, quero expressar minha profunda gratidão pela orientação, paciência e dedicação ao longo desta jornada. Admiro muito você como mulher, amiga, professora e orientadora. Essa jornada só foi possível porque você fez parte dela. Obrigada por todo o conhecimento, críticas construtivas e incentivo durante esses dois anos.

Ao meu coorientador, Professor Tiago Marafiga Degrandi, agradeço pelas contribuições e pelo apoio técnico e científico que enriqueceram esta pesquisa.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), em especial ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, pela estrutura e oportunidades oferecidas durante todo o mestrado. A Fundação Araucária de Apoio e Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná e ao NAPI bioinformática pelo apoio financeiro e a bolsa concedida.

Aos professores do LABGEV, Professor Mateus Henrique Santos e Professor Roberto Ferreira Artoni, agradeço por todo o apoio, conhecimento e orientação ao longo dessa jornada. A dedicação de ambos em compartilhar saberes, esclarecer dúvidas e incentivar o desenvolvimento acadêmico dos alunos foi fundamental para a conclusão deste trabalho.

Agradeço também ao Miguel, pelo apoio técnico e pelos momentos de descontração no laboratório.

Aos meus colegas de laboratório, meu sincero agradecimento por todo o apoio, pela paciência e por estarem dispostos a me ajudar em todos os momentos que precisei. Um agradecimento especial ao meu colega Jesús María Hernández Gómez, por todo o suporte dado, desde as análises até as dúvidas de laboratório, e pelas risadas e momentos de descontração. E a Débora Nascimento da Nóbrega pela amizade e momentos de descontração que vivemos juntas no laboratório. Obrigada pela amizade.

Por fim, agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho. Cada um de vocês fez parte desta conquista, e sou imensamente grata por isso.

Devemos acreditar que somos talentosos para algumas coisas, e que essa coisa, a qualquer custo, deve ser alcançada

Marie Curie

RESUMO

Os genomas dos organismos eucariotos possuem sequências repetitivas que podem estar dispersas ou organizadas *in tandem*. Nesta última categoria encontram-se os DNA satélites (satDNA) principal componente da heterocromatina e com diversas funções relacionadas a segregação cromossômica, estruturação do centrômero, montagem do cinetócoro e pareamento cromossômico na meiose. Estudos recentes indicam que o acúmulo e a amplificação de satDNAs estão relacionados com a evolução e diferenciação de cromossomos sexuais. Dessa forma, essas sequências podem estar associadas com os cromossomos sexuais gigantes e assinápticos encontrados na subtribo Oedionychina (Chrysomelidae, Alticini). Essas características têm sido amplamente discutidas em espécies do gênero *Alagoasa*, no entanto, na literatura somente uma espécie de Alticini foi caracterizada em relação ao satelitoma. Assim, este estudo teve como objetivo caracterizar o conjunto de satDNAs e descrever o mitogenoma de *Alagoasa pantina*. Os dados do satelitoma foram processados com a plataforma *Tandem Repeat Analyzer* (TAREAN), integrada ao *RepeatExplorer2*, seguindo o protocolo SatMiner. O mitogenoma foi montado utilizando o GetOrganelle, com *Omophoita* sp. como referência, e anotado no Proksee por meio da ferramenta MITOS2. O genoma diploide de *A. pantina* foi estimado em aproximadamente 4,54 Gb nas fêmeas e 4,24 Gb nos machos. Dentro desse genoma, o satDNA constitui uma fração significativa, composto por 87 famílias distintas, presentes em ambos os sexos. O conteúdo de satDNA representa 8,70% do genoma da fêmea e 9,52% no macho, o que equivale a aproximadamente 395 Mb de satDNA na fêmea e 404 Mb no macho. O comprimento das unidades de repetição (RUL) para essas famílias variam de 4 pb a 4.070 pb, com uma mediana de 425 pb. A maioria dessas famílias apresentam uma alta composição de A+T, com uma mediana de 63,42%, sugerindo um viés em favor de sequências com alta composição de A+T. Além disso, a análise comparativa entre os sexos revelou diferenças na abundância de satDNA, com três famílias enriquecidas no macho e quatro na fêmea. Essas diferenças podem estar associadas aos cromossomos sexuais, sugerindo que essas famílias de satDNA sejam específicas desses cromossomos e, possivelmente, desempenhem um papel na sua diferenciação. Além da caracterização do satelitoma, a montagem do genoma mitocondrial de *A. pantina* resultou em uma molécula circular de fita dupla com 15.636 pb, contendo 35 genes funcionais e duas regiões não codificantes. Os resultados obtidos fornecem novos *insights* sobre a organização genômica de *A. pantina*, tanto em relação à fração de DNA repetitivo quanto à estrutura do mitogenoma.

Palavras-chave: Cromossomos Sexuais; DNAm; DNA repetitivo; NGS.

ABSTRACT

The genomes of eukaryotic organisms contain repetitive sequences that can be either dispersed or organized in tandem. The latter category includes satellite DNAs (satDNAs), which are major components of heterochromatin and are involved in several functions such as chromosome segregation, centromere structuring, kinetochore assembly, and chromosome pairing during meiosis. Recent studies suggest that the accumulation and amplification of satDNAs are associated with the evolution and differentiation of sex chromosomes. Accordingly, these sequences may be linked to the presence of giant and asynaptic sex chromosomes observed in the subtribe Oedionychina (Alticini, Chrysomelidae). These features have been extensively discussed in species of the genus *Alagoasa*, yet only one Alticini species has been characterized in terms of its satellitome in the literature. Therefore, this study aimed to characterize the set of satDNAs and describe the mitogenome of *Alagoasa pantina*. The satellitome data were processed using the Tandem Repeat Analyzer (TAREAN) platform, integrated into RepeatExplorer2, following the SatMiner pipeline. The mitogenome was assembled using GetOrganelle, with *Omophoita* sp. as a reference, and annotated on Proksee using the MITOS2 tool. The diploid genome size of *A. pantina* was estimated at approximately 4.54 Gb in females and 4.24 Gb in males. Within this genome, satDNA constitutes a significant fraction, comprising 87 distinct families present in both sexes. SatDNA content represents 8.70% of the female genome and 9.52% of the male genome, corresponding to approximately 395 Mb in females and 404 Mb in males. The repeat unit lengths (RULs) for these families range from 4 bp to 4,070 bp, with a median of 425 bp. Most of these families exhibit high A+T content, with a median of 63.42%, suggesting a bias toward A+T-rich sequences. Furthermore, comparative analysis between sexes revealed differences in satDNA abundance, with three families enriched in males and four in females. These differences may be associated with the sex chromosomes, suggesting that these satDNA families are sex-specific and may play a role in their differentiation. In addition to satellitome characterization, the mitochondrial genome assembly of *A. pantina* resulted in a circular double-stranded molecule of 15,636 bp, containing 35 functional genes and two non-coding regions. The results provide new insights into the genomic organization of *A. pantina*, both in terms of its repetitive DNA fraction and mitochondrial genome structure.

Keywords: Sex Chromosomes; mtDNA; Repetitive DNA; NGS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Cariótipo de <i>Alagosa pantina</i> , corado com Giemsa, mostrando $2n=22=20+X+Y$	17
Figura 4.1 - Indivíduos adultos de <i>Alagoasa pantina</i> . Em A) Macho e em B) Fêmea.	27
Figura 5.1 - Gráfico de citometria de de fluxo representando o tamanho do genoma de <i>A. pantina</i> . O primeiro pico em A e B corresponde ao tamanho do genoma ($2n$) do peixe <i>Psalidodon aff. fasciatus</i> . O segundo pico em A representa o tamanho do genoma da fêmea e o segundo pico em B corresponde ao tamanho do genoma do macho de <i>A. pantina</i>	36
Figura 5.2 - Distribuição tamanho das 87 famílias de satDNA para <i>A. pantina</i>	37
Figura 5.3 - Distribuição do conteúdo de A+T (%) para as 87 famílias de <i>A. pantina</i>	38
Figura 5.4 - Comparação da abundância das 87 famílias de satDNAs no genoma da fêmea (azul) e macho (vermelho) de <i>A. pantina</i> - O eixo x representa as famílias de satDNAs (numeradas de 1 a 87) e o eixo y indica a abundância relativa (em porcentagem) para cada umas das famílias.....	38
Figura 5.5 - <i>Repeat landscapes</i> dos satDNA em <i>A. pantina</i> . O eixo x representa a divergência (nível de substituição K2P) e o eixo y mostra a abundância relativa. São apresentados ApanSat32-3005 (controle, com distribuição equilibrada entre sexos) e sete famílias com abundância diferencial entre machos e fêmeas.	40
Figura 5.6 - <i>Repeat landscapes</i> das 87 famílias de satDNA em <i>A.pantina</i> . Os gráficos mostram a abundância relativa (eixo Y) e a divergência em relação à sequência consenso (eixo X), calculada com base no modelo de Kimura 2 parâmetros (K2P). (A) Perfil do satelitoma nos machos. (B) Perfil correspondente nas fêmeas. Picos mais altos indicam famílias mais abundantes, enquanto os valores de divergência refletem o grau de divergência acumulado desde a amplificação das repetições.	42
Figura 5.7 - Anotação do genoma mitocondrial completo de <i>A. pantina</i> , com cores diferentes para distinguir os diferentes genes.	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 - Características do genoma mitocondrial de *A. pantina*. As letras (L) e (H) indicam respectivamente, cadeia leve (light - L) e cadeia pesada (heavy - H). ...51

SUMÁRIO

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
1.1 ORDEM COLEOPTERA.....	11
1.2 CITOGENÉTICA DE ALTICINI	12
1.3 CROMOSSOMOS SEXUAIS E ELEMENTOS REPETITIVOS	17
2 JUSTIFICATIVA.....	25
3 OBJETIVOS	26
3.1 OBJETIVO GERAL.....	26
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1 MATERIAL BIOLÓGICO E LOCALIZAÇÃO DA AMOSTRA	27
4.2 EXTRAÇÃO DE DNA E SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO (NGS)	27
4.3 ANÁLISE DE CITOMETRIA DE FLUXO	28
4.4 CARACTERIZAÇÃO DO SATELITOMA.....	28
4.5 ANOTAÇÃO DO GENOMA MITOCONDRIAL (mtDNA)	30
5 RESULTADOS.....	31
5.1 ANÁLISE DO SATELITOMA DE <i>Alagoasa pantina</i> Bechyne, 1958 (COLEOPTERA, ALTICINI) MOSTRA DIVERSIDADE DE DNA SATÉLITE	31
5.2 GENOMA MITOCONDRIAL DE <i>Alagoasa pantina</i> Bechyne, 1958 (COLEOPTERA, ALTICINI)	47
5 CONCLUSÃO.....	55
REFERÊNCIAS	57
APÊNDICE A - FAMÍLIAS DE satDNAs CARACTERIZADAS PARA <i>A. pantina</i>	67
APÊNDICE B - ALINHAMENTO E SIMILARIDADE DAS FAMÍLIAS DE satDNAs CARACTERIZADAS PARA <i>A. pantina</i>	70
ANEXO A - PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA / FENOL: CLOROFÓRMIO.....	72

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 ORDEM COLEOPTERA

Os besouros (Ordem Coleoptera) são insetos cosmopolitas e a ordem mais diversa dentro da Classe Insecta (Lima *et al.*, 2010). Com aproximadamente 350 mil espécies descritas, distribuídas em 26 mil gêneros, os coleópteros correspondem a cerca de 40% de todas as espécies de insetos e 30% das espécies animais conhecidas (Lawrence; Slipinski, 1994; Costa, 2000; Gillott, 2005; Bouchard *et al.*, 2017; Gullan; Cranston, 2017; Casari; Biffie; Ide, 2024).

O sucesso evolutivo da ordem pode ser atribuído principalmente ao desenvolvimento das asas anteriores em élitros rígidos e esclerotizados. Esses élitros, quando em repouso, cobrem as asas posteriores membranosas e os espiráculos abdominais, oferecendo proteção contra choques mecânicos (Costa, 2000; Gullan; Cranston, 2017; Casari; Biffie; Ide, 2024). Outras adaptações relacionadas ao modo de vida incluem o achatamento e aumento da proporção da superfície do corpo que é esclerotizada, contribuindo na proteção contra predadores e doenças. Além disso, os espiráculos ficaram escondidos na cavidade subelítrica contribuindo com a redução da perda de água no sistema traqueal (Gillott, 2005).

A ordem Coleoptera está subdividida em quatro subordens: Archostemata, Myxophaga, Adephaga e o grande grupo Polyphaga (Gullan; Cranston, 2017). O clado Polyphaga é o mais diversificado, com mais de 90% das espécies de Coleópteros conhecidos, com aproximadamente 380 mil espécies descritas (Costa, 2000; Yan; Strelnikova, 2022; Casari; Biffie; Ide, 2024). Nesta subordem encontra-se a família Chrysomelidae, cujos membros são conhecidos como besouros folha ou *leaf beetles*, com mais de 40 mil espécies descritas (Jolivet; Santiago-Blay; Schmitt, 2009). Dentre as subfamílias de Chrysomelidae, Galerucinae destaca-se como a mais diversificada em espécies, agrupando a tribo Alticini (Douglas *et al.*, 2023) foco deste estudo. Estima-se que Alticini tenha se originado há cerca de 62,7 milhões de anos (Letsch, Beran, 2023), abrangendo atualmente aproximadamente 601 gêneros e 10.000 espécies descritas. Esta tribo inclui aproximadamente 601 gêneros e 10.000 espécies descritas (Douglas *et al.*, 2023; Konstantinov *et al.*, 2023), com distribuição global, porém ocorrem principalmente em regiões tropicais da América do Sul, África e Ásia (Biondi, Alessandro, 2012). A região Neotropical se destaca por abrigar a maior diversidade de Alticini, com 210 gêneros endêmicos (Biondi; Alessandro, 2012; Linzmeier, 2013; Nadein, 2013).

Essa diversidade é acompanhada por uma ampla discussão sobre a posição taxonômica de Alticini, atualmente é considerada como uma tribo da subfamília Galerucinae (Chapuis, 1875; Haddad; Mackenna, 2016; Douglas *et al.*, 2023; Letsch, Beran, 2023), e anteriormente como uma subfamília irmã dos Galerucinae (Maulik; Cantab, 1929; Csiki; Heikertinger, 1939; Seeno; Wilcox, 1982; Ge *et al.*, 2012; Nie *et al.*, 2019).

Além de sua relevância taxonômica, a tribo destaca-se por características morfológicas específicas, como os fêmures posteriores aumentados, decorrentes da presença da mola metafemoral interna e de musculatura especializada — adaptações que conferem a esses besouros a capacidade de realizar saltos rápidos para escapar de predadores (Konstantinov *et al.*, 2020). Em razão dessa habilidade, são popularmente conhecidos como *flea beetles*, ou besouros-pulgas (Furth, 1988; Costa Lima, 1995). Trata-se de um grupo fitófago altamente especializado: adultos e larvas alimentam-se preferencialmente de folhas, caules ou raízes, podendo eventualmente consumir estruturas florais, estando associados a diversas famílias de angiospermas (Biondi; Alessandro, 2012).

A tribo possui relevância ecológica, sendo apontada como potencial indicadora ambiental devido à presença dessas espécies em áreas de borda e a sensibilidade a alterações ambientais (Linzmeier *et al.*, 2006). Além disso, algumas espécies apresentam importância econômica, tanto negativa quanto positiva. Dentre elas, *Phyllotreta cruciferae* e *Phyllotreta striolata* são consideradas como pragas agrícolas em culturas de crucíferas na América do Norte (Capinera, 2008), enquanto outras são utilizadas como agentes de controle biológico no manejo de plantas daninhas invasoras (Tansey *et al.*, 2005; Roehrdanz *et al.*, 2006). Adicionalmente, os Alticini têm sido utilizados como espécies modelos em estudos evolutivos e ecológicos, contribuindo significativamente para o avanço do conhecimento em entomologia e ecologia aplicada (Vencl, Morton, 1998; Xue; Egan; Yang, 2007).

1.2 CITOGENÉTICA DE ALTICINI

Além da diversidade morfológica e ecológica, a ordem Coleoptera também se caracteriza por uma ampla variação citogenética entre suas espécies. No entanto, apesar da diversidade do grupo, apenas cerca de 4.959 espécies foram analisadas do ponto de vista da citogenética (Blackmon; Demuth, 2015). Esses estudos concentram-se principalmente nas subordens Adephaga e Polyphaga, sendo esta última a mais representada, com aproximadamente 3.668 espécies estudadas (Smith; Virkki, 1978; Blackmon; Demuth, 2015). A maioria das espécies de besouros apresenta machos heterogaméticos, com sistemas de

cromossomos sexuais XY heteromórficos (observados em 3.197 espécies), enquanto 771 espécies possuem o sistema XO (Blackmon; Demuth, 2015). A fórmula cariotípica basal proposta para a ordem é $2n=20=9II+Xyp$, composta por nove pares de autossomos e um sistema sexual Xyp, no qual o cromossomo X é significativamente maior que o Y. Durante a metáfase I da meiose, esses cromossomos sexuais formam uma estrutura característica, semelhante a um "paraquedas", considerada uma condição ancestral em besouros, por isso designado de Xyp (Smith, 1950).

Os coleópteros apresentam uma ampla variação do número diploide incluindo desde de $2n = 4$ em *Chalcolepidius zonatus* (Ferreira *et al.*, 1984) a $2n=69$ em *Ditomus capito* (Serrano, 1981), com morfologia metacêntrica predominando na maioria das espécies (Smith; Virkki 1978). Os processos cromossômicos envolvidos na derivação cariotípica nos coleópteros são as fissões cêntricas, seguidas por inversões pericêntricas ou adições de heterocromatina, o que explica o número de cromossomos e a prevalência de cromossomos metacêntricos em relação à fórmula ancestral (Smith; Virkki 1978; Virkki, 1984). Essa variação também se reflete nos sistemas de determinação do sexo, que incluem sistemas aquiasmáticos como Xyp, Xnyp/nXyp, Xyc, X0, X1+X2, X+y, e sistemas quiasmáticos, como neoXy, Xy, Xyr, X1X2Y, Xy1Y2 (Smith; Virkki 1978). Em Chrysomelidae também é descrito essa variação cariotípica, com o número cromossômico variando de $2n = 8$ em *Homoschema nigriventre* (Virkki; Purcell, 1965), a $2n = 64$ em *Disonycha bicarinata* (Vidal, 1984), ambas pertencentes a tribo Alticini.

Em relação aos estudos citogenéticos, Alticini permanece pouco representada na literatura, com aproximadamente 290 espécies analisadas até o momento, o que corresponde a cerca de 2,9% das espécies descritas (Smith; Virkki, 1978; Reid, 1995; Petitpierre, 2006). Essa tribo é considerada derivada devido à variação no número cromossômico e nos sistemas de determinação sexual (Virkki, 1968, 1988), bem como às irregularidades no comportamento, tamanho e morfologia dos cromossomos sexuais. O cariótipo considerado basal para Alticini é o mesmo da família, $2n=24=11II+Xyp$, um padrão identificado em *Fosterita sp.*, uma espécie considerada primitiva dentro do clado (Virkki, 1970;1988).

Dentre as várias subtribos que compõem Alticini, Oedionychina apresenta características citológicas únicas e interessantes para estudos, como o comportamento assináptico dos cromossomos sexuais e a presença de cromossomos sexuais extremamente grandes em relação aos autossomos, o que compreende até 50% do comprimento do cariótipo (Smith; Virkki, 1978; Virkki, 1988; Virkki; Santiago-Blay, 1993; Almeida; Campaner; Cella, 2009; Mello *et al.*, 2014, Azambuja, 2018, Vidal, 2022; Vidal *et al.*, 2025).

A formação dos cromossomos sexuais gigantes em *Oedionychina* pode ter resultado de eventos como rearranjos cromossômicos, incluindo inversões e translocações de heterocromatina de cromossomos autossômicos para os cromossomos sexuais (Smith; Virkki, 1978; Charlesworth *et al.*, 1994). Esse processo está ligado ao acúmulo e à amplificação de heterocromatina, que pode estar associado à diferenciação morfológica dos cromossomos sexuais em diversos organismos. Essas regiões são enriquecidas com sequências repetitivas, como os DNA satélite (satDNA) e elementos transponíveis (TEs). Dessa forma, a identificação e caracterização dessas sequências são importantes para compreender os mecanismos relacionados a evolução dos cromossomos (Mariotti *et al.*, 2009; Azambuja, 2018, Gatto *et al.*, 2018; Azambuja, 2020, Crepaldi, Parise-Maltempi, 2020; Ferretti *et al.*, 2020; Serrano-Freitas *et al.*, 2020; Vidal, 2022, Kretschmer *et al.*, 2022, Vidal *et al.*, 2025).

Para compreender a composição e evolução desses cromossomos gigantes, diversas abordagens têm sido empregadas, incluindo técnicas de citogenética clássica, bandamento C, uso de sondas de microssatélites, hibridação com elementos transponíveis, hibridização genômica comparativa (CGH), pintura cromossômica (WCP - Whole Chromosome Painting) e sequenciamento de genomas (Almeida; Campaner; Cella, 2009; Mello *et al.*, 2014; Mello, 2015; Goll *et al.*, 2018; Azambuja, 2018; Azambuja *et al.*, 2020, Vidal *et al.*, 2023; Vidal *et al.*, 2025).

Estudos prévios utilizaram a técnica de bandamento C para mapear a distribuição da heterocromatina em Alticini, mostrando padrões variados entre espécies e sugerindo seu envolvimento na diferenciação cromossômica (Almeida; Campaner; Cella, 2009; Mello *et al.*, 2014; Goll *et al.*, 2018). Virkki (1983) analisou espécies de *Omophoita* por meio da técnica de banda-C. Os resultados demonstraram a presença de bandas pericentroméricas em cada cromossomo complementar e bandas adicionais que variaram em número, posição e intensidade de coloração nos cromossomos sexuais. Em *Paranaita opima* a heterocromatina é predominantemente centromérica, tanto em cromossomos autossômicos quanto em sexuais (Almeida; Campaner; Cella, 2006). Por outro lado, o estudo de Mello *et al.* (2014) em três espécies de *Omophoita* mostrou diferenças na distribuição da heterocromatina nos cromossomos sexuais. Para *O. octoguttata* a heterocromatina se localiza na região centromérica e intersticial em um braço do cromossomo X, enquanto no cromossomo Y apresenta bandas intersticiais em seu braço longo e uma banda terminal em seu braço curto. Em *O. personata* mostra a heterocromatina na região centromérica do cromossomo X e em regiões terminais de um braço e intersticial do braço oposto no cromossomo Y. Por fim, em *O. sexnotata*, foram observadas bandas heterocromáticas centroméricas e terminais no cromossomo X, bandas

intersticiais no braço longo e uma banda terminal no braço curto no cromossomo Y (Mello *et al.*, 2014).

Em estudo complementar, Goll *et al.* (2018) caracterizaram citogeneticamente espécies do gênero *Omophoita* e observaram diferenças nas marcações de heterocromatina. Em *O. abbreviata*, a heterocromatina constitutiva estava presente nas regiões centroméricas. Enquanto, *O. aequinoctialis* destaca-se por apresentar variações no padrão entre os citótipos. O citótipo 1 apresenta marcações centroméricas em quase todos os seus cromossomos, enquanto os citótipos 2 e 3 apresentam bandas pericentroméricas na maioria dos cromossomos.

Além das análises baseadas na identificação da distribuição da heterocromatina (banda- C), abordagens de citogenética molecular também têm sido empregadas para aprofundar o conhecimento sobre a organização da heterocromatina. Mello (2015) utilizou sondas de microssatélites (SSR) em combinação com a hibridização *in situ* fluorescente (FISH) para mapear a distribuição dessas sequências em quatro espécies de *Omophoita* (*O. magniguttis*, *O. octoguttata*, *O. personata* e *O. sexnotata*). A FISH apresentou padrões distintos de marcação dos microssatélites nos cromossomos autossômicos e sexuais das espécies estudadas, variando entre marcações pericentroméricas, distais e dispersas. Por exemplo, o microssatélite (GAA)₁₀ marcou um único bivalente em *O. magniguttis* e *O. personata*, enquanto em *O. octoguttata* marcou em todos os bivalentes e não apresentou marcação em *O. sexnotata*. Nos cromossomos sexuais, os SSRs (CA)₁₅, (GA)₁₅, (CAC)₁₀ e (GAC)₁₀ apresentaram marcações dispersas ou específicas, enquanto (GATA)₈ se acumulou nas regiões pericentroméricas e distais. Além disso, a hibridação com elementos transponíveis clonados de *O. octoguttata* mostrou marcações dispersas nos cromossomos sexuais e autossômicos das quatro espécies estudadas (Mello, 2015).

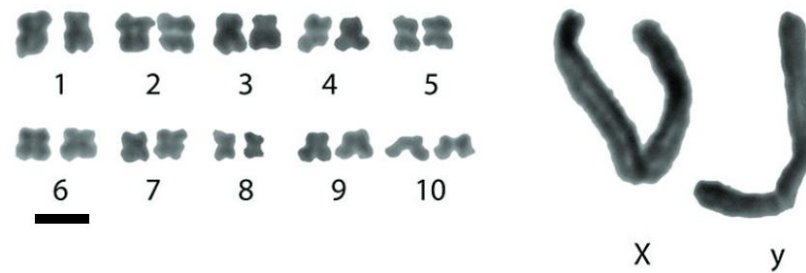
Essa diversidade estrutural também foi relatada no estudo de Vidal *et al.* (2023). Os autores realizaram a pintura cromossômica (WCP) em *O. octoguttata* com sondas de cromossomos sexuais. As sondas hibridizaram com os cromossomos sexuais e também mostraram sinais dispersos nos autossomos das espécies estudadas. Para o cromossomo Y de *O. octoguttata*, *O. sexnotata* e *O. personata* os autores observaram um padrão de hibridização com regiões sobrepostas das sondas OCT-X e OCT-Y, além de uma pequena região específica próxima ao centrômero marcada apenas por OCT-Y e vários blocos destacados pela sonda OCT-X. Por outro lado, o cromossomo Y de *O. magniguttis* foi quase inteiramente marcado pela sonda OCT-Y. No mesmo estudo, os autores também realizaram a hibridização genômica comparativa (CGH) intraespecífica e interespecífica. O CGH intraespecífico comparou o DNA de machos e fêmeas de *O. octoguttata*, mostrando que as sondas se localizaram

preferencialmente nas regiões centroméricas e pericentroméricas da maioria dos cromossomos, incluindo o cromossomo X, indicando uma região altamente ocupada por sequências repetitivas. Enquanto o cromossomo Y apresentou um sinal intersticial nos braços curtos, sugerindo uma região específica masculina. Para a análise do CGH interespecífico foi comparado o DNA de *O. octoguttata* com outras três espécies (*O. personata*, *O. sexnotata* e *O. magniguttis*) e os resultados mostraram uma alta similaridade genômica no conteúdo repetitivo, com sinais específicos nos cromossomos X e Y de *O. octoguttata*, como marcas intersticiais e terminais (Vidal *et al.*, 2023).

Apesar dos significativos avanços proporcionados pelas análises citogenéticas convencionais e moleculares, essas abordagens oferecem apenas uma visão parcial da organização cromossômica. Para superar essas limitações, o sequenciamento de nova geração (NGS) associado a análises bioinformáticas apresenta-se como uma abordagem complementar, permitindo a identificação detalhada de sequências repetitivas, como os satDNAs (Mora *et al.*, 2020; Rico-Porras *et al.*, 2024). Complementando essas análises, a FISH com sondas específicas derivadas de dados de NGS permite o mapeamento dessas sequências nos cromossomos. Embora essa abordagem já tenha sido aplicada a outros grupos de insetos, até o momento, *O. octoguttata* é a única espécie de Alticini com o satelitoma caracterizado, conforme descrito por Vidal *et al.* (2025). No entanto, análises semelhantes em outras espécies do grupo, incluindo os gêneros *Alagoasa* e *Walterianella*, são importantes para elucidar os mecanismos envolvidos na diferenciação dos cromossomos sexuais e no compartilhamento dessas sequências repetitivas.

A espécie *Alagoasa pantina*, foco deste estudo, apresenta um cariótipo descrito por Azambuja (2020) com base na análise de metáfases espermatogoniais, sendo $2n = 22$, com cromossomos sexuais gigantes e um sistema de determinação sexual do tipo X+Y, uma característica conservada dentro do grupo. Com cromossomos autossomos metacêntricos e submetacêntricos, com um par acrocêntrico. O cromossomo X é metacêntrico, enquanto o Y é submetacêntrico (Figura 1.1).

Figura 1.1 - Cariótipo de *Alagoasa pantina*, corado com Giemsa, mostrando $2n=22=20+X+Y$. Barra= 10 μ m.



Fonte: AZAMBUJA, M. *et al.* Cytogenetic and molecular characterization of three mimetic species of the genus *Alagoasa* Bechyné 1955 (Coleoptera: Alticinae) from the Neotropical region. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 160, n. 4, p. 214-223, 2020.

1.3 CROMOSSOMOS SEXUAIS E ELEMENTOS REPETITIVOS

Os cromossomos sexuais são componentes altamente dinâmicos dos genomas, apresentando uma alta variação intraespecífica e interespecífica (Cabral-de-Mello *et al.*, 2021). O sistema cromossômico de determinação sexual foi descrito em 1905 por Nettie Stevens, que, ao estudar larvas do besouro *Tenebrio molitor*, observou diferenças entre os cromossomos de machos e fêmeas. Stevens identificou o sistema XX/XY, caracterizado pela heterogamia masculina, em que os machos possuem um cromossomo X e um Y, sendo este último exclusivo do sexo masculino (Ellegren, 2011; Blackmon; Ross; Bachtrog, 2017; Furman *et al.*, 2020). Esse sistema, é amplamente distribuído nas espécies da ordem Insecta. Desde então, variações desse sistema foram descritas em diferentes grupos de insetos, como o sistema ZZ/ZW, no qual as fêmeas são heterogaméticas e carregam um cromossomo Z e um W (Furman *et al.*, 2020). Esse sistema ocorre em ordens como Lepidoptera e Trichoptera, evidenciando a diversidade dos mecanismos cromossômicos de determinação sexual nos insetos (Blackmon; Demuth, 2015; Wei; Barbash, 2015; Blackmon; Ross; Bachtrog, 2017).

O modelo clássico da evolução dos cromossomos sexuais propõe que eles se originam de um par de autossomos originalmente homólogos, que adquiriram um gene determinante do sexo (Ohno, 1967; Ellegren, 2011; Wei; Barbash, 2015; Abbott *et al.*, 2017; Furman *et al.*, 2020), seja por meio de uma mutação ou pela transposição de um gene de outro cromossomo (Wei; Barbash, 2015). Após a aquisição desse gene determinante do sexo, ocorre uma supressão da recombinação entre os cromossomos (X e Y ou Z e W), inicialmente homomórficos (Charlesworth *et al.*, 94; Hobza, 2006; Ellegren, 2011; Abbott *et al.*, 2017; Furman *et al.*, 2020). Na ausência de recombinação, as mutações deletérias se acumulam de forma irreversível, resultando na degeneração do cromossomo Y ou W (Wei; Barbash, 2015). Esse processo dá

origem a um cromossomo que contém pseudogenes não funcionais e o acúmulo de sequências repetitivas, como os TEs e os satDNA, frequentemente localizadas em sítios de heterocromatina (Wei, Barbash, 2015; Abbott *et al.*, 2017).

A heterocromatina é uma região cromossômica caracterizada por seu estado altamente condensado. Sua composição é predominantemente de sequências repetitivas, como os satDNAs e TEs, localizando-se preferencialmente em regiões centroméricas, pericentroméricas e teloméricas dos cromossomos (López-Flores; Garrido-Ramos *et al.*, 2015; Biscotti *et al.*, 2015; Brändle; Frühbauere; Jagannathan, 2022). A heterocromatina também pode ser encontrada em cromossomos específicos, como os cromossomos sexuais, cromossomos supranumerários ou em regiões específicas de um cromossomo (Garrido-Ramos, 2017).

Entre essas sequências repetitivas, os satDNA se destacam como uma classe altamente abundante e dinâmica (Biscotti *et al.*, 2015). São sequências não codificantes, altamente repetitivas, organizadas *in tandem* que apresentam uma alta variação em relação ao tamanho e complexidade dos monômeros, sequências de nucleotídeos, conteúdo de AT, números de cópias e distribuição no genoma e cromossomos (Charlesworth *et al.* 1994; Palomeque; Lorite, 2008; Garrido-Ramos, 2015; Ruiz-Ruano *et al.*, 2018, Šatović-Vukšić, Plohl, 2023).

O surgimento de uma nova família de satDNA ocorre a partir da duplicação de sequências curtas de dois ou mais pares de bases, que formam repetições *in tandem* localizadas em regiões específicas do genoma. Essas sequências podem se dispersar por mecanismos como transposição ou reinserção de intermediários extracromossômicos, sendo posteriormente amplificadas localmente e formando clusters que podem ser visualizados por técnicas como FISH (Ruiz-Ruano *et al.*, 2016; Garrido-Ramos, 2017). Uma vez originadas, essas sequências seguem diferentes padrões evolutivos, explicados principalmente por duas hipóteses: a hipótese da biblioteca e a evolução em concerto. A hipótese da biblioteca estabelece que espécies relacionadas compartilham uma biblioteca comum de sequências de satDNA, que são conservadas ao longo da evolução, mas amplificadas diferencialmente em cada espécie (Meštrović *et al.*, 1998; Ruiz-Ruano *et al.*, 2016; Garrido-Ramos, 2017; Thakur; Packiaraj; Henikoff, 2021). As famílias de satDNA dentro dessa biblioteca variam em sequência, tamanho, número de cópias e localização cromossômica (Louzada *et al.*, 2020). Estudos em insetos forneceram evidências que sustentam essa hipótese (Meštrović *et al.*, 1998; Mravinac *et al.*, 2002).

A evolução das sequências de satDNA também podem ser explicadas pelo modelo da evolução em concerto, que propõem que essas repetições são homogeneizadas dentro de uma espécie, mas divergem entre as espécies ao longo do tempo. De acordo com esse modelo, novas

variantes surgem por mutação em unidades individuais e se espalham para o restante das repetições por meio de mecanismos como *crossing-over* desigual, transposição ou reinserção de formas extracromossômicas replicadas, além da conversão gênica, que atuam na homogeneização dos satDNA. Em um segundo momento, essas variantes expandidas são fixadas na população por meio da reprodução sexuada, resultando tanto na conservação quanto na diversificação dessas famílias de satDNA entre as linhagens (Dover, 1982; Garrido-Ramos, 2017; Thakur; Packiaraj; Henikoff, 2021).

O conjunto de toda a coleção de sequências de satDNA presentes no genoma é denominada de satelitoma (Ruiz-Ruano *et al.*, 2016). Tradicionalmente, o satDNA é classificado em três categorias com base no comprimento da unidade de repetição ou *Repeat Unit Length* (RUL). Os microssatélites, também conhecidos como repetições de sequências simples (SSRs) ou repetições curtas *in tandem* (STRs), possuem unidades de 1 a 9 pares de bases (pb) e podem apresentar entre 5 e 40 repetições. Essas sequências estão presentes em regiões codificadoras, não codificadoras e regulatórias, sendo altamente polimórficas devido a mutações pontuais e variações no número de repetições (López-Flores; Garrido-Ramos, 2012; Garrido-Ramos, 2017; Thakur; Packiaraj; Henikoff, 2021).

Os minissatélites, também chamados de *variable number of tandem repeats* (VNTRs), possuem unidades de 10 a 100 pb e podem variar entre 10 e algumas centenas de repetições. Seu comprimento total pode variar de 0,5 a 30 kb. Essas sequências estão presentes principalmente em regiões eucromáticas dos genomas de vertebrados, fungos e plantas (López-Flores; Garrido-Ramos, 2012; Garrido-Ramos, 2017; Thakur; Packiaraj; Henikoff, 2021).

Os satélites ou macrossatélites possuem unidades com mais de 100 pb e podem apresentar milhares a milhões de repetições, formando blocos que variam de 100 kb a mais de 100 megabases. Essas sequências são altamente frequentes nos genomas e constituem blocos de heterocromatina, sendo componentes essenciais de estruturas como centrômeros e telômeros (López-Flores; Garrido-Ramos, 2012; Liao *et al.*, 2023).

A relação entre a organização estrutural e a função dessas sequências tem sido amplamente discutido. Embora os satDNAs sejam sequências não codificantes, o estudo de Feliciello *et al.* (2015) sugere que, quando localizados na eucromatina, podem atuar na modulação da expressão gênica. Além dessa possível função regulatória, os satDNAs também desempenham papéis estruturais importantes, como na segregação cromossômica, organização do centrômero, montagem do cinetócoro e pareamento cromossômico (Henikoff *et al.*, 2001; Plohl; Meštrović; Mravinac, 2012; 2014).

No contexto evolutivo, os satDNAs destacam-se por suas altas taxas de evolução e variação no número de cópias, características que contribuem para processos de especiação e no estabelecimento do isolamento reprodutivo (Ferree; Barbash, 2022). Esse comportamento evolutivo possibilita a identificação de sequências específicas de espécies ou cromossomos dentro das famílias de satDNA que compõem o satelitoma, permitindo inferências sobre a dinâmica genômica e os processos de diferenciação entre linhagens (Thakur; Packiaraj; Henikoff, 2021; Montiel *et al.*, 2022; Cabral-De-Mello *et al.*, 2023).

Em insetos, a identificação de famílias de satDNA foi inicialmente limitada por métodos convencionais, como a digestão do DNA genômico com endonucleases de restrição e a cinética de reassociação baseada em DNA C0t-1 (Garrido-Ramos, 2017, Mora *et al.*, 2020; Montiel *et al.*, 2022). No entanto, esses métodos apresentavam limitações, permitindo a identificação apenas das sequências mais abundantes no genoma. Com o avanço das tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS) e o desenvolvimento de análise *in silico* de alto rendimento, tornou-se possível caracterizar os satDNA de forma mais detalhada e abrangente (Novák *et al.*, 2010; Garrido-Ramos, 2017; Ruiz-Ruano *et al.*, 2018). Desta forma, obtendo uma grande diversidade e complexidade nos satelitomas de diferentes grupos taxonômicos (Mora *et al.*, 2020; Rico-Porras *et al.*, 2024).

A detecção de sequências repetitivas em genomas, especialmente de espécies sem genoma de referência, tem sido viabilizada por *pipelines* bioinformáticos — fluxos automatizados que integram diversas ferramentas. Um dos mais utilizados é o *RepeatExplorer2*, que identifica e classifica famílias repetitivas por meio de agrupamento de leituras genômicas (Novák *et al.*, 2010, 2013). A partir dele, foi desenvolvido o satMiner, um protocolo iterativo que combina análises sucessivas no *RepeatExplorer2* com etapas de filtragem e reagrupamento, aumentando a sensibilidade para a detecção de famílias de satDNAs pouco abundantes (Ruiz-Ruano *et al.*, 2016, 2018, 2019; Rico-Porras *et al.*, 2024). Complementar a essa análise a ferramenta *Tandem Repeat Analyzer* (TAREAN), integrada ao *RepeatExplorer2*, permite a identificação automática de satDNAs com base na detecção de estruturas circulares típicas de repetições *in tandem* (Novák *et al.*, 2017; Garrido-Ramos, 2017). Essas abordagens têm sido incorporadas em protocolos padronizados para a mineração de satDNAs, contribuindo significativamente para o avanço do conhecimento sobre a composição e organização do satelitoma.

A aplicação dessas novas abordagens permitiu a identificação e caracterização detalhada de satDNAs em diversas ordens de insetos. E um padrão recorrente tem sido observado: o acúmulo e a amplificação dessas sequências de satDNA, especialmente na

heterocromatina. Esse fenômeno tem sido amplamente relacionado à evolução e diferenciação cromossômica em diversos táxons de animais e plantas, principalmente devido ao papel dessas sequências na supressão da recombinação entre cromossomos homomórficos (Ellegren, 2011; Wei; Barbash, 2015; Furman *et al.*, 2020). Estudos reforçam a associação entre o acúmulo de DNA repetitivo e a diferenciação dos cromossomos sexuais (Mariotti *et al.*, 2009; Palacios-Gimenez *et al.*, 2017; Gatto *et al.*, 2018; Giovannotti *et al.*, 2018 ; Utsunomia *et al.*, 2019; Ferretti *et al.*, 2020; Serrano-Freitas *et al.*, 2020; Cabral-de-Mello *et al.*, 2021; Kretschmer *et al.*, 2022; Vidal *et al.*, 2023; Vidal *et al.*, 2025).

Na ordem Orthoptera, os estudos relatam padrões variados na composição do satelitoma entre diferentes grupos. Na superfamília Acridoidea, *Locusta migratoria* apresenta 62 famílias de satDNA (Ruiz-Ruano *et al.*, 2016), enquanto *Pyrgomorpha conica* apresenta 76 famílias. Em *Eumigus monticola* (Melanoplinae), foram identificadas 27 famílias de satDNA (Ruiz-Ruano *et al.*, 2017). Em *Eneoptera surinamensis* (Eneopteridae), observa-se um acúmulo de satDNAs nos cromossomos sexuais do sistema neoXY, especialmente no neo-Y, que concentrou 39 das 45 famílias identificadas (Palacios-Gimenez *et al.*, 2017). Esse padrão representa a maior diversidade de satDNAs já registrada para cromossomos sexuais, reforçando a hipótese de que essas sequências participam da diferenciação cromossômica (Palacios-Gimenez *et al.*, 2017). Para *Gryllus assimilis* (Gryllidae) 11 famílias de satDNA foram descritas (Palacios-Gimenez *et al.*, 2018a). E por fim, nos gafanhotos da subfamília Melanoplinae, *Ronderosia bergii* se destaca com 10 famílias encontradas (Palacios-Gimenez *et al.*, 2018b).

Além dos Orthoptera, análises do satelitoma em espécies de outras ordens também demonstraram padrões variados de distribuição e acúmulo de satDNAs. No estudo de Cabral-de-Mello *et al.* (2021), por exemplo, a caracterização de três espécies apresentou variação na distribuição dessas sequências repetitivas nos cromossomos. Para *Cydalima perspectalis*, por exemplo, a única família identificada (Cper-Sat01) estava amplamente dispersa por todos os cromossomos, sem um enriquecimento específico. No entanto, análises de núcleos interfásicos indicaram um acúmulo dessa sequência na cromatina do cromossomo W, um padrão que se tornou ainda mais evidente durante o estágio de paquíteno, quando clusters de Cper-Sat01 se distribuíram ao longo de todo o W, enquanto estavam quase ausentes no cromossomo Z. Em *Diatraea postlineella*, duas famílias foram identificadas: Dpos-Sat01, associada à região organizadora nucleolar (NOR) em um par de autossomos, e Dpos-Sat02, restrita a outro par autossômico. Em *Ostrinia nubilalis*, por outro lado, três satDNAs apresentaram acúmulo significativo nos cromossomos W, contribuindo para sua diferenciação em relação ao Z.

Além desses estudos citados, outros trabalhos foram realizados em espécies como em plantas (Mariotti *et al.*, 2009) ortópteros (Ferreti *et al.*, 2020), mamíferos (Acosta *et al.*, 2007; Escudeiro *et al.*, 2019), peixes (Crepaldi; Parise-Maltempi *et al.*, 2020; Serrano-Freitas *et al.*, 2020; Kretschmer *et al.*, 2022), répteis (Giovannotti *et al.*, 2018) e anuros (Gatto *et al.*, 2018). Esses estudos demonstraram o papel dessas sequências repetitivas na diferenciação dos cromossomos sexuais das espécies.

Para ordem Coleoptera, análises do satelitoma também indicaram uma ampla diversidade de famílias de satDNAs e padrões de distribuição cromossômica. Em *Hippodamia variegata* (Coccinellidae), foram identificadas 30 famílias de satDNA, representando cerca de 14,93% do genoma. A família mais abundante, HvarSat01-277, apresentou localização pericentromérica, coincidente com regiões heterocromáticas, padrão comum em besouros (Mora *et al.*, 2020). Para *Rhynchophorus ferrugineus* (Curculionidae) foram identificadas 112 famílias, correspondendo a 25% do genoma (Montiel *et al.*, 2022). Em *Tribolium castaneum* (Tenebrionidae) foram identificados 46 novos satDNA, que ocuparam um total de 2,1% do genoma, contribuindo para a caracterização do satelitoma da espécie, sendo que 11 famílias já haviam sido descritas anteriormente (Gržan *et al.*, 2023). Para *Tenebrio molitor* (Tenebrionidae) foram identificadas 11 famílias de satDNA, que ocupam cerca de 28% do genoma (Oppert *et al.*, 2023).

Em *Chrysolina americana* foram identificadas 165 famílias de satDNA, o maior número já registrado em um inseto até o momento (Rico-Porras *et al.*, 2024). As duas famílias mais abundantes, CameSat001-141 e CameSat002-187, apresentaram sinal predominante nas regiões pericentroméricas da maioria dos cromossomos, com exceção dos dois pares autossômicos menores e do cromossomo Y. Ambas foram detectadas no cromossomo X. Esses resultados destacam a diversidade na organização cromossômica e abundância das famílias de satDNAs entre espécies de coleópteros (Rico-Porras *et al.*, 2024).

Além da caracterização dos satelitomas nas espécies estudadas, essa abordagem possibilitou análises comparativas entre diferentes grupos taxonômicos. Estudos demonstram que a composição do satelitoma pode apresentar variações significativas mesmo entre populações de uma mesma espécie (Feliciello *et al.*, 2015; Pita *et al.*, 2017). Como exemplo, Montiel *et al.* (2022) compararam duas populações de *R. ferrugineus* e identificaram diferenças na abundância dessas sequências. Na população espanhola, os satDNAs representavam 24,9% do genoma, enquanto na população dos Emirados Árabes Unidos correspondiam a 11,4%.

Por outro lado, Pita *et al.* (2017) conduziram um estudo com *Triatoma infestans*, vetor da doença de Chagas na América do Sul, comparando a fração repetitiva do genoma entre

linhagens andinas e não andinas. Das 42 famílias de satDNA identificadas, 34 estavam presentes em ambas as linhagens. As sequências de cada satDNA mostraram-se conservadas, compartilhando a mesma sequência consenso, reforçando a estabilidade do genoma entre essas populações.

Por fim, o estudo de Vidal *et al.* (2025) apresenta a única caracterização do satelitoma para uma espécie da tribo Alticini, *Omophoita octoguttata*, na qual foi identificado que aproximadamente 68% do genoma é composto por sequências repetitivas. Entre os principais componentes estão elementos LTR/gypsy (~13%) e satDNAs (~8–9%), com a identificação de 49 famílias de satDNAs. Algumas dessas famílias apresentaram padrão de distribuição exclusivo nos cromossomos sexuais: OocSat47 e OocSat48 foram localizadas apenas no cromossomo X, enquanto OocSat15, OocSat20, OocSat21 e OocSat35 foram exclusivas do cromossomo Y. Outras famílias, como OocSat02, OocSat05 e OocSat40, mostraram distribuição em ambos os cromossomos autossômicos e sexuais. O acúmulo e a amplificação dessas sequências nos cromossomos sexuais podem estar associadas com a diferenciação sexual, especialmente considerando os cromossomos sexuais gigantes e assinápticos característicos desse grupo (Vidal *et al.* 2025). Embora o estudo de Vidal *et al.* (2025) represente um avanço importante ao caracterizar o satelitoma de *O. octoguttata*, ainda é o único trabalho disponível para a tribo Alticini com esse enfoque, o que evidencia a necessidade de mais estudos sobre o papel das sequências repetitivas na diferenciação dos cromossomos sexuais.

Além disso, a tribo Alticini apresenta problemas taxonômicos, incluindo a posição filogenética incerta de muitos gêneros (Douglas *et al.*, 2023) e a ocorrência de mimetismo entre espécies (Begosí; Benson, 1988), o que dificulta sua delimitação com base apenas em caracteres morfológicos. Diante desse contexto, a caracterização do DNA mitocondrial (mitogenoma) torna-se uma ferramenta importante para auxiliar na resolução de questões sistemáticas e evolutivas dentro da tribo.

Dessa forma, a partir dados de NGS associado a ferramentas bioinformáticas, é possível recuperar e montar mitogenoma. Em insetos, o mtDNA apresenta uma organização bastante conservada, geralmente como uma molécula circular de fita dupla contendo 13 genes codificadores de proteínas (PCGs), 22 genes de RNA de transferência (tRNAs), 2 genes de RNA ribossômico (rRNAs), além de uma região de controle rica em pares A+T (Wei *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2015; Song *et al.*, 2016). O tamanho desses genomas costuma variar entre 14 e 20 kb, embora existam casos que ultrapassem essa faixa (Negrisolo; Babbucci; Patarnello, 2011).

A montagem de mitogenomas tem sido amplamente utilizada para obter informações genéticas detalhadas, além de servir como ferramenta para a identificação de espécies de insetos. Esses genomas também são empregados como modelos para a evolução molecular e como marcadores moleculares abundantes em pesquisas filogenéticas e populacionais (Wei *et al.*, 2010; Negrisolo; Babbucci; Patarnello, 2011). Embora exista muitos estudos na literatura com descrições do mtDNA para as espécies, ainda não há registros disponíveis para espécies do gênero *Alagoasa*. No contexto da tribo Alticini, Vidal (2022) realizou a caracterização do satelitoma de *O. octoguttata*, identificando sequências de 16.549 pb e 16.398 pb para os indivíduos 1 e 2, respectivamente. O mitogenoma dessa espécie apresentou a estrutura típica de DNA circular de dupla fita, contendo: 13 genes PCGs, 22 tRNAs, 2 rRNAs, Duas regiões de origem de replicação (OH) e uma região controle.

Dessa forma, o presente estudo representa uma contribuição inédita ao integrar, pela primeira vez para *Alagoasa pantina*, dados de NGS e análises bioinformáticas para a caracterização conjunta do satelitoma e do mitogenoma. Este é o primeiro registro dessas informações para a espécie, ampliando a compreensão sobre a organização e evolução das sequências repetitivas para a espécie e fornecendo dados mitocondriais que poderão ser utilizados em estudos filogenéticos, evolutivos e taxonômicos no contexto da tribo Alticini.

2 JUSTIFICATIVA

A caracterização do satelitoma de *Alagoasa pantina* representa um avanço no entendimento da composição genômica de espécies da subtribo Oedionychina, especialmente por se tratar da primeira descrição dessas sequências repetitivas para o gênero. A subtribo Oedionychina é particularmente interessante do ponto de vista citogenético por ser caracterizada pela presença de cromossomos sexuais gigantes e assinápticos durante a meiose, os quais, apesar dessa configuração, apresentam segregação regular. Esse padrão encontrado sugere a atuação de mecanismos moleculares específicos na manutenção da estrutura e no comportamento meiótico desses cromossomos, ainda pouco compreendidos.

Estudos anteriores em outros grupos sugerem que a amplificação de sequências repetitivas, como DNAs satélite (satDNAs) e elementos transponíveis (TEs), pode estar associada à evolução e diferenciação desses cromossomos sexuais. No entanto, até o momento, apenas uma espécie da subtribo Oedionychina teve seu satelitoma descrito: *Omophoita octoguttata*, na qual foram identificadas famílias de satDNA com localização específica nos cromossomos sexuais. Esses achados reforçam a importância dessas sequências na organização e diferenciação cromossômica.

Diante desse contexto, a caracterização do satelitoma de *A. pantina* é relevante para preencher uma lacuna de conhecimento sobre a diversidade de sequências repetitivas na subtribo Oedionychina.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o satelitoma de *Alagoasa pantina* e determinar as diferenças na abundância de sequências repetitivas entre macho e fêmea que possam estar associadas aos cromossomos sexuais.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

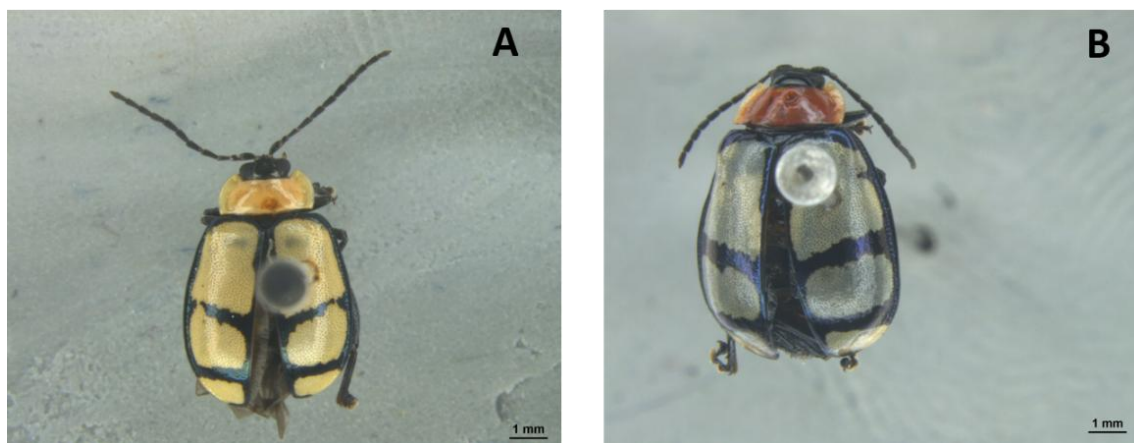
- Descrever o conjunto de satDNA presente no genoma de *A. pantina*;
- Buscar satélites mais abundantes e/ou sexo específico em *A. pantina*;
- Montar o mitogenoma para *A. pantina*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL BIOLÓGICO E LOCALIZAÇÃO DA AMOSTRA

Para o estudo foram utilizados um macho e uma fêmea da espécie *Alagoasa pantina* (Oedionychina, Alticini) (Figura 4.1). Os exemplares foram coletados utilizando puçá entomológico em populações naturais no Distrito de Itaiacoca, Ponta Grossa, Paraná, Brasil (25°07'19" S 49°56'24" W). Após a coleta, os indivíduos foram armazenados em potes plásticos e levados até o Laboratório de Citogenética e Evolução da Universidade Estadual de Ponta Grossa, onde foram realizados os ensaios subsequentes. As espécies foram coletadas com a autorização do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio MMA / IBAMA / SISBIO, número 15402 e o acesso ao patrimônio genético cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado com o código A3076BE, no Ministério do Meio Ambiente.

Figura 4.1 - Indivíduos adultos de *Alagoasa pantina*. Em A) Macho e em B) Fêmea.



Fonte: O autor.

4.2 EXTRAÇÃO DE DNA E SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO (NGS)

O DNA genômico de *A. pantina* foi extraído de acordo com o protocolo de Sambrook; Fritsch, Maniatis *et al.* (1989). As amostras foram obtidas através da fragmentação da cabeça, pronoto e do 3º par de pernas de um macho e uma fêmea. Para a digestão foi adicionado tampão de lise e proteinase K (20 mg/mL) e incubado por 2 horas a 60°C em banho-maria.

Posteriormente, adicionado 5 µL de RNase (10 mg/mL) e incubado por 2 hora à 37 °C, seguido pelo acréscimo de fenol-clorofórmio (1:1).

As amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 20 minutos (4 °C) e o sobrenadante foi retirado e adicionado clorofórmio (600 µL). Após uma nova centrifugação a 14.000 rpm por 15 minutos (4 °C), o sobrenadante foi transferido e misturado com isopropanol 100% gelado. Para a amostra do macho, a mistura foi deixada em *overnight* para precipitação do DNA, enquanto para a fêmea, a precipitação foi realizada por 1 hora no freezer a -80 °C.

Em seguida, foi centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o DNA foi deixado secar na estufa a 55°C. Para finalizar foi ressuscitado em 27 µL de TE e deixado eluir *overnight*, procedimento realizado para o macho e fêmea.

A concentração e a qualidade e pureza do DNA genômico foi estimada no espectrofotômetro Nanovue da GE Healthcare® e a sua integridade, após corrida eletroforética à 60 V por 1 hora, em gel de agarose 0,8% corado com 2 µL de Gel Red (Biotium®) mais tampão de carregamento azul de bromofenol (1:1). Posteriormente, fotodocumentado sob luz ultravioleta no Imagequant Las 4000 da GE Healthcare®.

O DNA de um macho e uma fêmea de *A. pantina* foi sequenciado com baixa cobertura 3X na plataforma Illumina HiSeq 2000, no Centro de Estudos do Genoma Humano e Células-Tronco da Universidade de São Paulo (USP).

4.3 ANÁLISE DE CITOMETRIA DE FLUXO

Para estimar o tamanho do genoma de *A. pantina*, foram processados três fêmea e três machos separadamente para análise por citometria de fluxo. A cabeça, o pronoto e as pernas de cada indivíduo foram maceradas em um tubo Eppendorf de 1,5 mL contendo 100 µL de solução de lise (MgCl₂.7H₂O 9,53 mM; KCl 47,67 mM; Tris 15 mM; Sacarose 74 mM; Triton X-100 0,6%) (Xavier *et al.*, 2017). Em seguida, foram adicionados mais 100 µL da mesma solução. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 20 minutos, sendo agitadas em um vortex a cada 4 minutos. Posteriormente, foram adicionados 800 µL de solução corante com DAPI (CyStain® UV Ploidy) e mantidos por 4 minutos antes da leitura no citômetro de fluxo Ploidy Analyzer (Sysmex). O genoma do peixe *Psalidodon aff. fasciatus* foi utilizado como padrão de referência, com um tamanho de genoma estimado em 1,37 pg.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DO SATELITOMA

Para a análise bioinformática das bibliotecas de *A. pantina* (macho e fêmea) foi

utilizado o protocolo SatMiner, uma ferramenta para mineração e análise de satDNA, conforme descrito por Ruiz-Ruano *et al.* (2016). As ferramentas RepeatExplorer2 e Tandem Repeat Analyzer (TAREAN), ambas disponíveis na plataforma Galaxy (<https://galaxy-elixir.cerit-sc.cz/>) foram acessadas em 2024 (Novák *et al.*, 2010). Primeiramente, foi realizada a avaliação da qualidade das bibliotecas utilizando o programa FastQC (Andrews, 2010). Em seguida, os adaptadores do NGS foram removidos com o software Trimmomatic v0.39 (Bolger, Lohse, Usadel *et al.*, 2014), utilizando as seguintes opções de parâmetros: “ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE.fa:2:30:10 LEADING:3 TRAILING:3 SLIDINGWINDOW:4:15 MINLEN:151 CROP:151”. A partir das bibliotecas limpas, foram tomadas subamostras de 500.000 leituras para cada biblioteca com o programa Seqtk (<https://github.com/lh3/seqtk>). Em seguida, as bibliotecas foram concatenadas e carregadas no RepeatExplorer2 (Novák *et al.*, 2020). Após a análise inicial no RepeatExplorer2 dois arquivos foram gerados: um contendo sequências de satDNA de alta confiança e outro com sequências de baixa confiança. Esses arquivos foram baixados, combinados e submetidos a uma nova filtragem utilizando o software DeconSeq (Schmieder, Edwards, 2011) para remover contaminantes e sequências indesejadas. Em seguida esse novo arquivo foi carregado no TAREAN para uma nova busca de famílias de satDNA. Esse processo foi repetido até não encontrar mais sequências de satDNA.

Ao todo foram realizadas cinco rodadas de análise utilizando o RepeatExplorer2 (Novák *et al.*, 2020) e o TAREAN (Novák *et al.*, 2017), seguidas de filtrações adicionais com o software DeconSeq (Schmieder, Edwards, 2011), até que nenhuma sequência de satDNA fosse detectada. Após a mineração dos candidatos a satDNA, foi realizada a detecção de famílias multigênicas (famílias de rDNA, snDNA, histonas) e DNA mitocondrial (COI) nas sequências obtidas com o programa Geneious v.7.1.3 (Drummond *et al.*, 2009). Além disso, as sequências foram submetidas à plataforma BLASTn do NCBI para descartar possíveis falsos positivos de DNA satélite. Em seguida, utilizando o software RepeatMasker (Smit *et al.*, 2013) com o motor de busca RMBlast foi realizada uma busca de homologia entre as sequências de consenso (macho e fêmea) encontradas. As sequências foram agrupadas como pertencentes ao mesmo satélite quando a similaridade foi superior a 95%, como variantes entre 80% e 95%, como superfamília entre 50% e 80% e como satélites diferentes quando inferior a 50% (Ruiz-Ruano *et al.*, 2016). Em seguida, a abundância e a divergência dos satélites foram estimadas utilizando o programa RepeatMasker (Smit *et al.*, 2013). As famílias de satDNA foram organizadas em ordem decrescente de abundância e nomeadas de acordo com o padrão proposto por Ruiz-Ruano *et al.* (2016).

A divergência média foi calculada, e os gráficos de divergência e abundância foram gerados com base nas distâncias entre as sequências. Para isso, aplicou-se o modelo de Kimura de 2 parâmetros utilizando o script Perl *calcDivergenceFromAlign.pl*, disponível no pacote RepeatMasker (Smit et al., 2013). O alinhamento das sequências foi realizado no software Geneious v.7.1.3 (Drummond et al., 2009), a fim de verificar as similaridades entre os monômeros das diferentes superfamílias e variantes de satDNA. Em seguida, o programa R foi utilizado, juntamente com o pacote ggplot2, para gerar os gráficos. A abundância e a divergência das diferentes famílias de satDNA foram comparadas entre machos e fêmeas, destacando-se os satDNAs enriquecidos nas bibliotecas de cada sexo. Para identificar diferenças nas abundâncias, foi calculada a proporção M/F, que representa a razão entre os valores de abundância das famílias de satDNA nos machos (M) e nas fêmeas (F). O teste de Wilcoxon também foi utilizado para verificar possíveis diferenças significativas nas abundâncias entre as famílias de satDNA identificadas (Wilcoxon, 1945).

4.5 ANOTAÇÃO DO GENOMA MITOCONDRIAL (mtDNA)

Os resultados do sequenciamento de *A. pantina* foram analisados quanto à qualidade utilizando o software FastQC (Andrews, 2010). Em seguida, as leituras foram processadas no Trimmomatic v.0.36 (Bolger, Lohse, Usadel *et al.*, 2014), para a remoção de adaptadores e filtragem de sequências de baixa qualidade. O mtDNA de *A. pantina* foi montado utilizando o programa GetOrganelle (Jin *et al.*, 2020), com o mtDNA de referência de *Omophoita sp.* (código de acesso: MG021084), disponível no GenBank. A sequência consenso do mitogenoma foi submetida à plataforma Proksee (<https://proksee.ca>) para as anotações, usando a ferramenta MITOS2 (Donath *et al.*, 2019). Os parâmetros empregados foram: Referência: RefSeq 63 Metazoa e código genético: 5 (invertebrados).

5 RESULTADOS

Os resultados estão organizados em forma de artigo científico em dois capítulos, conforme as normas de escrita exigidas pela Instituição.

5.1 ANÁLISE DO SATELITOMA DE *Alagoasa pantina* Bechyne, 1958 (COLEOPTERA, ALTICINI) MOSTRA DIVERSIDADE DE DNA SATÉLITE

RESUMO

A subtribo Oedionychina (Alticini) destaca-se por apresentar cromossomos sexuais gigantes e assinápticos, um padrão citogenético incomum e de interesse para estudos evolutivos. No entanto, os mecanismos que levaram à origem e diferenciação desses cromossomos ainda são pouco compreendidos. Em diferentes grupos de organismos, a amplificação de sequências repetitivas tem sido associadas com a evolução e diferenciação dos cromossomos sexuais. Entre essas sequências, os DNAs satélites (satDNAs) são componentes genômicos amplamente distribuídos, frequentemente acumulados em regiões heterocromáticas. No entanto, apesar da relevância desse tipo de dado, ainda não há caracterizações do satelitoma para o gênero *Alagoasa*. Até o momento, a única descrição disponível refere-se a *Omophoita octoguttata*, um gênero próximo de *Alagoasa*, na qual foram identificadas famílias de satDNA possivelmente associadas aos cromossomos sexuais. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo caracterizar o satelitoma de *Alagoasa pantina*, por meio de abordagens baseadas no sequenciamento de nova geração (NGS) e análises *in silico*. Buscamos compreender a composição, abundância e distribuição das famílias de satDNA, além de avaliar possíveis diferenças entre os sexos e sua relação com a evolução dos cromossomos sexuais gigantes e assinápticos. Após cinco iterações, foram identificadas 87 famílias de satDNAs no genoma de *A. pantina*. O tamanho do genoma diploide foi estimado em aproximadamente 4,54 Gb nas fêmeas e 4,24 Gb nos machos, com o satDNA representando uma fração significativa desse conteúdo. O satDNA corresponde a 8,70% do genoma feminino (395 Mb) e 9,52% do masculino (404 Mb), estando presente em ambos os sexos. O comprimento das unidades de repetição (RUL) das famílias de satDNA variaram de 4 pb a 4070 pb, apresentando um viés para alta composição de A+T, com uma mediana de 63,42%. Algumas dessas famílias exibiram diferenças na abundância entre macho e fêmea, sugerindo um possível papel na diferenciação dos cromossomos sexuais gigantes e assinápticos.

Palavras-chave: Cromossomos Sexuais; DNA repetitivo; NGS.

ABSTRACT

The subtribe Oedionychina (Alticini) is notable for exhibiting giant, asynaptic sex chromosomes, an unusual cytogenetic pattern of interest for evolutionary studies. However, the mechanisms leading to the origin and differentiation of these chromosomes are still poorly understood. In different organismal groups, the amplification of repetitive sequences has been associated with the evolution and differentiation of sex chromosomes. Among these sequences, satellite DNAs (satDNAs) are widely distributed genomic components, frequently accumulated in heterochromatic regions. However, despite the relevance of this type of data, there are still

no satelitome characterizations for the genus *Alagoasa*. To date, the only available description refers to *Omophoita octoguttata*, a closely related genus to *Alagoasa*, in which satDNA families potentially associated with sex chromosomes were identified. In this context, the present study aimed to characterize the satelitome of *Alagoasa pantina* using next-generation sequencing (NGS) approaches and *in silico* analyses. We sought to understand the composition, abundance, and distribution of satDNA families, as well as to evaluate possible differences between sexes and their relationship with the evolution of giant, asynaptic sex chromosomes. After five iterations, 87 satDNA families were identified in the *A. pantina* genome. The diploid genome size was estimated at approximately 4.54 Gb in females and 4.24 Gb in males, with satDNA representing a significant fraction of this content. SatDNA corresponds to 8.70% of the female genome (395 Mb) and 9.52% of the male genome (404 Mb), being present in both sexes. The repeat unit lengths (RUL) of the satDNA families ranged from 4 bp to 4070 bp, showing a bias towards a high A+T composition, with a median of 63.42%. Some of these families exhibited differences in abundance between males and females, suggesting a possible role in the differentiation of giant, asynaptic sex chromosomes.

Keywords: Sex Chromosomes; Repetitive DNA; NGS.

INTRODUÇÃO

O genoma dos eucariotos é composto por uma ampla diversidade de sequências repetitivas de DNA, incluindo DNA satélite (satDNA), elementos transponíveis (TEs) e famílias multigênicas (López-Flores; Garrido-Ramos, 2012; Biscotti *et al.*, 2015, Garrido-Ramos *et al.*, 2015, 2017). Dentre essas sequências, os satDNA se destacam como uma classe altamente abundante e dinâmica. Constituem sequências não codificantes, que podem estar organizadas *in tandem*, e que apresentam uma grande variação quanto ao tamanho das unidades de repetição (RUL), composição de nucleotídeos, número de cópias e distribuição multiloci no genoma (Charlesworth *et al.*, 1994; Palomeque, Lorite, 2008; Garrido-Ramos, 2015; Ruiz-Ruano *et al.*, 2018).

Do ponto de vista estrutural, tem sido visto que os satDNA podem estar localizadas nas regiões centroméricas e teloméricas dos cromossomos, coincidindo com a heterocromatina, embora também possam ocorrer em regiões eucromáticas intersticiais (Charlesworth *et al.*, 1994; Plohl *et al.*, 2012; Cabral-De-Mello *et al.*, 2023; Rico-Porras *et al.*, 2024). Nas últimas décadas, diversos estudos têm evidenciado que essas sequências repetitivas desempenham funções estruturais e funcionais relevantes, incluindo a organização do centrômero, montagem do cinetócoro, pareamento cromossômico durante a meiose e a correta segregação dos cromossomos (Henikoff *et al.*, 2001, Plohl; Meštrović; Mravinac, 2012; 2014). Além dessas funções estruturais, os satDNAs desempenham um papel importante nos processos evolutivos. Suas altas taxas de evolução e variação no número de cópias, contribuem para processos de

especiação e no estabelecimento do isolamento reprodutivo (Ferree, Barbash, 2022).

O acúmulo de satDNA na heterocromatina constitutiva tem sido associada à diferenciação e evolução dos cromossomos sexuais em diversos táxons de animais e plantas, sobretudo por seu papel na supressão da recombinação entre cromossomos homomórficos (Ellegren, 2011; Wei, Barbash, 2015; Furman *et al.*, 2020). Estudos recentes reforçam a associação entre o acúmulo de DNA repetitivo e a diferenciação dos cromossomos sexuais (Mariotti *et al.*, 2009; Palacios-Gimenez *et al.*, 2017; Gatto *et al.*, 2018; Utsunomia *et al.*, 2019; Cabral-de-Mello *et al.*, 2021; Kretschmer *et al.*, 2022; Vidal *et al.*, 2025). Dessa forma, identificação e caracterização dessas sequências podem ser fundamentais para compreender os mecanismos relacionados a evolução e diferenciação dos cromossomos sexuais.

Os besouros da tribo Alticini (Oedionychina, Chrysomelidae) além do número diploide constante $2n = 22$, fórmula meiótica $10II + X + Y$, têm como principal característica cromossomos sexuais gigantes e assinápticos. Essas características têm sido amplamente discutidas em espécies do gênero *Alagoasa*, *Omophoita* e *Walterianella* (Virkki, 1988, Mello *et al.*, 2014, Vidal *et al.*, 2014; Azambuja, 2018, Azambuja *et al.*, 2020). No entanto, há escassez de estudos mais refinados como a caracterização do satelitoma nessa tribo. A amplificação de sequências repetitivas, especialmente satDNA, pode estar associada à evolução dos cromossomos sexuais gigantes nesse grupo. Diante disso, este estudo tem como objetivo caracterizar o satelitoma de *A. pantina* por meio do NGS, aliado a análises bioinformáticas. Além disso, realizamos uma análise comparativa das sequências de satDNA entre machos e fêmeas, a fim de identificar possíveis famílias específicas de sexo que possam estar relacionadas à diferenciação dos cromossomos sexuais.

MATERIAL E MÉTODOS

AMOSTRAS

Foram amostrados um macho e uma fêmea da espécie *A. pantina*, Alticini. Os espécimes foram coletados utilizando puçá entomológico em populações naturais localizadas no Distrito de Itaiacoca, Ponta Grossa, Paraná, Brasil (25°07'19" S 49°56'24" W), 2024. As espécies foram coletadas com a autorização do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio MMA / IBAMA / SISBIO, número 15402 e o acesso ao patrimônio genético cadastrado

no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado com o código A3076BE, no Ministério do Meio Ambiente.

ANÁLISE DE CITOMETRIA DE FLUXO

Para estimar o tamanho do genoma de *A. pantina* foram processados três machos e três fêmeas (separadamente) para análise por citometria de fluxo. A cabeça, o pronoto e as pernas de cada indivíduo foram colocadas em um tubo Eppendorf de 1,5 mL contendo 100 µL de solução de lise (MgCl₂.7H₂O 9,53 mM; KCl 47,67 mM; Tris 15 mM; Sacarose 74 mM; Triton X-100 0,6%) (Xavier *et al.*, 2017) e macerados. Em seguida, foram adicionados mais 100 µL da mesma solução. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 20 minutos, sendo agitadas em um vortex a cada 4 minutos. Posteriormente, foram adicionados 800 µL de solução corante com DAPI (CyStain® UV Ploidy) e mantidos por 4 minutos antes da leitura no citômetro de fluxo Ploidy Analyzer (Sysmex). O peixe *Psalidodon aff. fasciatus* foi utilizado como padrão de referência, com um tamanho de genoma estimado em 1,37 pg.

EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO, SEQUENCIAMENTO (NGS) E CARACTERIZAÇÃO DO SATELITOMA

O DNA genômico foi extraído a partir da fragmentação, da cabeça, pronoto e do terceiro par de pernas de um macho e uma fêmea adultos de *A. pantina*, seguindo o protocolo padrão de fenol-clorofórmio (Sambrook; Fritsch, Maniatis *et al.*, 1989). As amostras foram quantificadas utilizando o espectrofotômetro Nanovue (GE Healthcare®), e sua integridade foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 0,8%.

O DNA de um macho e uma fêmea de *A. pantina* foi sequenciado com baixa cobertura 3X na plataforma Illumina HiSeq 2000, no Centro de Estudos do Genoma Humano e Células-Tronco da Universidade de São Paulo (USP).

Para a análise bioinformática das bibliotecas do macho e fêmea seguiu-se o protocolo SatMiner de Ruiz-Ruano *et al.* (2016). Inicialmente, a qualidade das bibliotecas foi avaliada com FastQC (Andrews, 2010). e os adaptadores do sequenciamento NGS foram removidos pelo Trimmomatic v.0.36 (Bolger, Lohse, Usadel *et al.*, 2014). A partir das bibliotecas limpas, foram tomadas subamostras de 500.000 leituras para cada biblioteca com o programa Seqtk (<https://github.com/lh3/seqtk>). Após essa etapa, as bibliotecas foram concatenadas e carregadas no RepeatExplorer2 (Novák *et al.*, 2020). Após a análise inicial no RepeatExplorer2 dois

arquivos foram gerados: um contendo sequências de satDNA de alta confiança e outro com sequências de baixa confiança. Esses arquivos foram baixados, combinados e submetidos a uma nova filtragem utilizando o software DeconSeq (Schmieder, Edwards, 2011) para remover contaminantes e sequências indesejadas. Em seguida esse novo arquivo foi carregado no TAREAN para uma nova busca de famílias de satDNA. Esse processo foi repetido até não encontrar mais sequências de satDNA. Esse procedimento foi repetido cinco vezes com RepeatExplorer2 (Novák *et al.*, 2020), TAREAN (Novák *et al.*, 2017), e DeconSeq (Schmieder; Edwards, 2011) até que nenhuma sequência de satDNA fosse detectada.

Após a mineração dos candidatos a satDNA, foi feita a detecção de famílias multigênicas (rDNA, snDNA, histonas) e DNA mitocondrial (COI) com o programa Geneious v.7.1.3 (Drummond *et al.*, 2009). As famílias satDNA foram nomeadas de acordo com Ruiz-Ruano *et al.* 2016, incluindo a abreviatura do nome da espécie, um número em abundância decrescente e o comprimento da sequência de repetição. As sequências obtidas foram submetidas ao BLASTn do NCBI para eliminar possíveis falsos positivos. A busca de homologia entre as sequências de consenso de machos e fêmeas foi realizada com RepeatMasker (Smit *et al.*, 2013) usando o motor de busca RMBlast. Com base na similaridade calculada no Geneious, as sequências foram definidas como pertencentes ao mesmo satélite, variantes, superfamílias ou satélites distintos (Ruiz-Ruano *et al.*, 2016).

A divergência média foi calculada com base nas distâncias entre as sequências, utilizando o modelo de Kimura de 2 parâmetros. E em seguida, os gráficos de divergência e abundância foram gerados por meio do script Perl calcDivergenceFromAlign.pl, disponível no pacote RepeatMasker (Smit *et al.*, 2013). A abundância e a divergência das famílias de satDNA foram comparadas entre machos e fêmeas, com ênfase nas sequências enriquecidas em cada sexo. Para avaliar diferenças na abundância, foi calculada a proporção M/F, que representa a razão entre os valores de machos (M) e fêmeas (F). Também foi aplicado o teste de Wilcoxon para avaliar se havia diferenças significativas nas abundâncias entre as famílias de satDNA identificadas (Wilcoxon, 1945).

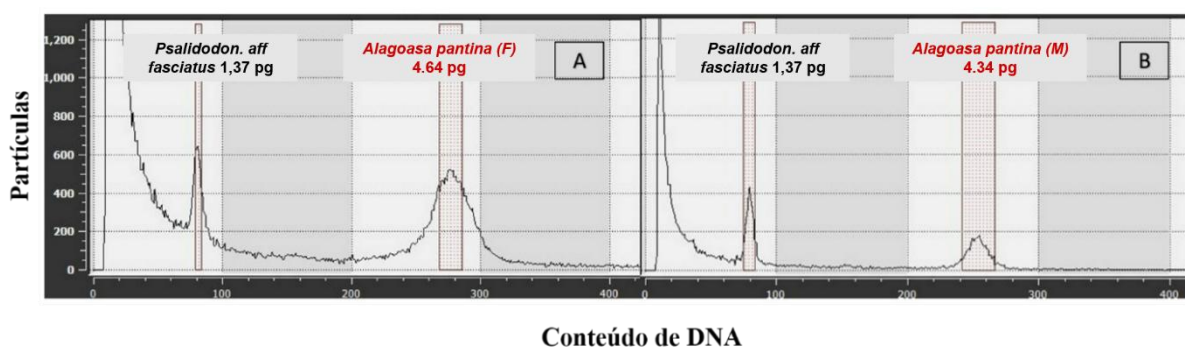
Por fim, o alinhamento das sequências para as famílias de satDNA encontradas foi realizado no software Geneious v.7.1.3 (Drummond *et al.*, 2009). Os gráficos foram plotados no programa R (R Core Team, 2023), utilizando o pacote ggplot2 (Wickham, 2016).

RESULTADOS

Determinação do tamanho do genoma de *Alagoasa pantina*

O tamanho do genoma diploide de *A. pantina* foi estimado em aproximadamente 4,64 picogramas (pg) para a fêmea (cerca de 4,54 GB) e 4,34 pg (4,24 GB) para o macho (Figura 5.1).

Figura 5.1 - Gráfico de citometria de de fluxo representando o tamanho do genoma de *A. pantina*. O primeiro pico em A e B corresponde ao tamanho do genoma (2n) do peixe *Psalidodon aff. Fasciatus*. O segundo pico em A representa o tamanho do genoma da fêmea e o segundo pico em B corresponde ao tamanho do genoma do macho de *A. pantina*.



Fonte: o autor.

Descrição do Satelitoma de *Alagoasa pantina*

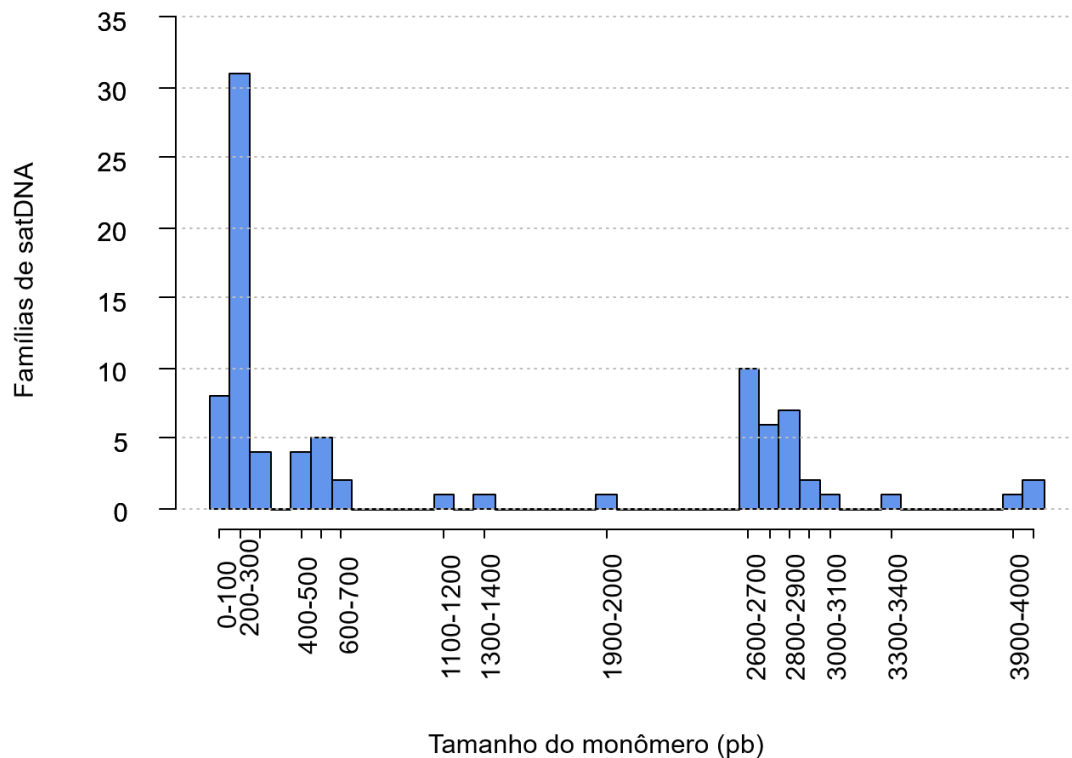
O sequenciamento de *A. pantina* foi realizado na plataforma Illumina HiSeq 2000, com cobertura média de 3X, gerando aproximadamente 97,7 milhões de leituras pareadas (151 pb) para a fêmea e 92,5 milhões para o macho (151 pb). A análise do satelitoma de *Alagoasa pantina* identificou 87 famílias distintas de satDNA que foram nomeadas com base em uma convenção proposta por Ruiz-Ruano et al. (2016). O nome das famílias se inicia com a abreviação da espécie (Apan), seguida da designação “Sat”, um número indicativo da ordem decrescente de abundância, e o comprimento da unidade de repetição em pares de bases. Dessa forma, as famílias foram nomeadas de ApanSat01-4 (mais abundante) a ApanSat87-30 (menos abundante). Essas sequências correspondem a 8,70% do genoma da fêmea (394,89 Mb) e a 9,52% do genoma do macho (404,02 Mb), conforme detalhado no Apêndice A.

A análise de homologia de satDNAs revelou similaridade entre 20 famílias, as quais foram agrupadas em nove superfamílias. A similaridade entre as sequências variou conforme a superfamília: a superfamília SF1 apresentou 79% de similaridade, a superfamília SF2 teve 52%, a superfamília SF3 variou entre 60% e 71%, a superfamília SF4 apresentou 54%, a superfamília SF5 teve 75%, a superfamília SF6 possui 65%, a superfamília SF7 apresentou 66%, a superfamília SF8 teve 60% e a superfamília SF9 apresentou 51% de similaridade (Apêndice B)

Uma ampla variação no comprimento das unidades de repetição (RUL) das famílias de satDNAs foi observada, com valores que variam 4 pb (ApanSat01-4) até 4070 pb

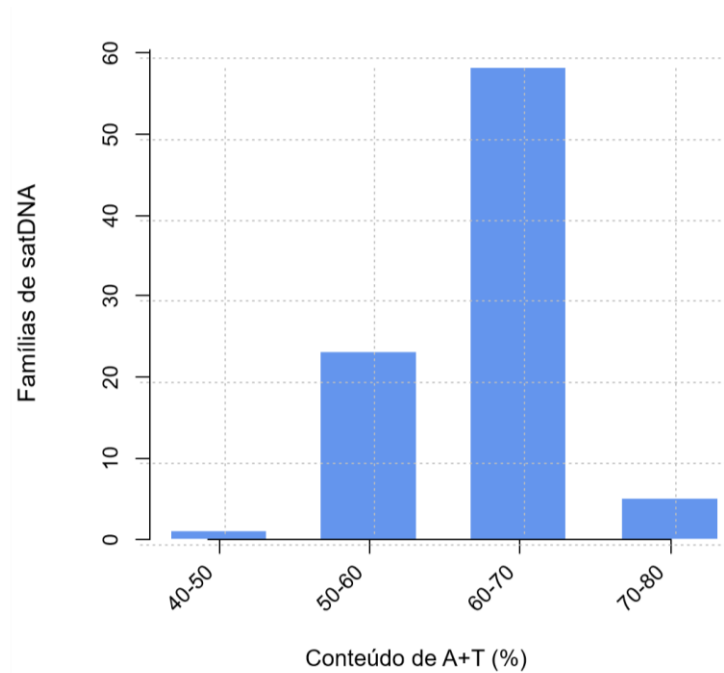
(ApanSat039-4070), com uma mediana de 425 pb. Com base nessa variação de tamanhos, três agrupamentos principais foram identificados: o primeiro inclui famílias de satDNA menores que 300 pb; o segundo agrupa aquelas com tamanhos variando entre 400 pb e 700 pb; e o terceiro, que inclui famílias com tamanhos entre 2600 pb a 3100 pb. Dessas, o tamanho de monômero mais comum encontrado entre as famílias varia entre 100 e 200 pb, com 31 famílias (Apêndice A, Figura 5.2). O conteúdo de A+T dos satDNA identificados varia entre 47,43% a 75%, com uma mediana de 63,42%, indicando um viés em favor das famílias de satDNA com uma alta porcentagem de A+T. Das famílias caracterizadas cerca de 65 apresentaram um conteúdo de A+T entre 60 e 70% (Apêndice A, Figura 5.3).

Figura 5.2 - Distribuição tamanho das 87 famílias de satDNA para *A. pantina*.



Fonte: o autor.

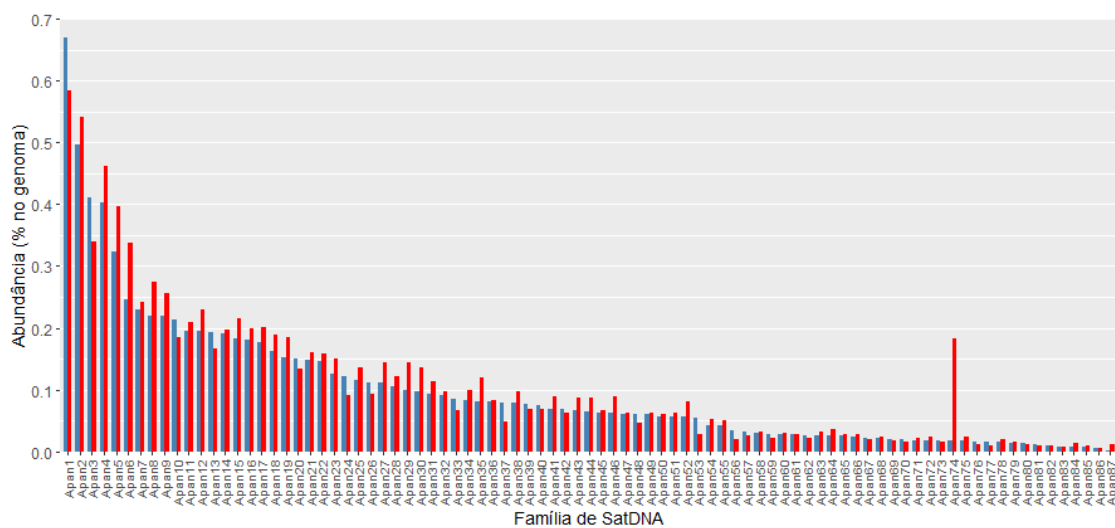
Figura 5.3 - Distribuição do conteúdo de de A+T (%) para as 87 famílias de *A. pantina*.



Fonte: o autor.

As 87 famílias de satDNAs identificadas estão presentes tanto na fêmea quanto no macho de *A. pantina*, porém com diferenças na abundância de cada família entre os sexos. O gráfico abaixo ilustra essas variações, mostrando a distribuição percentual específica para cada uns dos sexos (Figura 5.4).

Figura 5.4 - Comparação da abundância das 87 famílias de satDNAs no genoma da fêmea (azul) e macho (vermelho) de *A. pantina* - O eixo x representa as famílias de satDNAs (numeradas de 1 a 87), e o eixo y indica a abundância relativa (em porcentagem) para cada umas das famílias.



Fonte: o autor.

A partir do cálculo da razão de abundância M/F, observou-se que as famílias ApanSat29-2738, ApanSat74-178, ApanSat87-30 e ApanSat84-152 são mais abundantes no genoma dos machos, enquanto as famílias ApanSat53-107, ApanSat76-129, ApanSat77-27 e ApanSat53-107 são mais enriquecidas no genoma das fêmeas (Apêndice A).

Para analisar esses padrões, comparamos os *repeat landscapes* para os ApanSatDNAs que exibiram variação entre macho e fêmea de *A. pantina*. Nestes gráficos, o eixo x representa a divergência das sequências repetitivas em relação ao consenso (calculada pelo modelo K2P de Kimura), enquanto o eixo y indica a abundância relativa dos satDNAs. A família ApanSat32-3005 foi escolhida como referência por apresentar abundâncias semelhantes entre os sexos, o que permitiu verificar um padrão de distribuição equilibrado. Importante destacar que os gráficos foram gerados independentemente para cada família, sem utilizar a ApanSat32-3005 como parâmetro de construção. Esta família específica foi incluída na análise comparativa apenas como referência visual, pois apresenta abundâncias similares entre macho e fêmea, servindo como controle para contrastar com as demais famílias que exibem variações mais acentuadas (Figura 5.5).

A análise comparativa dos *repeat landscapes* revelou padrões distintos na distribuição dos satDNAs entre macho e fêmea de *A. pantina*. Entre as famílias analisadas, ApanSat32-3005, utilizada como controle, apresentou curvas muito similares entre machos e fêmeas, sem diferenças significativas na abundância. Padrão similar foi observado em ApanSat29-2738, embora esta apresentasse uma ligeira predominância inicial nos machos que se equilibrava progressivamente em níveis maiores de divergência.

As famílias ApanSat53-107, ApanSat74-178 e ApanSat84-152 apresentaram diferenças mais marcantes entre os sexos. A primeira família ApanSat53-10 apresentou uma predominância nas fêmeas, com pico principal mais abundante. Em contraste, ApanSat74-178 apresentou abundância maior nos machos, indicando uma amplificação. Além de apresentarem diferenças entre as abundâncias, a curva está deslocada em relação ao 0 no eixo x, indicando que essas famílias podem ter divergindo ao longo do tempo entre os sexos. Enquanto ApanSat84-152 mostrou uma abundância inicial relativamente maior no macho, com uma homogeneização presente para ambos os sexos e com poucas mutações.

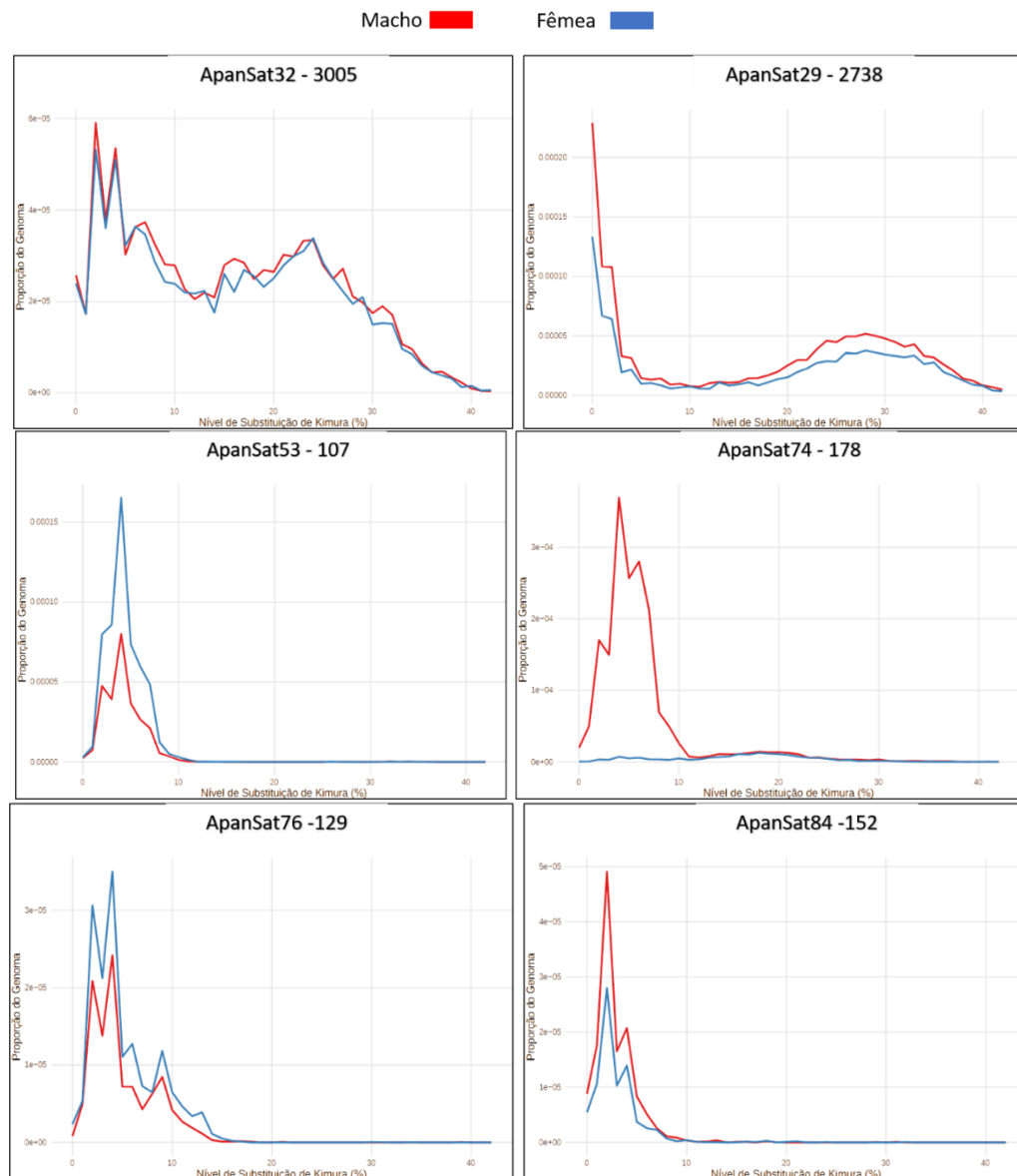
Para ApanSat76-129, observa-se um pico principal de abundância, com a fêmea apresentando uma abundância ligeiramente maior. À medida que a divergência aumenta, a abundância diminui para ambos os sexos.

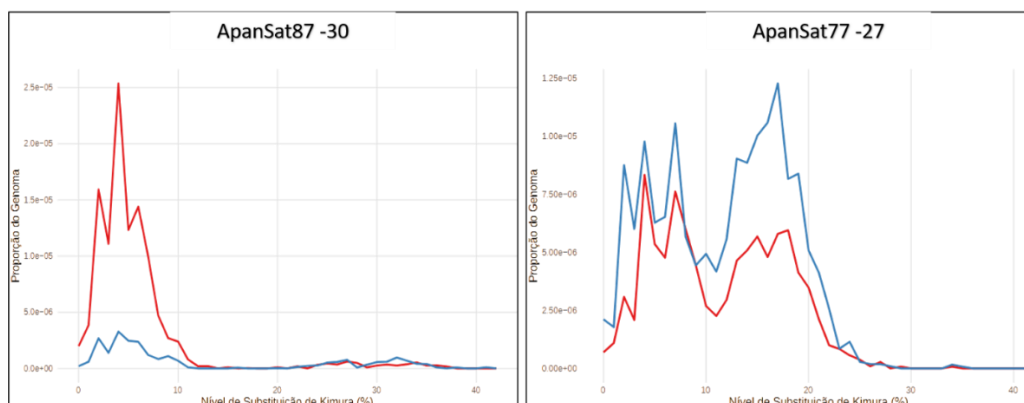
Para as famílias ApanSat87-30, observa-se uma predominância da curva correspondente ao macho, indicando maior abundância destas sequências no genoma do macho.

O perfil do gráfico apresenta um declínio gradual após o pico principal, sugerindo a presença de cópias com mutações acumuladas. O pico bem definido e estreito revela a existência de um conjunto principal de cópias altamente homogêneas, característica típica de famílias que passaram por processos de homogeneização.

Quanto à família ApanSat77-27, o padrão observado difere significativamente. A curva azul, representativa das fêmeas, mostra maior abundância em relação à vermelha dos machos. A distribuição ao longo do gráfico se apresenta mais complexa, com múltiplos picos de abundância em diferentes níveis de divergência. Esta configuração está associada à ausência de um único pico dominante.

Figura 5.5 - *Repeat landscapes* dos satDNA em *A. pantina*. O eixo x representa a divergência (nível de substituição K2P) e o eixo y mostra a abundância relativa. São apresentados ApanSat32-3005 (controle, com distribuição equilibrada entre sexos) e sete famílias com abundância diferencial entre machos e fêmeas.



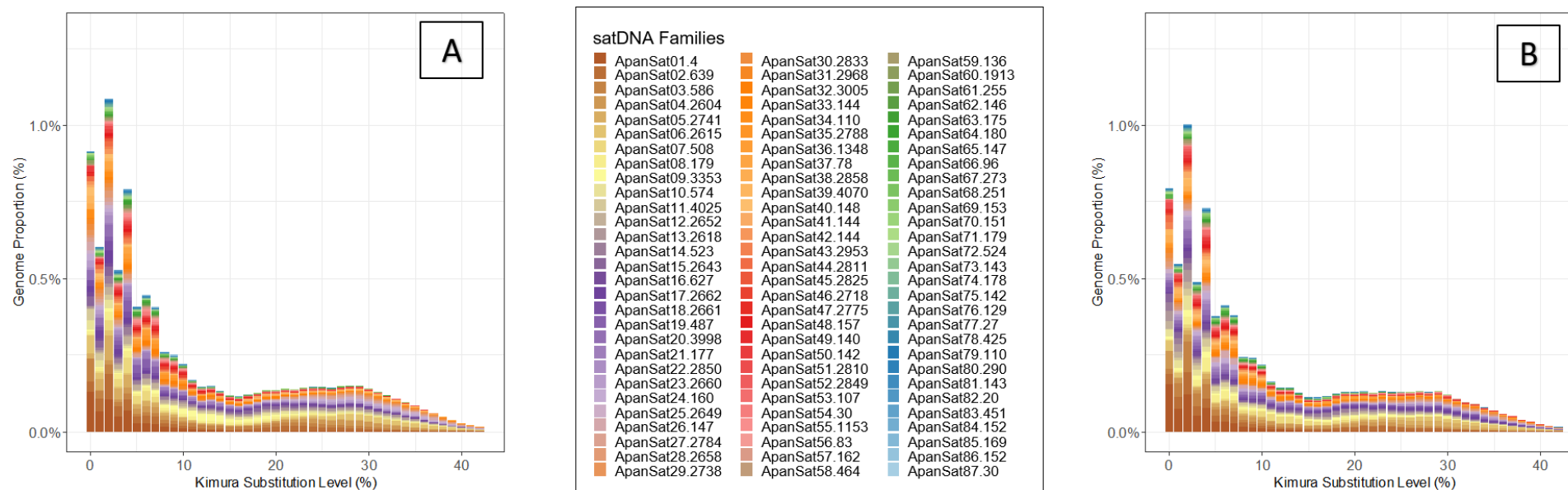


Fonte: o autor.

Para avaliar se há diferenças significativas nas abundâncias das 87 famílias de satDNA entre fêmeas e machos de *Alagoasa pantina*, foi utilizado o teste de Wilcoxon. A hipótese nula (H_0) considerou que a razão das abundâncias entre os sexos seria igual a 1:1, indicando ausência de diferença. A hipótese alternativa (H_1) assumida foi a de que a proporção das abundâncias entre os sexos é 1:1, indicando equilíbrio. O teste resultou em um valor de $p = 0,0253$. Considerando o nível de significância de $\alpha = 0,05$, rejeita-se a hipótese nula, o que indica que a abundância de algumas famílias de satDNA difere significativamente entre os sexos.

A análise da divergência para cada família de satDNA em *A. pantina* variou de 3% e 24,64% nas fêmeas, com uma mediana de 9,73%. O menor valor foi observado na família ApanSat75-142, enquanto o maior foi registrado na ApanSat54-30. Nos machos, os valores variaram de 3,15% a 22,42%, com os extremos representados pelas famílias ApanSat39-4070 e ApanSat27-2784, respectivamente (Tabela Suplementar S1). Essas estimativas de divergência foram calculadas com base no modelo de Kimura 2 parâmetros (K2P) e refletem o grau de acúmulo de mutações nas cópias de satDNA em relação à sua sequência consenso. Valores mais baixos indicam famílias mais recentes, enquanto maiores divergências sugerem famílias mais antigas. A análise dos *Repeat landscapes* para o satelitoma de *A. pantina*, tanto para o macho quanto para a fêmea, mostra a abundância (eixo y) das 87 famílias e a divergência (eixo x) em relação à sua sequência consenso (Figura 5.6). Nenhuma das sequências apresentou similaridade com outras sequências depositadas no GenBank.

Figura 5.6 - *Repeat landscapes* das 87 famílias de satDNA em *Alagoasa pantina*. Os gráficos mostram a abundância relativa (eixo Y) e a divergência em relação à sequência consenso (eixo X), calculada com base no modelo de Kimura 2 parâmetros (K2P). (A) Perfil do satelitoma nos machos. (B) Perfil correspondente nas fêmeas. Picos mais altos indicam famílias mais abundantes, enquanto os valores de divergência refletem o grau de divergência acumulado desde a amplificação das repetições.



Fonte: o autor.

DISCUSSÃO

Alagoasa pantina tem um sistema de determinação sexual X+Y, com cromossomos sexuais extremamente grande e totalmente assinápticos durante a meiose. Essas características são conservadas no gênero e ocorre em outras espécies de Oedionychina (Smith; Virkki, 1978; Virkki, 1968, Almeida *et al.*, 2006, 2009; Azambuja, 2018; Vidal *et al.*, 2022, 2025). Almeida *et al.* (2009) consideraram que esse sistema é altamente derivado quando comparado com os sistemas sexuais de outras espécies de Coleóptera Xyp, presente na tribo Galerucinae, filogeneticamente relacionado a Alticini. Alguns trabalhos com esse grupo têm proposto que diferentes tipos de DNA repetitivos podem estar relacionados com a heterocromatinização e o surgimento desses cromossomos sexuais gigantes (Mello *et al.*, 2014, Rosolen *et al.*, 2018, Vidal *et al.*, 2025).

Nesse sentido os dados com a análise do satelitoma de *A. pantina* mostraram a abundância de satDNA no genoma, sendo alguns diferencialmente abundante entre os sexos. Isso poderia reforçar a ideia de Vidal *et al.* (2005) que analisou o satelitoma de *O. octoguttata*, espécie de um gênero relacionado a *Alagoasa*, sugerindo que mutações e sequências repetitivas seriam responsáveis pelo aumento dos sexuais. Esses dados estão de acordo com os trabalhos que mostram que a amplificação de sequências repetitivas, como os satDNAs e os TEs podem estar relacionada à diferenciação desses cromossomos sexuais (Mariotti *et al.*, 2009, Palacios-Gimenez *et al.*, 2017, Gatto *et al.*, 2018; Crepaldi, Parise-Maltempi, 2020; Ferretti *et al.*, 2020; Serrano-Freitas *et al.*, 2020; Kretschmer *et al.*, 2022, Vidal *et al.*, 2025). Nosso estudo contribui para a compreensão da organização e evolução das sequências de satDNAs no genoma da espécie e na subtribo Oedionychina. Até o momento, a única espécie da subtribo com o satelitoma caracterizado é *Omophoita octoguttata* (Vidal *et al.*, 2025), na qual foram identificadas 49 famílias de satDNAs, representando aproximadamente 8–9% de seu genoma. Esse dado fornece um referencial importante para comparações dentro da tribo, permitindo avaliar padrões de diversidade e abundância dessas repetições.

A ampla variação das famílias de satDNAs identificadas em *A. pantina*, bem como sua abundância relativa, está em conformidade com os padrões observados em outros estudos sobre a caracterização dessas sequências em insetos, especialmente na ordem Coleoptera. Por exemplo, em espécies de coleópteros, como *Hippodamia variegata*, foram identificadas 30 famílias de satDNAs (Mora *et al.*, 2020), enquanto em *Rhynchophorus ferrugineus* foram encontradas 112 famílias (Montiel *et al.*, 2022). Em *Tribolium castaneum*, 46 famílias foram

caracterizadas (Gržan *et al.*, 2023), e em *Tenebrio molitor*, 11 famílias foram descritas (Oppert *et al.*, 2023). Por fim, em *Chrysolina americana*, o número de famílias de satDNAs chega a 165 (Rico-Porras *et al.*, 2024). Essa variação no número de famílias de satDNAs não se restringe apenas a essa ordem, mas também é encontrada em outras ordens de insetos. Em *Eneoptera surinamensis* (Orthoptera), por exemplo, foram identificadas 45 famílias (Palacios-Gimenez *et al.*, 2017), enquanto em *Drosophila melanogaster* (Diptera) (Kuhn, 2015) foram encontradas 16 famílias, e no gafanhoto *Locusta migratória* (Orthoptera), 62 famílias (Ruiz-Ruano *et al.*, 2016). Para Hemiptera, em *Triatoma delpontei* foram identificadas 160 famílias de satDNAs (Mora *et al.*, 2023), enquanto em *Triatoma infestans* foram encontradas 42 famílias (Pita *et al.*, 2017). Por fim, em *Holhymenia histrio*, 34 famílias de satDNAs foram caracterizadas, representando cerca de 17,07% do genoma, com a abundância por família variando de 0,0076% a 14,64% (Bardella *et al.*, 2020). Na ordem Lepidoptera, o satelitoma foi caracterizado para três espécies: *Ostrinia nubilalis*, com 4 famílias de satDNA; *Cydalima perspectalis*, com 1 família; e *Diatraea postlineella*, com 2 famílias (Cabral de Mello *et al.*, 2021).

Essa variação no número e na abundância de famílias de satDNAs entre diferentes espécies de insetos reflete não apenas a diversidade genômica desses organismos, mas também a complexidade evolutiva dessas sequências repetitivas no genoma. A caracterização dessas famílias em *A. pantina* e em outras espécies reforça a importância dos estudos de sequências repetitivas para compreender a organização, a dinâmica e a evolução dos genomas.

Outra característica interessante observada em *A. pantina* é que nenhuma família de satDNA é predominante, o que contrasta com o observado em várias outras espécies, nas quais uma ou poucas famílias tendem a prevalecer. Em nosso estudo, a família mais abundante de satDNA representa menos de 1% do genoma, uma porcentagem significativamente menor quando comparada a outros estudos com espécies de insetos. Para *O. octoguttata*, também Alticini, a família mais abundante, OocSat01-183, representa apenas 0,01995% nas fêmeas e 0,02027% nos machos, valores que estão em conformidade com os dados encontrados neste trabalho (Vidal *et al.*, 2025). Em *Hippodamia variegata*, a família mais abundante, HvarSat01-277, corresponde a 9,37% do genoma, enquanto a segunda mais representativa, HvarSat02-127, ocupa 2%, com as demais famílias apresentando abundância abaixo de 0,1% (Mora *et al.*, 2020). Em *Rhynchophorus ferrugineus*, a família mais abundante, RferSat01-169, representa 20,5% do genoma (Montiel *et al.*, 2022). Em *Tenebrio molitor*, das 11 famílias de satDNAs encontradas, TmSat1 é a mais abundante, constituindo 26,5% do genoma, enquanto as demais famílias ocupam proporções muito menores, variando de 0,45% (TmSat2) a 0,01% (TmSat11)

(Oppert *et al.*, 2023). Em *Holhymenia histrio*, a família HhiSat01 representa sozinha 14,64% do genoma, enquanto o segundo satDNA mais abundante corresponde a apenas 3,57% (Bardella *et al.*, 2020). Para *Tribolium castaneum*, a família TCsat15 é responsável por 1,7% do genoma, enquanto as 45 famílias de satDNAs restantes representam apenas 0,4% do genoma (Gržan *et al.*, 2023). Essa semelhança encontrada para espécies da ordem confirma a ideia de que em alguns grupos de insetos, a ausência de uma família de satDNA predominante pode ser uma característica compartilhada.

Em *A. pantina*, destaca-se a família ApanSat039, com uma RUL de 4070 pb, possivelmente a segunda maior família já descrita em Coleoptera. Até então, os maiores registros na ordem era a família CameSat120, de *Chrysolina americana*, com 3.664 pb (Rico-Porras *et al.*, 2024). E a família OocSat31 de *O. octoguttata* com 5042 pb (Vidal *et al.*, 2025). A ocorrência de famílias de satDNAs com monômeros altamente variáveis, como observado em *A. pantina*, reforça o dinamismo dessa fração repetitiva nos genomas dos Alticini. Especificamente, satDNAs com monômeros grandes, como os descritos aqui, são incomuns para os insetos. Embora satDNAs com RUL superiores a 1000 pb sejam raros em insetos, casos semelhantes já foram relatados em *Monomorium subopacum* (2500 pb) (Lorite *et al.*, 2004), *Triatoma infestans* (1000 pb) (Pita *et al.*, 2017) e em mariposas como *Cydalima perspectalis* (2244 pb) e *Diatraea postlineella*, que possui dois satDNAs acima de 1000 pb (Cabral-de-Mello *et al.*, 2021). Além disso, em *O. octoguttata*, os satDNAs variam de 16 a 5042 pb, sendo que 22 desses possuem RULs maiores que 1 kb (Vidal *et al.*, 2025). Esses achados evidenciam a diversidade e a complexidade dos satDNAs em insetos, destacando a importância de estudos genômicos para compreender a evolução e a organização dessas sequências repetitivas.

O enriquecimento do genoma em conteúdo de A+T observado em *A. pantina* é uma característica comum nos genomas de insetos, podendo, em algumas espécies, ultrapassar 70% (Mora *et al.*, 2020; Rico-Porras *et al.*, 2024). Entre os insetos, a média de conteúdo A+T relatada varia significativamente: em *O. octoguttata* os valores variam de 46% a 75% (Vidal *et al.*, 2025), 63,6% em *Hippodamia variegata* (Mora *et al.*, 2020), 67% em *Rhynchophorus ferrugineus* (Montiel *et al.*, 2022) e 64,17% em *Chrysolina americana* (Rico-Porras *et al.*, 2024). Em *Holhymenia histrio*, o conteúdo A+T das sequências consenso variou de 36,36% a 71,20% (Bardella *et al.*, 2020). Por fim, em *Eneoptera surinamensis*, variou de 15% a 67,15% (Palacios-Gimenez *et al.*, 2017). Esses dados reforçam a grande variabilidade no conteúdo de A+T entre diferentes espécies de insetos, destacando a importância dessa característica na organização e evolução dos genomas.

Os valores de divergência das famílias de satDNA em espécies da ordem Coleoptera variam amplamente, refletindo a dinâmica evolutiva dessas sequências repetitivas. Em *Rhynchophorus ferrugineus*, por exemplo, a divergência varia entre 0,48% na família RferSat66-431 e 25,36% na RferSat11-268, com uma média de 8,52% (Montiel *et al.*, 2022). Em *Chrysolina americana*, a média é de 9,91%, com valores variando de 1,77% (CameSat074-1625) a 26,18% (CameSat031-28) (Rico-Porras *et al.*, 2024). Para *Hippodamia variegata*, a divergência varia de 0,23% a 25,74%, com uma mediana de 5,75%. Os valores observados em *A. pantina* está dentro dessa faixa de variação encontrada para outras espécies da ordem. Essa ampla variação na divergência é influenciada por processos evolutivos como mutação, amplificação e homogeneização. A divergência é diretamente proporcional à taxa de mutação, mas inversamente relacionada à amplificação e homogeneização (Ruiz-Ruano *et al.*, 2018). Esses processos, em conjunto, moldam a diversidade e a dinâmica dos satDNAs, destacando a importância dessas sequências na evolução e organização dos genomas.

A análise comparativa dos catálogos de satDNA entre macho e fêmea de *A. pantina*, baseada na proporção de M/F das famílias identificadas, revelou diferenças na abundância desses elementos repetitivos entre os sexos. Algumas famílias apresentaram maior enriquecimento no genoma do macho, como ApanSat29-2738, ApanSat74-178 e ApanSat87-30, enquanto as famílias ApanSat53-107, ApanSat76-129, ApanSat77-27 e ApanSat 84-152 foram mais abundantes na fêmea. Essas famílias podem estar associadas com os cromossomos sexuais na espécie. No entanto, é necessário localizar essas famílias nos cromossomos por meio da técnica de FISH para confirmar se são específicas dos cromossomos sexuais e se estão associadas à diferenciação dos cromossomos sexuais gigantes na espécie. Além disso, esse padrão de diferenciação sexual na abundância de satDNA também foi observado em outras espécies, como *O. octoguttata* (Vidal *et al.*, 2025). O genoma da espécie apresenta 9,07% de satDNA no macho e 8,25% na fêmea. Dentre as 49 famílias caracterizadas, OocSat47 e OocSat48 foram encontradas exclusivamente no cromossomo X, enquanto OocSat15, OocSat20, OocSat21 e OocSat35 foram localizadas apenas no cromossomo Y. Essas famílias de satDNAs presentes nos cromossomos sexuais demonstraram ser específicas para o cromossomo X ou Y. Dessa forma, as famílias identificadas em *A. pantina*, que apresentam diferenças nas abundâncias, também podem ser específicas dos cromossomos sexuais.

Os dados obtidos para *A. pantina* são relevantes para ampliar o entendimento sobre a dinâmica evolutiva das sequências de satDNA na ordem Coleoptera, especialmente no contexto da diferenciação dos cromossomos sexuais gigantes observados em Oedionychina. A montagem do satelitoma permitiu identificar 87 famílias distintas de satDNA, algumas das

quais apresentaram diferenças significativas de abundância entre machos e fêmea, fornecendo dados importantes para estudos futuros. Essas análises serão essenciais para elucidar os padrões de amplificação e distribuição dessas sequências, contribuindo para uma melhor compreensão da evolução cromossômica e da diversificação genômica da tribo.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação Araucária de Apoio e Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná e ao NAPI Bioinformática pelo apoio financeiro e pela concessão da bolsa, assim como à Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), em especial ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, pela infraestrutura e pelas oportunidades proporcionadas ao longo de todo o mestrado.

REFERÊNCIAS

As referências deste artigo foram depositadas no final da dissertação.

5.2 GENOMA MITOCONDRIAL DE *Alagoasa pantina* Bechyne, 1958 (COLEOPTERA, ALTICINI)

RESUMO

A tribo Alticini, pertencente ao grupo Oedionychina da família Chrysomelidae, destaca-se pela diversidade e riqueza de espécies encontrada, especialmente na região Neotropical, onde 210 gêneros endêmicos são registrados. Além disso, várias espécies dessa tribo possuem importância ecológica e econômica. No entanto, o conhecimento genômico de Alticini ainda é limitado, com apenas dois mitogenomas de espécies neotropicais caracterizados na literatura. Este estudo teve como objetivo a caracterização do mitogenoma de *Alagoasa pantina*, uma espécie representativa da tribo Alticini. O sequenciamento foi realizado na plataforma Illumina HiSeq 2000, e os dados gerados passaram por um processo de controle de qualidade e análise bioinformática utilizando as ferramentas FastQC, Trimmomatic, GetOrganelle e MITOS2. A análise da organização do mitogenoma de *A. pantina* indicou a presença de 13 genes codificadores de proteínas, 22 genes de RNA de transferência (tRNAs), 2 genes de RNA ribossômico (rRNAs) e uma região de controle, essencial para a replicação e transcrição do genoma mitocondrial. A caracterização do mtDNA de *A. pantina* contribui para o avanço do conhecimento sobre a tribo Alticini, fornecendo novos dados genéticos que podem auxiliar na resolução de questões taxonômicas e no entendimento da evolução molecular desse grupo.

Palavras-chave: Chrysomelidae; DNAm, NGS.

ABSTRACT

The Alticini tribe, belonging to the Oedionychina group within the Chrysomelidae family, is notable for its diversity and richness of species, especially in the Neotropical region, where 210 endemic genera are recorded. Furthermore, several species within this tribe hold ecological and economic importance. However, genomic knowledge of Alticini remains limited, with only two mitogenomes from Neotropical species characterized in the literature. This study aimed to characterize the mitogenome of *Alagoasa pantina*, a representative species of the Alticini tribe. Sequencing was performed on the Illumina HiSeq 2000 platform, and the generated data underwent a quality control process and bioinformatics analysis using FastQC, Trimmomatic, GetOrganelle, and MITOS2 tools. Analysis of the *A. pantina* mitogenome organization indicated the presence of 13 protein-coding genes, 22 transfer RNA (tRNA) genes, 2 ribosomal RNA (rRNA) genes, and a control region, essential for mitochondrial genome replication and transcription. The characterization of *A. pantina* mtDNA contributes to advancing knowledge on the Alticini tribe, providing new genetic data that can aid in resolving taxonomic questions and understanding the molecular evolution of this group.

Keywords: Chrysomelidae; mtDNA; NGS

INTRODUÇÃO

A tribo Alticini (Chrysomelidae) agrupa cerca de 601 gêneros e 10 000 espécies descritas (Douglas *et al.*, 2023; Konstantinov *et al.*, 2023), com distribuição predominantemente tropical, especialmente na América do Sul, África e Ásia. Sendo que, a região Neotropical apresenta a maior diversidade de Alticini, com aproximadamente 210 gêneros endêmicos (Biondi, 2012; Linzmeier, 2013; Nadein, 2013). Apesar de sua diversidade e de seu papel ecológico e econômico, incluindo pragas de crucíferas como *Phyllotreta* spp. (Capinera, 2008), agentes de controle biológico de plantas invasoras (Roehrdanz *et al.*, 2006; Tansey *et al.*, 2005) e potenciais bioindicadores ambientais (Linzmeier *et al.*, 2006), a posição filogenética de muitos gêneros permanece incerta (Douglas *et al.*, 2023) devido ao mimetismo entre espécies e à sobreposição de caracteres morfológicos (Begosi, Benson, 1988).

Nesse contexto, o DNA mitocondrial (mtDNA) é um marcador molecular importante para elucidar relações sistemáticas e evolutivas em Alticini. O mtDNA de insetos é uma molécula circular de fita dupla, tipicamente entre 14 kb e 19 kb, contendo 13 genes codificadores de proteínas, 22 tRNAs, 2 rRNAs e uma região controle rica em A+T, importante para replicação e transcrição (Zhang, Hewitt, 1997; Wei *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2023; Dallagnol, Cònsoli, 2024). Dessa forma, a caracterização do mtDNA dessas espécies é fundamental para estudos evolutivos, fornecendo marcadores genéticos para análises filogenéticas e populacionais, delimitação taxonômica, estudos comparativos de evolução genômica, estimação de tempos de divergência e avaliação de padrões de diversificação (Barr *et al.*, 2005; Cameron, 2014; Song *et al.*, 2016; Hao *et al.*, 2017; Dallagnol, Cònsoli, 2024).

Como o desenvolvimento das tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS) associado a ferramentas bioinformáticas (Mardins, 2008) têm aumentado o número de trabalhos com a caracterização de mitogenomas para insetos. Desde a publicação do primeiro genoma mitocondrial de um inseto em 1985, com *Drosophila yakuba*, foram sequenciados representantes de todas as ordens, ampliando o conhecimento sobre a diversidade e evolução do DNA mitocondrial no grupo (Clary, Wolstenholme, 1985; Wang *et al.*, 2015, Cai, Yan, 2024, Dallagnol, Cônsoli, 2024).

No entanto, entre os Alticini, apenas dois mitogenomas de espécies neotropicais foram publicados até o momento, o que representa menos de 0,02% das espécies descritas. Um desses trabalhos é o de Vidal (2022), que descreveu o mitogenoma de *Omophoita octoguttata*. Sendo de dupla fita e circular, o mitogenoma descrito apresenta 16 549 pb e 16 398 pb em dois indivíduos, respectivamente, com a organização típica observada em insetos: 13 genes codificadores de proteínas (PCGs), 22 genes de RNA transportador (tRNAs), 2 genes de RNA ribossômico (rRNAs), além de duas origens de replicação.

Dessa forma, a ausência de estudos voltados à caracterização do mitogenoma em outros gêneros da tribo representa uma lacuna que limita avanços em estudos filogenéticos e evolutivos dentro de Alticini. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo caracterizar o mitogenoma de *Alagoasa pantina*, contribuindo para a ampliação do conhecimento genômico da tribo.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta da amostra, extração de DNA e sequenciamento

A espécie *A. pantina* foi coletada em habitat natural no Distrito de Itaiacoca, Município de Ponta Grossa, Paraná, Brasil (25°07'19"S 49°56'24"W), durante o ano de 2024. As espécies foram coletadas com a autorização do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio MMA / IBAMA / SISBIO, número 15402 e o acesso ao patrimônio genético cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado com o código A3076BE, no Ministério do Meio Ambiente.

A extração de DNA genômico foi realizada seguindo o protocolo estabelecido por Sambrook Fritsch, Maniatis *et al.* (1989) com adaptações. O material biológico para extração foi obtido através da fragmentação das seguintes estruturas morfológicas: cabeça, pronoto e terceiro par de pernas.

Por fim, o DNA de indivíduo de *A. pantina* foi enviado ao Centro de Estudos do Genoma Humano e Células-Tronco da Universidade de São Paulo (USP) para sequenciamento. O processo foi realizado com baixa cobertura (3X) na plataforma Illumina HiSeq 2000.

Anotação do Genoma Mitocondrial (mtDNA)

Os resultados do sequenciamento de *A. pantina* foram analisados quanto à qualidade utilizando o software FastQC (Andrews, 2010). Em seguida, as leituras foram processadas no *Trimmomatic* v.0.36 (Bolger *et al.*, 2014) para a remoção de adaptadores e filtragem de sequências de baixa qualidade. O mtDNA de *A. pantina* foi montado utilizando o programa GetOrganelle (Jin *et al.*, 2020), com o mtDNA de referência de *Omophoita sp.* (código de acesso: MG021084), disponível no GenBank. A sequência consenso do mitogenoma foi submetida à plataforma Proksee (<https://proksee.ca>) para as anotações, usando a ferramenta MITOS2 (Donath *et al.*, 2019). Os parâmetros empregados foram: Referência: RefSeq 63 Metazoa e código genético: 5 (invertebrados).

RESULTADOS

O sequenciamento de *A. pantina* foi realizado na plataforma Illumina HiSeq 2000, com cobertura média de 3X, gerando aproximadamente 92,5 milhões de leituras de 151 pb.

O genoma mitocondrial de *A. pantina* apresenta uma estrutura circular com 15.636 pares de base (pb) de comprimento, contendo um total de 35 genes funcionais. Esses genes incluem 13 genes codificadores de proteínas (PCGs), 20 genes de tRNA e 2 genes de rRNA (16S e 12S). Além disso, foram identificadas duas regiões não codificantes: a origem de replicação (Ori) e a região de controle (CR), ambas envolvidas na regulação da replicação e transcrição do DNA mitocondrial (Figura 5.7) e (Tabela 5.1).

Os genes estão organizados nas fitas pesada (H) e leve (L). A maioria dos PCGs está localizada na fita H, exceto NADH1, NADH4, NADH4L e NADH5, que estão na fita L. Na mesma fita (L), também se encontram os genes de tRNA: *tRNA-Gln*, *tRNA-Cys*, *tRNA-Tyr*, *tRNA-Phe*, *tRNA-Pro*, *tRNA-Leu (CUN)*, *tRNA-Val*, além dos rRNAs 16S e 12S. Entre os PCGs, o maior é NADH5 (1.710 pb) seguido por COX1 (1.548 pb).

O comprimento dos 20 genes de tRNA de *A. pantina* variam entre 62 pb e 69 pb, com *tRNA-Gln* e *tRNA-Met* sendo os mais longos (69 pb), enquanto *tRNA-Ser (UCN)* e *tRNA-Val* são os mais curtos (62 pb). Cada tRNA possui um anticódon específico, como *tRNA-Ile (UAU)*,

Tabela 5.1 - Características do genoma mitocondrial de *A. pantina*. As letras (L) e (H) indicam respectivamente, cadeia leve (light - L) e cadeia pesada (heavy – H).

(Conclusão)

Gene	Posição		Tamanho	Fita	Anticódon
	Início	Fim			
tRNA-Tyr	2280	2344	64	L	GTA
COX1	2336	3884	1548	H	
tRNA-Leu(UUR)	3879	3944	65	H	TAA
COX2	3992	4676	684	H	
tRNA-Asp	4694	4760	66	H	GTC
ATP8	4760	4913	153	H	
ATP6	4906	5581	788	H	
COX3	5580	6368	788	H	
tRNA-Gly	6367	6431	64	H	TCC
NADH 3	6431	6785	354	H	
tRNA-Ala	6783	6846	63	H	TGC
tRNA-Arg	6845	6910	65	H	TCG
tRNA-Asn	6909	6973	64	H	GTT
tRNA-Ser(AGN)	6973	7039	66	H	TCT
tRNA-Glu	7039	7101	62	H	TTC
tRNA-Phe	7099	7161	62	L	GAA
NADH 5	7135	8845	1710	L	
NADH 4	8866	10204	1338	L	
NADH 4L	10248	10530	282	L	
tRNA-Thr	10532	10596	64	H	TGT
tRNA-Pro	10596	10659	63	L	TGG
NADH 6	10664	11156	492	H	
Cytochrome b	11155	12295	1140	H	
tRNA-Ser(UCN)	12293	12359	66	H	TGA
NADH 1	12376	13303	927	L	
tRNA-Leu(CUN)	13328	13393	65	L	TAG
16S rRNA	13393	14640	1247	L	
tRNA-Val	14670	14737	67	L	TAC
12S Rrna	14734	15490	756	L	
Control Region	15491	949	1904	-	

Fonte: O autor.

DISCUSSÃO

O mitogenoma de *A. pantina* fornece informações sobre a organização genética e a estrutura do mtDNA desta espécie. Com 15.636 pb, o genoma mitocondrial segue o padrão típico para insetos, contendo 13 genes codificadores de proteínas (PCGs), 20 genes de tRNA e

2 genes de rRNA (Wei *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2022, Li *et al.*, 2022; Vidal, 2022; Dallagnol, CÔnsoli, 2024). A análise do mtDNA de *A. pantina* possibilita uma comparação com os mitogenomas de outras espécies de insetos, especialmente dentro da ordem Coleoptera, permitindo a identificação de semelhanças estruturais e características evolutivas exclusivas para essa espécie.

O tamanho do mitogenoma de *A. pantina* está dentro da faixa observada para outros insetos, especialmente quando comparado a outras espécies da ordem Coleoptera. O mitogenoma de *Omophoita octoguttata* (Alticini) possui 16.549 pb no indivíduo 1 e 16.398 pb no indivíduo 2 (Vidal, 2022), diferente de *A. pantina* essa espécie apresentou 22 genes de tRNA. Para *Diceraeus melacanthus* o genoma mitocondrial tem 17.197 pb e *D. furcatus* apresenta 15.444 pb. Embora essas espécies compartilhem 13 genes PCGs, 2 genes de rRNA, há variação no número de genes de tRNA: *D. melacanthus* possui 22 genes de tRNA, enquanto *D. furcatus* tem 21 (Dallagnol, CÔnsoli, 2024). No caso de *A. pantina*, a análise identificou 20 genes de tRNA, refletindo essa variação no número de genes de tRNA para os insetos. Em comparação com outras ordens de insetos, como Lepidoptera, o mitogenoma de *Chibiraga houshuaai* apresenta uma molécula de DNA circular de fita dupla de 15.487 pb (Cai, Yin, 2024). Por outro lado, *Luperomorpha xanthodera* possui um comprimento total de 16.021 pb (Li *et al.*, 2023). Essas comparações estruturais entre diferentes grupos de insetos evidenciam variações no tamanho do genoma mitocondrial e na organização dos genes, fornecendo dados relevantes para entender as diferenças genéticas entre as espécies e como essas características podem variar ao longo do tempo.

O mitogenoma de *A. pantina* apresenta uma organização típica para insetos, com a maioria dos genes localizados na fita H. Esta distribuição segue um padrão observado em diversas espécies de *Coleoptera* e outros insetos, como evidenciado em *O. octoguttata* (Vidal, 2022) e em *Luperomorpha xanthodera* (Li *et al.*, 2023), reforçando a conservação estrutural entre essas espécies.

O comprimento dos 20 genes de tRNA de *A. pantina* varia entre 62 pb e 69 pb, com tRNA-Gln e tRNA-Met sendo os mais longos (69 pb). Essa característica é semelhante à observada em *Luperomorpha xanthodera*, que possui 22 genes de tRNA, variando de 62 pb (tRNA-Ile) a 70 pb (tRNA-Lys) (Li *et al.*, 2023).

Essas variações no comprimento dos tRNAs são interessantes, pois podem refletir diferenças no processo de tradução e nas exigências evolutivas específicas para cada linhagem. A região de controle do mitogenoma, também denominada região D-loop ou região rica em A+T, desempenha um papel importante início da replicação e duplicação do DNA mitocondrial

(Inohira; Hara, Matsuo, 1997). O tamanho dessa região pode variar consideravelmente entre as espécies de coleópteros. Em *A. pantina*, essa região possui 1.904 pb, enquanto em *O. octoguttata* apresenta variações de 2.007 pb e 1.855 pb. Em *Coccinella septempunctata*, pode atingir até 4.468 pb (Kima; Wang, Kim, 2012).

Essas comparações estruturais e genômicas entre *A. pantina* e outras espécies de Coleoptera, bem como com outras ordens de insetos, fornecem uma compreensão valiosa sobre a diversidade e as adaptações evolutivas que moldaram o genoma mitocondrial ao longo do tempo. O estudo detalhado dessas características pode revelar padrões evolutivos comuns e diferenças específicas que são fundamentais para a reconstrução das relações filogenéticas e a compreensão da evolução de diferentes grupos de insetos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação Araucária de Apoio e Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná e ao NAPI Bioinformática pelo apoio financeiro e pela concessão da bolsa, assim como à Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), em especial ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, pela infraestrutura e pelas oportunidades proporcionadas ao longo de todo o mestrado.

REFERÊNCIAS

As referências deste artigo foram depositadas no final da dissertação.

6 CONCLUSÃO

Neste estudo, realizamos a primeira análise do satelitoma e a da primeira descrição completa do genoma mitocondrial para o gênero *Alagoasa*. A espécie *Alagoasa pantina* pertence a tribo Alticini (grupo Oedionychina) que se destaca pela presença de cromossomos sexuais gigantes e assinápticos durante a meiose. Estudos recentes indicam que a amplificação de sequências repetitivas, como os satDNA, podem estar associados à diferenciação de cromossomos sexuais. Apesar disso, há poucos trabalhos na literatura sobre a tribo. Até o momento, apenas um estudo caracterizou o satelitoma e descreveu o mitogenoma *O. octoguttata*, evidenciando uma amplificação dessas sequências no genoma da espécie e a presença de famílias específicas do sexo. Neste trabalho foram mapeados vários satDNA nos cromossomos sexuais.

Diante disso, este trabalho buscou avançar na compreensão do papel dessas sequências repetitivas, especialmente dos satDNA, no genoma de *A. pantina*. Além disso, realizamos uma análise comparativa entre os sexos para identificar possíveis famílias de satDNA específicas do sexo, que podem estar associadas à diferenciação dos cromossomos sexuais. A análise do satelitoma de *A. pantina* identificou a presença de uma grande quantidade de sequências repetitivas, com 87 famílias de satDNAs caracterizadas, as quais são compartilhadas entre os sexos. Contudo, foram observadas variações na abundância dessas sequências entre macho e fêmea, com algumas sequências sendo mais enriquecidas no genoma do macho e outras mais prevalentes na fêmea. Tais sequências podem estar associadas aos cromossomos sexuais, embora a confirmação de sua especificidade só possa ser realizada após a aplicação de técnicas como a FISH.

Entre as famílias identificadas, observa-se uma ampla variação no tamanho das unidades de repetição. Dentre estas, 65 famílias apresentaram um conteúdo de A+T variando entre 60% e 70%, indicando um viés por sequências ricas em A+T. Característica comum encontrada para a ordem Coleoptera. Os satDNAs representam aproximadamente 8,70% do genoma fêmea e 9,52% no macho, evidenciando uma diferença entre os sexos.

A análise do satelitoma também indicou que algumas dessas famílias de satDNAs apresentam variação em sua abundância entre os sexos, o que pode indicar um papel dessas famílias específicas na diferenciação dos cromossomos sexuais. No entanto, são necessárias análises adicionais. Embora a localização cromossômica dessas sequências ainda dependa do mapeamento por FISH, a alta representatividade de certas famílias de satDNAs no genoma

sugere um possível acúmulo nos cromossomos e poderiam estar associados à amplificação dos cromossomos sexuais. Esses dados fornecem *insights* importantes sobre os mecanismos evolutivos envolvidos na diferenciação e organização dos cromossomos sexuais dentro da tribo Alticini, Mostrando que esses satDNA estão presentes em duas espécies do grupo com cromossomos sexuais gigantes.

Por fim, a caracterização do genoma mitocondrial de *A. pantina* representa um avanço no conhecimento genômico da tribo Alticini, sendo o primeiro mitogenoma descrito para o gênero. Esses dados associados ao estudo em um maior número de espécies permitirão análises comparativas em um contexto mais amplo, possibilitando a comparação com outras espécies da tribo Alticini e, de forma mais abrangente, com outros Coleoptera. A escassez de informações sobre o genoma mitocondrial de Alticini torna este estudo uma contribuição relevante para preencher essa lacuna.

O mitogenoma de *A. pantina* apresentou a organização típica de insetos, com 15.636 pb e 35 genes funcionais, corroborando a conservação estrutural observada em outros Coleoptera. Dessa forma, esses resultados fornecem informações importantes para o entendimento da evolução genômica da espécie e da tribo, contribuindo para futuros estudos filogenéticos e evolutivos dentro do grupo.

Apesar dos avanços obtidos com a caracterização do satelitoma e do mitogenoma de *A. pantina* ainda são necessários estudos adicionais na tribo Alticini, incluindo outras espécies do gênero e de gêneros relacionados. A compreensão da evolução dos cromossomos sexuais gigantes nesse grupo é de grande relevância, uma vez que a tribo constitui o único grupo de insetos conhecido por apresentar essa característica. Além disso, análises citogenéticas, como a hibridação *in situ* serão fundamentais para mapear a localização cromossômica dos satDNAs identificados, permitindo a identificação de sequências específicas dos cromossomos sexuais e contribuindo para a elucidação dos mecanismos envolvidos na evolução dessas sequências. Além de ser importante a realização da hibridação em outras espécies, para poder identificar o compartilhamento destes satélites. É necessário também mais descrições do genoma mitocondrial, não apenas do gênero *Alagoasa*. mas em todos os outros gêneros, pois a partir dos dados gerados pode-se realizar diversas pesquisas, estas sendo filogenéticas, ecológicas e comparativas.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, J, et al. Sex chromosome evolution: historical insights and future perspectives. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 284, p. 20162806, 2017.
- ACOSTA, M. J, et al. Characterization of the satellite DNA Msat-160 from the species – (Rodentia, Arvicolinae). *Genetica*, [S. l.], v. 130, p. 43–51, 2007.
- ALMEIDA, M. C.; CAMPANER, C.; CELLA, D. M. Cytogenetics of four Omophoita species (Coleoptera, Chrysomelidae, Alticinae): A comparative analysis using mitotic and meiotic cells submitted to the standard staining and C-banding technique. *Micron*, v. 40, n. 5–6, p. 586–596, 2009.
- ALMEIDA, M. C.; CAMPANER, C.; CELLA, D. M. Karyotype characterization, constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions of *Paranaita opima* (Coleoptera, Chrysomelidae, Alticinae). *Genetics and Molecular Biology*, v. 29, n. 3, p. 475–481, 2006.
- ANDREWS, S. **FastQC**: A quality control tool for high throughput sequence data. 2010.
- AZAMBUJA, M. et al. Cytogenetic and molecular characterization of three mimetic species of the genus *Alagoasa* Bechyné 1955 (Coleoptera: Alticinae) from the Neotropical region. *Cytogenetic and Genome Research*, v. 160, n. 4, p. 214-223, 2020.
- AZAMBUJA, M. S. **Filogeografia de *Omophoita octoguttata* Fabricius (1775) (Coleoptera: Alticinae) na região sul do Brasil e diferenciação de espécies crípticas pertencentes ao gênero *Alagoasa* Bechyné (1955) (Coleoptera: Alticinae)**. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Biologia Evolutiva) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2018.
- BARDELLA, V. B.; MILANI, D.; CABRAL-DE-MELLO, D. C. Analysis of *Holhymenia histrio* genome provides insight into the satDNA evolution in an insect with holocentric chromosomes. *Chromosome Research*, [S. l.], v. 28, n. 3-4, p. 369-380, dez. 2020.
- BARR, C. M.; NEIMAN, M.; TAYLOR, D. R. Inheritance and recombination of mitochondrial genomes in plants, fungi and animals. *New Phytologist*, v. 168, n. 1, p. 39-50, 2005.
- BECHYNÉ, J.; SPRINGLOVÁ DE BECHYNE, B. Preliminary list of Phytophaga of agricultural importance in Venezuela. *Memoria Sextas Jornadas Agronómicas Sociedad Venezolana de Ingenieros Agrónomos*, [S. l.], v. 3, p. 5, 1966.
- BEGOSI, A.; BENSON, W. W. Host plant and defense mechanism in *Oedionychina* (Alticinae). In: **Biology of Chrysomelidae**. Dordrecht/ Boston/ Londres: Kluwer Academic Publishers, p. 57-71, 1988.
- BIONDI, M.; D'ALESSANDRO, P. Afrotropical flea beetle genera: a key to their identification, updated catalogue and biogeographical analysis (Coleoptera, Chrysomelidae, Galerucinae, Alticini). *ZooKeys*, v. 2012, p. 1-34, 20 dez. 2012.
- BISCOTTI, M. A. Transcription of tandemly repetitive DNA: functional roles. *Chromosome Research*, v. 23, p. 463-477, 2015.
- BLACKMON, H.; DEMUTH, J. P. Coleoptera karyotype database. **The Coleopterists**

Bulletin, v. 69, p. 174-175, 2015.

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

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

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

BRÄNDLE, F.; FRÜHBAUER, B.; JAGANNATHAN, M. Principles and functions of pericentromeric satellite DNA clustering into chromocenters. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 128, p. 26-39, 2022.

CABRAL-DE-MELLO, D. C, et al. The Role of Satellite DNAs in Genome Architecture and Sex Chromosome Evolution in Crambidae Moths. **Frontiers in Genetics**, [S. l.], v. 12, p. 661417, 2021.

CABRAL-DE-MELLO, D. C. The spread of satellite DNAs in euchromatin and insights into the multiple sex chromosome evolution in Hemiptera revealed by repeatome analysis of the bug *Oxycaenus hyalinipennis*. **Insect Molecular Biology**, v. 32, n. 6, p. 725-737, 2023.

CAI, Y.; YIN, A. The complete mitochondrial genome of *Chibiraga houshuai* (Lepidoptera, Limacodidae) and its phylogenetic implications. **Scientific Reports**, v. 14, art. 7009, 25 mar. 2024.

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

CAPINERA, J. L. **Encyclopedia of entomology**. 2. ed. Heidelberg: Springer Science & Business Media, 2008. DOI: 10.1007/978-1-4020-6359-6.

CASARI, S. A.; BIFFI, G.; IDE, S. Coleoptera Linnaeus, 1758. In: **Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia**. 2ª ed., 2024.

CHAPUIS, F. **Famille des phytophages**. In: *Histoire Naturelle des Insectes. Genera des Coléoptères ou exposé méthodique et critique de tous les genres proposés jusqu'ici dans cet ordre d'insectes*. [S. l.]: [s. n.], v. 11, p. 1-420, 1875.

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

CLARY, D. O.; WOLSTENHOLME, D. R. The mitochondrial DNA molecular of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization, and genetic code. **Journal of Molecular Evolution**. v. 22, n. 3, p. 252-271, 1985.

COSTA LIMA, A. da. **Insetos do Brasil: 9º tomo, coleópteros: 3ª parte**. Brasília: Ministério da Agricultura, 1995.

COSTA, C. Estado de conocimiento de los Coleoptera neotropicales. Sociedad **Entomológica Aragonesa**, SEA, p. 99-114, 2000.

CREPALDI, C.; PARISE-MALTEMPI, P. P. Heteromorphic Sex Chromosomes and Their DNA Content in Fish: An Insight through Satellite DNA Accumulation in *Megaleporinus elongatus*. **Cytogenetic and Genome Research**, [S. l.], v. 160, n. 1, p. 38–46, 2020.

CSIKI, E.; HEIKERTINGER, F. 1940. **Chrysomelidae: Halticinae**. W. Junk and S. Schenkling. Berlin, 25, p. 166-169, 1939.

DALLAGNOL, L. C.; CÔNSOLI, F. L. Evolutionary and phylogenetic insights from the mitochondrial genomic analysis of *Dicraeus melacanthus* and *D. furcatus* (Hemiptera: Pentatomidae). **Scientific Reports**, v. 14, art. 12861, 2024.

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

DOUGLAS, H. B. et al. Phylogeny of the flea beetles (Galerucinae: Alticini) and the position of *Aulacothorax* elucidated through anchored phylogenomics (Coleoptera: Chrysomelidae: Alticini). **Systematic Entomology**, [S. l.], v. 48, n. 3, p. 361-386, jul. 2023.

DOVER, G. Molecular drive: A cohesive mode of species evolution. **Nature**, v. 299, p. 111–117, 1982.

DRUMMOND, A. J. et al. **Geneious v4.8**. [S. l.], 2009.

ELLEGREN, H. Sex-chromosome evolution: recent progress and the influence of male and female heterogamety. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, p. 157–166, 2011.

ESCUDEIRO, A, et al. Conservation, divergence, and functions of centromeric satellite DNA families in the Bovidae. **Genome Biology and Evolution**, [S. l.], v. 11, p. 1152–1165, 2019.

FELICIELLO, I.; AKRAP, I.; UGARKOVIĆ, Đ. Satellite DNA modulates gene expression in the beetle *Tribolium castaneum* after heat stress. **PLoS Genetics**, v. 11, n. 8, p. e1005466, 2015.

FERREE, P. M.; BARBASH, D. A. Species-specific heterochromatin prevents mitotic chromosome segregation to cause hybrid lethality in *Drosophila*. **PLoS Biology**, v. 7, e1000234, 2009.

FERREIRA, A. Two pairs of chromosomes: a new low record for Coleoptera. **Revista Brasileira de Genética**, p. 231-239, 1984.

FERRETTI, A. B. S. M, et al. How dynamic could be the 45S rDNA cistron? An intriguing variability in a grasshopper species revealed by integration of chromosomal and genomic data. **Chromosoma**, [S. l.], v. 128, p. 165–175, 2019.

FURMAN, B. L. S. et al. Sex chromosome evolution: so many exceptions to the rules. **Genome Biology and Evolution**, v. 12, p. 750–763, 2020.

FURTH, D. G. The jumping apparatus of flea beetles (Alticinae)—The metafemoral spring. In: **BIOLOGY of Chrysomelidae**. Springer. p. 285-297, 1988.

GARRIDO-RAMOS, M. A. Satellite DNA in plants: more than just rubbish. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 146, n. 2, p. 153-170, 2015.

- GARRIDO-RAMOS, M. A. Satellite DNA: an evolving topic. *Genes*, v. 8, n. 9, p. 230, 2017.
- GATTO, K. P. et al. Sex chromosome differentiation in the frog genus *Pseudis* involves satellite DNA and chromosome rearrangements. *Frontiers in Genetics*, v. 9, p. 301, 2018.
- GE, D. Suprageneric systematics of flea beetles (Chrysomelidae: Alticinae) inferred from multilocus sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 62, n. 3, p. 793-805, 2012.
- GILLOTT, C. *Entomology*. Springer Science & Business Media, 2005.
- GIOVANNOTTI, M, et al. Characterization of a satellite DNA in the genera *Lacerta* and *Timon* (Reptilia, Lacertidae) and its role in the differentiation of the W chromosome. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, [S. l.], 2018.
- GOLL, L. G. et al. Comparative Cytogenetics of *Omophoita abbreviata* and *O. aequinoctialis* (Coleoptera, Chrysomelidae, Alticini) from the Adolpho Ducke Forest Reserve in Brazilian Amazonia: Intrapopulation Variation in Karyotypes. *Cytogenetic and Genome Research*, v. 156, n. 1, p. 56–64, 2018.
- GRŽAN, T. et al. The low-copy-number satellite DNAs of the model beetle *Tribolium castaneum*. *Genes*, v. 14, p. 999, 2023.
- GULLAN, P. J.; CRANSTON, P. S. *Insetos: fundamentos da entomologia*. Rio de Janeiro: Gen/Editora Roca, 2017.
- HADDAD, S.; MCKENNA, D. D. Phylogeny and evolution of the superfamily Chrysomeloidea (Coleoptera: Cucujiformia): Phylogeny and evolution of the superfamily Chrysomeloidea (Coleoptera: Cucujiformia). *Systematic Entomology*, v. 41, n. 4, p. 697–716, 2016.
- Hao, Y. J. et al. Complete mitochondrial genomes of *Anopheles stephensi* and *A. dirus* and comparative evolutionary mitogenomics of 50 mosquitoes. *Scientific Reports*, v. 7, p. 7666, 2017.
- HENIKOFF, S.; AHMAD, K.; MALIK, H. S. The centromere paradox: stable inheritance with rapidly evolving DNA. *Science*, v. 293, p. 1098–1102, 2001.
- HOBZA, R. et al. An accumulation of tandem DNA repeats on the Y chromosome in *Silene latifolia* during early stages of sex chromosome evolution. *Chromosoma*, v. 115, p. 376–382, 2006.
- INOHIRA, K.; HARA, T.; MATSUURA, E. T. Nucleotide sequence divergence in the A+ T-rich region of mitochondrial DNA in *Drosophila simulans* and *Drosophila mauritiana*. *Molecular biology and evolution*, v. 14, n. 8, p. 814-822, 1997.
- JIN, J. J. et al. GetOrganelle: a fast and versatile toolkit for accurate de novo assembly of organelle genomes. *Genome biology*, v. 21, n. 1, p. 1-31, 2020.
- JOLIVET, P.; SANTIAGO-BLAY, J. A.; SCHMITT, M. (Org.). *Research on Chrysomelidae*. Leiden-Boston: Brill, v. 2. 2009.

- KIM, M. J.; WAN, X.; KIM, I. Complete mitochondrial genome of the seven-spotted lady beetle, *Coccinella septempunctata* (Coleoptera: Coccinellidae). **Mitochondrial DNA**, v. 23, n. 3, p. 179-181, 2012.
- KONSTANTINOV, A. S. et al. Besouros que vivem em musgos das Índias Ocidentais (Insecta: Coleoptera). **Journal of Insect Biodiversity**, v. 38, n. 2, p. 48-72, 2023
- KONSTANTINOV, A. S.; LINZMEIER, A. M. Moss inhabiting flea beetles of the West Indies III: *Erinacealtica*, a new genus from Hispaniola (Coleoptera, Chrysomelidae, Galerucinae, Alticini). **ZooKeys**, v. 955, p. 113-145, 2020
- KRETSCHMER, R. et al. Satellitome analysis illuminates the evolution of ZW sex chromosomes of Triportheidae fishes (Teleostei: Characiformes). **Chromosoma**, [S. l.], v. 131, p. 29-45, 2022.
- Kuhn, G. C. S. Satellite DNA transcripts have diverse biological roles in *Drosophila*. **Heredity** 115, 1-2 (2015).
- LAWRENCE, J. Review of the Australian Archeocrypticidae (Coleoptera), with descriptions of a new genus and four new species. **Invertebrate Systematics**, v. 8, n. 2, p. 449-470, 1994.
- LETSCH, H.; BERAN, F. Jumping to new hosts: the diversification of flea beetles (Coleoptera: Chrysomelidae: Alticini) in the context of their host plant associations. **Insect Systematics and Diversity**, v. 7, n. 5, 15 set. 2023
- LI, J. et al. Characterization of the complete mitochondrial genome of a flea beetle *Luperomorpha xanthodera* (Coleoptera: Chrysomelidae: Galerucinae) and phylogenetic analysis. **Genes**, v. 14, n. 2, art. 414, 4 fev. 2023.
- LIAO, X. Repetitive DNA sequence detection and its role in the human genome. **Communications Biology**, v. 6, n. 1, p. 954, 2023.
- LIMA, R. L. D. Riqueza de famílias e hábitos alimentares em Coleoptera capturados na fazenda da EMPARN-Jiqui, Parnamirim/RN. **EntomoBrasilis**, 3, n. 1, p. 11-15, 2010.
- 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. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 50, p. 101-109, 2006.
- LÓPEZ-FLORES, I.; GARRIDO-RAMOS, M. The repetitive DNA content of eukaryotic genomes. **Repetitive DNA**, v. 7, p. 1-28, 2012.
- LORITE, P. et al. Isolation and characterization of two families of satellite DNA with repetitive units of 135 bp and 2.5 kb in the ant *Monomorium subopacum* (Hymenoptera, Formicidae). **Cytogenetic and Genome Research**, [S. l.], v. 105, p. 83-92, 2004.
- LOUZADA, S. et al. Decoding the Role of Satellite DNA in Genome Architecture and Plasticity—An Evolutionary and Clinical Affair. **Genes**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 72, 2020.
- MARDIS, E. R. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. **Trends in genetics**, v. 24, n. 3, p. 133-141, 2008.

MARIOTTI, B, et al. Accumulation of Y-specific satellite DNAs during the evolution of *Rumex acetosa* sex chromosomes. **Molecular Genetics and Genomics**, [S. l.], v. 281, p. 249–259, 2009.

MAULIK, S.; CANTAB, M. Chrysomelidae; with a note on the comparative anatomy of some Halticine tibiae. **Insects of Samoa**, 4, n. 3, p. 177-215, 1929.

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

MELLO, L. R. A. **Mecanismos envolvidos na origem dos cromossomos sexuais gigantes no gênero *Omophoita* (Coleoptera, Chrysomelidae)**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Biologia Evolutiva) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2015.

MEŠTROVIĆ, N. et al. Evolution of satellite DNAs from the genus *Palorus*—experimental evidence for the “library” hypothesis. **Molecular Biology and Evolution**, v. 15, n. 9, p. 1062–1068, 1998.

MONTIEL, E. E. et al. Satellitome of the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae), the most diverse among insects. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 10, Article 826808, 2022.

MORA, P, et al. Making the Genome Huge: The Case of *Triatoma delponte*, a Triatominae Species with More than 50% of Its Genome Full of Satellite DNA. **Genes**, [S. l.], v. 14, n. 2, p. 371, 2023.

MORA, P. et al. Satellitome analysis in the ladybird beetle *Hippodamia variegata* (Coleoptera, Coccinellidae). **Genes**, [S. l.], v. 11, n. 7, p. 783, jul. 2022.

MRAVINAC, B. et al. Sequence of PRAT satellite DNA "frozen" in some coleopteran species. **Journal of Molecular Evolution**, v. 54, p. 774–783, 2002.

NADEIN, K. S. Febrina: a new subtribe of Alticini with cladistic analysis based on morphology (Coleoptera: Chrysomelidae: Galerucinae). **Systematic Entomology**, v. 38, n. 3, p. 491-506, jul. 2013.

NEGRISOLO, E.; BABBUCCI, M.; PATARNELLO, T. The mitochondrial genome of the ascalaphid owlfly *Libelloides macaronius* and comparative evolutionary mitochondriomics of neuropterid insects. **BMC Genomics**, v. 12, art. 221, 10 mai. 2011.

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

NOVÁK, P, et al. TAREAN: A computational tool for identification and characterization of satellite DNA from unassembled short reads. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 45, n. e111, 2017.

NOVÁK, P, et al. Graph-based clustering and characterization of repetitive sequences in next-generation sequencing data. **BMC Bioinformatics**, [S. l.], v. 11, n. 378, 2010.

NOVÁK, P. RepeatExplorer: a Galaxy-based web server for genome-wide characterization of

eukaryotic repetitive elements from next-generation sequence reads. **Bioinformatics**, v. 29, n. 6, p. 792-793, 2013.

NOVÁK, P.; NEUMANN, P. Global analysis of repetitive DNA from unassembled sequence reads using RepeatExplorer2. **Nature Protocols**, [S. l.], v. 15, p. 3745–3776, 2020.

OHNO, S. Sex chromosomes and sex-linked genes. Heidelberg: **Springer**, 1967.

OPPERT, B. et al. The genome of the yellow mealworm, *Tenebrio molitor*: it's bigger than you think. **Genes**, v. 14, e2209, 2023.

PALACIOS-GIMENEZ, O. M, et al. High-throughput analysis of the satellitome revealed enormous diversity of satellite DNAs in the neo-Y chromosome of the cricket *Eneoptera surinamensis*. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 7, n. 6422, 2017.

PALACIOS-GIMENEZ, O. M. et al. Satellite DNAs are conserved and differentially transcribed among *Gryllus* cricket species. **DNA Research**, v. 25, n. 2, p. 137–147, abr. 2018a.

PALACIOS-GIMENEZ, O. M. et al. Uncovering the evolutionary history of neo-XY sex chromosomes in the grasshopper *Ronderosia bergii* (Orthoptera, Melanoplinae) through satellite DNA analysis. **BMC Evolutionary Biology**, v. 18, art. 2, 8 jan. 2018b.

PALOMEQUE, T.; LORITE, P. Satellite DNA in insects: a review. **Heredity**, v. 100, n. 6, p. 564-573, 2008.

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

PITA, S. et al. Comparative repeatome analysis on *Triatoma infestans* Andean and non-Andean lineages, main vector of Chagas disease. **PLoS One**, v. 12, e0181635, 2017.

PLOHL, M.; MEŠTROVIĆ, N.; MRAVINAC, B. Centromere identity from the DNA point of view. **Chromosoma**, v. 123, p. 313-325, 2014.

PLOHL, M.; MEŠTROVIĆ, N.; MRAVINAC, B. Satellite DNA evolution. **Repetitive DNA**, v. 7, p. 126-152, 2012.

R CORE TEAM. **R**: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, 2023.

REID, C. A. M. A cladistic analysis of subfamilial relationships in the Chrysomelidae sensu lato (Chrysomeloidea). In: PAKALUK, J.; ŚLIPINSKI, S. A. (Ed.). **Biology, phylogeny, and classification of Coleoptera**: papers celebrating the 80th birthday of Roy A. Crowson. Warszawa: Muzeum i Instytut Zoologii PAN, 1995. v. 2, p. 559-631.

RICO-PORRAS, J. M et al. Heterochromatin is not the only place for satDNAs: the high diversity of satDNAs in the euchromatin of the beetle *Chrysolina americana* (Coleoptera, Chrysomelidae). **Genes**, v. 15, n. 4, p. 395, 2024.

ROEHRDANZ, R. Mitochondrial DNA diversity and Wolbachia infection in the flea beetle *Aphthona nigricutis* (Coleoptera: Chrysomelidae): an introduced biocontrol agent for leafy spurge. **Biological Control**, v. 37, n. 1, p. 1-8, 2006.

- ROSOLEN, L. A. M. VICARI, M. R.; ALMEIDA, M. C. Accumulation of Transposable Elements in Autosomes and Giant Sex Chromosomes of Omophoita (Chrysomelidae: Alticinae). **Cytogenetic and Genome Research, Basel**, v. 156, n. 4, p. 215–22, dec. 2018.
- RUIZ-RUANO, et al. High-throughput analysis of the satellitome illuminates satellite DNA evolution. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 6, n. 28333, p. 1-12, 7 jul. 2016.
- RUIZ-RUANO, F. J. et al. Evolutionary success of a parasitic B chromosome rests on gene content. **bioRxiv**, p. 683417, 2019
- RUIZ-RUANO, F. J. et al. Satellite DNA content illuminates the ancestry of a supernumerary (B) chromosome. **Chromosoma**, v. 126, n. 4, p. 487-500, ago. 2017
- RUIZ-RUANO, F. J. High-throughput analysis of satellite DNA in the grasshopper *Pyrgomorpha conica* reveals abundance of homologous and heterologous higher-order repeats. **Chromosoma**, v. 127, p. 323-340, 2018.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2. ed. New York: **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 1989.
- ŠATOVIĆ-VUKŠIĆ, E.; PLOHL, M. Satellite DNAs—from localized to highly dispersed genome components. **Genes** (Basel), v. 14, n. 3, p. 742, 17 mar. 2023.
- SCHMIEDER, R.; EDWARDS, R. Fast Identification and Removal of Sequence Contamination from Genomic and Metagenomic Datasets. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 6, n. 3, p. e17288, 2011.
- SEENO, T. N.; WILCOX, J. A. Leaf beetle genera (Coleoptera: Chrysomelidae). **Entomography**, [S. l.], v. 1, p. 1-221, 1982.
- SERRANO, J. Chromosome numbers and karyotypic evolution of Caraboidea. **Genetica**, 55, n. 1F, p. 51-60, 1981.
- SERRANO-FREITAS, E. A. et al. Satellite DNA content of B chromosomes in the characid fish *Characidium gomesi* supports their origin from sex chromosomes. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 295, p. 195–207, 2020.
- SMIT, A.; HUBLEY, R.; GREEN, P. **RepeatMasker** Open-4.0. [S. l.], 2013.
- SMITH, S. G. The cyto-taxonomy of Coleoptera. **The Canadian Entomologist**, v.82, p.58-68, 1950.
- SMITH, S. G.; VIRKKI, N. Coleoptera. In: JOHN, B. (Ed.). **Animal Cytogenetic**. Berlin; Stuttgart: Gebruder Borntraeger, p.366.1978.
- TANSEY, J. Evidence for the influence of conspecific chemical cues on *Aphthona nigricutis* (Coleoptera: Chrysomelidae) behaviour and distribution. **BioControl**, 50, p. 343-358, 2005.
- THAKUR, J.; PACKIARAJ, J.; HENIKOFF, S. Sequence, chromatin and evolution of satellite DNA. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 9, p. 4309, 2021.
- UTSUNOMIA, R. et al. Satellitome landscape analysis of *Megaleporinus macrocephalus*

(Teleostei, Anostomidae) reveals intense accumulation of satellite sequences on the heteromorphic sex chromosome. **Scientific Reports**, v. 9, p. 5856, 2019.

VENCL, F. V.; MORTON, T. C. The shield defense of the sumac flea beetle, *Blepharida rhois* (Chrysomelidae: Alticinae). **Chemoecology**, v. 8, p. 25-32, 1998.

VIDAL, J. A. D. **Diferenciação genômica e evolução dos cromossomos sexuais em espécies de Omophoita (Alticinae) por meio da análise do satelitoma e pintura cromossômica**. 2022. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Biologia Evolutiva) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2022.

VIDAL, J. A. D. et al. Unraveling the role of satellite DNAs in the evolution of the giant XY sex chromosomes of the flea beetle *Omophoita octoguttata* (Coleoptera, Chrysomelidae). **BMC Biology**, v. 23, n. 1, p. 53, 21 fev. 2025.

VIDAL, Jhon A. D. et al. Giant sex chromosomes in *Omophoita* species (Coleoptera, Chrysomelidae): structural and evolutionary relationships revealed by zoo-FISH and comparative genomic hybridization (CGH). **Insects**, v. 14, n. 5, p. 440, 2023.

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

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

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

VIRKKI, N. Regular segregation of seven asynaptic sex chromosomes in the male of *Asphaera daniela* Bechyné (Coleoptera, Alticidae). **Caryologia**, v. 21, n. 1, p. 47–51, 1968.

VIRKKI, N. Sex chromosomes and karyotypes of the Alticidae (Coleoptera). *Hereditas*, v. 64, n. 2, p. 267–282, 1970. VIRKKI, N. The sex chromosomes of *Disonychina* (Coleoptera, Alticinae): Xy + nX systems. **Cytobios** 53: 43–55, 1988.

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

VIRKKI, N.; PURCELL, C. M. Four pairs of chromosomes: the lowest number in Coleoptera. **Journal of Heredity**, 56, n. 2, p. 71-74, 1965.

VIRKKI, N.; SANTIAGO-BLAY, J. A. Trends of karyotype evolution in Neotropical *Oedionychina* (Coleoptera: Chrysomelidae: Alticinae). **Hereditas** 119: 263–283, 1993.

WANG, Y. et al. Hemipteran mitochondrial genomes: Features, structures and implications for phylogeny. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 6, p. 12382-12404, 1 jun. 2015.

WEI, K. H. C.; BARBASH, D. A. Never settling down: frequent changes in sex chromosomes. **PLoS Biology**, v. 13, e1002077, 2015.

WEI, S. J. et al. Comparative mitogenomics of Braconidae (Insecta: Hymenoptera) and the phylogenetic utility of mitochondrial genomes with special reference to Holometabolous insects. **BMC Genomics**, v. 11, art. 371, 11 jun. 2010.

WEI, S. J. et al. New views on strand asymmetry in insect mitochondrial genomes. **PLoS ONE**, v. 5, n. 9, art. e12708, 15 set. 2010.

WICKHAM, H. **ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis**. 2. ed. Springer, 2016.

WILCOXON, F. Individual comparisons by ranking methods. **International Journal of Psychology**, v. 4, p. 80-83, 1945.

XAVIER, P. L. P. A et al. Flow Cytometry Protocol to Estimate DNA Content in the Yellowtail Tetra *Astyanax altiparanae*. **Frontiers in Genetics**, 8, 2017. Methods.

XUE, H. J.; EGAS, M.; YANG, X. K. Development of a positive preference–performance relationship in an oligophagous beetle: adaptive learning? **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 125, n. 2, p. 119-124, 2007.

YAN, E.; STRELNIKOVA, O. Early evolution of beetles of the suborder polyphaga (Insecta: Coleoptera) at the Permian–Triassic Boundary. **Paleontological Journal**, 56, n. 3, p. 268-29, 2022.

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

ZHANG, D. X.; HEWITT, G. M. The long and short of nuclear mitochondrial DNA (Numt) lineages: reply from D-X. Zhang and G.M. Hewitt. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 12, n. 3, p. 114, mar. 1997.

APÊNDICE A - FAMÍLIAS DE satDNAs CARACTERIZADAS PARA *A. pantina*

Tabela A1 – Análise comparativa para as 87 famílias de satDNAs encontradas para a fêmea e macho de *A. pantina*.

(continua)

SF	Famílias de SatDNA		RUL	A+T (%)	Fêmea		Macho		M/F
					% no genoma	Divergência	% no genoma	Divergência	
	ApanSat01-4	+	4	75	0,6699	4,7	0,5838	4,66	0,062666667
1	ApanSat02-639	+	639	65	0,4966	11,69	0,5418	11,41	0,179846154
2	ApanSat03-586	+	586	59	0,4109	6,82	0,339	6,71	0,11559322
	ApanSat04-2604	+	2604	61	0,402	13,73	0,4627	13,07	0,225081967
5	ApanSat05-2741	+	2741	67	0,3242	20,93	0,3965	20,8	0,31238806
3	ApanSat06-2615		2615	65	0,2455	23,28	0,3383	22,22	0,358153846
	ApanSat07-508		508	60	0,2288	12,44	0,2421	12,05	0,207333333
7	ApanSat08-179		179	63	0,2205	9,1	0,2748	8,92	0,144444444
	ApanSat09-3353		3353	63	0,2205	13,34	0,2562	12,67	0,211746032
2	ApanSat10-574		574	59	0,2136	8,07	0,1858	7,86	0,136779661
	ApanSat11-4025		4025	62	0,1945	9,73	0,2092	10,01	0,156935484
3	ApanSat12-2652		2652	64	0,1943	14,42	0,229	13,74	0,2253125
	ApanSat13-2618		2618	54	0,1934	8,02	0,1668	7,07	0,148518519
5	ApanSat14-523		523	56	0,1903	11,23	0,1973	10,48	0,200535714
3	ApanSat15-2643		2643	62	0,1831	13,05	0,2157	13	0,210483871
1	ApanSat16-627		627	65	0,1799	10,73	0,1982	10,23	0,165076923
	ApanSat17-2662		2662	62	0,1774	20,77	0,2017	20,73	0,335
	ApanSat18-2661		2661	65	0,1623	18,64	0,1894	18,79	0,286769231
	ApanSat19-487		487	69	0,1522	7,59	0,1854	7,32	0,11
	ApanSat20-3998		3998	61	0,1501	12,98	0,1343	13,75	0,212786885
	ApanSat21-177		177	61	0,1475	9,03	0,16	9,66	0,148032787
	ApanSat22-2850		2850	64	0,1463	12,72	0,1583	12,73	0,19875
	ApanSat23-2660		2660	63	0,1253	16,78	0,1503	16,34	0,266349206
	ApanSat24-160		160	55	0,1208	8,74	0,0907	8,65	0,158909091
	ApanSat25-2649		2649	63	0,1164	16,56	0,1362	16,33	0,262857143
	ApanSat26-147		147	56	0,1122	7,4	0,0932	7,63	0,132142857
	ApanSat27-2784		2784	69	0,1106	22,07	0,1442	22,42	0,319855072
	ApanSat28-2658		2658	63	0,106	15,62	0,1213	16,34	0,247936508
4	ApanSat29-2738		2738	71	0,0985	18,98	0,1445	17,64	0,267323944
4	ApanSat30-2833		2833	69	0,0969	16,19	0,1364	15,71	0,234637681
	ApanSat31-2968		2968	70	0,0931	11,54	0,1146	11,48	0,164857143
	ApanSat32-3005		3005	60	0,0918	15,75	0,098	15,8	0,2625
	ApanSat33-144		144	63	0,0844	8,59	0,0659	8,76	0,136349206
	ApanSat34-110		110	58	0,0832	10,03	0,0988	9,78	0,172931034
	ApanSat35-2788		2788	69	0,0803	17,46	0,1197	16,54	0,253043478
	ApanSat36-1348		1348	62	0,0801	17,74	0,083	18,52	0,286129032
	ApanSat37-78	♀	78	47	0,0798	6,72	0,0488	6,73	0,142978723
	ApanSat38-2858		2858	70	0,0794	5,84	0,0979	6,34	0,083428571
	ApanSat39-4070		4070	67	0,0778	3,21	0,0686	0,0686	0,0686148
	ApanSat40-148		148	57	0,0751	6,57	0,0687	6,05	0,115263158
	ApanSat41-144		144	62	0,0688	5,3	0,0893	5,64	0,085483871
	ApanSat42-144		144	56	0,0684	7,54	0,0623	7,46	0,134642857

Tabela A1 – Análise comparativa para as 87 famílias de satDNAs encontradas para a fêmea e macho de *A. pantina*.

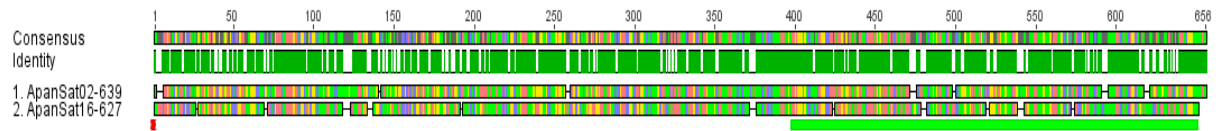
(conclusão)									
SF	Famílias de SatDNA		RUL	A+T (%)	Fêmea		Macho		M/F
					% no genoma	Divergência	% no genoma	Divergência	
6	ApanSat43-2953		2953	71	0,066	12,36	0,0875	12,73	0,174084507
	ApanSat44-2811		2811	68	0,0647	6,41	0,0866	6,06	0,094264706
	ApanSat45-2825		2825	60	0,0621	9,81	0,0675	9,59	0,1635
	ApanSat46-2718		2718	69	0,0621	20,22	0,089	19,52	0,293043478
	ApanSat47-2775		2775	63	0,0613	12,01	0,0635	11,08	0,190634921
	ApanSat48-157		157	56	0,0612	6,31	0,0465	6,43	0,112678571
	ApanSat49-140		140	70	0,0597	6,73	0,0626	7,08	0,096142857
	ApanSat50-142		142	64	0,057	5,47	0,0597	5,94	0,08546875
	ApanSat51-2810		2810	66	0,0561	5,81	0,0622	5,78	0,088030303
	ApanSat52-2849		2849	71	0,0556	9,73	0,0805	9,43	0,137042254
	ApanSat53-107	♀	107	59	0,0548	4,82	0,0274	4,77	0,081694915
	ApanSat54-30		30	57	0,0422	24,64	0,0524	22,32	0,432280702
	ApanSat55-1153		1153	63	0,0416	11,61	0,0503	10,75	0,184285714
	ApanSat56-83	♀	83	59	0,0344	10,58	0,0191	10,3	0,179322034
	ApanSat57-162		162	60	0,0321	19,06	0,0257	20,11	0,317666667
	ApanSat58-464		464	60	0,0299	6,95	0,0315	6,8	0,115833333
	ApanSat59-136		136	70	0,029	4,63	0,0211	5,48	0,066142857
	ApanSat60-1913		1913	64	0,028	8,87	0,0306	8,39	0,13859375
	ApanSat61-255		255	67	0,0272	7,17	0,0275	7,23	0,107014925
	8	ApanSat62-146		146	64	0,0269	17,08	0,0229	17,58
ApanSat63-175			175	63	0,0265	7,19	0,0315	7,16	0,114126984
ApanSat64-180			180	66	0,0254	8,52	0,0359	8,94	0,129090909
ApanSat65-147			147	67	0,0252	6,15	0,0279	6,07	0,091791045
ApanSat66-96			96	65	0,0238	5,15	0,0287	5	0,079230769
ApanSat67-273			273	66	0,0216	4,46	0,0205	4,47	0,067575758
ApanSat68-251			251	66	0,0211	6,95	0,0248	6,62	0,10530303
ApanSat69-153			153	69	0,02	5,41	0,0181	5,56	0,078405797
ApanSat70-151			151	64	0,019	10,93	0,0159	10,22	0,17078125
ApanSat71-179			179	65	0,0183	14,51	0,0214	15,14	0,223230769
7	ApanSat72-524		524	67	0,0178	8,51	0,0232	6,63	0,127014925
	ApanSat73-143		143	64	0,0173	5,32	0,0167	5,31	0,083125
	ApanSat74-178		178	65	0,0172	16,77	0,1828	6,77	0,258
	ApanSat75-142		142	63	0,017	3	0,0237	3,32	0,047619048
	ApanSat76-129	♀	129	62	0,0164	5,64	0,0109	5,47	0,090967742
	ApanSat77-27	♀	27	52	0,0159	12,2	0,0097	11,92	0,234615385
	ApanSat78-425		425	68	0,0156	13,23	0,0206	12,97	0,194558824
	ApanSat79-110		110	64	0,0144	4,89	0,0162	4,43	0,07640625
	ApanSat80-290		290	55	0,0136	9,27	0,0116	9,65	0,168545455
	ApanSat81-143		143	62	0,0118	6,2	0,01	6,92	0,1
9	ApanSat82-20		20	75	0,0095	12,44	0,0098	14,01	0,165866667
	ApanSat83-451		451	70	0,0087	7,68	0,0084	7,49	0,109714286
	ApanSat84-152	♂	152	59	0,0079	3,36	0,0132	3,27	0,056949153
	ApanSat85-169		169	64	0,0069	10,89	0,0094	9,91	0,17015625
	ApanSat86-152		152	59	0,0065	7,2	0,0064	8,16	0,122033898
	ApanSat87-30	♂	30	53	0,0024	12,55	0,0111	6,21	
	Total				8,7044	TOTAL	9,521		

Fonte: O autor.

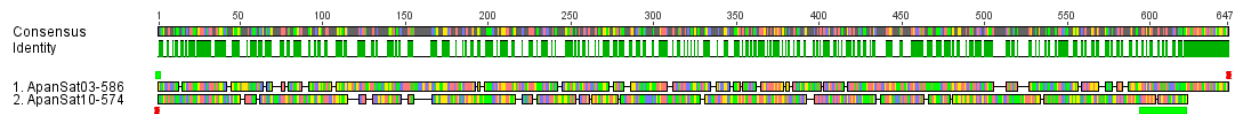
Nota: SF – Superfamília, + - satDNA mais abundante no genoma de macho e fêmea, ♀ - satDNA mais abundante em fêmea, ♂ - satDNA mais abundante em macho, comprimento da unidade de repetição (RUL), conteúdo de A + T, abundância de satDNA genoma (%) em macho e fêmea, divergência (%) em macho e fêmea e proporção da abundância entre fêmea e macho (M/F).

APÊNDICE B – DADOS DE ALINHAMENTO E SIMILARIDADE DE satDNAs EM *A. pantina*

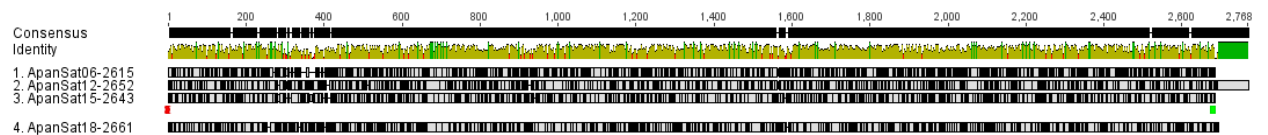
Superfamília 1 (79%)



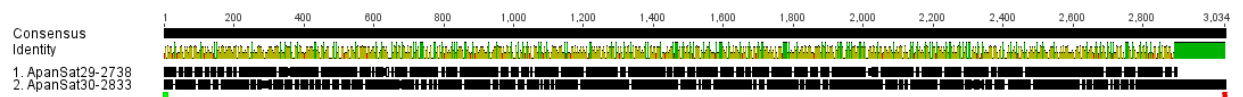
Superfamília 2 (52%)



Superfamília 3 (Entre 60% a 71%)



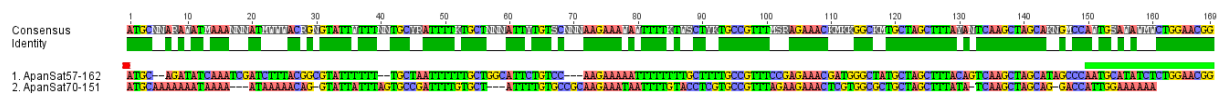
Superfamília 4 (54%)



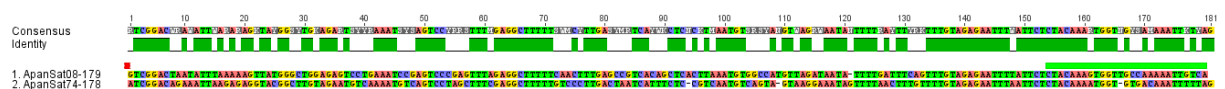
Superfamília 5 (75%)



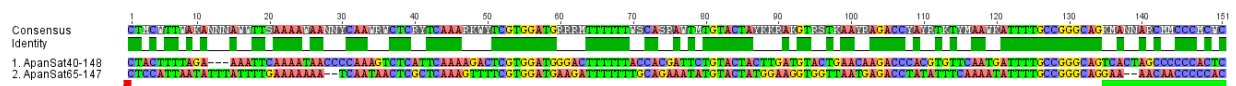
Superfamília 6 (65%)



Superfamília 7 (66%)

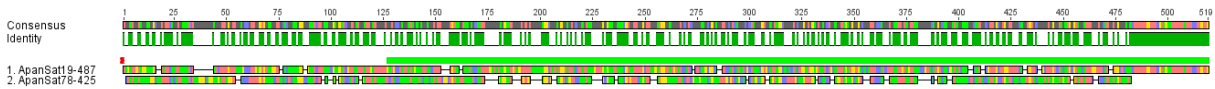


Superfamília 8 (60%)



APÊNDICE B – DADOS DE ALINHAMENTO E SIMILARIDADE DE satDNAs EM *A. pantina*

Superfamília 9 (51%)



Fonte: o autor.

ANEXO A – PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA / FENOL: CLORFÓRMIO

(Descrito por Sambrook et al., 1989)

1. Preparação da Amostra:

- Colocar tecido (cabeça, pronoto, pernas) em um tubo de 1,5 mL.
- Macerar com nitrogênio líquido.

2. Lise Celular e Digestão de Proteínas:

- Adicionar 500 µL de tampão de lise.
- Adicionar 15 µL de proteinase K (10 mg/mL), totalizando 20 µL.

2.2. Incubação:

- Incubar a 60°C sob agitação por 1 hora, ou até a completa digestão do tecido.

3. Remoção de RNA:

- Adicionar 15 µL de RNase (10 mg/mL), totalizando 20 µL.
- Deixar a 37°C por 1 hora.

4. Extração com Fenol-Clorofórmio:

- Adicionar o mesmo volume (600 µL) de fenol-clorofórmio (1:1).
- Misturar gentilmente por inversão.
- Centrifugar por 20 minutos a 14.000 rpm.

5. Limpeza com Clorofórmio:

- Transferir o sobrenadante para um novo tubo, com cuidado.
- Adicionar o mesmo volume de clorofórmio (600 µL).
- Misturar gentilmente por inversão.
- Centrifugar por 15 minutos a 14.000 rpm.

6. Precipitação do DNA:

- Transferir o sobrenadante para um novo tubo, com cuidado.
- Adicionar o mesmo volume de isopropanol 100% gelado (600 µL).
- Misturar gentilmente por inversão.
- Deixar precipitar a -20°C overnight ou a -80°C por 1 hora.

7. Lavagem do Pellet:

- Centrifugar por 20 minutos a 14.000 rpm.
- Descartar o sobrenadante, com cuidado.
- Lavar o pellet com 300 μ L de etanol 70% gelado.
- Centrifugar por 10 minutos a 14.000 rpm.

8. Secagem e Ressuspensão:

- Descartar o sobrenadante, com cuidado.
- Deixar secar na estufa a 55°C, com cuidado.
- Ressuspender em 30 μ L (máximo, depende do pellet) em TE ou água.
- Deixar eluir overnight.

Reagentes do Protocolo:

Tampão de lise

- 8 mL de Tris-HCl 1M pH 8,0
- 1 mL de NaCl 1M
- 10 mL de SDS 10%
- 2 mL de EDTA 0,5 M
- Completar para 100 mL

EDTA 0,5 M

- 9,3 g de EDTA
- Completar para 50 mL

Tris-HCl 1M pH 8,0

- 6,05 g de Tris
- Completar para 50 mL com água (após o pH chegar a 8, inicialmente não coloque 50 mL)
- Ajustar o pH com HCl

NaCl 1M

- 58,44 g de NaCl
- Completar para 1 L