

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

CRISLAINE XAVIER DA SILVA

**Estudo da diversidade genética de *Euchroma gigantea* (Coleoptera:
Buprestidae): contribuições à elucidação dos mecanismos evolutivos e *status*
taxonômico**

Recife
2018

CRISLAINE XAVIER DA SILVA

**Estudo da diversidade genética de *Euchroma gigantea* (Coleoptera:
Buprestidae): contribuições à elucidação dos mecanismos evolutivos e *status*
taxonômico**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Genética da Universidade Federal de
Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para
obtenção do título de Doutora em Genética.

Orientadora: Rita de Cássia de Moura
Coorientador: Diogo Cavalcanti Cabral de Mello

Recife

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Silva, Crislaine Xavier da

Estudo da diversidade genética de *Euchroma gigantea* (Coleoptera: Buprestidae): contribuições à elucidação dos mecanismos evolutivos e status taxonômico / Crislaine Xavier da Silva - 2018.

187 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Rita de Cássia de Moura

Coorientador: Diogo Cavalcanti de Mello

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Genética.

Recife,

2018.

Inclui referências e anexos

1. Evolução cromossômica 2. Citogenética molecular 3. *Euchroma gigantea* I. Moura, Rita de Cássia de (orient.) II. Mello, Diogo Cavalcanti (coorient.) III. Título

576.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018-406

Elaborado por Claudina Karla Queiroz Ribeiro CRB4/1752

CRISLAINE XAVIER DA SILVA

Estudo da diversidade genética de *Euchroma gigantea* (Coleoptera: Buprestidae): contribuições à elucidação dos mecanismos evolutivos e *status* taxonômico

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Área de Concentração Evolução, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de doutora em Genética.

Aprovada em 26/04/2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Rita de Cássia de Moura
Universidade de Pernambuco

Prof^a Dr^a Ana Maria Benko Iseppon
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o Dr. Luiz Gustavo Rodrigues Souza
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a Dr^a Ana Christina Brasileiro Vidal
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a Dr^a Neide Santos
Universidade Federal de Pernambuco

Àquelas cujos nomes carregam Alexandrina, Souza da Silva e Xavier. Minhas heroínas, que sempre foram exemplos de força e perseverança. Com muito amor, dedico.

AGRADECIMENTOS

Em 2008 fui apresentada a *Euchroma gigantea*. Na ocasião minha orientadora, Rita Moura, falou-me sobre a citogenética da espécie com muito entusiasmo. Fui convidada para estudar a espécie, mas desconversei. Alto polimorfismo cromossômico, cromossomos B, mecanismo de determinação sexual múltiplo... me assustei. Por muito tempo julguei que meus olhos ainda não estavam preparados para lidar com essa citogenética complexa. Até que chegou um tempo em que eu senti que era justamente desse desafio que eu precisava para crescer. Trabalhar com *Euchroma* exigiu de mim atributos que precisei aprender e exercitar. E nesse caminho eu sempre me inspirei e encontrei apoio em muitas pessoas. Jamais conseguiria trilhá-lo sozinha! Por isso tenho muito a agradecer a cada um que Deus colocou em meu caminho ao longo desses anos.

Agradeço a minha mãe, Lúcia, e ao meu pai, Joaquim, que sempre me incentivaram, deram todo o amor e suporte necessários para que eu chegasse até aqui. Aos meus irmãos, Carlos André e Cleriston pela parceria de sempre. A minha vizinha Maria, aos meus tios, tias, primos e primas pela compreensão das minhas ausências, por vibrarem comigo a cada conquista e pelo apoio sempre. Gratidão sem medidas. Amo muito vocês.

À minha orientadora-desde-sempre, Rita Moura. Juntas passamos por muitas fases e eu agradeço pela nossa parceria firme e forte em cada uma delas. Por todos os desafios propostos desde o início da minha jornada acadêmica. Por me permitir assumir responsabilidades para as quais eu não sabia que tinha competência. Pelo incentivo de enfrentar o novo, de buscar voar mais alto e de não ter medo das dificuldades. Durante todo esse tempo eu cresci bastante e devo muito disso à sua orientação, que foi sempre muito exigente e às vezes dura, mas também foi maternal às vezes, reconheço. Agradeço pela confiança e ainda pela compreensão em diversos momentos.

Ao meu coorientador, Diogo Cabral de Mello pela orientação, incentivos e por ter me permitido espaço para conduzir os experimentos com autonomia em seu laboratório. Agradeço também pelas suas críticas tão peculiares. Jamais as esquecerei porque sei que aprendi com todas elas. #semrancores

Encontrar Diogo e Rita nesta jornada foi um prazer. Profissionais exemplares, pelos quais tenho respeito, amizade, carinho e admiração. Serei sempre grata a vocês.

A Cláudio Vasconcelos por todo apoio e pela ajuda nas coletas em Recife, Brasília e Goiânia. Ao Dr. Gabriel da Luz Wallau pela colaboração na montagem e análises do genoma mitocondrial. Às professoras que compuseram a minha banca de qualificação Andrea Harand, Ana Christina Vidal e Neide Santos pelas críticas a este trabalho. Ao professor Dr. Fernando Silva e a MsC Amanda Arcanjo pelas amostras de Belém do Pará. Ao professor Dr. Edgar Bione pelo auxílio no início das coletas em Brasília. À Dra. Sônia Casari e ao Dr. Carlos Campaner pelas amostras cedidas pelo Museu de Zoologia da USP.

À velha guarda do LBGI: Adriana, Celso, Cristiane, Jéssica, Julliana, Igor e Sárah que estiveram comigo ao longo dessa jornada me dando suporte científico, metodológico e emocional também. A Karol e Rógean, que desde o começo embarcaram comigo no desafio de estudar *Euchroma*. A Aline, Geyner, Josival, Júlio, Liliane, Moara, Rafaelle e Thyago pelos conhecimentos, momentos de descontração e tudo o mais que partilhamos.

Ao pessoal do Laboratório de Citogenética Animal da UNESP de Rio Claro: Allison, Ana Beatriz, Diogo Milani, Mariani, Octávio, Rafael e Vanessa por todo o suporte metodológico e convívio durante a minha estada em Rio Claro. A Mariani e Vanessa, agradeço especialmente por terem me recebido em Rio Claro e por me permitirem a honra do convívio com suas famílias. Foi maravilhoso me sentir tão bem acolhida em suas casas e corações.

Às minhas amigas Cristina Heleodoro, Viviane Mattos e Amanda Albuquerque, que muitas vezes a distância foram sempre apoio para enfrentar essa jornada que todas nós amamos, mas que por vezes nos sequestra a subjetividade. Vocês me inspiram.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética pelas oportunidades e aos mestres que tanto contribuíram na minha formação. À CAPES, FACEPE, FAPESP, ao PFAUPE e ao CNPq pelo financiamento desta pesquisa.

“Diego não conhecia o mar. O pai, Santiago Kovadloff, levou-o para que descobrisse o mar. [...] Ele, o mar, estava do outro lado das dunas altas, esperando.

Quando o menino e o pai enfim alcançaram aquelas alturas de areia, depois de muito caminhar, o mar estava na frente de seus olhos. E foi tanta a imensidão do mar, e tanto seu fulgor, que o menino ficou mudo de beleza.

E quando finalmente conseguiu falar, tremendo, gaguejando pediu ao pai: — *Me ensina a olhar!*”

(Eduardo Galeano)

RESUMO

O gênero *Euchroma* Solier, 1833 (Buprestidae, Coleoptera) considerado monoespecífico para *E. gigantea*, apresenta polimorfismo morfológico e cromossômico. O objetivo deste trabalho foi correlacionar os polimorfismos genéticos de *E. gigantea* com o processo de diversificação cariotípica e *status* taxonômico da espécie. Espécimes de Recife-PE, Maceió-AL, Belém-PA, Ribeirão Preto-SP e Brasília-DF foram cariotipados e analisados através de FISH com sondas de DNAr 18S, histonas (H3/H4) e DNAsat (Egig1, Egig2, Egig3). Além disso, foram realizadas análises filogenéticas de um fragmento do COI, análise de variabilidade de dois DNAsat, montagem e análise do mitogenoma da espécie. Os cariótipos variaram entre $2n = 22$ e $2n = 36$, todos com mecanismo de determinação sexual múltiplo com cinco, seis ou oito cromossomos. Todos os cariótipos apresentaram cromossomos B, exceto os de Brasília. Rearranjos cromossômicos do tipo fissões, translocações e inversões pericêntricas foram os principais rearranjos responsáveis pela diversificação cromossômica em *E. gigantea*, que se originou a partir do cariótipo ancestral de Coleoptera. Análises filogenéticas do COI indicaram a ocorrência de três linhagens de *Euchroma* no Brasil, todas com polimorfismo cromossômico. Os sítios de histonas e Egig1 foram observados nas regiões pericentroméricas de todos os cromossomos em diferentes cariótipos. Sítios de DNAr e duas sequências de DNAsat foram variáveis entre diferentes cariótipos e indivíduos com mesmo cariótipo. Sequências repetitivas podem estar influenciando a alta taxa de rearranjos cromossômicos. Por outro lado, a variabilidade na distribuição de sítios de DNAr e DNAsat foi provavelmente ocasionada por rearranjos e eventos de recombinação ectópica. O mitogenoma da espécie possui características únicas, que podem ser consideradas linhagem-específicas e sinapomorfias no gênero.

Palavras-chave: Evolução cromossômica. Citogenética molecular. Filogenia. Especiação. Mitogenoma.

ABSTRACT

Euchroma Solier, 1833 (Buprestidae, Coleoptera) is a monospecific genus for *E. gigantea*, which presents morphological and chromosomal polymorphism. The aim of this work was to correlate the genetic polymorphisms of *E. gigantea* with the process of karyotype diversification and taxonomic status of the species. Specimens from Recife-PE, Maceió-AL, Belém-PA, Ribeirão Preto-SP and Brasília-DF were karyotyped and analyzed by FISH with 18S rDNA probes, histones (H3 / H4) and satDNA (Egig1, Egig2 , Egig3). In addition, phylogenetic analysis of a fragment of COI was performed, as well as variability analysis of two satDNAs, assembly and analysis of the mitogenome of the species. Karyotypes ranged from $2n = 22$ to $2n = 36$, all with multiple sexual mechanism with five, six or eight chromosomes. In addition, all karyotypes had B chromosomes, except those from Brasília. Chromosome rearrangements such as fission, translocations and pericentric inversions were the main rearrangements responsible for chromosome diversification in *E. gigantea* from the ancestral karyotype in Coleoptera. Phylogenetic analysis of COI indicated the occurrence of three lineages of *Euchroma* in Brazil, all with chromosomal polymorphism. Histone and Egig1 sites were observed in the pericentromeric regions of all chromosomes in different karyotypes. DNAr sites and two satDNA sequences were variable between different karyotypes and individuals with the same karyotype. Repetitive sequences may be influencing the high rate of chromosomal rearrangements. On the other hand, the variability in the distribution of rDNA and satDNA sites was probably caused by rearrangements and ectopic recombination events. The mitogenoma of the species has unique characteristics, which may be considered lineage-specific and synapomorphies in the genus.

Key words: Chromosomal evolution. Molecular cytogenetics. Phylogeny. Speciation. Mitogenome.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão da literatura

- Figura 1-** Sítipo de *Euchroma gigantea* descrito por Linnaeus em 1758, depositado no museu The Linnaean Society of London (a-c). Vista dorsal (a), ventral (b) e lateral (c) do adulto e vista dorsal da larva (d). Fonte: a-c) The Linnean Society of London, d) Autora.....26
- Figura 2-** Células em metáfase I de três espécimes de *Euchroma gigantea* oriundos do município de Colômbia-SP. Barra: 5 µm.....33
- Figura 3-** Células em metáfase espermatogonial (A-D) e metáfase I (E) de espécimes de *Euchroma gigantea* oriundos de Recife e Igarassu-PE. Barra: 10 µm.34
- Figura 4-** Padrão de bandeamento C, coloração com AgNO₃ e hibridização *in situ* fluorescente com sonda de DNAr em células meióticas e mitóticas de *Euchroma gigantea*. Metáfase mitótica de um macho (A). Representação esquemática do bandeamento C dos cromossomos sexuais (B). Impregnação com AgNO₃ em zigóteno indicando a RON (C). Metáfase espermatogonial exibindo os dois sítios de DNAr (D). Metáfase I indicando a localização dos sítios nos cromossomos X₁ e X₂ (cabeças de setas) (E). Barra: 10 µm.36
- Figura 5-** Diagrama do mitogenoma ancestral de insetos. Genes de RNAt estão indicados pelas abreviações de uma letra para seus aminiácidos correspondentes segundo a IUPAC. A direção da transcrição dos genes é indicada pelas setas. O tamanho dos genes é grosseiramente proporcional ao seu comprimento. Abreviações dos genes codificates de proteínas: atp6, atp8: Subunidades 6 e 8 da ATP sintase; cob: Citocromo oxidase b; cox1–cox3: Subunidades 1-3 da Citocromo oxidase c; nad1–6, nad4L, Subunidades 1-6 e 4L da NADH desidrogenase; rrnS, rrnL, subunidades maior e menor de RNA ribossomal; CR, região controle.....42

Insights into the karyotype evolution and speciation of the beetle *Euchroma gigantea* (Coleoptera: Buprestidae)

- Figure 1-** Sampling sites of *Euchroma gigantea* used for cytogenetic and COI analyses: Pará (PA), Pernambuco (PE), Alagoas (AL), São Paulo (SP),

and Federal District (DF). Coordinates: Belém—01° 28' 13.55" S, 48° 26' 49.98" W; Recife—08° 03' 060" S, 34° 57' 200" W; Maceió—09° 33' 4.11" S, 35° 46' 6.74" W; Ribeirão Preto—21° 10' 16.22" S, 47° 51' 19.67" W; Brasília—15° 46' 44.7" S, 47° 55' 20.4" W.....69

Figure 2- Chromosomal variation in metaphase I of *Euchroma gigantea* from (a–d) Brasília, DF; (e, f) Ribeirão Preto, SP; (g) Belém, PA; (h, j) Recife, PE; and (i, k) Maceió, AL. Black arrowheads indicate the ends of the sex chromosome chains with (a, i) five, (b, d–h, k) six, or (c) eight chromosomes. Note the presence of an autosomal trivalent (T) in a. Hollow arrowheads indicate examples of punctiform B chromosomes (e, f, g, k). Note two large B chromosomes (*) in g. Insets in i–k represent the alternative conditions of pair 1 in these karyotypes. Bar = 10 µm.....70

Figure 3- Variability of multiple sex chromosome mechanism in *Euchroma gigantea*. Conventional (a, p) and inverted DAPI staining (d, g, j, m). The same chain is shown in the second column, after FISH with histone H4 (green) or H3 (red) as probe, and respective drawing schemes are shown in the third column. Bar = 10 µm.....71

Figure 4- (a) Bayesian phylogenetic tree and (b) median-joining haplotype network topology for COI fragment from *Euchroma gigantea*. Abbreviations of sampling sites are shown in the tree and correspond to those in Table 1. The posterior probabilities/maximum likelihood bootstrap values are given near the branches. The scale bar indicates 0.04 change per site. In the network topology, small black circles represent extinct or unsampled haplotypes; numbers next to the network correspond to the number of steps among the lineages; and circle areas are proportional to the haplotype frequencies. Emb. pat.: *Embrikillium patricium*, Bup. lae. *Buprestis laeviventris*, Sphe. sp. *Sphenoptera* sp., and Sel. cal.: *Selagis caloptera*. Asterisks (*) next to the specimen abbreviation in DF samples correspond to the sexual chain with five (*), six (**), or eight (***) chromosomes.....72

Figure 5- FISH mapping of histones H3 and H4 in (a–e, g) meiotic and (f, h) mitotic cells of *Euchroma gigantea*. White arrowheads indicate the ends of the sex chromosome chains with (a, g) five, (c, d, e) six, or (b) eight

chromosomes. Insets in (g) represent the alternative conditions to pair 1 in this karyotype. Bar = 10 μ m.....73

Figure 6- Hypotheses of chromosomal evolution in *Euchroma gigantea* (a, b). Idiograms A and B (a) correspond to Coleoptera and Buprestidae modal karyotypes, respectively. Underlined letters are karyotypes described in this work; remaining karyotypes were described in Mesa and Fontanetti (1984) and Moura et al. (2008). *Pericentric inversions were observed in one or two pairs of these karyotypes.....74

Figure S1- Karyotype analysis of *Euchroma gigantea* with $2n = 22$, $X_1Y_1X_2Y_2X_3$ from Brasília-DF. The cells are stained with Giemsa. Autosomal and sexual chromosomes are indicated and chromosomes of compound trivalent are indicated as T_A (acrocentric) and T_M (metacentric). The insert is a sexual chain from a different metaphase belonging to the same individual. Bar = 5 μ m.....75

Figure S2- Karyotype analysis of *Euchroma gigantea* with $2n = 22$, $X_1Y_1X_2Y_2X_3Y_3$ from Brasília-DF. The cells are stained with Giemsa. Autosomal and sexual chromosomes are indicated. All cells belong to same individual. Bar = 5 μ m.....76

Figure S3- Karyotype analysis of *Euchroma gigantea* with $2n = 22$, $X_1Y_1X_2Y_2X_3Y_3X_4Y_4$ from Brasília-DF. The cells are stained with Giemsa. Autosomal and sexual chromosomes are indicated. All cells belong to same individual. Bar = 5 μ m.....77

Figure S4- Karyotype analysis of *Euchroma gigantea* with $2n = 24$, $X_1Y_1X_2Y_2X_3Y_3$ from Brasília-DF. The cell is stained with DAPI and the color was inverted using Photoshop CC 2014. Autosomal and sexual chromosomes are indicated. Bar = 5 μ m.....78

Figure S5- Karyotype analysis of *Euchroma gigantea* with $2n = 26$, $X_1Y_1X_2Y_2X_3Y_3$ from Ribeirão Preto-SP. The cell is stained with Giemsa. Autosomal and sexual chromosomes are indicated. Bar = 5 μ m.....78

Figure S6- Karyotype analysis of *Euchroma gigantea* with $2n = 28$, $X_1Y_1X_2Y_2X_3Y_3$ from Ribeirão Preto-SP. The cell is stained with Giemsa. Autosomal and sexual chromosomes are indicated. Bar = 5 μ m.....79

Figure S7- Karyotype analysis of <i>Euchroma gigantea</i> with $2n = 32$, $X_1Y_1X_2Y_2X_3Y_3$ from Belém-PA. The cell is stained with Giemsa. Autosomal and sexual chromosomes are indicated. Bar = 5µm.....	80
Figure S8- Karyotype analysis of <i>Euchroma gigantea</i> with $2n = 32$, $X_1Y_1X_2Y_2X_3Y_3 + 2$ B, from Belém-PA. The cell is stained with Giemsa. Autosomal and sexual chromosomes are indicated. Note the presence of two large B chromosomes. Bar = 5µm.....	81
Figure S9- Karyotype analysis of <i>Euchroma gigantea</i> with $2n = 34$, $X_1Y_1X_2Y_2X_3Y_3$ from Recife-PE. The cell is stained with DAPI and the color was inverted in Photoshop CC 2014. Autosomal and sexual chromosomes are indicated. Bar = 5µm.....	82
Figure S10- Karyotype analysis of <i>Euchroma gigantea</i> with $2n = 35$, $X_1Y_1X_2Y_2X_3$ from Maceió-AL. The cell is stained with Giemsa. Autosomal and sexual chromosomes are indicated. Bar = 5µm.....	83
Figure S11- Karyotype analysis of <i>Euchroma gigantea</i> with $2n = 36$, $X_1Y_1X_2Y_2X_3Y_3$ from Recife-PE. The cell is stained with Giemsa. Autosomal and sexual chromosomes are indicated. Bar = 5µm.....	84
Figure S12- C-banding in meiotic cell of <i>E. gigantea</i> . The black arrowheads indicate the ends of sex chain and hollow arrowheads point to punctiform B chromosomes. In detail, comparison of pair 1 heteromorphic (submeta/acrocentric) and homomorphic with two homologs acrocentric. Bar = 10µm.....	85
Figure S13- Co-localization of histone genes in meiotic cell. The white arrowheads indicate the ends of sexual chain and hollow arrowheads point to punctiform B chromosomes. Bar = 10µm.....	85
18s rDNA and satDNAs mapping in the chromosomes of <i>Euchroma gigantea</i> (Coleoptera: Buprestidae) highlights the complex evolutionary history of divergent karyotypes	
Figure 1- Egig2 and Egig3 sequence logos (upper) and haplotype networks (bottom). In the logos each line represents sequence variation in lineages Northeast, North and Southeast/Midwest. In nodes with more than one mutation between haplotypes, the number of steps are indicated. Small black circles correspond to unsampled haplotypes and circles are proportional to the haplotypes frequencies.....	103

- Figure 2-** Fluorescence *in situ* hybridization with 18S rDNA probe on meiotic (a-f, h-j) and mitotic (g,k) cells of *Euchroma gigantea*. The arrows indicate 18S rDNA sites and arrowheads indicate the ends of sex chromosome chain with five (a, h-j), six (b, d-f) or eight chromosomes (c). Note in (a) the presence of an autosomal trivalent – T. See the dot B chromosomes in (d, g-k). The diploid numbers and location of sampling are indicated in each image. Bar = 10µm.....104
- Figure 3-** FISH mapping of Egig1 in spermatogonial metaphases (a, c), metaphases I (b, d) and metaphases II (e, f) of *Euchroma gigantea*. Note the location of signals in pericentromeric regions of all chromosomes independent of diploid number. The diploid numbers and location of sampling are indicated directly in each cell. Bar: 5µm.....105
- Figure 4-** Meiotic cells in metaphases II (a, b) and metaphases I (c-f) of *Euchroma gigantea* probed for Egig2 (green) and Egig3 (red) through FISH. Inserts show separated signals. The diploid numbers and location of sampling are indicated directly in each image. Bar = 10µm.....106
- Figure 5-** Chromosomal mapping through FISH of Egig3 and 18S rDNA in *Euchroma gigantea* metaphases I showing the co-location of both sequences. Inserts show the signals separately. Bar 10 µm.....106
- Figure S1-** Idiograms showing results of FISH with rDNA probe. The asterisks (*) identify heteromorphic pairs.....107

Mitogenoma de *Euchroma gigantea* (Coleoptera: Buprestidae) revela redução do gene *COII*, sequência não codificante e duplicação de genes de RNAt

Figura 1- Mapa circular do mitogenoma de *Euchroma gigantea*. Os genes de RNAt estão indicados de acordo com o código de três letras para o aminoácido segundo a IUPAC. Abreviações: *ATP6*, *ATP8*, genes das subunidades 6 e 8 da ATP sintase; *Cob*, gene da citocromo oxidase b; *COI*, *COII*, *COIII*, genes das subunidades 1-3 da citocromo C oxidase; *ND1-6*, *ND4L*, genes das subunidades 1-6 e 4L da NADH desidrogenase; *rRNAL*, *rRNAS*, subunidades do RNA ribossomal. O círculo interno em azul representa a cobertura de *reads* para cada nucleotídeo. Azul mais escuro marca regiões onde a profundidade de sequenciamento foi maior que 1000x. O círculo externo indica as regiões anotadas pelo MITOS com RNAt em

amarelo, genes codificantes de proteínas em azul com exceção do COII em verde. Os genes de RNAr estão marcados em vermelho e a região controladora em cinza.....124

Figura 2- Esquema do fragmento entre o gene *RNA^tL2* e *ATP8*. Os genes de *RNA^t* estão indicados de acordo com o código de três letras para o aminoácido segundo a IUPAC. Note o tamanho do gene COII conservado (618 pb) e três tipos de organização na região após o gene *RNA^tAsp*. No tipo I, uma duplicação do gene *RNA^tAsp*, está separada da sua cópia por uma região não codificante de 370 pb; no tipo II, presença de um gene *RNA^tAsn2* e uma região não codificante de 171 pb; no tipo III, presença do gene *RNA^tTyr*, no sentido inverso, que se sobrepõem em 1 pb ao gene de *RNA^tAsp*125

Figura 3- Predição de estruturas secundárias dos genes de *RNA^tAsp*, *RNA^tTyr2* e *RNA^tAsn2* identificadas no mitogenoma de *Euchroma gigantea*. Variações em cada sítio do *RNA^tAsp1* foram indicadas próximo ao nucleotídeo correspondente. Cada amostra com mutações foi identificada com uma cor e as que foram idênticas à sequência identificada na montagem do mitogenoma foram mantidas em preto. Note em *RNA^tAsp1* e *RNA^tAsp1'* que a diferença em 1pb alterou o tamanho do *loop TψU*.....125

Figura 4- Alinhamento entre as sequências variantes do gene *RNA^tAsp* e do gene putativo *RNA^tAsn2*.....126

Figura 5- Árvore filogenéticas bayesiana para as sequências de nucleotídeos dos genes codificantes de proteínas de *Euchroma gigantea* e outras espécies da ordem Coleoptera. Os valores de probabilidade posterior/aLTR estão indicados próximos aos nós. A barra de escala indica o número de mutações por sítio.....127

Figura 6- Árvore filogenética bayesiana para as sequências de aminoácidos dos genes codificantes de proteínas de *Euchroma gigantea* e outras espécies da ordem Coleoptera. Os valores de probabilidade posterior/aLTR estão indicados próximos aos nós. A barra de escala indica o número de mutações por sítio.....128

Figura S1- Estruturas secundárias preditas para os 23 genes de tRNA do mitogenoma de *Euchroma gigantea*.....130

Figura S2- Comparação da sequência de nucleotídeos do gene <i>COII</i> entre espécies de Buprestoidea.....	131
Figura S3- Comparação da sequência de aminoácidos do gene <i>COII</i> entre espécies de Buprestoidea. Note as regiões I e II, e os sítios evolutivamente conservados entre vertebrados, levedura, milho e insetos: histidina (24, 161) em verde, ácido glutâmico (62 e 202) em rosa e ácido aspártico (88, 139,158 e 173) em azul.....	133

LISTA DE TABELAS

Revisão da literatura

Tabela 1- Números diploides das espécies de Buprestidae analisadas citogeneticamente.....	29
--	----

Insights into the karyotype evolution and speciation of the beetle *Euchroma gigantea* (Coleoptera: Buprestidae)

Table 1- <i>Euchroma gigantea</i> sampling locations, chromosomal variability, and COI Genbank accession numbers.....	68
--	----

Table 2. Pairwise distance of cytochrome oxidase c I subunit within and between populations of <i>Euchroma gigantea</i> . The means (minimum–maximum) of pairwise distances are indicated.....	69
---	----

18s rDNA and satDNAs mapping in the chromosomes of *Euchroma gigantea* (Coleoptera: Buprestidae) highlights the complex evolutionary history of divergent karyotypes

Table 1- Chromosomal data of <i>Euchroma gigantea</i> analyzed individuals per sampling site.....	104
--	-----

Mitogenoma de *Euchroma gigantea* (Coleoptera: Buprestidae) revela redução do gene *COII*, sequência não codificante e duplicação de genes de RNAt

Tabela 1- Localidades de coleta dos espécimes analisados e cariótipos.....	126
---	-----

Tabela 2- Distância par a par entre as sequências variantes do gene RNAt ^{Asp} e o gene RNAt ^{Asn2}	129
--	-----

Tabela S1- Resumo do mitogenoma de <i>Euchroma gigantea</i>	130
--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2n	Número diploide
AgNO ₃	Nitrato de prata
AL	Estado de Alagoas
CAD	Domínio carbamoilfosfato-sintase
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CMA ₃	Cromomicina A ₃
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
COI	Citocromo c oxidase subunidade I
DAPI	4'-6-diamidino-2-fenil-indol
dATP	Desoxiadenosina trifosfato
DF	Distrito Federal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNA C0t-1	DNA altamente e moderadamente repetido
DNAr	DNA ribossomal
DNAsat	DNA Satélite
dUTP	Desoxiuridina trifosfato
eccDNA	Extrachromosomal circular DNA
FACEPE	Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FISH	Hibridização <i>in situ</i> fluorescente
FITC	Isocianato de fluoresceína
GO	Estado de Goiás
HC	Heterocromatina constitutiva
IBAMA	Instituto do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LBGI	Laboratório de Biodiversidade e Genética de Insetos
MEGA	<i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i>
mL	Mililitros
mm	Milímetros
PA	Estado do Pará
pb	Pares de bases

PE	Estado de Pernambuco
PFAUPE	Programa de Fortalecimento Acadêmico da UPE
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNA	Ácido ribonucleico
RNAr	RNA ribossomal
RON	Região organizadora do nucléolo
RNA _t	RNA transportador
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UNESP	Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
UPE	Universidade de Pernambuco
Xy _p	Sistema sexual Xy com configuração em para-quedas
Xy _r	Sistema sexual Xy com configuração em bastão

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 OBJETIVOS	23
1.1.1 Objetivo geral	23
1.1.2 Objetivos específicos.....	23
2 REVISÃO DA LITERATURA	25
2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A FAMÍLIA BUPRESTIDAE (COLEOPTERA)	25
2.1.1 <i>Euchroma gigantea</i>	26
2.2 CITOGENÉTICA DE BUPRESTIDAE	28
2.2.1 Citogenética de <i>Euchroma gigantea</i>	32
2.3 REARRANJOS CROMOSSÔMICOS E ESPECIAÇÃO	36
2.4 USO DE DNA REPETITIVO NO ENTENDIMENTO DA EVOLUÇÃO CROMOSSÔMICA EM COLEOPTERA	39
2.5 O DNA MITOCONDRIAL E APLICAÇÃO EM INCERTEZAS TAXONÔMICAS ..	42
3 INSIGHTS INTO THE KARYOTYPE EVOLUTION AND SPECIATION OF THE BEETLE <i>EUCHROMA GIGANTEA</i> (COLEOPTERA: BUPRESTIDAE)	45
4 18S rDNA AND SATDNAS MAPPING IN THE CHROMOSOMES OF <i>EUCHROMA GIGANTEA</i> (COLEOPTERA: BUPRESTIDAE) HIGHLIGHTS THE COMPLEX EVOLUTIONARY HISTORY OF DIVERGENT KARYOTYPES	86
5 MITOGENOMA DE <i>EUCHROMA GIGANTEA</i> (COLEOPTERA: BUPRESTIDAE) REVELA REDUÇÃO DO GENE <i>COII</i>, SEQUÊNCIA NÃO CODIFICANTE E DUPLICAÇÃO DE GENES DE rNAT	108
6 DISCUSSÃO GERAL	134
7 CONCLUSÕES	146

REFERÊNCIAS.....	147
ANEXO A – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO	159
ANEXO B - CURRICULUM VITAE (LATTES).....	181

1 INTRODUÇÃO

Euchroma gigantea Linneus 1735 é um besouro pertencente à família Buprestidae, subfamília Chrysochroinae e tribo Chalcophorini. Para esta espécie atualmente são consideradas quatro subespécies (*E. gigantea goliath*, *E. gigantea harperi*, *E. gigantea inca* e *E. gigantea peruanum*) e algumas variedades, todas com distribuição neotropical. Citogeneticamente a espécie apresentou um alto polimorfismo, com espécimes apresentando cariótipos com $2n = 24, 26, 32, 33, 34$ e 36 . Todos os cariótipos possuem mecanismo de determinação sexual múltiplo em cadeia com cinco ou seis cromossomos e cromossomos B que variaram de cinco a 32.

Com base nos cariótipos descritos e em cariótipos hipotéticos foi sugerida a ocorrência de sucessivos rearranjos do tipo fusão (reduzindo o número cromossômico de $2n = 36$ a 24) ou fissão (aumentando o número cromossômico de $2n = 24$ a 36), além de inversões pericêntricas como sendo responsáveis pela variação cromossômica observada em *E. gigantea*. O alto polimorfismo cromossômico observado na espécie, aliado à descrição de subespécies e variedades, sugerem a ocorrência de diferentes espécies no gênero *Euchroma*, que é considerado monoespecífico.

Rearranjos cromossômicos quando fixados entre subpopulações de uma espécie e em espécies proximalmente relacionadas podem facilitar o isolamento reprodutivo. O cruzamento entre progenitores cromossomicamente divergentes pode comprometer a viabilidade ou a fertilidade dos híbridos em decorrência de problemas de segregação durante a meiose, da formação de gametas não balanceados ou de possíveis incompatibilidades gênicas entre os parentais. Para o entendimento do papel dos rearranjos cromossômicos no processo de especiação, análises filogenéticas, principalmente com o uso de genes mitocondriais, têm sido realizadas possibilitando a identificação de barreiras reprodutivas entre espécies ou subpopulações cromossomicamente divergentes.

Até o presente não foram realizados estudos correlacionando o polimorfismo cromossômico de *E. gigantea* com marcadores genéticos, que possam ajudar a elucidar se a variação cromossômica descrita corresponde a cariótipos espécie-específicos ou constitui um alto polimorfismo como sugerido

anteriormente. Assim, a ampliação da análise cariotípica em espécimes de diferentes localidades brasileiras, bem como o mapeamento de sequências de DNA repetitivo (DNAr 18S, histonas e DNAs satélites) nos diversos cariótipos poderão contribuir para a melhor identificação dos rearranjos cromossômicos envolvidos da diversificação cromossômica em *E. gigantea*. Além disso, análises comparativas e filogenéticas do mitogenoma e de fragmentos do gene COI em espécimes cariotipados fornecerão subsídios para testar a suposta condição polimórfica da espécie ou a ocorrência de um complexo de espécies crípticas. Isto permitirá verificar se (I) *Euchroma gigantea* é uma espécie cromossomicamente polimórfica ou se (II) diferentes cariótipos constituem grupos filogeneticamente distintos, gerando evidências da ocorrência de espécies crípticas.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Realizar análises cromossômicas e moleculares em espécimes de *Euchroma gigantea*, visando correlacionar os polimorfismos genéticos com o processo de diversificação cariotípica e *status* taxonômico da espécie.

1.1.2 Objetivos específicos

1. Descrever a macroestrutura cromossômica de espécimes de *Euchroma gigantea* de diferentes localidades para verificar a ocorrência de polimorfismo cromossômico e novos cariótipos.
2. Verificar o *status* taxonômico da espécie através de análise filogenética visando correlacioná-lo com a variação cromossômica.
3. Propor um modelo evolutivo com base na diversificação cromossômica de *E. gigantea* visando identificar os principais rearranjos envolvidos no processo.
4. Verificar se sequências repetitivas de DNA estão envolvidas no processo de diversificação cromossômica da espécie.

5. Determinar a estrutura do mitogenoma e verificar se existe variação significativa de alguma região entre indivíduos de diferentes cariótipos e localidades.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A FAMÍLIA BUPRESTIDAE (COLEOPTERA)

Buprestidae (Subordem: Polyphaga) constitui uma das famílias de besouros mais representativas, com cerca de 15.000 espécies distribuídas em todas as regiões biogeográficas, desde as florestas boreais do Hemisfério Sul até as mais distantes ilhas do oceano pacífico (BELLAMY, 2008; BELLAMY; VOLKOVITSH, 2005). No Brasil, há registros de 1.459 espécies, pertencentes a 68 gêneros (CASARI; IDE, 2012). Bellamy (2003), baseando-se na análise morfológica da antena realizada por Volkovitsh (2001), propôs para Buprestidae a ocorrência de seis subfamílias (Julodinae, Polycestinae, Galbelinae, Chrysochroinae, Buprestinae e Agrilinae).

Recentemente, Evans *et al.* (2015) construíram uma filogenia molecular utilizando uma sequência concatenada de genes nucleares (CAD, DNAr 18S, 28S) e mitocondrial (COI), e observaram que várias das 141 espécies estudadas apresentaram agrupamento inesperado quando comparado com a classificação de Bellamy (2003). Neste trabalho, foram observados três clados principais, um correspondente a subfamília Agrilinae, outro aos representantes das subfamílias Buprestinae, Chrysochroinae e Galbelinae, e o terceiro formado por espécies de Polycestinae e Julodinae Evans *et al.* (2015).

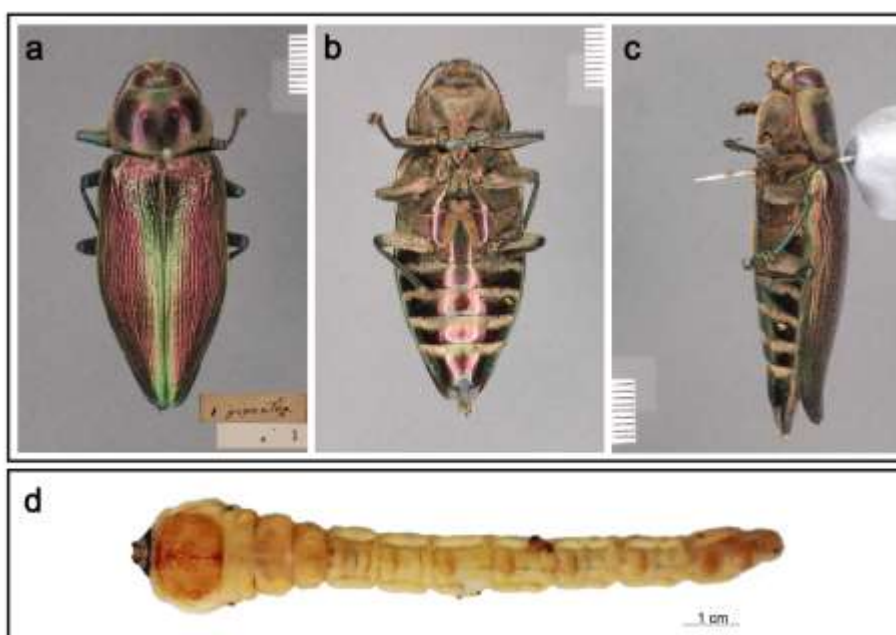
Embora os suportes dos nós não tenham sido suficientes para determinar de forma conclusiva as inter-relações entre as seis subfamílias, os resultados foram consistentes com as principais linhagens geralmente aceitas em estudos baseados em caracteres morfológicos, com exceção da subfamília monogenérica Galbelinae que, embora tenha formado um grupo monofilético, permaneceu inserida no clado Buprestinae-Chrysochroinae. Apesar da monofilia da família Buprestidae ter sido fortemente suportada por Evans *et al.* (2015), os autores sugeriram que estudos adicionais são necessários para o melhor entendimento das inter-relações entre as subfamílias de Buprestidae.

2.1.1 *Euchroma gigantea*

Euchroma Dejean, 1833 é um dos 79 gêneros da família Buprestidae com ocorrência no Brasil. Este gênero está incluído na subfamília Chrysochroinae, tribo Chalcophorini (BELLAMY, 2008; BLACKWELDER, 1944) e é considerado monoespecífico para *E. gigantea* Linneus 1735. *Euchroma gigantea* possui descrições de seis variedades e quatro subespécies (*E. gigantea goliath*, *E. gigantea harperi*, *E. gigantea inca* e *E. gigantea peruanum*) as quais apresentam distribuição neotropical (BELLAMY, 2008; BLACKWELDER, 1944).

Euchroma gigantea é uma espécie vulgarmente conhecida como mãe-de-sol ou buprestídeo gigante da América do Sul (RODRIGUES-NETTO; CAMPOS; IDE, 2003), devido a sua coloração iridescente metálica e ao tamanho, que pode chegar a oito centímetros na fase adulta (Figura 1a-c) (COSTA LIMA, 1953). Na fase de larva, os espécimes medem em torno de um centímetro no primeiro instar, podendo chegar até 15 cm no 5º e último instar (FONSECA, 2010; GARCIA, 1998). Assim como outras larvas de espécies de Buprestidae, as larvas de *E. gigantea* lembram a forma de uma palmatória (COSTA LIMA, 1953), apresentando coloração amarelo-creme, cabeça grande em relação ao corpo e com uma placa esclerosada na região do protorax (GARCIA, 1998) (Figura 1d).

Figura 1. Síntipo de *Euchroma gigantea* descrito por Linnaeus em 1758, depositado no museu The Linnaean Society of London (a-c). Vista dorsal (a), ventral (b) e lateral (c) do adulto e vista dorsal da larva (d).



Fonte: a-c) The Linnean Society of London, d) Autora.

Considerando a classificação de *E. gigantea* em subespécies, existe registro apenas para *E. gigantea inca* na Região Sudeste do Brasil (BELLAMY, 2008). Nas demais localidades onde esta espécie ocorre não há informações sobre a qual subespécie os exemplares pertencem, sendo todos classificados unicamente como *Euchroma gigantea*. Assim, no Brasil há registros de *E. gigantea* nos estados do Amazonas (INPA, 2013), Ceará (PEREIRA et al., 2013), Paraíba (CREÃO-DUARTE et al., 2000), Pernambuco (MOURA; MELO; SOUZA, 2008), Alagoas (FONSECA, 2010), Bahia (LIMA; SOUZA; LHANO, 2014), Goiás (GARCIA, 1998), Minas Gerais (VICHATO et al., 2014), São Paulo (MESA; FONTANETTI, 1984; RODRIGUES-NETTO; CAMPOS; IDE, 2003), Rio de Janeiro (SHARP, 1881), Mato Grosso do Sul (BERTI FILHO; MENDES FILHO; KRUGNER, 1980) e no Distrito Federal (MORENO, 2010). *Euchroma gigantea* é geralmente encontrada hospedada em espécies da família Malvaceae comumente utilizadas para arborização de áreas urbanas, como *Pachira aquatica* (GARCIA, 1998, 1999), *P. quinatum* (ARGUEDAS, 2006), *Ceiba speciosa* (RODRIGUES-NETTO; CAMPOS; IDE, 2003), *C. pentandra* (GARCÍA; PÉREZ; IRIARTE, 2014) e *Eriotheca crenulaticalyx* (CREÃO-DUARTE et al., 2000). No entanto, existem relatos da ocorrência de *E. gigantea* também em espécies de outras famílias, por exemplo, *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) (MECKE, 2002) e *Ficus* spp. (Moraceae) (BERTI FILHO; MENDES FILHO; KRUGNER, 1980).

Estudos sobre a biologia da espécie são escassos, no entanto foram realizadas observações sobre o desenvolvimento de *E. gigantea* em espécimes de *P. aquatica* em Goiânia – GO (GARCIA, 1998) e Maceió-AL (FONSECA, 2010). As fêmeas ovopositam em média seis vezes entre os meses de dezembro e março, com uma média de 40 ovos por postura em fendas próximas às raízes da espécie hospedeira (FONSECA, 2010; GARCIA, 1998). A eclosão das larvas ocorre em média em 19 dias e a partir de então as mesmas constroem uma galeria no sentido do sistema radicular da planta, onde se alimentam e se desenvolvem em média por 240 dias, com viabilidade média de 72% (GARCIA, 1998). O período pré-pupal apresenta um tempo médio de 13 dias e a viabilidade média de 63%, o período pupal tem média de 30 dias e viabilidade de 69%. O empupamento ocorre entre a serragem deixada pelas larvas, ficando a pupa com

a cabeça voltada para a entrada da galeria e após o período pupal, o adulto constrói uma galeria de forma ovalada no sentido vertical em direção à superfície do solo. O ciclo biológico médio é de 302 dias (GARCIA, 1998) e segundo Fonseca (2010), o adulto tem longevidade média de 60 dias.

Este hábito de reprodução de *E. gigantea*, aliado à voracidade das larvas, são características que a fazem se destacar como praga, causando prejuízos diretos na planta hospedeira, que fica sem nenhum sistema de sustentação e cai devido a ação dos ventos, e indiretos, provocados pela queda das árvores, colocando em risco a segurança de pessoas e animais (RODRIGUES-NETTO; CAMPOS; IDE, 2003). No Brasil, em alguns estados e particularmente na cidade de Brasília, onde a *Pachira aquatica* foi extensivamente utilizada para a arborização urbana, mais de 1500 exemplares da espécie foram removidos devido ao risco iminente de queda das árvores infestadas por *E. gigantea* (MORENO, 2010).

2.2 CITOGENÉTICA DE BUPRESTIDAE

Os estudos citogenéticos prévios na família Buprestidae foram realizados apenas em 93 espécies (0,62%) pertencentes a 23 gêneros (Mesa e Fontanetti, 1984; Karagyan e Kuznetsova, 2000; Karagyan *et al.*, 2004, 2012; Karagyan e Lachowska, 2007; Moura *et al.*, 2008). Embora este número seja relativamente baixo, é possível observar uma considerável variabilidade cariotípica nesta família, onde o número diploide varia de $2n = 12$ em *Melanophila acuminata* (Buprestinae) a $2n = 46$ em *Sphenoptera scovitzi* (Chrysochroinae) (Tabela 1).

O número cromossômico modal é o $2n = 22$, presente em 36 espécies das subfamílias Agrilinae (4) e Buprestinae (32), seguido por $2n = 20$, observado em 19 espécies distribuídas em todas as subfamílias exceto Julodinae (KARAGYAN, 2001; KARAGYAN; KUZNETSOVA, 2000; KARAGYAN; KUZNETSOVA; LACHOWSKA, 2004; KARAGYAN; LACHOWSKA, 2007; KARAGYAN; LACHOWSKA; KALASHIAN, 2012).

Quanto ao sistema de determinação sexual, o mais frequente é o XY, encontrado em diferentes conformações (XY_p , XY_r , "XY"), no entanto, sistemas sexuais derivados do tipo neo-XY e múltiplos X-Y também são observados. O tipo

"pára-quedas" Xy_p é o mais comum e foi registrado em 66 espécies (Tabela 1) (KARAGYAN, 2001; KARAGYAN; KUZNETSOVA, 2000; KARAGYAN; KUZNETSOVA; LACHOWSKA, 2004; KARAGYAN; LACHOWSKA, 2007; KARAGYAN; LACHOWSKA; KALASHIAN, 2012; MESA; FONTANETTI, 1984; MOURA; MELO; SOUZA, 2008).

Tabela 1. Números diploides das espécies de Buprestidae analisadas citogeneticamente.

Subfamília <i>Espécies</i>	Cariótipo	Referências
Agrilinae		
<i>Agrilus</i> sp.	20, neo-XY	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>A. angustulus</i>	22, Xy_p	Karagyan et al., 2004
<i>A. anxius</i>	22, Xy_p	Karagyan et al., 2004
<i>A. araxenus</i>	20, Xy_p	Karagyan et al., 2004
<i>A. liragus</i>	20, neo XY	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>A. obscuricollis</i>	20, Xy_p	Karagyan et al., 2004
<i>A. politus</i>	20, XY	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>Coraebus rubi</i>	22, Xy_p	Karagyan et al., 2004
<i>C. sinuatus</i>	24, XY	Karagyan et al., 2004
<i>Meliboeus caucasicus</i>	22, Xy_p	Karagyan et al., 2004
Buprestinae		
<i>Anthaxia amasina</i>	16, Xy_p	Karagyan e Lachowska, 2007
<i>A. bicolor</i>	16, Xy_p	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>A. deaurata</i>	16, Xy_p	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>A. hungarica</i>	16, Xy_p	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>A. Igockii</i>	16, Xy_p	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>A. mirabilis</i>	16, Xy_p	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>A. olympica</i>	16, Xy_p	Karagyan e Lachowska, 2007
<i>A. podolica</i>	16, Xy_p	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>A. sponsa</i>	16, Xy_p	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>A. viridifrons</i>	16, Xy_p	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>Buprestis fasciata</i>	20	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>Castiarina adelaidae</i>	22, Xy_p	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>C. argillacea</i>	22, Xy_p	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>C. cupreoflava</i>	22, Xy_p	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>C. decemmaculata</i>	22, Xy_p	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>C. flavopicta</i>	22, Xy_p	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>C. grata</i>	22, Xy_p	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>C. rufipennis</i>	22, Xy_p	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>C. sexplagiata</i>	22, Xy_p	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>C. simulata</i>	22, Xy_p	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>C. subnotata</i>	22, Xy_p	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>C. subtineta</i>	22, Xy_p	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>C. triramosa</i>	22, Xy_p	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>Chrysobothris affinis</i>	16, Xy_p	Karagyan e Lachowska, 2007
<i>C. dentipes</i>	16, Xy_p	Karagyan e Kuznetsova, 2000

Subfamília Espécies	Cariótipo	Referências
<i>C. floricola</i>	16, Xy _p	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>Melanophila acuminata</i>	12, Xy _p	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>M. drummondi</i>	16, XY	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>M. intrusa</i>	16, XY	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>Sphaerobothris aghababiani</i>	16, Xy _p	Karagyan et al., 2012
<i>Stigmodera cancellata</i>	22, Xy _p	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>S. goryi</i>	22, Xy _p	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>S. gratiosa</i>	22, Xy _p	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>S. macularia</i>	22, Xy _p	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>S. porosa</i>	22, Xy _p	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>S. roei</i>	22, Xy _p	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>Themognatha alternata</i>	20, Xy _p	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>T. barbiventris</i>	22, Xy _p	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>T. bonvouloiri</i>	22, Xy _p	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>T. chalcodera</i>	22, Xy _p	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>T. chevrolati</i>	22, Xy _p	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>T. donovani</i>	22, Xy _p	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>T. heros</i>	22, Xy _p	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>T. mitchelli</i>	22, Xy _p	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>T. mnischechi</i>	22, Xy _p	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>T. nickerli</i>	20, Xy _p	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>T. parvicollis</i>	22, Xy _p	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>T. pubicollis</i>	22, Xy _p	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>T. regia</i>	22, Xy _p	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>T. tricolorata</i>	22, Xy _p	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>T. variabilis</i>	22, Xy _p	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>T. viridicincta</i>	22, Xy _p	Karagyan e Kuznetsova, 2000
Chrysochroinae		
<i>Acmaeodera flavolineata</i>	20, neo-XY	Karagyan e Lachowska, 2007
<i>Capnodis miliars</i>	20, Xy _p	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>C. tenebrionis</i>	14, neo-XY	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>Chalcophora lacustris</i>	21, X0	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>Dicerca aenea validiuscula</i>	20, Xy _p	Karagyan et al., 2012
<i>D. divaricata</i>	20, Xy _p	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>D. prolongata</i>	20, Xy _p	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>D. tenebrosa</i>	20, Xy _p	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>Euchroma gigantea</i>	24, X ₁ Y ₁ X ₂ Y ₂ X ₃ Y ₃	Mesa e Fontanetii, 1984
<i>E. gigantea</i>	26, X ₁ Y ₁ X ₂ Y ₂ X ₃	Mesa e Fontanetii, 1984
<i>E. gigantea</i>	32, X ₁ Y ₁ X ₂ Y ₂ X ₃ Y ₃	Moura et al., 2008
<i>E. gigantea</i>	33	Moura et al., 2008
<i>E. gigantea</i>	34, X ₁ Y ₁ X ₂ Y ₂ X ₃ Y ₃	Moura et al., 2008
<i>E. gigantea</i>	36, X ₁ Y ₁ X ₂ Y ₂ X ₃ Y ₃	Moura et al., 2008
<i>Ovalisiana nasdezhdae</i>	20, Xy _p	Karagyan et al., 2004
<i>Perotis cuprata</i>	20, Xy _p	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>P. lugubris</i>	20, Xy _p	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>Sphenoptera artemisiae</i>	24, XY	Karagyan et al., 2004

Subfamília Espécies	Cariótipo	Referências
<i>S. glabrata</i>	40, XY	Karagyan et al., 2004
<i>S. mesopotâmica</i>	24, XY	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>S. scovitzii</i>	24	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>S. scovitzii</i>	38-46	Karagyan et al., 2012
<i>S. tamarisci</i>	30, neo-XY	Karagyan e Lachowska, 2007
Julodinae		Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>Julodis andreae</i>	26, neo-XY	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>J. faldermanni</i>	26, XY	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>J. whithilli</i>	24, neo-XY	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>Julodella globithorax</i>	26, XY _p	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>Stenocera sp.</i>	26, neo-XY	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>S. laevigata</i>	26, neo-XY	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>S. nitidicollis</i>	26, neo-XY	Karagyan e Kuznetsova, 2000
Polycestinae		
<i>Acmaeodera boryi</i>	18, Xy _r	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>A. flavofasciata</i>	18, Xy _r	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>A. gibbulosa</i>	18, Xy _r	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>A. hepburni</i>	18, neo-XY	Karagyan e Kuznetsova, 2000
<i>A. pilosellae persica</i>	20, neo-XY	Karagyan et al., 2012
<i>A. vetusta</i>	18, Xy _r	Karagyan e Kuznetsova, 2000

Poucos cariótipos de espécies da família Buprestidae foram analisados através da citogenética convencional e molecular. Karagyan (2001) estudou seis espécies através de coloração com AgNO₃ e observou blocos argirofílicos em um ou dois pares autossômicos em duas espécies de *Acmaeoderella*, enquanto quatro espécies do gênero *Sphenoptera* exibiram blocos argirofílicos no bivalente sexual (Xy_p). Segundo a autora esses blocos podem representar regiões organizadoras de nucléolos (RONs).

Karagyan et al. (2012) estudaram os cariótipos das espécies *Acmaeodera pilosellae persica*, *Sphenoptera scovitzii*, *Dicerca aenea validiuscula* e *Sphaerobothris aghababiani* através de bandeamento C, impregnação com AgNO₃ e coloração com fluorocromos DAPI e CMA₃. Pequenos blocos de HC foram observados na região pericentromérica dos cromossomos das quatro espécies. Alguns blocos da HC foram CMA₃⁺, indicando riqueza em pares de bases GC, os quais foram também AgNO₃⁺. Adicionalmente, as espécies *S. aghababiani* e *D. aenea validiuscula* apresentaram marcação CMA₃⁺ e AgNO₃⁺ nos cromossomos sexuais Xy_p (para-quedas). Os autores discutem a possível relação das marcações AgNO₃⁺ com a presença de RONs. No entanto, visto que

as células não foram analisadas em prófase, fase na qual as RONS são identificadas em cromossomos de besouros, os autores admitem a necessidade do uso de técnicas mais específicas para elucidar esta questão.

Frydrychová e Marec (2002), em um estudo com várias espécies de Coleoptera, detectaram a presença da sequência telomérica (TTAGG) n nas regiões terminais dos cromossomos da espécie *Agrilus viridis* (Buprestidae). Infelizmente, como observado, os resultados destes estudos em Buprestidae geraram dados fragmentados que impossibilitam análises comparativas e evolutivas mais abrangentes.

2.2.1 Citogenética de *Euchroma gigantea*

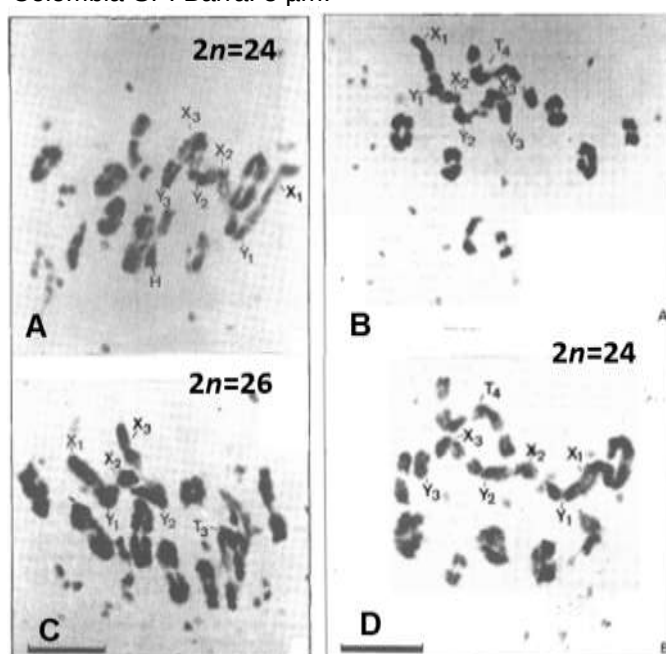
Na família Buprestidae, um alto polimorfismo cromossômico foi observado no gênero *Euchroma*, que é monoespecífico para *E. gigantea*. Nesta espécie os cariótipos apresentaram variação de $2n = 24$ até $2n = 36$ (MOURA; MELO; SOUZA, 2008), todos com mecanismo de determinação sexual múltiplo, além da presença de cromossomos B (Mesa e Fontanetti, 1984; Moura *et al.*, 2008) (Tabela 1). O polimorfismo cromossômico intraespecífico em *E. gigantea*, aliado à ocorrência de subespécies e variedades, sugere a ocorrência de mais de uma espécie no gênero, provavelmente um complexo de espécies crípticas.

Mesa e Fontanetti (1984), analisando três espécimes de *E. gigantea* oriundos do município de Colômbia – SP, encontraram os cariótipos com $2n = 24$ e $2n = 26$ com a presença de um mecanismo de determinação sexual múltiplo e cromossomos B puntiformes variando de 16 a 32 (Figura 2). Neste estudo, um dos três espécimes apresentou o cariótipo $2n = 24$, $X_1Y_1X_2Y_2X_3Y_3$, com cinco pares de autossomos metacêntricos, três pares acrocêntricos, um par de cromossomos heteromórficos, sendo um acrocêntrico e outro metacêntrico (Figura 2A); o segundo espécime apresentou o $2n = 24$, $X_1Y_1X_2Y_2X_3Y_3$, com cinco pares de autossomos metacêntricos, dois pares acrocêntricos, um tetravalente formando uma cadeia de zig-zag com dois cromossomos metacêntricos e dois acrocêntricos (Figura 2B, D). O terceiro indivíduo apresentou $2n = 26$, com uma cadeia de cromossomos sexuais com cinco cromossomos ($X_1Y_1X_2Y_2X_3$), cinco pares de autossomos metacêntricos, quatro pares de acrocêntricos, um trivalente formado

por um cromossomo metacêntrico no centro e dois acrocêntricos nas extremidades. Na cadeia de cromossomos sexuais, com exceção do Y_3 , que exibiu morfologia acrocêntrica, os demais cromossomos foram metacêntricos ou submetacêntricos (Figura 2C).

Mesa e Fontanetti (1984) sugeriram que sucessivas translocações envolvendo autossomos e cromossomos sexuais foram responsáveis pela formação deste complexo mecanismo encontrado em *E. gigantea*, e que provavelmente é derivado de um sistema Xy.

Figura 2. Células em metáfase I de três espécimes de *Euchroma gigantea* oriundos do município de Colômbia-SP. Barra: 5 μ m.

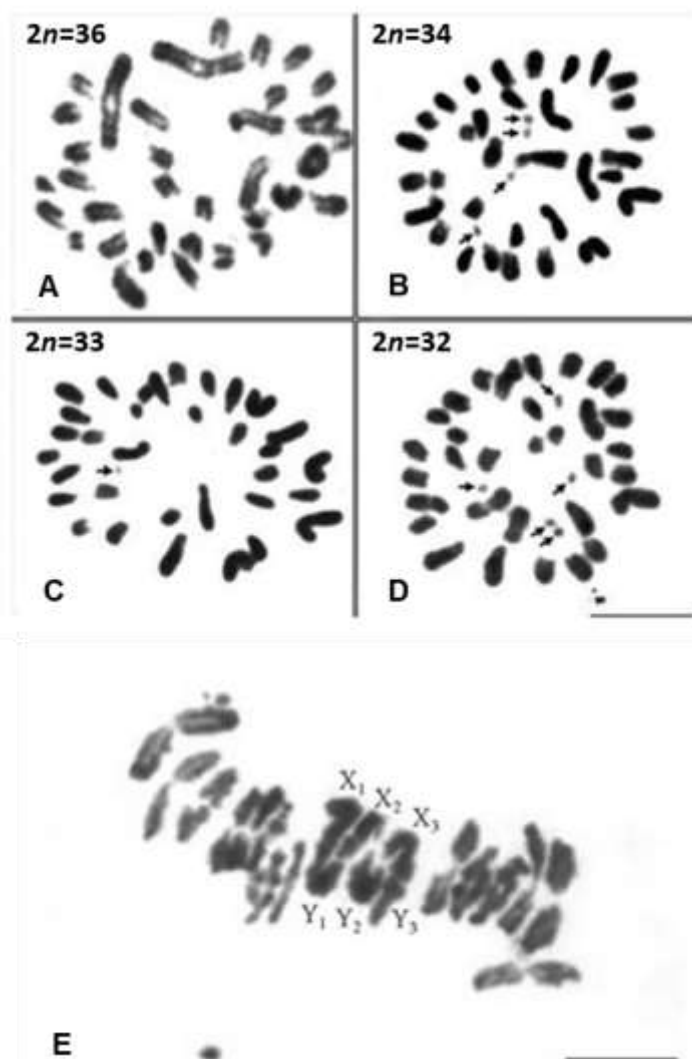


Fonte: Mesa e Fontanetti, 1984

Moura *et al.* (2008), analisando espécimes de *E. gigantea* oriundos de Recife e Igarassu-PE, observaram os cariótipos com $2n = 32$, $2n = 34$ e $2n = 36$, todos apresentando o mecanismo sexual $X_1Y_1X_2Y_2X_3Y_3$. A morfologia dos cromossomos autossomos foi predominantemente acrocêntrica, sendo observado apenas um par submetacêntrico no cariótipo com $2n = 34$ e dois pares submetacêntricos no cariótipo com $2n = 32$. Além disso, um cariótipo heteromórfico com $2n = 33$ foi observado em um espécime. No sistema sexual múltiplo, todos os cromossomos X foram submetacêntricos, os cromossomos Y_1 e Y_2 metacêntricos e o cromossomo Y_3 acrocêntrico. A presença do mecanismo

$X_1Y_1X_2Y_2X_3Y_3$ em todas as composições dos cariótipos encontrados em *E. gigantea* sugere que este é antigo e bem estabelecido. Durante a metáfase I, os cromossomos sexuais apresentaram-se ligados por quiasma distal formando uma cadeia alternada com a seguinte sequência $X_1-Y_1-X_2-Y_2-X_3-Y_3$ (Figura 3).

Figura 3. Células em metáfase espermatogonial (A-D) e metáfase I (E) de espécimes de *Euchroma gigantea* oriundos de Recife e Igarassu-PE. Barra: 10 μ m.



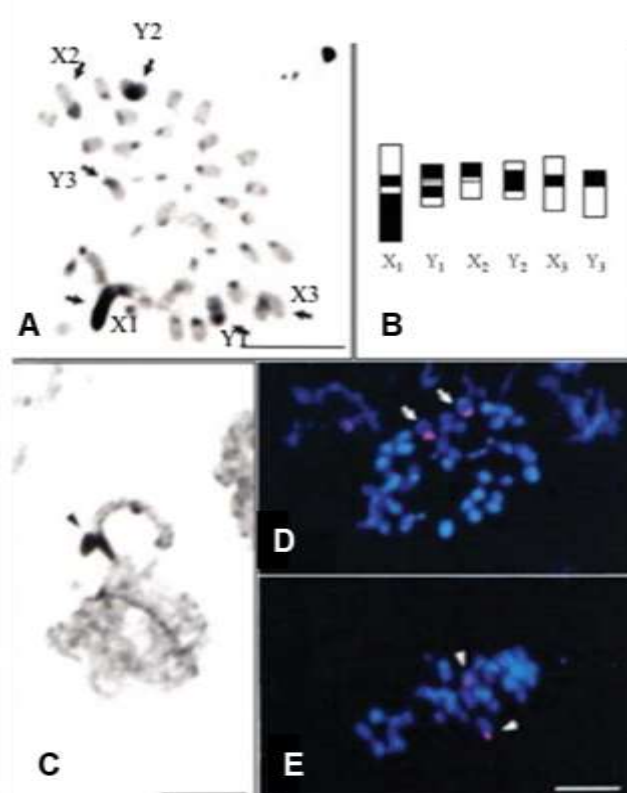
Fonte: Adaptado de MOURA *et al.* 2008

Comparando os cariótipos encontrados nas amostras de *E. gigantea* de Pernambuco e de São Paulo, Moura *et al.* (2008) sugeriram dois possíveis caminhos evolutivos para a formação dos distintos cariótipos. Considerando que o cariótipo plesiomórfico seja o $2n = 36$, sucessivas fusões cêntricas teriam resultado nos cariótipos derivados, iniciando com uma única fusão homozigótica,

produzindo $2n = 34$, seguido por duas fusões produzindo $2n = 32$, cinco fusões produzindo $2n = 26$ e seis dando origem ao $2n = 24$. A outra alternativa sugerida foi que os rearranjos ocorreram a partir do cariótipo $2n = 24$, no qual uma fissão daria origem ao $2n = 26$, quatro fissões produziriam o $2n = 32$, cinco fissões dariam origem ao $2n = 34$ e seis fissões ao $2n = 36$. Além dos rearranjos descritos, os autores sugeriram a ocorrência de inversões pericêntricas responsáveis pela alteração da morfologia dos cromossomos nos diferentes cariótipos observados em *E. gigantea*.

Ainda no estudo de Moura *et al.* (2008) as técnicas de bandeamento C, impregnação com AgNO_3 e hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sonda de DNAr 45S foram aplicadas nos cariótipos com $2n = 32$ de *E. gigantea*. Pequenos blocos de heterocromatina constitutiva (HC) foram observados na região pericentromérica dos cromossomos autossômicos e uma grande quantidade de HC nos cromossomos sexuais. Os cromossomos X_1 e X_3 apresentaram-se quase completamente heterocromáticos e no X_2 a HC foi observada apenas na região terminal do braço curto. O Y_1 apresentou o braço curto quase completamente heterocromático e uma banda de HC intersticial no braço longo. O Y_2 apresentou um bloco de HC se estendendo ao longo dos dois braços cromossômicos e o Y_3 exibiu um bloco de HC pericentromérico no braço curto. Uma RON foi observada na cadeia de cromossomos sexuais e a hibridização *in situ* florescente evidenciou sinais de DNAr 45S nos cromossomos X_1 e X_2 , confirmando o resultado da impregnação com AgNO_3 .

Figura 4. Padrão de bandeamento C, coloração com AgNO_3 e hibridização *in situ* fluorescente com sonda de DNAr em células meióticas e mitóticas de *Euchroma gigantea*. Metáfase mitótica de um macho (A). Representação esquemática do bandeamento C dos cromossomos sexuais (B). Impregnação com AgNO_3 em zigóteno indicando a RON (C). Metáfase espermatogonial exibindo os dois sítios de DNAr (D). Metáfase I indicando a localização dos sítios nos cromossomos X_1 e X_2 (cabeças de setas) (E). Barra: 10 μm .



Fonte: Adaptada de MOURA *et al.* 2008

2.3 REARRANJOS CROMOSSÔMICOS E ESPECIAÇÃO

White (1968) propôs um modelo no qual rearranjos cromossômicos podem desempenhar um papel direto na promoção da especiação. Isto com base na observação de que os rearranjos cromossômicos podem alterar as taxas e padrões de fluxo gênico dentro e entre espécies, através da redução no *fitness* de indivíduos híbridos cromossômicos.

Muitos modelos de especiação cromossômica têm sido propostos e divergem quanto à necessidade de isolamento geográfico para a especiação aos processos que originam os rearranjos e como eles se tornam fixos nas

populações, quanto à intensidade dos efeitos dos rearranjos no *fitness* de indivíduos heterozigotos cromossômicos e ainda se as modificações cromossômicas estão associadas com diferenças adaptativas que permitem a colonização de novos habitats. No entanto, esses modelos compartilham uma característica fundamental, a qual postula que as diferenças cromossômicas acumuladas entre as novas espécies e os seus progenitores comprometem a fertilidade ou a viabilidade dos híbridos interespecíficos (sub-dominância) (BROWN; O'NEILL, 2010; CRESPI; NOSIL, 2013; LIVINGSTONE; RIESEBERG, 2004; RIESEBERG, 2001).

Rearranjos cromossômicos permitem a diferenciação de genes, consequentemente o acúmulo de incompatibilidades, além de alterar a expressão gênica perto de *breakpoints* (Faria e Navarro, 2010). Além disso, em heterozigotos para translocações e inversões, o *crossing over* em certas áreas de cromossomos rearranjados gera cromátides com duplicações e deficiências no conteúdo gênico (LIVINGSTONE; RIESEBERG, 2004). Sendo assim, o efeito negativo no *fitness* do heterozigoto cromossômico pode ser decorrente tanto de problemas de segregação durante a meiose e a formação de gametas não balanceados, bem como de possíveis incompatibilidades gênicas entre os parentais (BROWN; O'NEILL, 2010; CRESPI; NOSIL, 2013; FARIA; NAVARRO, 2010).

Uma crítica às teorias de evolução cromossômica é que uma forte sub-dominância implica que os rearranjos seriam rapidamente eliminados da população, por outro lado, uma fraca sub-dominância sugere que os rearranjos podem permanecer na população, mas não têm forte efeito na esterilidade do híbrido para facilitar o isolamento das espécies incipientes (LANDE, 1985; RIESEBERG, 2001). Uma ressalva a esta crítica é que tanto a deriva genética como *drive* meiótico podem oferecer meios para que um rearranjo subdominante persista em uma população (BROWN; O'NEILL, 2010). Assim, a hibridização entre indivíduos cromossomicamente distintos pode contribuir para a divergência de populações, gerando uma população híbrida que permanece distinta de ambas populações parentais (ABBOTT et al., 2013). Além disso, uma barreira genética bem como a especiação não resultam de uma única variação, mas do acúmulo de variações (BROWN; O'NEILL, 2010).

Em alguns gêneros de diferentes ordens de insetos foi observado que rearranjos cromossômicos podem desempenhar um papel importante na origem de barreiras reprodutivas que isolam espécies ou populações em processo de especiação (COLUZZI et al., 2002; KAWAKAMI; BUTLIN; COOPER, 2011; KOBAYASHI et al., 2000; MILLS; COOK, 2014; NOOR et al., 2001).

No gênero *Drosophila* (Diptera), inversões que distinguem as espécies *D. pseudoobscura* e *D. persimilis* carregam alelos que causam esterilidade do híbrido quando introgrididos. Para estas espécies, Noor et al. (2001) propuseram um modelo no qual a supressão da recombinação entre as regiões invertidas acarreta um isolamento pós-zigótico entre essas espécies. Neste modelo, rearranjos cromossômicos podem facilitar a diversificação após um contato secundário, por reduzir a recombinação na região rearranjada e então manter o desequilíbrio de ligação entre genes envolvidos nesta parte do genoma.

Um modelo similar foi proposto para o complexo de espécies *Anopheles gambiae* (Diptera), que apresenta diferentes padrões de fixação de inversões paracêntricas em sete espécies crípticas citogeneticamente distinguíveis (COLUZZI et al., 2002). No gênero *Vandiemena* (Orthoptera), hibridizações subsequentes entre indivíduos de populações adjacentes, que possuem inversões ou fusões cêntricas fixadas diferencialmente, resultam em híbridos inférteis (KAWAKAMI; BUTLIN; COOPER, 2011). Neste gênero, os estudos citogenéticos, aliados a análises filogenéticas utilizando genes mitocondriais e nucleares permitiu o melhor entendimento do papel dos rearranjos cromossômicos na especiação (KAWAKAMI; BUTLIN; COOPER, 2011).

Na ordem Coleoptera, estudos sobre a relação de rearranjos cromossômicos e especiação são escassos. Nesta ordem, os estudos citogenéticos, em geral, relacionam cariótipos de diferentes gêneros em uma família ou subfamília e os rearranjos cromossômicos são discutidos nesse contexto, focando principalmente na variação do número diploide e mecanismos sexuais (CABRAL-DE-MELLO et al., 2008; PETITPIERRE, 2011; ROZEK et al., 2004) com pouca ênfase nos processos de especiação (GALIÁN; PROENÇA; VOGLER, 2007; KOBAYASHI et al., 2000). Em geral, o que tem sido observado nos gêneros, como por exemplo *Bembidion* (Carabidae) e *Onthophagus* (Scarabaeidae), é a predominância de um número diploide na maioria das

espécies cariotipadas e no caso de cariótipos derivados, o aumento ou redução de dois cromossomos (BLACKMON; DEMUTH, 2015). Aparentemente, o processo de especiação para a maioria das espécies nesses gêneros não envolve muitos rearranjos cromossômicos.

Em Coleoptera, um exemplo no qual a diferenciação cromossômica foi considerada no processo de especiação foi na espécie *Epilachna vigintioctopunctata* (Coccinellidae) (KOBAYASHI et al., 2000). Neste trabalho, os autores analisaram oito populações asiáticas de *E. vigintioctopunctata* através de citogenética convencional, análise filogenética de um fragmento do gene codificador da enzima citocromo oxidase I (COI) e cruzamentos. Apesar dos espécimes apresentarem o mesmo número diploide ($2n = 18$, Xy_p/XY_p), diferenças na morfologia dos seis menores pares de autossomos relacionadas com o aumento de heterocromatina, além do tamanho diferencial do cromossomo Y, permitiram distinguir as populações do Norte e do Sul asiático. Esta separação foi bem suportada pela análise filogenética. Além disso, o cruzamento intergrupo não originou prole viável, indicando que possivelmente as diferenças cromossômicas estão atuando como barreira, promovendo o isolamento reprodutivo das populações. Estes resultados indicaram que os espécimes analisados pertencem a pelo menos duas espécies crípticas.

2.4 USO DE DNA REPETITIVO NO ENTENDIMENTO DA EVOLUÇÃO CROMOSSÔMICA EM COLEOPTERA

A técnica de hibridização *in situ* fluorescente com o uso de diferentes sondas de DNA repetitivo tem contribuído para o entendimento da estrutura e organização cromossômica em Coleoptera. As sequências mais utilizadas são as de famílias multigênicas, seguida por DNA satélite, elementos de transposição e sequências teloméricas (CABRAL-DE-MELLO et al., 2011a; LORITE et al., 2002; MRAVINAC et al., 2011; SÁNCHEZ-GEA; SERRANO; GALIÁN, 2000; UGARKOVIĆ; PODNAR; PLOHL, 1996). O número de espécies de Coleoptera analisadas ainda é pequeno (<0,05%) e restrito a poucas famílias das subordens Adephaga (FRYDRYCHOVÁ; MAREC, 2002; GALIAN; HUDSON, 1999; SÁNCHEZ-GEA; SERRANO; GALIÁN, 2000) e Polyphaga (AMORIM et al., 2016;

CABRAL-DE-MELLO et al., 2011a; COLOMBA et al., 2004; COLOMBA; VITTURI; ZUNINO, 2000; FRYDRYCHOVÁ; MAREC, 2002; GOLL et al., 2015; MENDES-NETO et al., 2010; MOURA; MELO; SOUZA, 2008; MRAVINAC et al., 2011; SAHARA; MAREC; TRAUT, 1999; XAVIER; CABRAL-DE-MELLO; MOURA, 2014).

O DNAr 45S é a sequência mais mapeada considerando o número de espécies analisadas nas diferentes famílias de Coleoptera, sendo possível observar de dois a 16 sítios distribuídos exclusivamente em autossomos, apenas em cromossomos sexuais ou em ambos (ALMEIDA et al., 2010; ARCANJO et al., 2009; CABRAL-DE-MELLO et al., 2011a; COLOMBA et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2010; SÁNCHEZ-GEA; SERRANO; GALIÁN, 2000). A família Scarabaeidae (Polyphaga) é a que apresenta o maior número de espécies estudadas através da FISH. É também nesta família onde se encontram as espécies de Coleoptera com sequências de DNAr 5S, histona H3, fração de DNA *Cot*-1 e elementos de transposição (TEs) mapeadas (AMORIM et al., 2016; CABRAL-DE-MELLO et al., 2011a, 2011b; CABRAL-DE-MELLO; MOURA; MARTINS, 2011; OLIVEIRA et al., 2012; OLIVEIRA; MOURA; MARTINS, 2012; XAVIER; CABRAL-DE-MELLO; MOURA, 2014). Estes estudos, em geral, revelaram de dois a cinco sítios referentes aos genes de DNAr 5S e histona H3, que apresentaram co-localização dos sinais em todos os cariótipos nos quais as duas sequências foram mapeadas (CABRAL-DE-MELLO et al., 2011a).

O mapeamento da fração de DNA *Cot*-1 e de elementos de transposição foi restrito a espécies dos gêneros *Coprophanaeus* e *Dichotomius* (Scarabaeidae) e contribuiu para o entendimento da origem do cromossomo B em *C. cyanescens* (OLIVEIRA; MOURA; MARTINS, 2012) e da possível relação dos TEs com a dinâmica da HC em espécies do gênero *Dichotomius* (AMORIM et al., 2016; CABRAL-DE-MELLO et al., 2011b; XAVIER; CABRAL-DE-MELLO; MOURA, 2014).

O mapeamento de sequências teloméricas revelou a presença da repetição (TTAGG)_n, comumente encontrada em invertebrados, nas extremidades dos cromossomos de nove espécies pertencentes as famílias Anobiidae, Buprestidae, Chrysomelidae, Coccinellidae, Cucujidae, Curculionidae e Elateriade (FRYDRYCHOVÁ; MAREC, 2002; MORA et al., 2015). Em espécies da família

Tenebrionidae, a sequência (TCAGG)_n, caracterizada no genoma de *Tribolium castaneum*, foi mapeada nas extremidades dos cromossomos de *Tenebrio molitor* e *T. castaneum*. Esta repetição (TCAGG) pode representar uma variante funcional da sequência (TTAGG)_n, visto que, ao menos em *T. molitor*, esta sequência não foi encontrada (MRAVINAC et al., 2011; SAHARA; MAREC; TRAUT, 1999).

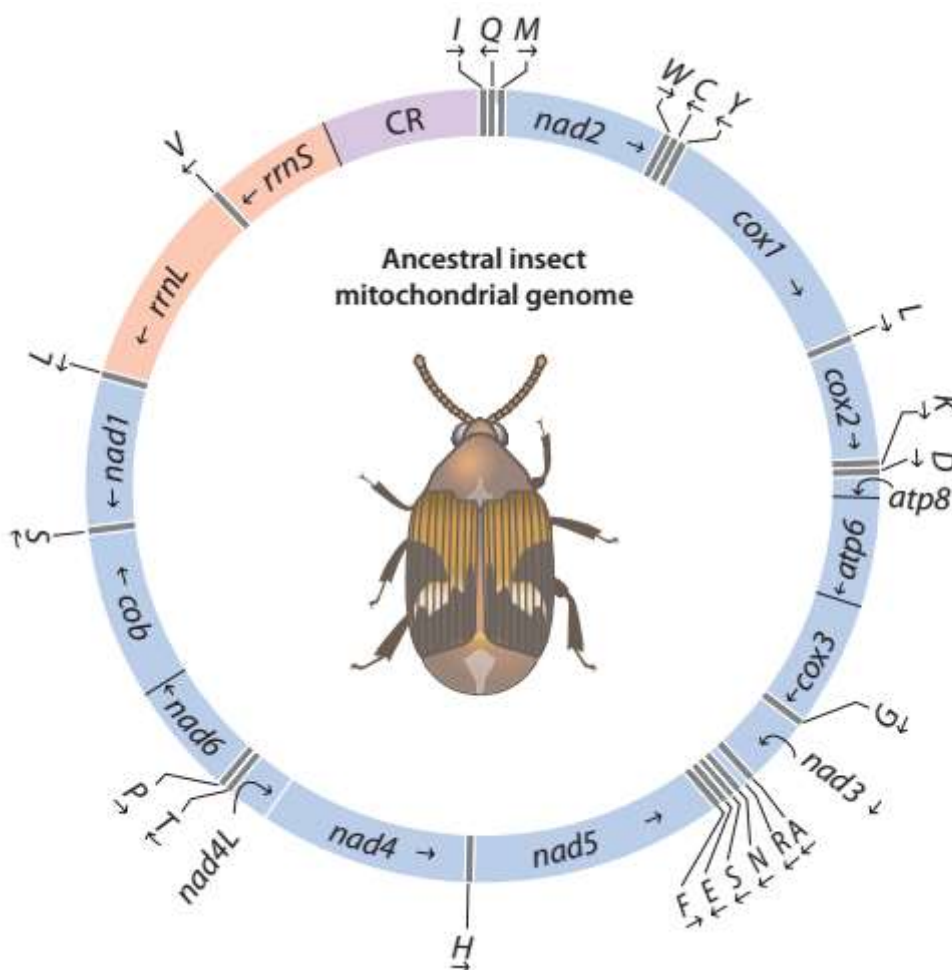
Diferentes famílias de DNA satélite espécies-específicas, obtidas através do método clássico com enzimas de restrição, foram mapeadas em espécies das famílias Tenebrionidae e Chrysomelidae, ambas da subordem Polyphaga. Em comum, os estudos revelaram que estas sequências possuem monômeros de 110 a 711pb, são ricas em A-T e estão presentes nas regiões pericentroméricas de todos ou quase todos os cromossomos. Algumas vezes, as sequências exibiram subrepetições diretas ou invertidas que podem fornecer indícios de como elas evoluíram ou que podem ter algum papel funcional no genoma devido à possibilidade de gerar estruturas secundárias (JUAN; PONS; PETITPIERRE, 1993; LORITE et al., 2001, 2002; LORITE; TORRES; PALOMEQUE, 2013; MRAVINAC; PLOHL, 2010; UGARKOVIĆ; DURAJLIJA; PLOHL, 1996; UGARKOVIĆ; PODNAR; PLOHL, 1996).

Recentemente, Pavlek et al. (2015) realizaram um estudo mais detalhado do DNA satélite TCAST, anteriormente descrito para *Tribolium castaneum* e, através de análises bioinformáticas do genoma de *T. castaneum*, descobriram várias outras famílias e subfamílias de DNAs repetitivos. Neste estudo, nove famílias de DNAsat mais abundantes, além do TCAST, foram mapeadas através de FISH no cariótipo de *T. castaneum*. Embora a localização do TCAST na HC de todos os cromossomos tenha sido confirmada, as demais famílias de DNAsat estiveram presentes principalmente em regiões eucromáticas. Estes resultados, aliados às análises bioinformáticas da distribuição genômica das sequências, permitiram aos autores sugerir que trocas inter-cromossômicas seguidas pela amplificação foram responsáveis pelos padrões de distribuição observados. Além disso, que elementos de transposição podem estar atuando na dispersão das sequências.

2.5 O DNA MITOCONDRIAL E APLICAÇÃO EM INCERTEZAS TAXONÔMICAS

O genoma mitocondrial (mt) em animais geralmente é constituído de uma molécula circular composta por 37 genes, sendo 13 genes codificantes de proteínas, 22 de RNAt e dois de RNAr (BOORE, 1999). Este genoma possui características únicas quando comparado ao genoma nuclear, como a herança materna, a alta taxa de mutações, a baixa frequência de recombinação e o alto número de cópias (BOORE, 1999; LADOUKAKIS; ZOUROS, 2017).

Figura 5. Diagrama do mitogenoma ancestral de insetos. Genes de RNAt estão indicados pelas abreviações de uma letra para seus aminoácidos correspondentes segundo a IUPAC. A direção da transcrição dos genes é indicada pelas setas. O tamanho dos genes é grosseiramente proporcional ao seu comprimento. Abreviações dos genes codificantes de proteínas: *atp6*, *atp8*: Subunidades 6 e 8 da ATP sintase; *cob*: Citocromo oxidase b; *cox1-cox3*: Subunidades 1-3 da Citocromo oxidase c; *nad1-6*, *nad4L*, Subunidades 1-6 e 4L da NADH desidrogenase; *rrnS*, *rrnL*, subunidades maior e menor de RNA ribossomal; CR, região controle.



Fonte: CAMERON, 2014

Outras características do mitogenoma refletem em facilidades de ordem metodológica que fazem do DNAm uma informação acessível e útil, por exemplo, em estudos de genética de populações (KAJTOCH et al., 2014; LOPES et al., 2013; LOPEZ et al., 2014) e de identificação molecular de espécies (HAN et al., 2012; KEKKONEN; HEBERT, 2014; WU et al., 2017).

Embora as sequências do mitogenoma sejam conhecidas por evoluir rapidamente, seus arranjos gênicos frequentemente são mantidos por longos períodos na escala evolutiva (BOORE, 1999). Em insetos a maioria mitogenomas descritos possuem o arranjo considerado ancestral para artrópodes (BOORE, 1999; CAMERON, 2014). Porém, rearranjos têm sido encontrados em muitas ordens, os quais não são compartilhados entre elas. Em vez disso, os rearranjos ocorreram independentemente e são considerados como sinapomórficos em categorias taxonômicas abaixo de ordem, como infraordem, família, subfamília e gênero (CAMERON, 2014).

Rearranjos também têm sido observados em nível de espécies, mas a extensão taxonômica desses rearranjos não foi determinada nestes casos. Tais rearranjos variam entre eventos de inversões, como observado em Hymenoptera (CAMERON, 2014), deleções de RNAt em Coleoptera (NAN; WEI; HE, 2016; TANG et al., 2017) ou duplicações de genes de RNAt como identificado em Lepidoptera (LIU et al., 2017), até rearranjos de maiores extensões envolvendo múltiplos genes, incluindo os codificantes de proteínas em espécies da ordem Mecoptera (BECKENBACH, 2011).

Embora essas variações representem um estado derivado que não é filogeneticamente informativo, elas podem representar sinapomorfias particulares de alguns táxons (TIMMERMANS; VOGLER, 2012). Estas sinapomorfias são consideradas com grande potencial para resolver alguns ramos da filogenia de metazoários, pois comparações do mitogenoma completo podem resultar em *insights* significantes sobre a evolução tanto dos organismos, quanto dos genomas (BOORE, 1999).

Em Buprestidae, apenas oito espécies tiveram descrição completa ou parcial do mitogenoma (DUAN et al., 2017; HONG et al., 2009; TIMMERMANS et al., 2015). Dentre estes, o único que apresentou variações ao padrão considerado ancestral para insetos foi o da espécie *Chrysochroa fulgidissima* (Chrysochroinae)

(BOORE, 1999; DUAN et al., 2017; HONG et al., 2009). Neste mitogenoma sequências similares aos genes de tRNA^{Leu} e tRNA^{Asn} foram encontradas na região controle (HONG et al., 2009). Estas sequências possuem o anticódon e o potencial de gerar estruturas secundárias, porém, apresentam distâncias de 50-58% dos genes regulares e a presença de muitos *mismatches* nas regiões do anticódon e aminoacil, o que põe em questão a sua funcionalidade (HONG et al., 2009). Além disso, neste mitogenoma foi identificado um espaçador de 37 pares de bases (pb) entre os genes tRNA^{Asp} e AP8, o qual é incomum em Coleoptera e sua origem não foi discutida (HONG et al., 2009).

Sequências isoladas de DNAm_t também têm sido úteis para resolução de problemas taxonômicos. Em Coleoptera, análises filogenéticas para distintos grupos utilizando genes mitocondriais em conjunto com genes nucleares têm sido realizadas, algumas abrangendo famílias inteiras e outras restritas a unidades taxonômicas mais terminais, como subfamílias, tribos e gêneros (BERGSTEN et al., 2012; MAGRO et al., 2010; PFEILER et al., 2010; RAUPACH; HANNIG; WÄGELE, 2011).

A utilização de genes mitocondriais em análises filogenéticas ou de distância genética (*DNA barcode*) tem sido especialmente útil no estudo de espécies crípticas, ou seja, aquelas que pertencem a linhagens geneticamente divergentes, mas são morfologicamente indistinguíveis ou de difícil distinção. Essas espécies são encontradas em vários grupos animais (BICKFORD et al., 2007; PFENNINGER; SCHWENK, 2007) incluindo besouros da família Buprestidae (KIM; HWANG; KWON, 2014; PENTINSAARI; MUTANEN; KAILA, 2014). Em geral estas espécies carecem de análise taxonômica (KEKKONEN; HEBERT, 2014; KIM; HWANG; KWON, 2014; MILLS; COOK, 2014) e estas metodologias podem ser utilizadas como o primeiro passo para a organização de grupos geneticamente divergentes, que podem então ser mais facilmente analisados por taxonomia convencional (HAJIBABAEI et al., 2007; MILLS; COOK, 2014).

3 INSIGHTS INTO THE KARYOTYPE EVOLUTION AND SPECIATION OF THE BEETLE *EUCHROMA GIGANTEA* (COLEOPTERA: BUPRESTIDAE)

Crislaine Xavier¹; Rógean Vinícius Santos Soares¹; Igor Costa Amorim¹; Diogo Cavalcanti Cabral-de-Mello²; Rita de Cássia de Moura^{1*}

¹Universidade de Pernambuco (UPE), Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Biodiversidade e Genética de Insetos, Recife, Pernambuco, Brazil

²Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Departamento de Biologia, Rio Claro, São Paulo, Brazil

*Universidade de Pernambuco (UPE) - Instituto de Ciências Biológicas/ICB, Laboratório de Biodiversidade e Genética de Insetos. Rua Arnóbio Marques 310, Santo Amaro, CEP 50100-130 Recife - PE, Brazil.
e-mail: ritamoura.upe@gmail.com

Este manuscrito foi publicado na Revista Chromosome Research
Fator de impacto: 2.385
Qualis B1 (CBI)

Abstract

Euchroma Dejean, 1833 (Buprestidae: Coleoptera) is a monotypic genus comprising the species *Euchroma gigantea*, with populations presenting a degree of karyotypic variation/polymorphism rarely found within a single taxonomic (specific) unit, as well as drastically incompatible meiotic configurations in populations from extremes of the species range. To better understand the complex karyotypic evolution of *E. gigantea*, the karyotypes of specimens from five populations in Brazil were investigated using molecular cytogenetics and phylogenetic approaches. Herein, we used FISH with histone genes as well as sequencing of the COI to determine differential distribution of markers and relationships among populations. The analyses revealed new karyotypes, with variability for chromosome number and morphology of multiple sex-chromosome mechanisms, occurrence of B chromosome variants (punctiform and large ones), and high dispersion of histone genes in different karyotypes. These data indicate that chromosomal polymorphism in *E. gigantea* is greater than previously reported, and that the species can be a valuable model for cytogenetic studies. The COI phylogenetic and haplotype analyses highlighted the formation of three groups with chromosomally polymorphic individuals. Finally, we compared the different karyotypes and proposed a model for the chromosomal evolution of this species. The species *E. gigantea* includes at least three cytogenetically polymorphic lineages. Moreover, in each of these lineages different chromosomal rearrangements have been fixed. Dispersion of repetitive sequences may have favored the high frequency of these rearrangements, which could be related to both adaptation of the species to different habitats and the speciation process.

Keywords: Chromosomal evolution; chromosomal rearrangement; multiple sex-chromosome mechanism; molecular cytogenetics; histone dispersion

Introduction

Chromosomal rearrangements can promote reproductive isolation by either hybrid sterility or suppression of recombination, which are processes directly involved in speciation events (Faria and Navarro 2010). The traditional theory of chromosomal speciation, for instance, predicts that this process may occur when structural rearrangements become fixed in a population. Then, recombination among rearranged chromosomes in heterokaryotypic hybrids generates unbalanced gametes, resulting in underdominance, i.e. reduced fertility or complete sterility (Brown and O'Neill 2010). Furthermore, incompatibility between rearranged chromosomes could lead to reproductive isolation and speciation, especially when such changes are linked to the sex chromosomes (Rieseberg 2001). The role of chromosomal rearrangements in originating reproductive barriers, has been investigated and reported to play an important role in isolating species or populations in some genera of Hemiptera (Mills and Cook 2014), Diptera (Noor et al. 2001; Coluzzi et al. 2002), Orthoptera (Kawakami et al. 2011) and Coleoptera (Kobayashi et al. 2000) insects.

In Coleoptera, studies on the relationship between chromosomal rearrangements and speciation are scarce. In this order, general karyotypic descriptions have been made and chromosomal rearrangements have been discussed with focus on understanding the variation in diploid number ($2n$) as well as the origin and evolution of sex chromosomes (Karagyan and Kuznetsova 2000; Rozek et al. 2004; Schneider et al. 2007; Cabral-de-Mello et al. 2008; Petitpierre 2011). However, there are few examples in which speciation processes related to chromosomal rearrangements in some genera are well documented. Among these, two general scenarios are observed in phylogenetically related or cryptic species: (i) increase or decrease in diploid number; or (ii) maintenance of diploid number with change of chromosome morphology due to rearrangements or differential constitutive heterochromatin content (Kobayashi et al. 2000; Galián et al. 2007; Dutrillaux and Dutrillaux 2016).

Euchroma Dejean, 1833 (Coleoptera, Buprestidae) is a monotypic genus to *E. gigantea* (Linnaeus) 1758, accounting for four subspecies with Neotropical distribution: *E. g. goliath*, *E. g. harperi*, *E. g. inca* and *E. g. peruanum* (Blackwelder

1944). Morphological variability has been observed along the species geographical distribution, whereby only the subspecies *E. g. inca* is recorded in Brazil (Blackwelder 1944; Bellamy 2003). From a chromosomal point of view, *E. gigantea* is also polymorphic among Brazilian populations from Colômbia (state of São Paulo – SP), Recife and Igarassu (state of Pernambuco – PE). The diploid numbers $2n=24$ or 26 have been reported in individuals from São Paulo (Mesa and Fontanetti 1984), and $2n=32$, 33 , 34 or 36 in individuals from Pernambuco (Moura et al. 2008). The occurrence of a multiple sex chromosome chain ($X_1Y_1X_2Y_2X_3Y_3$) originated from sex chromosome-autosome translocations (Mesa and Fontanetti 1984; Moura et al. 2008) is noteworthy, as well as the punctiform B chromosomes varying in number from five (Moura et al. 2008) to 32 (Mesa and Fontanetti 1984). Moura et al. (2008) proposed two most likely mechanisms to explain the chromosomal variation in *E. gigantea*. In both cases, the sex chromosome chain was hypothesized to have emerged before the diversification of autosomal chromosomes. The first mechanism suggests that the ancestral karyotype was $2n=36$, from which successive centric fusions resulted in reduction of the diploid number to $2n=24$. The second hypothesis proposes that, starting from a $2n=24$ ancestral karyotype, successive centric fissions occurred, increasing the diploid number to $2n=36$. In addition, pericentric inversions are suggested to be responsible for changes in the proportions of chromosome arms in different karyotypes described in *E. gigantea*.

The chromosome features, i.e. diploid number, sex chromosomes and presence of B chromosomes, in *E. gigantea* are remarkably different from those reported for other species in the family Buprestidae, indicating the need for further investigations. In this family, the diploid number varies from $2n=12$ in *Melanophila acuminata* (Buprestinae) to $2n=46$ for *Sphenoptera scovitzi* (Chrysochroinae), but most species show $2n=22$ or 20 , simple sexual mechanism, and no B chromosomes (Karagyan and Kuznetsova 2000; Karagyan et al. 2004; Karagyan and Lachowska 2007; Karagyan et al. 2012).

In this work, conventional and molecular cytogenetic analyses and phylogeny of cytochrome c oxidase subunit I (COI) were combined to unravel the complex chromosomal evolution of *E. gigantea*. The present data support the

hypothesis of diverse chromosome rearrangements generating the high chromosomal polymorphism, as well as lineage diversification in *E. gigantea*.

Material and methods

Sample collection

E. gigantea (Linnaeus, 1758) specimens were collected manually from trees of the family Malvaceae used in afforestation of urban areas in Recife (state of Pernambuco – PE), Maceió (state of Alagoas – AL), Ribeirão Preto (state of São Paulo – SP), Belém (state of Pará – PA) and Brasília (Federal District – DF), Brazil. Male individuals were predominant in all populations, and females could not be sampled in SP and PA. Sixty-two male individuals were karyotyped, 55 of which were used for molecular investigation. For COI analysis, two specimens from Colômbia (SP) were also included which were previously analyzed cytogenetically by Mesa and Fontanetti (1984) and deposited at the Zoology Museum of the University of São Paulo (MZUSP), Brazil (Fig. 1, Table 1). Sampling was performed in accordance with Brazilian laws of environmental protection, permitted by license from IBAMA/SISBIO (No. 16278-1).

Cytogenetic analyses

Chromosomal preparations were obtained from 62 individuals by the classical method of testicular squashing, followed by conventional staining with 5% Giemsa solution. Ovaries were treated for 30 min with 0.05% colchicine solution; however, only low-quality preparations could be obtained, frequently with no metaphases. Whenever possible, the morphology of all chromosomes was also compared among individuals with the same diploid number. C-banding was performed as described by Sumner (1972), with exposure to BaOH (barium hydroxide) for 50 seconds.

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) was performed as described by Pinkel et al. (1986) with modifications (Cabral-de-Mello et al. 2010). Genomic DNA was extracted from leg muscle tissue using the phenol-chloroform procedure described by Sambrook and Russel (2001). H3 and H4 histone gene sequences were obtained from the genome of *E. gigantea* using specific primers described by

Cabral-de-Mello et al. (2010) and Pineau et al. (2005), respectively. PCR products were sequenced by Macrogen Inc. (Korea), and the sequences were deposited in GenBank (accession numbers: KX885406, KX885407). The reactions were performed in a volume of 50 μ L containing 1X *Taq* DNA polymerase recombinant buffer (Invitrogen), 1.5 mM of $MgCl_2$, 0.02 mM of dNTP, 0.4 μ M of each primer and 0.02 units of *Taq* DNA polymerase. The PCR program consisted of initial denaturation for 5 min at 94°C; 30 cycles of 1 min at 94 °C; 30 s at 55°C; 60 s at 72°C; and final extension for 5 min at 72°C. The H3 and H4 histone probes were labeled by nick translation using digoxigenin-dUTP (Roche) and biotin-14-dATP (Invitrogen, San Diego, CA, USA), following the guidelines of the suppliers. The H3 histone probe was detected with anti-digoxigenin-rhodamine (Roche), and the H4 histone probe was detected with avidin-FITC (fluorescein isothiocyanate) (Invitrogen, San Diego, CA, USA). Whenever possible, two probes were combined in the same slide.

The cells were analyzed in an Olympus microscope BX61 equipped with a fluorescent lamp. The images were captured using a DP70 cooled digital camera, and the brightness and contrast of photographs were optimized using the software Photoshop CC 2014.

Phylogenetic analysis

A fragment of cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene from 53 karyotyped individuals plus the two specimens provided by MZUSP was amplified using the primers C1-J-2183 (Jerry) – 5' CAA CAT TTA TTT TGA TTT TTT GG – and TL2-N-3014 (Pat) – 5' TCC AAT GCA CTA ATC TGC CAT ATT A (Simon et al. 1994). The reactions were performed in a volume of 50 μ L containing 1X *Taq* DNA polymerase recombinant buffer (Invitrogen), 1.5 mM of $MgCl_2$, 0.02 mM of dNTP, 0.4 μ M of each primer, and 0.02 U of *Taq* DNA polymerase. The PCR program was conducted as follows: initial denaturation for 5 min at 94°C; 40 cycles of 30 sec at 94°C; 30 s at 55°C; 1 min at 72°C; and final extension for 5 min at 72°C. The PCR products were purified using the ExoSAP-IT (Affymetrix) reagent,

following the guidelines of the suppliers, and sequenced with the Jerry primer by Macrogen Inc. (Korea).

Chromatograms were analyzed using the Pregap4 software, Staden package (Bonfield et al. 1995). The sequences were aligned with the program Clustal W (Thompson et al. 1994) and genetic distances were calculated using Kimura's two-parameter model (Kimura 1980), both implemented in the MEGA 6 software (Tamura et al. 2013). A phylogenetic analysis using Bayesian inference was performed with the program MrBayes 3.2.2 (Ronquist et al. 2012), and the appropriate model of nucleotide sequence evolution determined using jModelTest (<http://jmodeltest.org>) was applied (HKY+G). Two independent replicates of the Markov chain Monte Carlo search were performed with 10,000,000 simulations, each with eight chains. Trees were sampled every 100 generations, and the first 25% were discarded as "burn-in". The analysis was ran in the CIPRES Science Gateway (Miller et al. 2010). Maximum likelihood analysis was performed using raxmlGUI 1.2 (Silvestro and Michalak 2011) with 1,000 bootstrap replications. Homologous sequences of *Embrikillium patricium* (KM364387), *Buprestis laeviventris* (KM364353), *Sphenoptera* sp. (KM364392) and *Selagis caloptera* (KM364373) (Buprestidae) were used as out-group. The topological relationship between the haplotypes was estimated using the program Network 5.0 (<http://www.fluxus-engineering.com>) with the median-joining approach.

Results

Karyotypes

Extensive intra- and interpopulation chromosomal variability was observed in meiotic and mitotic cells of the 62 studied individuals (Fig. 2, Fig. S1-S11). Diploid numbers ranged from $2n=22$ to $2n=36$. Variation in chromosome number was found in Brasília – DF ($2n=22$ and 24), Maceió – AL ($2n=35$ and 36), Recife – PE ($2n=34$ and 36) and Ribeirão Preto – SP ($2n=26$ and 28), whereas a single karyotype with $2n=32$ was found in Belém – PA (Table 1, Fig. 2, Fig. S1-S11). All these karyotypes harbor multiple sex chromosome chains consisting of five ($X_1Y_1X_2Y_2X_3$), six ($X_1Y_1X_2Y_2X_3Y_3$) or eight ($X_1Y_1X_2Y_2X_3Y_3X_4Y_4$) chromosomes,

which were observed in five, 52 and five individuals, respectively. Individuals bearing the chain with six chromosomes were observed in all populations, and that from Maceió – AL further presented specimens with five chromosomes in sex chromosome chain. Brasília – DF was the most diverse population, exhibiting the three aforementioned multivalent sex chain compositions. Moreover, we found punctiform B chromosomes in 51 individuals, except in those from Brasília – DF (Table 1, Fig. 2), and a large type of B chromosome in two individuals from Belém – PA (Table 1, Fig. 2).

Karyotypes with $2n=22$ were polymorphic for autosomal morphology and number of chromosomes in sex chain, which comprised five, six or eight chromosomes (Fig. 2a-c). One individual presented five sex chromosomes, as well as four meta-submetacentric and two acrocentric pairs, one heteromorphic pair composed of one submetacentric and one acrocentric chromosome, and a trivalent formed by one metacentric and two acrocentric chromosomes (Fig. 2a, Fig. S1), resulting in gametes with ten or twelve chromosomes (Fig. S1). Individuals with six sex chromosomes presented seven bivalent autosomal and one acrocentric pair (Fig. 2b, Fig. S2). Finally, in individuals showing $2n=22$ with eight sex chromosomes, we observed five bivalent and two acrocentric bivalents (Fig. 2c, Fig. S3). Only one specimen presented $2n=24$, showing six sex chromosomes and one submetacentric, five metacentric and three acrocentric autosomal pairs (Fig. 2d, Fig. S4). The karyotype with $2n=26$ showed five metacentric and five acrocentric autosomal pairs, and $2n=28$ displayed four metacentric and seven acrocentric autosomal pairs; both karyotypes harbored sex chains composed of six chromosomes (Fig. 2e, f Fig. S5, S6). B chromosomes with number ranging from eight to 16 in $2n=26$ and $2n=28$ individuals were noticed (Table 1).

Individuals with $2n=32$ were found in Belém – PA. They presented one or two submetacentric pairs and the remaining autosomal pairs with acrocentric morphology, and sex chromosome chain with six chromosomes (Fig. 2g, Fig. S7, S8). These specimens exhibited two to five punctiform B chromosomes, and two individuals showed large meta-submetacentric B chromosomes (Table 1, Fig. 2g, Fig. S8).

Specimens with $2n=34$ were found in Recife – PE, showing one metacentric and 13 acrocentric autosomal pairs (Fig. 2h, S9), in addition to B chromosomes ranging in number from two to 14 (Table 1). In individuals with $2n=35$, polymorphisms in autosomal morphology were observed: either all autosome pairs were acrocentric or only the major autosome pair was submetacentric, which was also observed in heteromorphic condition. All these individuals presented a sex chromosome chain formed by five chromosomes (Fig. 2i, S10) and B chromosomes with number varying from four to 14 (Table 1). Individuals with $2n=36$ were found in Maceió – AL and Recife – PE. However, despite maintenance of diploid number, sex chromosome chain with six chromosomes and most autosomes being acrocentric, polymorphisms in the major autosome pair were detected in both localities, showing acrocentric or submetacentric morphology, or heteromorphic condition (Fig. 2j, k, S11). Punctiform B chromosomes varied in number from one to 14 (Table 1).

Regarding the sex chromosome chain, differences in chromosomal morphology were observed even when the number of chromosomes is the same (Fig. 3, 6, S1-11). It was not possible to determine the proto X or proto Y chromosome, nor the homologies among all chromosomes in different chain configurations. However, the X_1 , identified through morphology by Mesa and Fontanetti (1984) and Moura et al. (2008) is similar in all karyotypes. Hence, starting the sex chromosome chain from X_1 , the other chromosomes could be denominated. In specimens from Brasília – DF, the chain with $X_1Y_1X_2Y_2X_3$ was composed only of biarmed chromosomes (Fig. 3a-c). In the sex chromosome chain with $X_1Y_1X_2Y_2X_3Y_3$, X_2 had acrocentric morphology while the other chromosomes were biarmed (Fig. 3d-f). Finally, in the specimens from Brasília – DF with $X_1Y_1X_2Y_2X_3Y_3X_4Y_4$, X_2 and X_4 were acrocentric and the other chromosomes were biarmed (Fig. 3g-i).

In all analyzed specimens from Ribeirão Preto – SP, Belém – PA and Recife – PE, and four individuals from Maceió – AL, the sex chromosome chain contained six chromosomes and showed similar chromosome morphology. While all X chromosomes in addition to Y_1 and Y_2 showed meta-submetacentric morphology, Y_3 was acrocentric (Fig. 3 j-l). Further, Y_3 was absent in four specimens from Maceió – AL (Fig. 2i, 3 p-r).

Very weak C bands were observed in the pericentromeric region of autosomal chromosomes in individuals with $2n=35$, $X_1Y_1X_2Y_2X_3$ from Maceió – AL, with the exception of the heteromorphic pair 1, where the short arm of the submetacentric chromosome was entirely heterochromatic. In addition, intense bands were present in the pericentromeric region of sex chromosomes (Fig. S12).

Phylogeny of COI and haplotype network

The COI sequences had an average length of 751 bp, 50 of which were variable sites, resulting in 22 haplotypes. The Bayesian and maximum-likelihood phylogenetic analysis showed a similar topology. They revealed a monophyletic group, and three main clades were highlighted (Fig. 4a). Three haplogroups were retrieved by the median-joining haplotype network (Fig. 4b). Samples from the same locality were grouped regardless of diploid or sex chromosome number. Groupings coincided with the Brazilian geographical regions Northeast and North, and individuals from the Southeast and Midwest were clustered into the same clade/group. The pairwise distance of COI within each of these groups ranged from 0 to 4%, and from 2 to 7% between groups (Table 2).

Chromosomal location of histone genes

The FISH technique using H3 and H4 histone genes as probes was performed in at least one representative of each collection site, and multiple sites were noticed. All signals were co-located in pericentromeric regions of all autosome and sex chromosomes (Fig. 3, 5, S13). As these sequences were located in pericentromeric regions of all chromosomes, they helped define autosomal polymorphisms with regards to morphology.

Discussion

*The high incidence of chromosomal polymorphism in *Euchroma gigantea**

The description of new karyotypes with $2n=22$, $2n=28$ and $2n=35$ and the uncovering of morphological variation in karyotypes with the same diploid number and in sex chromosomes provided in this work, expand the current view on chromosomal variability in *E. gigantea*. Our results depict a wider karyotypic variation than previously described by Mesa and Fontanetti (1984) and Moura et

al. (2008), and suggest that intense chromosomal evolution in the species might have resulted diversification of cryptic species in the genus. Considerable level of karyotypic diversity has been described in other Coleoptera genera. For instance, in the genus *Blaps* (Tenebrionidae) species are found displaying $2n=19, 21, 34, 35, 36, 37$ or 38 , and may have multiple sex chromosome systems varying from XXY to $X_{1-12}Y_{1-6}$ (Juan and Petitpierre 1991; Vitturi et al. 1996). In the suborder Polyphaga, centric fissions and fusions, in addition to translocations and loss of Y , have generated polymorphisms in some species. For instance, *Botanochara bonariensis* (Chrysomelidae) presents $2n=27, Xyy; 41, Xyy; 44, XXXY; \text{ and } 47, XXY$ (De Julio et al. 2010); whereas *Anthonomus bisignifer* (Curculionidae) shows $2n=19, XO; 30, Xy_p; 32, Xy_p; 34, Xy_p; \text{ and } 36, Xy_p$ (Blackmon and Demuth 2015). However, polymorphisms at species level observed in other Coleoptera or even Buprestidae (Karagyan and Kuznetsova 2000; Karagyan et al. 2004; Karagyan and Lachowska 2007; Karagyan et al. 2012) are smaller than the karyotypic polymorphism observed in *E. gigantea*.

Comparison among the *E. gigantea* karyotypes evidenced the occurrence of autosome-autosome and autosome–sex chromosome translocations, fissions, fusions, pericentric inversions and Y_3 loss in the chromosomal evolution of this species. These rearrangements are also observed in the karyotype evolution of other Coleoptera (Cabral-de-Mello et al. 2008; De Julio et al. 2010). Besides these rearrangements, comparison of the pair 1 in $2n=35$ individuals suggests amplification or loss of heterochromatin, as the short arm of the submetacentric chromosome was entirely heterochromatic whereas the size of the acrocentric counterpart corresponded to the long arm of the submetacentric one (Fig. 2i, S12). This suggests that heterochromatin amplification or loss could be responsible for morphology variation among individuals for pair 1. Based on the distribution of *E. gigantea* karyotypes in Brazilian populations and the COI phylogeny that showed an evident separation of individuals below and above $2n=30$, we proposed an evolutionary scenario for the chromosomal diversification of this species (Fig. 6), described in detail below.

From the putative karyotype with $2n=20, Xy$, which is ancestral for Coleoptera and also described for Buprestidae (Karagyan and Kuznetsova 2000; Karagyan et al. 2004; Karagyan et al. 2012), one autosome fission originated

$2n=22$, which is the modal karyotype in this family (Karagyan and Kuznetsova 2000). The occurrence of a multiple sexual chain with six chromosomes in all analyzed populations and in a large number of individuals (55 out of 62), suggests that it was likely present in the ancestor of *E. gigantea*, as previously proposed by Mesa and Fontanetti (1984), and originated before other chromosomal reorganizations, such as increasing diploid numbers. Therefore, we propose that sex chromosome-autosome translocations originated a chromosome chain with six sex chromosomes ($X_1Y_1X_2Y_2X_3Y_3$) from the karyotype with $2n=22$, Xy . Subsequently, the occurrence of additional autosome–sex chromosome translocation increased the number of chromosomes in the chain. Starting from a $2n=22$, $X_1Y_1X_2Y_2X_3Y_3$ state, one autosome fission originated a karyotype with $2n=24$ (Fig 6a) and, from it, pericentric inversions, a Robertsonian translocation and Y_3 -autosome fusion originated the karyotype with $2n=22$, $X_1Y_1X_2Y_2X_3$, which has an autosomal trivalent and one heteromorphic pair. From the karyotype with $2n=24$, fission events, pericentric inversions and autosome-autosome (A-A) translocations caused an increase of diploid number to $2n=32$, change of chromosomal morphology, and originated tri- or tetravalents in individuals from the Southeast/Midwest and North clades (Fig. 6a).

Karyotypes found in the Northeastern population may have arisen from that with $2n=32$ found in the Northern group through autosome fission and pericentric inversions (Fig. 6a). Nevertheless, the karyotype with $2n=32$ from Pernambuco described by Moura et al. (2008) may have originated independently, through centric fissions and pericentric inversions, from $2n=22$ with six sex chromosomes (Fig 6b). From this $2n=32$ set, karyotypes with $2n=34$ and 36 probably originated through centric fissions (Fig 6b). As suggested for other organisms, the high number of chromosomal rearrangements throughout the karyotype evolution of *E. gigantea* may have favored the emergence of punctiform B chromosomes (Colombo and Remis 1997; Rosetti et al. 2007; Martis et al. 2012; Zhou et al. 2012; Houben et al. 2014). The occurrence of B chromosome variants (punctiform and large ones) in distinct populations suggests multiple B chromosome origins or different evolution, further supporting the extensive chromosomal variability of the species. Absence of B chromosomes in the population from Brasília – DF and presence of large B chromosomes exclusively in individuals from Belém – PA

indicate that different factors may be acting on the maintenance and dynamics of these chromosomes in *E. gigantea*. Such factors may be mechanisms of origin, composition of these chromosomes, and the possible selective pressure which individuals are subject to in accordance with different environmental conditions (Camacho 2005).

Meiotic chains as observed in *E. gigantea* are also found in other animals, such as the huntsman spider *Delena cancerides* (Rowell 1990; Sharp and Rowell 2007), the centipede *Otocryptops sexspinosus* (White 1973), the termite *Incisitermes schwarzi* (Syren and Luykx 1977), the platypus *Ornithorhynchus anatinus* (Rens et al. 2004), and many tiger beetles (Cicindelidae) (Galián et al. 2007). In some species, the number of chromosomes involved in the chain is conserved between individuals (Rens et al. 2004). However, polymorphisms can be found, and might indicate either recent or rapid evolution of the chain, especially when there is no genetic differentiation among individuals with distinct karyotypic features (Luykx and Syren 1981; Rowell 1990). Meiotic chain polymorphisms are not often tolerated in many species, as they can disrupt the correct segregation of chromosomes and thus, the essential formation of balanced gametes. The segregation of contiguous elements can lead to migration of two chromosomes with partial homology to the same pole, resulting in aneuploid gametes (Gruetzner et al. 2006; Sharp and Rowell 2007). The alternate orientation of chromosomes X and Y at the first meiosis in the chains, seen in *E. gigantea* (Fig 2, S1-11), may have favored correct segregation and consequent production of balanced gametes.

The sex chromosome chains composed of five elements found in Brasília – DF and Maceió – AL probably have independent origins. While the individual with $2n=22$ presents a heteromorphic pair that probably contains Y_3 chromosomes, individuals with $2n=35$ seem to have lost the Y_3 chromosome. Loss of the Y chromosome has been reported in many groups of Coleoptera, including the suborders Adephaga and Polyphaga (Schneider et al. 2007; Cabral-de-Mello et al. 2008; De Julio et al. 2010). One hypothesis for this evolutionary event is that the Y chromosome could accumulate transposable elements, especially retrotransposons, which can change the chromatin structure from a euchromatic nature into a heterochromatic one, and thus contribute to Y degeneration with

consequent loss (Steinemann and Steinemann 1998). On the other hand, in multiple sex systems the loss of Y was reported in the monotreme echidna *Tachyglossus aculeatus*. In this species, inversion in the Y chromosome might suppress the meiotic synapsis and chromosome recombination, contributing to its differentiation, degradation, and ultimately entire loss (Gruetzner et al. 2006).

The presence of individuals with heteromorphic pairs in the Northeast clade and of polymorphic karyotypes $2n=22$ in the Southeast/Midwest clade indicate the possibility of crossing between parental specimens with the same diploid number, but cytogenetically distinct. However, the only available study regarding *E. gigantea* viability, performed in natural population of the city of Goiânia (state of Goiás – GO), has revealed that part of the offspring was inviable. Namely, the survival of larvae, pre-pupal and pupal stages declined by 72%, 63% and 69%, respectively (Garcia 1998). Karyotypes of individuals from Goiânia were not known, but possibly presented polymorphisms as seen in other populations of the Southeast/Midwest clade in which they were included (data not shown). Thus, the observed viability decline (Garcia 1998) could be related to fertilization of unbalanced gametes.

Our genetic variation data for in *E. gigantea* support the existence of at least three lineages, and suggest that chromosomal divergence could be involved in the speciation process, as seen in other insect species (Coluzzi et al. 2002; Mills and Cook 2014). In addition, the three lineages of *E. gigantea* were formed by individuals belonging to distinct biomes that possess different physical, climatic, geographic and lithological conditions, with specific fauna and flora (Coutinho 2006). Hence, differential fixation of rearrangements, such as translocations, fissions or inversions, among *E. gigantea* populations may involve adaptive processes, as reported for several eukaryotes (Coghlan et al. 2005; Crombach and Hogeweg 2007; Taffarel et al. 2015), whereby rearrangements can be correlated with phenotypic differences that confer varying fitness in different habitats (Coghlan et al. 2005).

Histone genes were amplified in centromeres of Euchroma gigantea

The co-localization of H3 and H4 histone genes observed in *E. gigantea* chromosomes was expected. In Coleoptera, as well as in other insects, these

genes are usually found near H1, H2A and H2B genes, in a quintet array repeated in tandem (Nagoda et al. 2005; Roehrdanz et al. 2010). However, the dispersion of histone sequences in all chromosomes was surprising. Most of the 15 Coleoptera species mapped for histone genes presented two FISH signals exclusively in autosome pairs (Cabral-de-Mello et al. 2011; Goll et al. 2015). Three exceptions were Scarabaeidae species that showed one or two sites located in sex chromosomes, or six sites in autosomes and the X chromosome (Cabral-de-Mello et al. 2011). Dispersion of histone sequences was also observed in grasshoppers (Oliveira et al. 2011; Bueno et al. 2013). However, dispersion in *E. gigantea* was found in all different karyotypes, unlike orthopterans, which present variation in number of sites among individuals within a species with a single karyotype (Oliveira et al. 2011; Bueno et al. 2013; Pine et al. 2017). Dispersion of histone genes is generally attributed to mechanisms that maintain highly repetitive sequences in centromeric regions, such as mobility of transposable elements, ectopic recombination or extrachromosomal circular DNA (eccDNA), which are also proposed to explain the dispersion of other classes of repetitive DNA (Fitch et al. 1990; Raskina et al. 2004; Bione et al. 2005; Cohen et al. 2010; Nguyen et al. 2010).

The dispersion of histone genes in *E. gigantea* must have occurred before chromosomal diversification, considering that it is observed in all populations. No positive correlation exists between chromosome number and histone gene dispersion, since all tested karyotypes show dispersion in all chromosomes. However, as previously documented, repetitive elements can trigger chromosomal rearrangements in invertebrates (Coghlan and Wolfe 2002; Coghlan et al. 2005): they constitute hotspots for breakpoints leading to chromosomal rearrangements such as translocations (Coghlan and Wolfe 2002) and fissions (Rousselet et al. 2000), which are frequent in the chromosome evolution history of *E. gigantea*. Hence, the presence of a large number of histone genes in *E. gigantea*, as well as other repetitive sequences commonly present in the centromeric region, e.g. satellite DNA (Slamovits et al. 2001; Evans et al. 2017) and transposable elements (Raskina et al. 2008), may promote the very high frequency of rearrangements occurring throughout the chromosomal evolution of this species.

Conclusions

Several rearrangements were responsible for the formation of distinct karyotypes within and among *Euchroma gigantea* populations. The chromosomal variation in *E. gigantea* possibly started from a set with $2n=20$, Xy, which underwent centric fissions and fusions, translocations, pericentric inversions and Y-chromosome loss. Some of these rearrangements may have been differently fixed in the three lineages exhibiting distinct geographical distribution, and thus possibly contributed to the adaptation to different habitats and to the speciation process. The dispersion of histone genes that occurred before karyotypic diversification, as well as of other repetitive sequences might have favored the high frequency of chromosomal rearrangements seen in the species.

Acknowledgements

We are grateful to Dr. Fernando A. B. Silva and M.Sc. Amanda Arcanjo for providing samples from Belém – PA; to Dr. Edgar Bione for help with specimen collection in Brasília – DF; to Dr. Sônia Casari and Dr. Carlos Campaner for providing the specimens analyzed here from the Zoology Museum at the University of São Paulo; and Dra. Cibele Sotero-Caio for the critical reading of the manuscript. This study was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) (doctorate scholarships to CX and ICA), Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco – FACEPE (APQ process number 0777-2.02/15 and Masters scholarship to RVSS), Fundação de Amparo à Ciência do Estado de São Paulo – FAPESP (2014/11763-8) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, Brazil (PQ-2 of RCM process number 305298/2014-3).

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Bellamy C (2003) An illustrated summary of the higher classification of the superfamily Buprestoidea (Coleoptera). *Folia Heyrovskiana* 10:44
- Bione EG, Camparoto M, Simões Z (2005) A study of the constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions of *Isocopris inhiata* and *Diabroctis mimas* (Coleoptera: Scarabaeidae, Scarabaeinae) using C-banding, AgNO₃ staining and FISH techniques. *Genet Mol Biol* 28:376–381
- Blackmon H, Demuth JP (2015) Coleoptera Karyotype Database. *Coleopt Bull* 69:174–175. doi: 10.1649/0010-065X-69.1.174
- Blackwelder RE (1944) Checklist of the coleopterous insects of Mexico, Central America, The West Indies, and South America. *Bull United States Natl Museum* 185:189–341
- Bonfield JK, Smith KF, Staden R (1995) A new DNA sequence assembly program. *Nucleic Acids Res* 24:4992–4999
- Brown JD, O'Neill RJ (2010) Chromosomes, conflict, and epigenetics: chromosomal speciation revisited. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 11:291–316
- Bueno D, Palacios-Gimenez OM, Cabral-de-Mello DC (2013) Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the grasshopper *Abracris flavolineata* reveal possible ancestry of the B chromosome and H3 histone spreading. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0066532
- Cabral-de-Mello DC, Moura RC, Martins C (2010) Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the beetle *Dichotomius geminatus* provides the first evidence for an association of 5S rRNA and histone H3 genes in insects, and repetitive DNA similarity between the B chromosome and A complement. *Heredity (Edinb)* 104:393–400
- Cabral-de-Mello DC, Oliveira SG, de Moura RC, Martins C (2011) Chromosomal organization of the 18S and 5S rRNAs and histone H3 genes in Scarabaeinae coleopterans: insights into the evolutionary dynamics of multigene families and heterochromatin. *BMC Genet* 12:88
- Cabral-de-Mello DC, Oliveira SG, Ramos IC, Moura RDC (2008) Karyotype differentiation patterns in species of the subfamily Scarabaeinae (Scarabaeidae, Coleoptera). *Micron* 39:1243–1250
- Camacho J (2005) B chromosomes. In: TR G (ed) *The evolution of the genome*.

- Elsevier, San Diego, pp 223–286
- Coghlan A, Eichler EE, Oliver SG, et al (2005) Chromosome evolution in eukaryotes: A multi-kingdom perspective. *Trends Genet* 21:673–682
- Coghlan A, Wolfe KH (2002) Fourfold faster rate of genome rearrangement in nematodes than in *Drosophila*. *Genome Res* 12:857–867
- Cohen S, Agmon N, Sobol O, Segal D (2010) Extrachromosomal circles of satellite repeats and 5S ribosomal DNA in human cells. *Mob DNA* 1:1–11
- Colombo PC, Remis MI (1997) On the origin of B-chromosomes: neo XY systems and X-like supernumeraries in Orthoptera. *Caryologia* 50:151–162
- Coluzzi M, Sabatini A, Torre A, et al (2002) A polytene chromosome analysis of the *Anopheles gambiae* species complex. *Science* 298:1415–1418
- Coutinho LM (2006) O conceito de bioma. *Acta Bot Brasilica* 20:13–23
- Crombach A, Hogeweg P (2007) Chromosome rearrangements and the evolution of genome structuring and adaptability. *Mol Biol Evol* 24:1130–1139
- De Julio M, Fernander FR, Costa C, et al (2010) Mechanisms of karyotype differentiation in Cassidinae sensu lato (Coleoptera , Polyphaga , Chrysomelidae) based on seven species of the Brazilian fauna and an overview of the cytogenetic data. *Micron* 41:26–38
- Dutrillaux A, Dutrillaux B (2016) Chromosome comparison of 17 species/ sub-species of African Goliathini (Coleoptera, Cetoniinae). *Comp Cytogenet* 10:269–282
- Evans BJ, Upham NS, Golding GB, et al (2017) Evolution of the largest mammalian genome. *Genome Biol Evol* 9:1711–1724
- Faria R, Navarro A (2010) Chromosomal speciation revisited: Rearranging theory with pieces of evidence. *Trends Ecol Evol* 25:660–669
- Fitch DH a., Strausbaugh LD, Barrett V (1990) On the origins of tandemly repeated genes: Does histone gene copy number in *Drosophila* reflect chromosomal location? *Chromosoma* 99:118–124
- Galián J, Proença SJR, Vogler AP (2007) Evolutionary dynamics of autosomal-heterosomal rearrangements in a multiple-X chromosome system of tiger beetles (Cicindelidae). *BMC Evol Biol* 7:158
- Garcia AH (1998) Aspectos sobre a biologia de *Euchroma gigantea* (L., 1758) (Coleoptera - Buprestidae) em *Pachira aquatica* AUBLET (Bombaceae). An

- da Esc Agron e Veterinária 28:69–73
- Goll LG, Matiello RR, Artoni RF, et al (2015) High-resolution physical chromosome mapping of multigene families in *Lagria villosa* (Tenebrionidae): occurrence of interspersed ribosomal genes in Coleoptera. *Cytogenet Genome Res* 146:64–70
- Gruetzner F, Ashley T, Rowell DM, Marshall Graves JA (2006) How did the platypus get its sex chromosome chain? A comparison of meiotic multiples and sex chromosomes in plants and animals. *Chromosoma* 115:75–88
- Houben A, Banaei-Moghaddam AM, Klemme S, Timmis JN (2014) Evolution and biology of supernumerary B chromosomes. *Cell Mol Life Sci* 71:467–478
- Juan C, Petitpierre E (1991) Chromosome numbers and sex-determining systems in Tenebrionidae (Coleoptera). In: Zunino M, Bellés X, Blas M (eds) *Advances in Coleopterology*. AEC, Barcelona, pp 167–176
- Karagyan G, Kuznetsova KG (2000) Chromosome numbers and sex chromosome systems in buprestid beetles (Coleoptera, Buprestidae). *Entomol Rev* 80:38–49
- Karagyan G, Kuznetsova VG, Lachowska D (2004) New cytogenetic data on Armenian buprestids (Coleoptera, Buprestidae) with a discussion of karyotype variation within the family. *Folia Biol (Kraków)* 52:151–158
- Karagyan G, Lachowska D (2007) Karyotypes of five species of jewel-beetles and presumptive ancestral state of karyotypes of the subfamilies Polycestinae, Chrysochroinae and Buprestinae (Insecta: Coleoptera: Buprestidae). *Comp Cytogenet* 1:121–127
- Karagyan G, Lachowska D, Kalashian M (2012) Karyotype analysis of four jewel-beetle species (Coleoptera, Buprestidae) detected by standard staining, C-banding, AgNOR-banding and CMA₃/DAPI staining. *Comp Cytogenet* 6:183–197
- Kawakami T, Butlin RK, Cooper SJB (2011) Chromosomal speciation revisited: Modes of diversification in Australian morabine grasshoppers (*Vandiemenella, viatica* species group). *Insects* 2:49–61
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16:111–120

- Kobayashi N, Shirai Y, Tsurusaki N, et al (2000) Two cryptic species of the phytophagous ladybird beetle *Epilachna vigintioctopunctata* (Coleoptera: Coccinellidae) detected by analyses of mitochondrial DNA and karyotypes, and crossing experiments. *Zoolog Sci* 17:1159–1166
- Luykx P, Syren RM (1981) Multiple sex-linked reciprocal translocations in a termite from Jamaica. *Experientia* 37:819–820
- Martis MM, Klemme S, Banaei-Moghaddam AM, et al (2012) Selfish supernumerary chromosome reveals its origin as a mosaic of host genome and organellar sequences. *Proc Natl Acad Sci* 109:13343–13346
- Mesa A, Fontanetti CS (1984) Multiple sex-chromosomes, autosomal polymorphism and a high number of S chromosomes in *Euchroma gigantea* L 1735 (Coleoptera, Buprestidae). *Rev. Bras. Genet.* 7:629–637
- Miller MA, Pfeiffer W, Schwartz T (2010) Creating the CIPRES Science Gateway for Inference of Large Phylogenetic Trees. In: *Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*. pp 1–8
- Mills PJ, Cook LG (2014) Rapid chromosomal evolution in a morphologically cryptic radiation. *Mol Phylogenet Evol* 77:126–135
- Moura R de C, Melo NF, Souza MJ (2008) High levels of chromosomal differentiation in *Euchroma gigantea* L. 1735 (Coleoptera, Buprestidae). *Genet Mol Biol* 31:431–437
- Nagoda N, Fukuda A, Nakashima Y, Matsuo Y (2005) Molecular characterization and evolution of the repeating units of histone genes in *Drosophila americana*: Coexistence of quartet and quintet units in a genome. *Insect Mol Biol* 14:713–717
- Nguyen P, Sahara K, Yoshido A, Marec F (2010) Evolutionary dynamics of rDNA clusters on chromosomes of moths and butterflies (Lepidoptera). *Genetica* 138:343–354
- Noor MA, Grams KL, Bertucci LA, Reiland J (2001) Chromosomal inversions and the reproductive isolation of species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:12084–12088
- Oliveira NL, Cabral-de-Mello DC, Rocha MF, et al (2011) Chromosomal mapping of rDNAs and H3 histone sequences in the grasshopper *Rhammatocerus brasiliensis* (Acrididae, Gomphocerinae): extensive chromosomal dispersion

- and co-localization of 5S rDNA/H3 histone clusters in the A complement and B chromosome. *Mol Cytogenet* 4:24
- Petitpierre E (2011) Cytogenetics, cytotaxonomy and chromosomal evolution of Chrysomelinae revisited (Coleoptera, Chrysomelidae). *Zookeys* 79:67–79
- Pine MB, Gallo RB, da Silva CRM, et al (2017) Chromosome mapping in *Abracris flavolineata* (De geer, 1773) (Orthoptera) from the Iguaçu National Park - Foz do Iguaçu, Paraná, Brazil. *Comp Cytogenet* 11:203–212
- Pineau P, Henry M, Suspène R, et al (2005) A universal primer set for PCR amplification of nuclear histone H4 genes from all animal species. *Mol Biol Evol* 22:582–588
- Pinkel D, Straume T, Gray JW (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci* 83:2934–2938
- Raskina O, Belyayev A, Nevo E (2004) Activity of the En/Spm-like transposons in meiosis as a base for chromosome repatterning in a small, isolated, peripheral population of *Aegilops speltoides* Tausch. *Chromosome Res* 12:153–161
- Raskina O, Barber JC, Nevo E, Belyayev A (2008) Repetitive DNA and chromosomal rearrangements: speciation- related events in plant genomes. *Cytogenet Genome Res* 120:351–357
- Rens W, Grützner F, O'Brien PCM, et al (2004) Resolution and evolution of the duck-billed platypus karyotype with an $X_1Y_1X_2Y_2X_3Y_3X_4Y_4X_5Y_5$ male sex chromosome constitution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:16257–16261
- Rieseberg LH (2001) Chromosomal rearrangements and speciation in animals. *Trends Ecol Evol* 16:351–358
- Roehrdanz R, Heilmann L, Senechal P, et al (2010) Histone and ribosomal RNA repetitive gene clusters of the boll weevil are linked in a tandem array. *Insect Mol Biol* 19:463–471
- Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, et al (2012) MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst Biol* 61:539–542
- Rosetti N, Vilardi JC, Remis MI (2007) Effects of B chromosomes and supernumerary segments on morphometric traits and adult fitness components in the grasshopper, *Dichroplus elongatus* (Acrididae). *J Evol Biol*

20:249–59

- Rousselet J, Monti L, Auger-Rozenberg M a, et al (2000) Chromosome fission associated with growth of ribosomal DNA in *Neodiprion abietis* (Hymenoptera: Diprionidae). *Proc Biol Sci* 267:1819–23
- Rowell DM (1990) Fixed fusion heterozygosity in *Delena cancerides* Walck. (Araneae: Sparassidae): an alternative to speciation by monobrachial fusion. *Genetica* 80:139–157
- Rozek M, Lachowska D, Petitpierre E, Holecová M (2004) C-bands on chromosomes of 32 beetle species (Coleoptera: Elateridae, Cantharidae, Oedemeridae, Cerambycidae, Anthicidae, Chrysomelidae, Attelabidae and Curculionidae). *Hereditas* 140:161–170
- Sambrook J, Russel DW (2001) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Third Edit. Cold Spring Harbor, New York
- Schneider MC, Rosa SP, Almeida MC, et al (2007) Strategies of karyotype differentiation in Elateridae (Coleoptera, Polyphaga). *Micron* 38:590–598
- Sharp HE, Rowell DM (2007) Unprecedented chromosomal diversity and behaviour modify linkage patterns and speciation potential: Structural heterozygosity in an Australian spider. *J Evol Biol* 20:2427–2439
- Silvestro D, Michalak I (2011) raxmlGUI: a graphical front-end for RAxML. *Org Divers Evol* 12:335–337
- Simon C, Frati F, Beckenbach A, et al (1994) Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequence and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann Entomol Soc Am* 87:651–701
- Slamovits CH, Cook J a, Lessa EP, Rossi MS (2001) Recurrent amplifications and deletions of satellite DNA accompanied chromosomal diversification in South American tuco-tucos (Genus *Ctenomys*, Rodentia: Octodontidae): a phylogenetic approach. *Mol Biol Evol* 18:1708–1719
- Steinemann M, Steinemann S (1998) Enigma of Y chromosome degeneration: neo-Y and neo-X chromosomes of *Drosophila miranda* a model for sex chromosome evolution. *Genetica* 102/103:409–420
- Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res* 75:304–306

- Syren RM, Luykx P (1977) Permanent segmental interchange complex in the termite *Incisitermes schwarzi*. *Nature* 266:167–168
- Taffarel A, Bidau CJ, Martí DA (2015) Chromosome fusion polymorphisms in the grasshopper , *Dichroplus fuscus* (Orthoptera: Acrididae: Melanoplinae): Insights on meiotic effects. *Eur J Entomol* 112:11–19
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6 . 0. *Mol Biol Evol* 30:2725–2729
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673–80
- Vitturi R, Catalano E, Sparacio I, et al (1996) Multiple-chromosome sex systems in the darkling beetles *Blaps gigas* and *Blaps gibba* (Coleoptera, Tenebrionidae). *Genetica* 97:225–233
- White MJD (1973) *Animal cytology and evolution*. Cambridge University Press, London
- Zhou Q, Zhu H, Huang Q, et al (2012) Deciphering neo-sex and B chromosome evolution by the draft genome of *Drosophila albomicans*. *BMC Genomics* 13:109

Tables and figures

Table 1 *Euchroma gigantea* sampling locations, chromosomal variability and COI Genbank accession numbers

Localities	Id. Sequence	GenBank accession number	2n	Sex chain	B/ B* chromosomes
Maceió – AL	AL1	KY081928	35	5	4
	AL2	KY081929	36	6	6
	AL3	KY081930	36	6	4
	AL4	KY081931	36	6	9
	AL5	KY081932	36	6	11
	AL6	KY081933	35	5	4
	AL7	KY081934	35	5	14
	AL8	KY081935	35	5	7
	AL9	-	36	6	8
Recife - PE	PE1	KY081909	34	6	4
	PE2	KY081910	36	6	4
	PE3	KY081911	34	6	7
	PE4	KY081912	36	6	5
	PE5	KY081913	34	6	6
	PE6	KY081914	34	6	10
	PE7	KY081915	34	6	4
	PE8	KY081916	34	6	8
	PE9	KY081917	36	6	1
	PE10	KY081918	36	6	4
	PE11	KY081919	34	6	8
	PE12	KY081920	34	6	14
	PE13	KY081921	34	6	5
Belém – PA	PE14	KY081922	34	6	2
	PE15	KY081923	34	6	5
	PE16	KY081924	34	6	5
	PE17	KY081925	36	6	3
	PE18	KY081926	34	6	2
	PE19	KY081927	34	6	6
	PE20	-	34	6	2
	PA1	KY081936	32	6	3
	PA2	KY081937	32	6	4/2*
	PA3	KY081938	32	6	3
	PA4	KY081939	32	6	4
	PA5	KY081940	32	6	4
	PA6	KY081941	32	6	4
Ribeirão Preto – SP	PA7	KY081942	32	6	2
	PA8	KY081943	32	6	2
	PA9	KY081944	32	6	5/1*
	PA10	KY081945	32	6	4
	SP1	KY081899	26	6	8
	SP2	KY081900	26	6	16
	SP3	KY081901	26	6	8
	SP4	KY081902	26	6	12
	SP5	KY081903	26	6	16
	SP6	KY081904	26	6	10
	SP7	KY081905	26	6	10
	SP8	KY081906	26	6	16
	SP9	-	28	6	15
Colômbia - SP	SP10	-	26	6	14
	SP11	-	26	6	10
	SP12	-	26	6	10
	SP13 ^a	KY081907	24 or 26	5 or 6	16, 20 or 32
Brasília - DF	SP14 ^a	KY081908	24 or 26	5 or 6	16, 20 or 32
	DF1	KY081946	22	8	0
	DF2	KY081947	22	8	0
	DF3	KY081948	22	6	0
	DF4	KY081949	22	8	0
	DF5	KY081950	22	8	0
	DF6	KY081951	24	6	0
	DF7	KY081952	22	8	0
	DF8	KY081953	22	5	0
	DF9	KY081954	22	6	0
	DF10	KY081955	22	6	0
	DF11	-	22	6	0

^a Indicates two individuals analyzed by Mesa and Fontanetti (1984); B: Punctiform B chromosomes; B*: Large B chromosomes

Table 2 Pairwise distance of cytochrome oxidase c I subunit within and between populations of *Euchroma gigantea*. The means (minimum - maximum) of pairwise distances are indicated

	Within populations	Between Populations	
		Northeast	North
Northeast	0.01 (0-0.01)		
North	0.00 (0-0.01)	0.03 (0.03-0.04)	
Southeast/West Center	0.01 (0-0.04)	0.03 (0.02-0.07)	0.03 (0.02-0.06)

Fig. 1 Sampling sites of *Euchroma gigantea* used for cytogenetic and COI analyses: Pará (PA), Pernambuco (PE), Alagoas (AL), São Paulo (SP), and Federal District (DF). Coordinates: Belém – 01°28'13.55" S 48°26'49.98" W; Recife – 08°03'060" S 34°57'200" W; Maceió – 09°33'4.11" S 35°46'6.74" W; Ribeirão Preto – 21°10'16.22" S 47°51'19.67" W; Brasília – 15°46'44.7" S 47°55'20.4" W

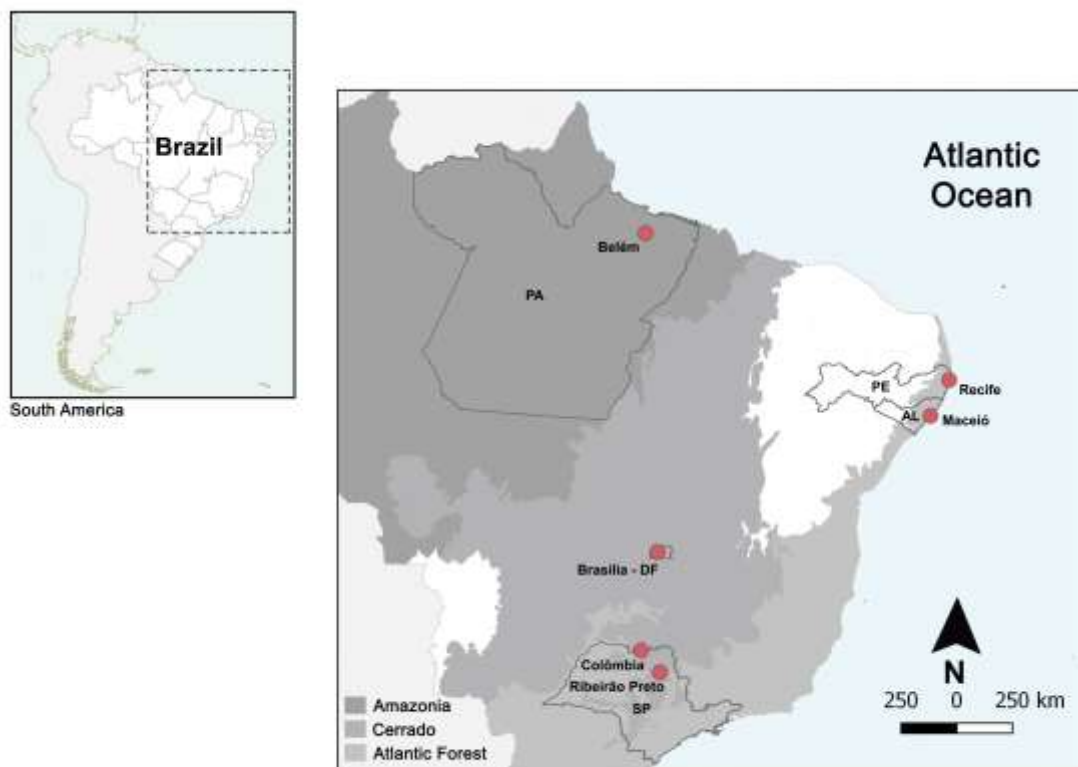


Fig. 2 Chromosomal variation in metaphase I of *Euchroma gigantea* from (a-d) Brasília – DF, (e, f) Ribeirão Preto – SP, (g) Belém – PA, (h, j) Recife – PE and (i, k) Maceió – AL. Black arrowheads indicate the ends of the sex chromosome chains with (a, i) five, (b, d-h, k) six or (c) eight chromosomes. Note the presence of an autosomal trivalent (T) in (a). Hollow arrowheads indicate examples of punctiform B chromosomes (e, f, g, k). Note two large B chromosomes (*) in (g). Insets in i-k represent the alternative conditions of pair 1 in these karyotypes. Bar = 10 μ m

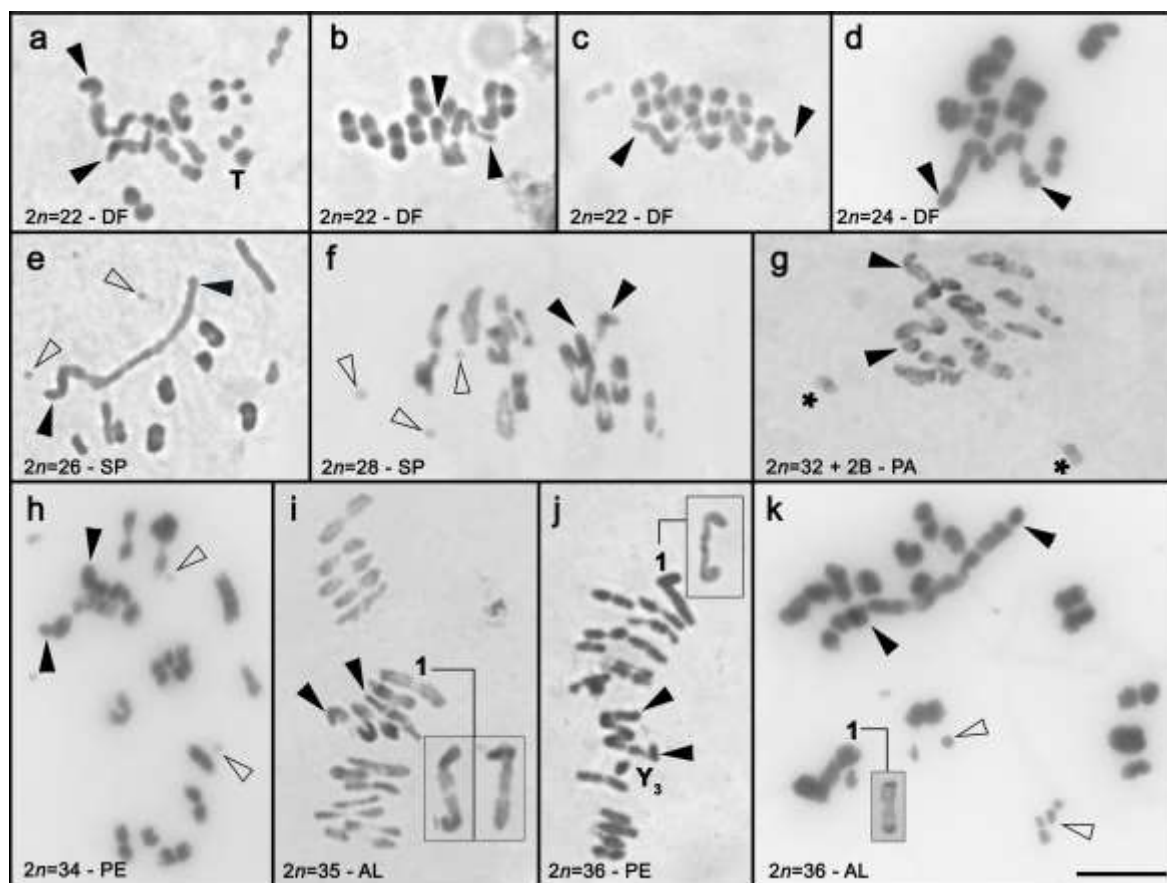


Fig. 3 Variability of multiple sex-chromosome mechanism in *Euchroma gigantea*. (a, p) Conventional and (d, g, j, m) inverted DAPI staining. The same chain is shown in the second column, after FISH with histone H4 (green) or H3 (red) as probe, and respective drawing schemes are shown in the third column. Bar = 10 μ m

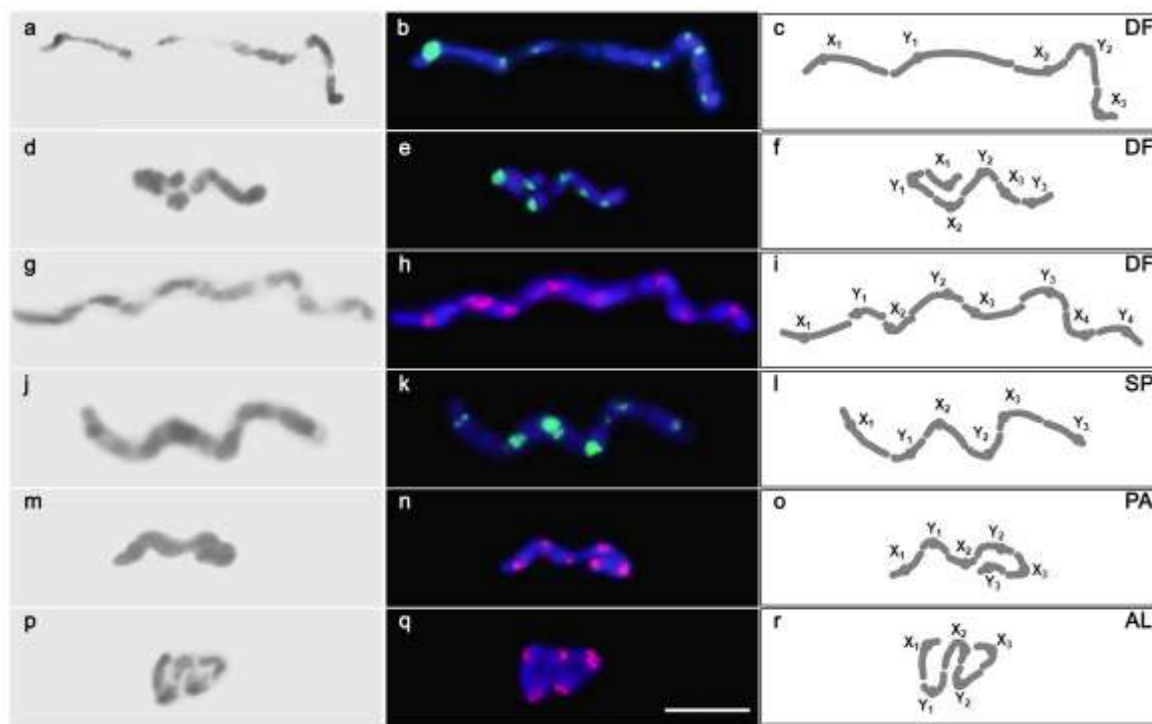


Fig. 5 FISH mapping of histones H3 and H4 in (a-e, g) meiotic and (f, h) mitotic cells of *Euchroma gigantea*. White arrowheads indicate the ends of the sex chromosome chains with (a, g) five, (c, d, e) six or (b) eight chromosomes. Insets in (g) represent the alternative conditions to pair 1 in this karyotype. Bar = 10 μ m

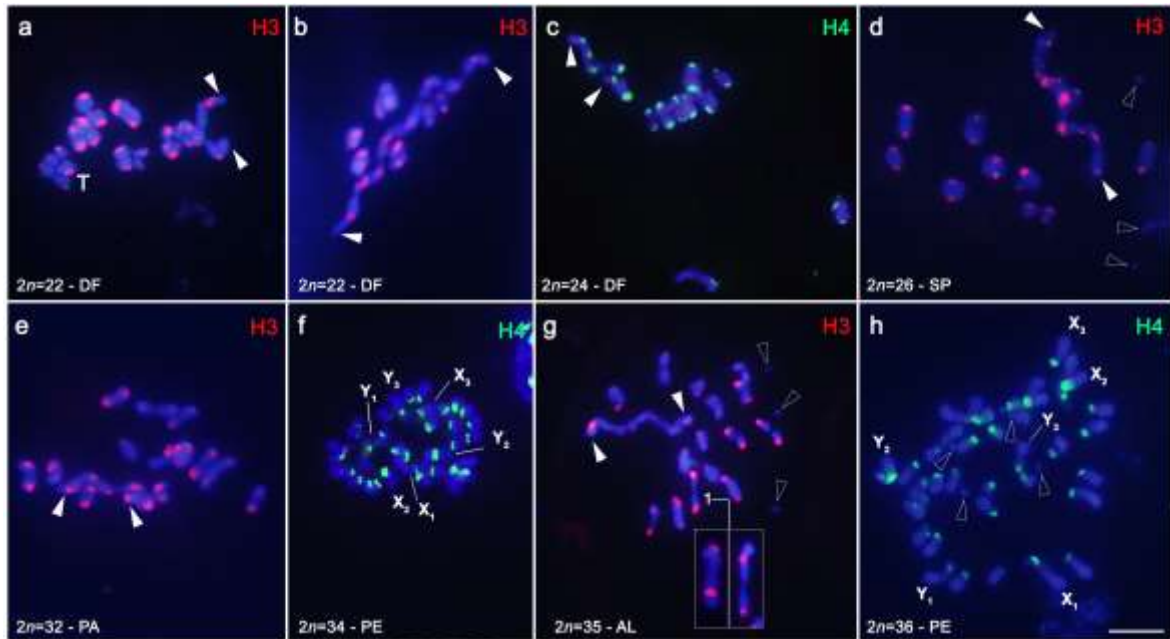
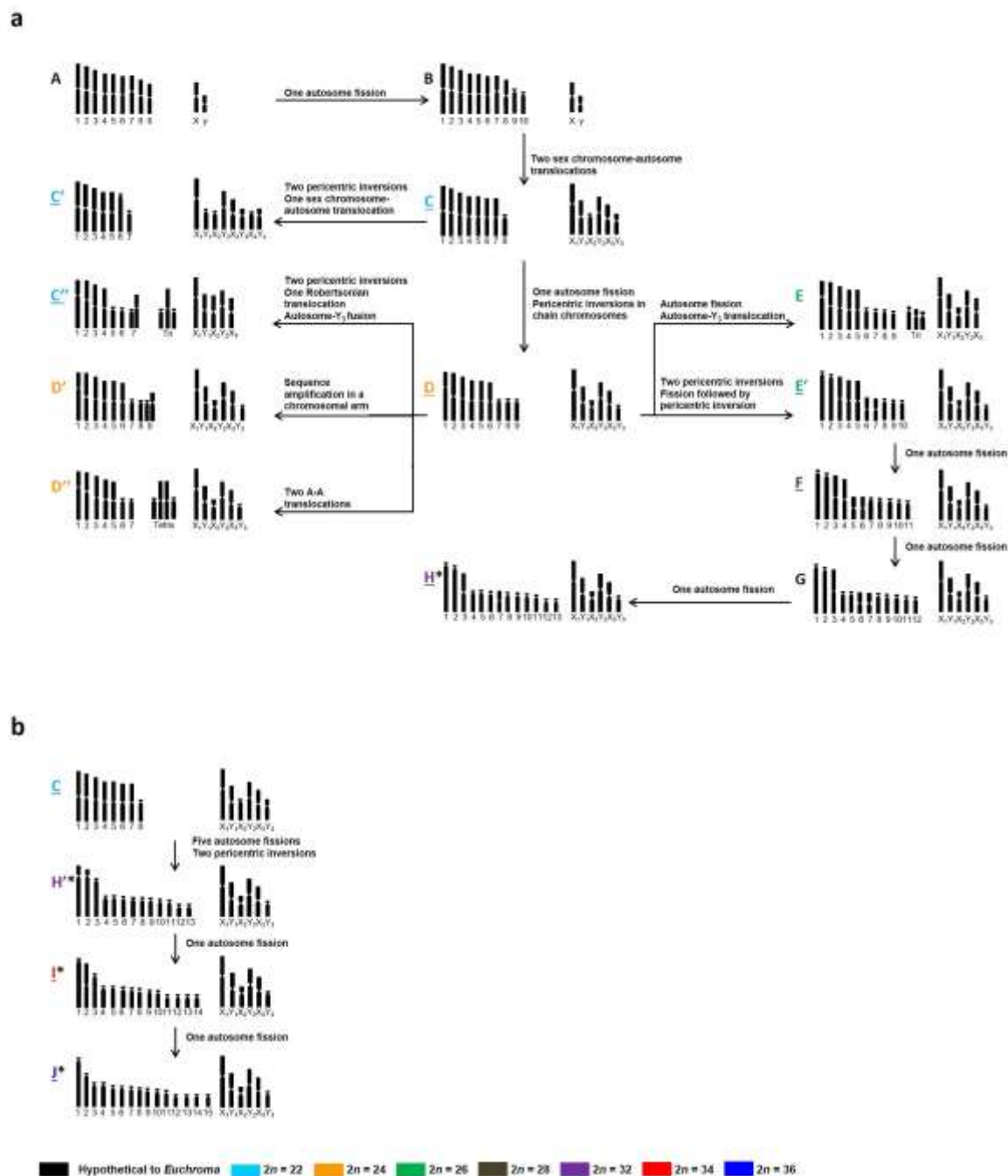


Fig. 6 Hypotheses of chromosomal evolution in *Euchroma gigantea* (a, b). Idiograms A and B (a) correspond to Coleoptera and Buprestidae modal karyotypes, respectively. Underlined letters are karyotypes described in this work; remaining karyotypes were described in Mesa and Fontanetti (1984) and Moura et al. (2008). *Pericentric inversions were observed in one or two pairs of these karyotypes



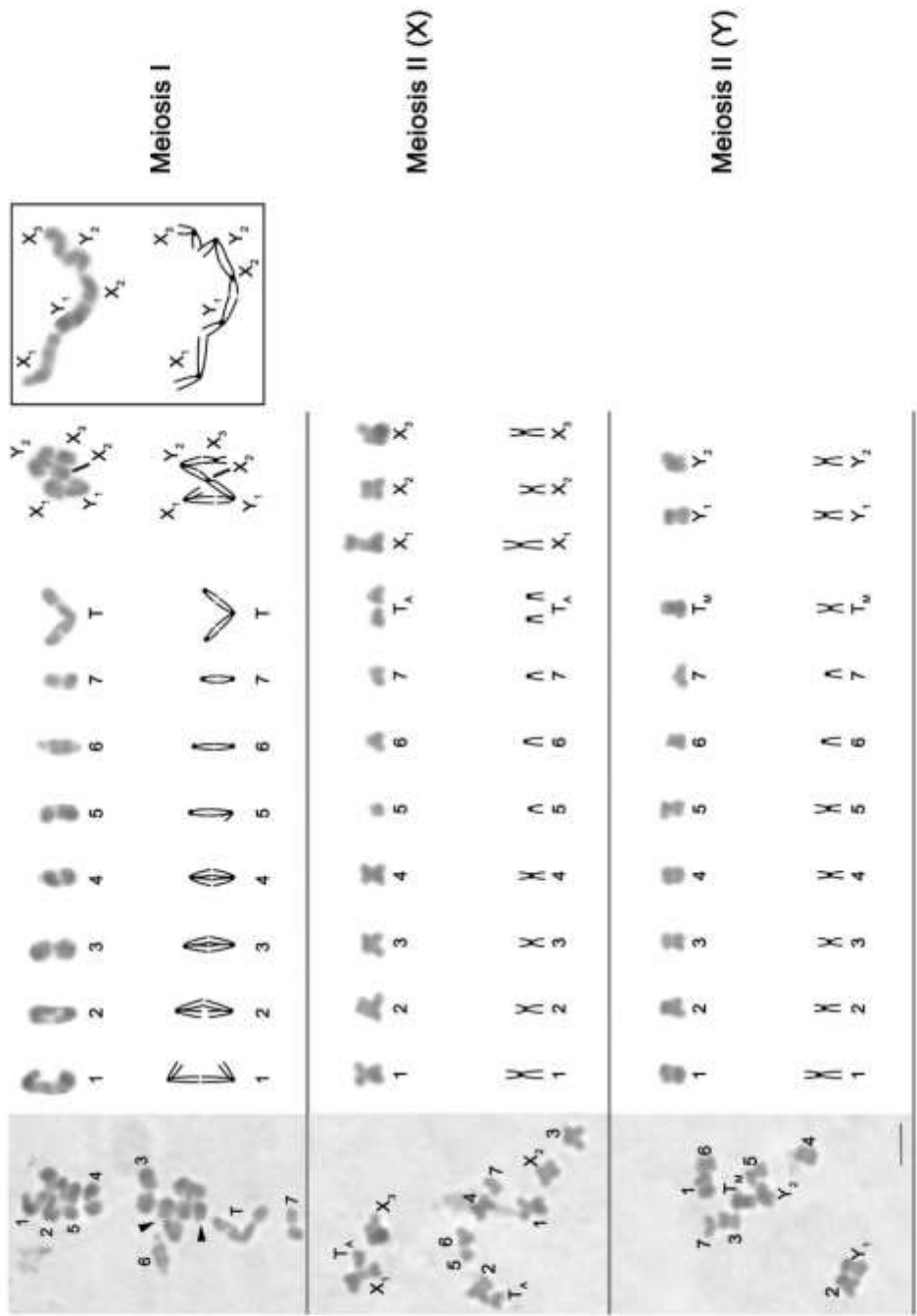


Fig. S1 Karyotype analysis of *Euchroma gigantea* with $2n=22$, $X_1Y_1X_2Y_2$, from Brasília-DF. The cells are stained with Giemsa. Autosomal and sexual chromosomes are indicated and chromosomes of compound trivalent are indicated as T_A (acrocentric) and T_M (metacentric). The insert is a sexual chain from a different metaphase belonging to the same individual. Bar = 5 μ m

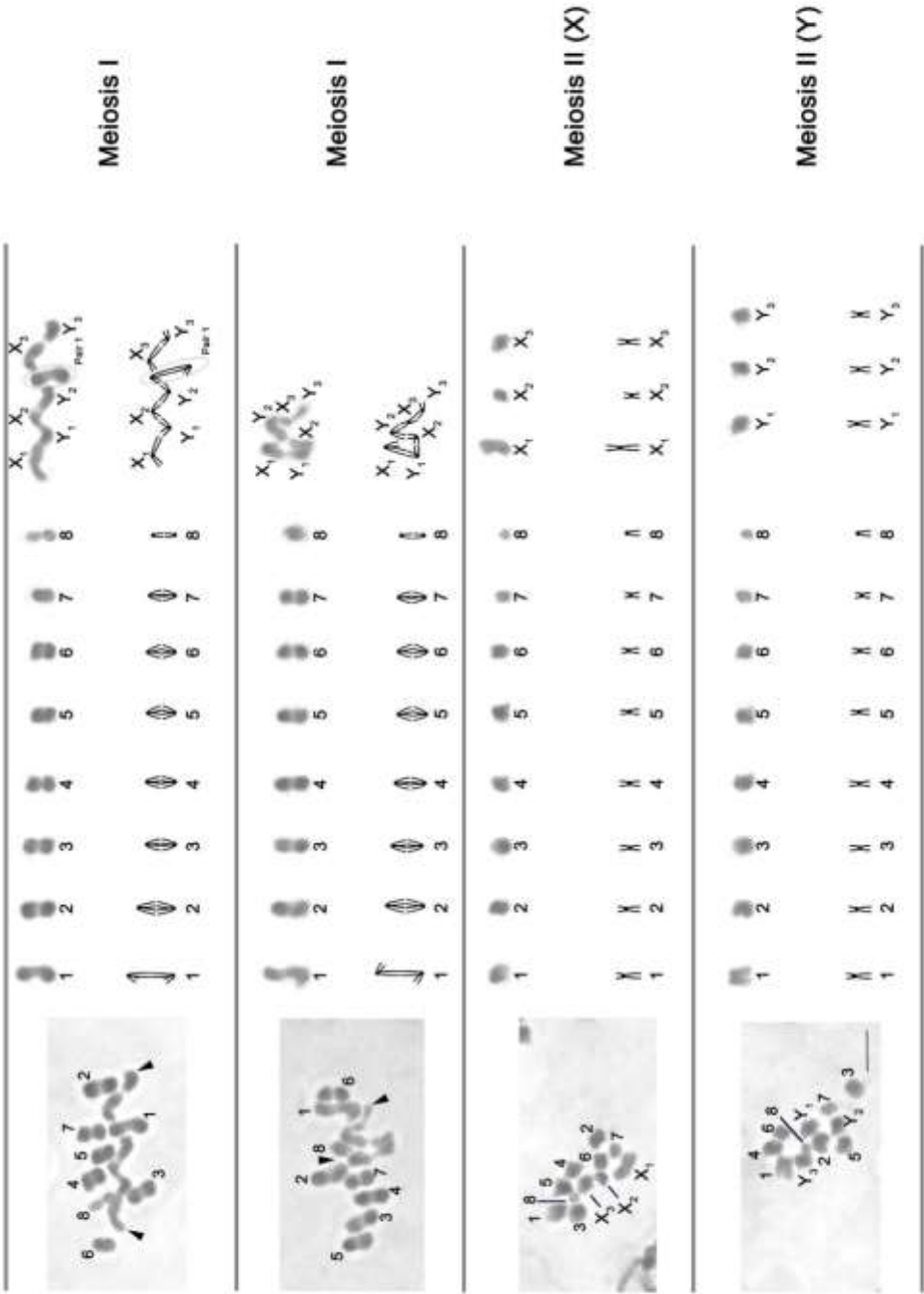


Fig. S2 Karyotype analysis of *Euchroma gigantea* with $2n=22$, $X_1Y_1X_2Y_2X_3Y_3$ from Brasília-DF. The cells are stained with Giemsa. Autosomal and sexual chromosomes are indicated. All cells belong to same individual. Bar = 5µm

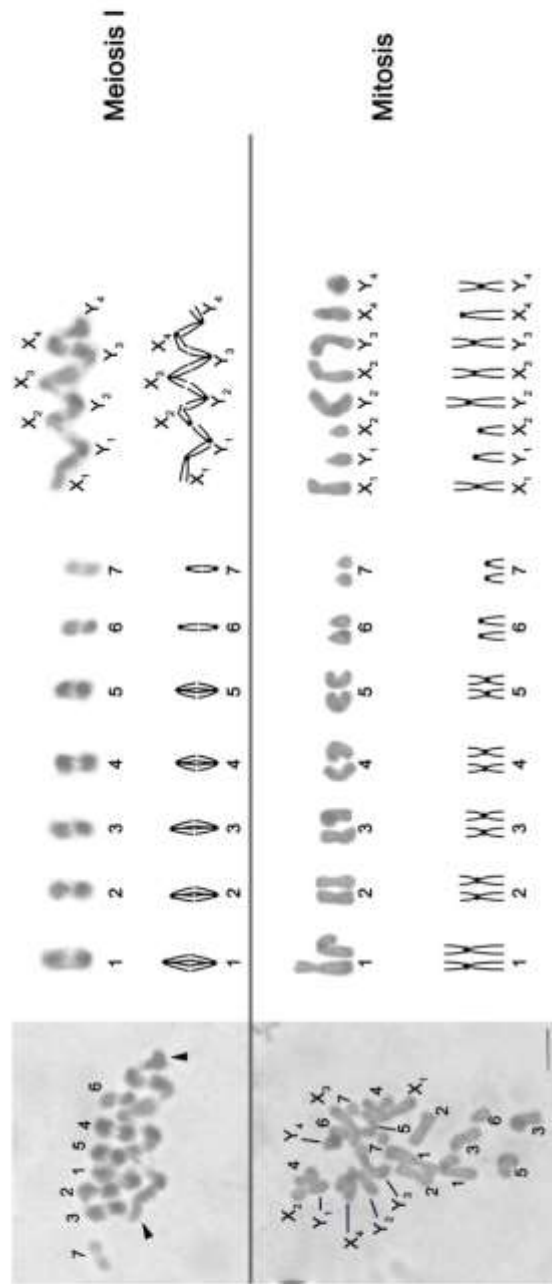


Fig. S3 Karyotype analysis of *Euchroma gigantea* with $2n=22, X_1Y_1X_2Y_2X_3Y_3X_4Y_4$ from Brasília-DF. The cells are stained with Giemsa. Autosomal and sexual chromosomes are indicated. All cells belong to same individual. Bar = 5µm

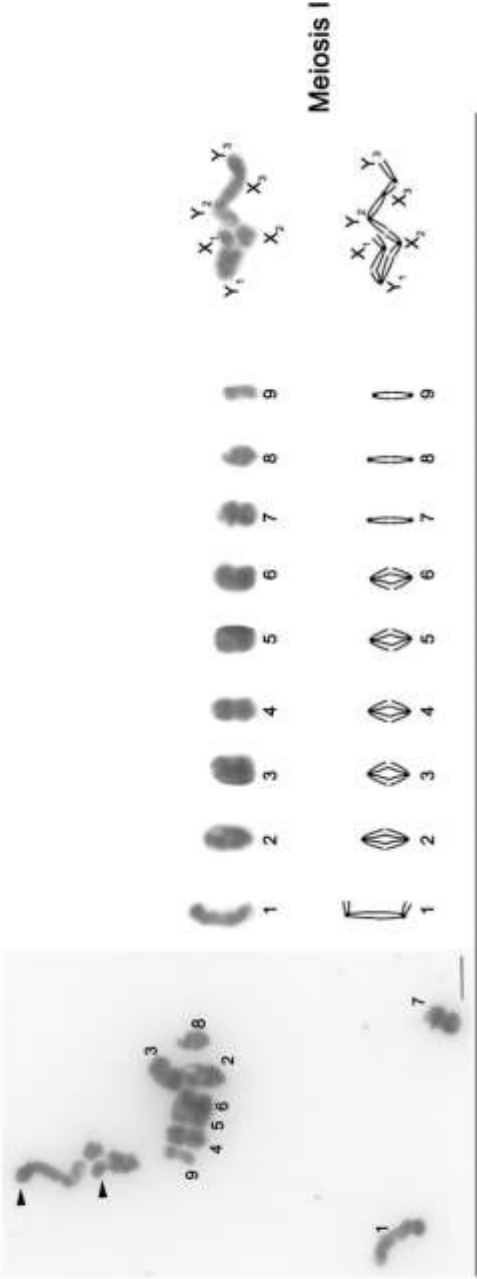


Fig. S4 Karyotype analysis of *Euchroma gigantea* with $2n=24$, $X_1Y_1X_2Y_2X_3Y_3$ from Brasília-DF. The cell is stained with DAPI and the color was inverted using Photoshop CC 2014. Autosomal and sexual chromosomes are indicated. Bar = 5 μm

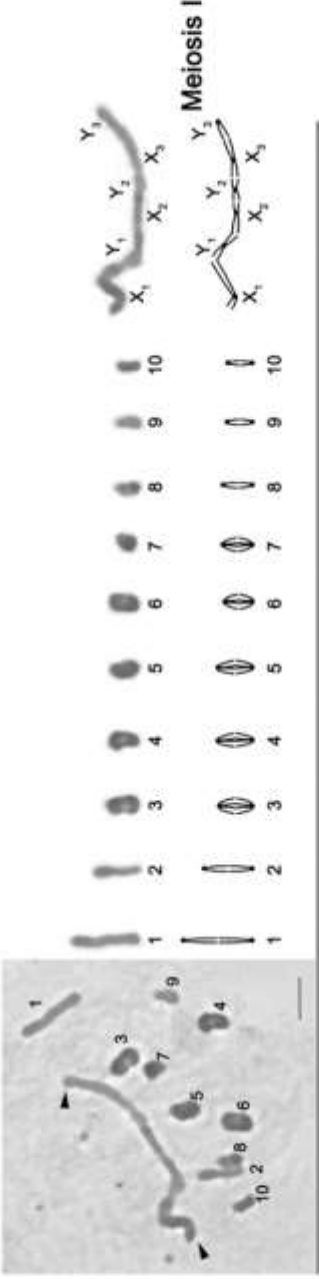


Fig. S5 Karyotype analysis of *Euchroma gigantea* with $2n=26$, $X_1Y_1X_2Y_2X_3Y_3$ from Ribeirão Preto-SP. The cell is stained with Giemsa. Autosomal and sexual chromosomes are indicated. Bar = 5 μm

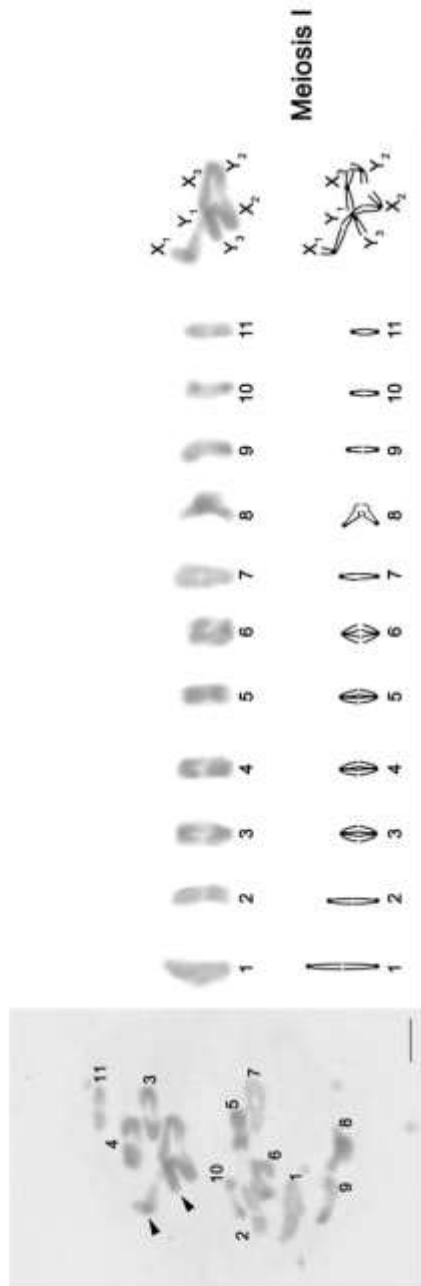


Fig. S6 Karyotype analysis of *Euchroma gigantea* with $2n=28$, X₁Y₁X₂Y₂X₃Y₃ from Ribeirão Preto-SP. The cell is stained with Giemsa. Autosomal and sexual chromosomes are indicated. Bar = 5 μm

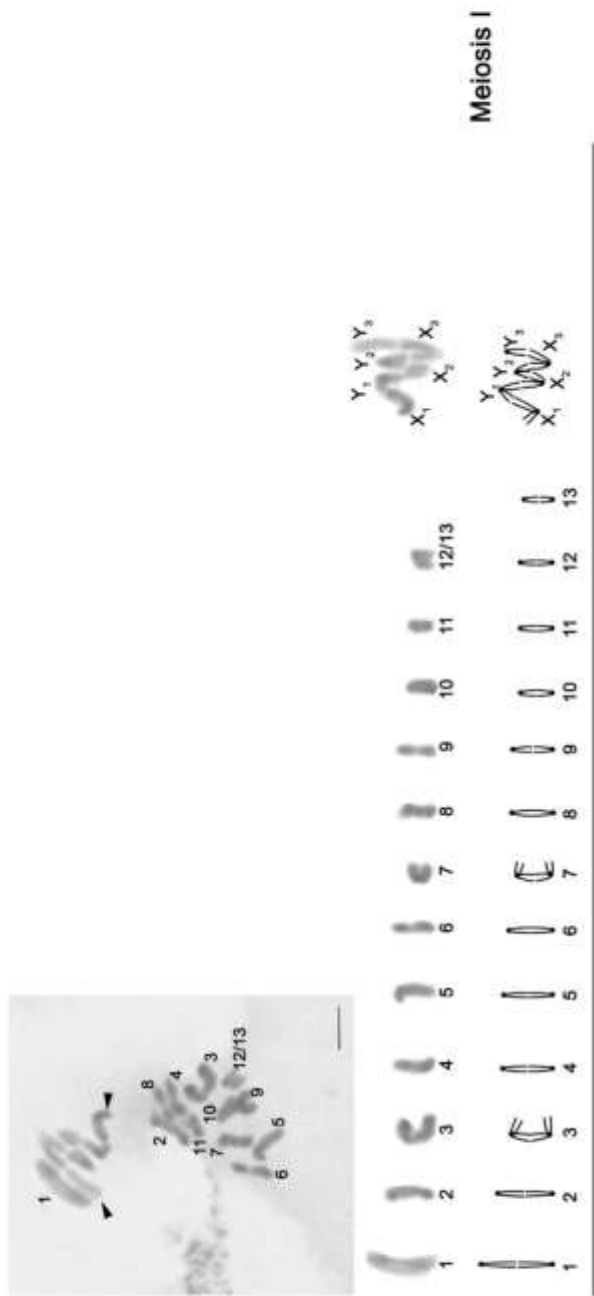


Fig. S7 Karyotype analysis of *Euchroma gigantea* with $2n=32$, $X_1Y_1X_2Y_2X_3Y_3$ from Belém-PA. The cell is stained with Giemsa. Autosomal and sexual chromosomes are indicated. Bar = 5μm

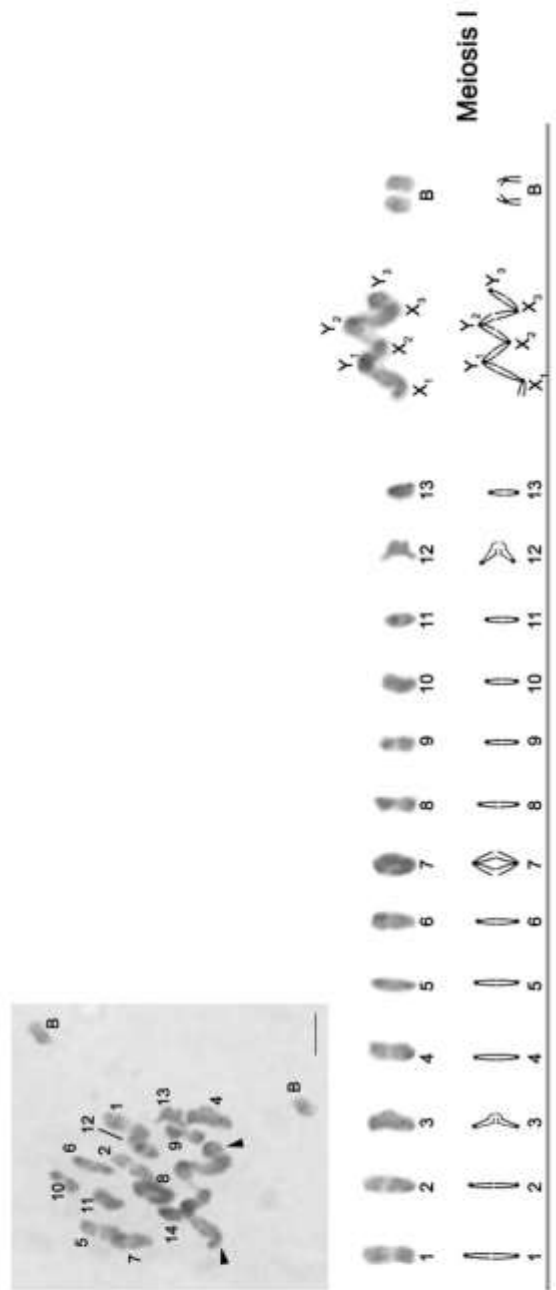


Fig. S8 Karyotype analysis of *Euchroma gigantea* with $2n=32$, $X_1Y_1X_3Y_3X_2Y_2 + 2B$, from Belém-PA. The cell is stained with Giemsa. Autosomal and sexual chromosomes are indicated. Note the presence of two large B chromosomes. Bar = 5µm

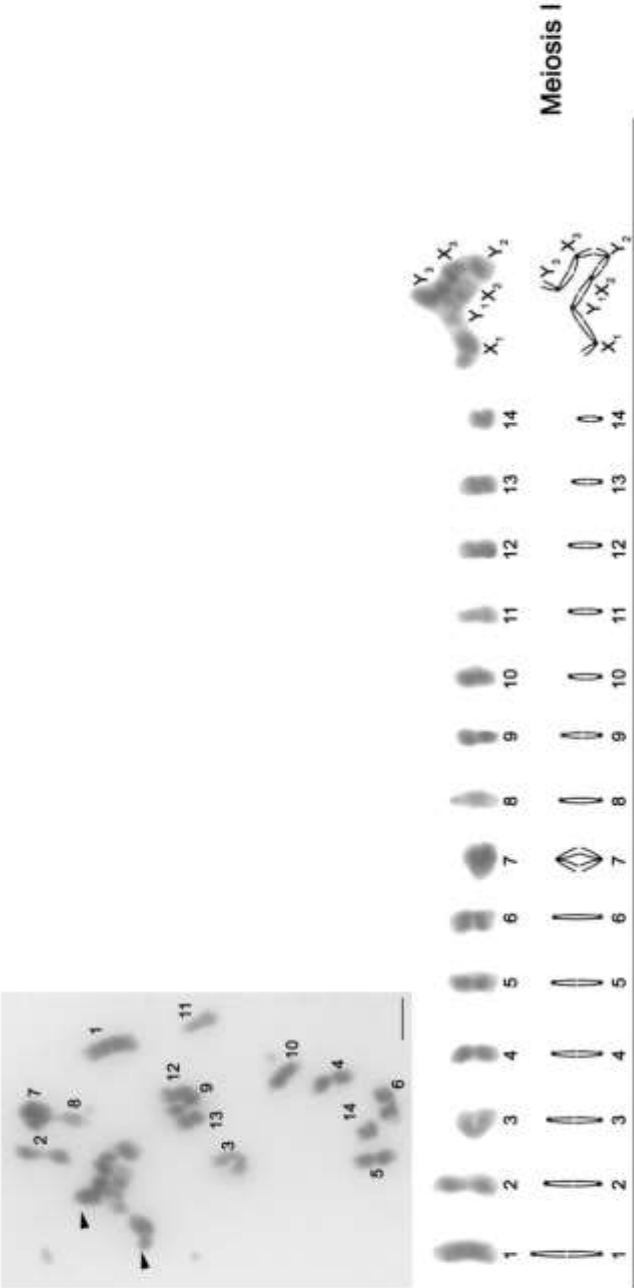


Fig. S9 Karyotype analysis of *Euchroma gigantea* with $2n=34$, $X_1Y_1X_2Y_2X_3Y_3$ from Recife-PE. The cell is stained with DAPI and the color was inverted in Photoshop CC 2014. Autosomal and sexual chromosomes are indicated. Bar = 5μm

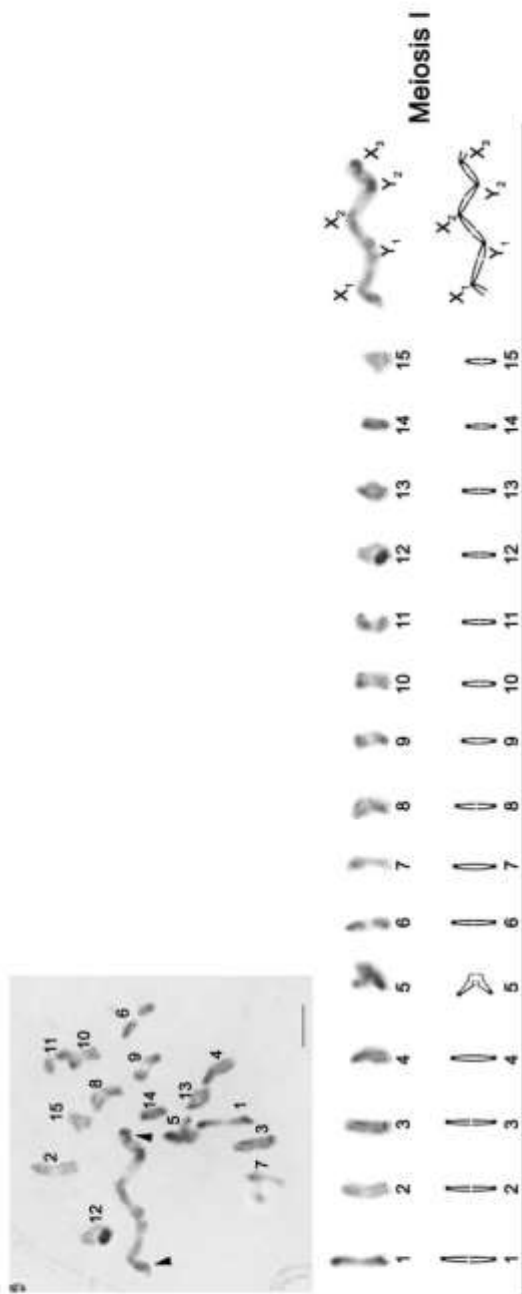


Fig. S10 Karyotype analysis of *Euechromia gigantea* with $2n=35$, X₁Y₁X₂Y₂X₃ from Macció-AL. The cell is stained with Giemsa. Autosomal and sexual chromosomes are indicated. Bar = 5 μm

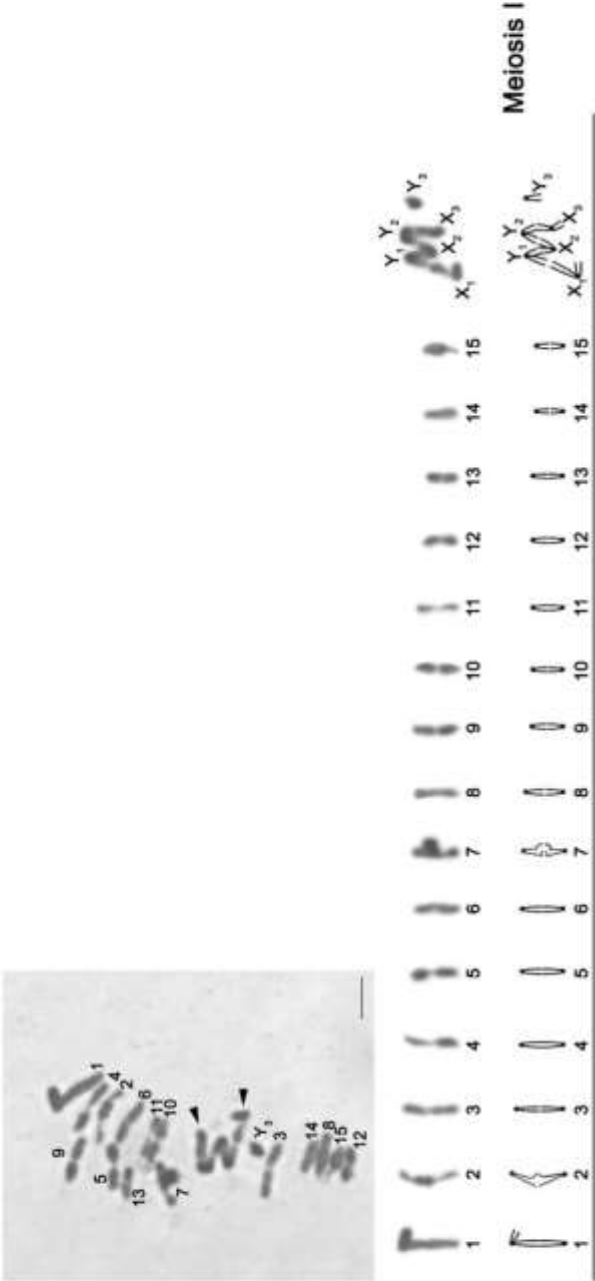


Fig. S11 Karyotype analysis of *Eochroma gigantea* with $2n=36$, $X_1Y_1X_2Y_2X_3Y_3$ from Recife-PE. The cell is stained with Giemsa. Autosomal and sexual chromosomes are indicated. Bar = 5 μ m

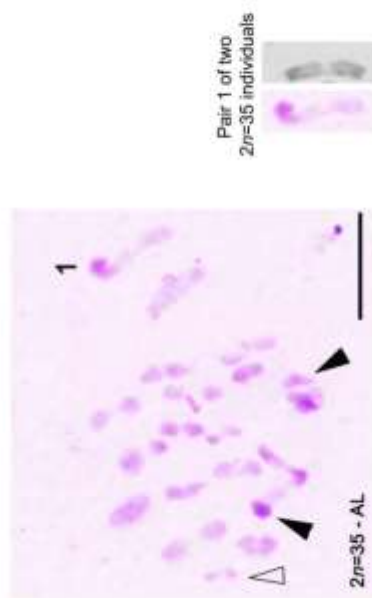


Fig. S12 C-banding in meiotic cell of *E. gigantea*. The black arrowheads indicate the ends of sex chain and hollow arrowheads point to punctiform B chromosomes. In detail, comparison of pair 1 heteromorphic (submeta/acrocentric) and homomorphic with two homologs acrocentric. Bar = 10µm

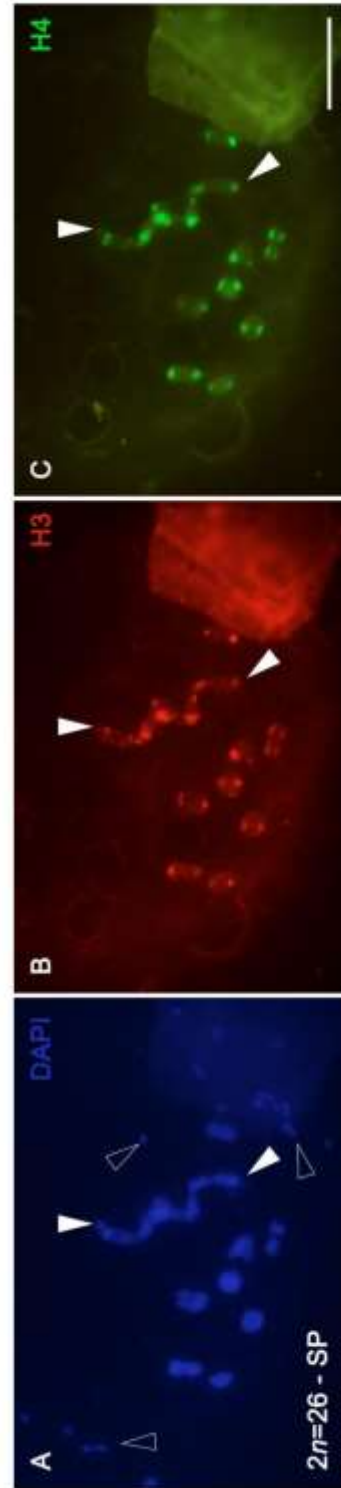


Fig. S13 Co-localization of histone genes in meiotic cell. The white arrowheads indicate the ends of sexual chain and hollow arrowheads point to punctiform B chromosomes. Bar = 10µm

**4 18S rDNA AND SATDNAS MAPPING IN THE CHROMOSOMES OF
EUCHROMA GIGANTEA (COLEOPTERA: BUPRESTIDAE) HIGHLIGHTS
THE COMPLEX EVOLUTIONARY HISTORY OF DIVERGENT KARYOTYPES**

Crislaine Xavier¹; Octavio Manuel Palacios-Gimenez²; Diogo Cavalcanti Cabral-de-Mello²; Rita de Cássia de Moura^{1*}

¹Universidade de Pernambuco (UPE), Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Biodiversidade e Genética de Insetos, Recife, Pernambuco, Brazil

²Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Departamento de Biologia, Rio Claro, São Paulo, Brazil

* Rita de Cássia de Moura

Universidade de Pernambuco (UPE) – Instituto de Ciências Biológicas/ICB, Laboratório de Biodiversidade e Genética de Insetos. Rua Arnóbio Marques 310, Santo Amaro. ZIP: 50.100-130 Recife – PE, Brazil.

e-mail: ritamoura.upe@gmail.com

Este manuscrito será submetido à revista Molecular Genetics and Genomics

Fator de impacto: 2.979

Qualis: B1 (CB1)

Abstract

Euchroma genus is monospecific to *E. gigantea* that possess a phenotypic plasticity and a chromosomal polymorphism, which involves variations of the diploid number, multiple sex mechanism and B chromosomes. All these variations have been originated from chromosomal rearrangements, which may be related to different repetitive sequences in the genome of the species. Here, satDNA sequences were identified in *E. gigantea* genome and in addition to 18S rDNA were mapped in different karyotypes of this species. The satellite sequence Egig1 (TACC) revealed conserved pattern of distribution in all tested karyotypes, otherwise two large satDNA Egig2, Egig3 and 18S rDNA were co-located and revealed variable pattern of distribution. Chromosomal rearrangements and ectopic recombination may be responsible for repattern localization of these sequences in chromosomes. Our results also indicate that despite different chromosomal patterns of distributions of Egig2, Egig3 these sequences possess high level of nucleotide conservation within and among populations. On the other hand Egig1 could play an important role in reorganization of *E. gigantea* karyotypes.

Keywords: Beetle, repetitive DNA, chromosomal polymorphism.

Introduction

High proportion of Eukaryotic genomes is composed by repetitive DNAs, that plays an essential role in shaping genomes and could influence the evolutionary trajectory and ecological adaptation (Long and Dawid 1980; Charlesworth et al. 1994; Kim et al. 2014). These repetitive DNAs may be arranged in tandem as satellite DNA (satDNAs) and some multigene families, or they may be dispersed in genomes as transposable elements (TEs) (Long and Dawid 1980; Charlesworth et al. 1994; Kim et al. 2014). The enrichment of repetitive sequences on specific chromosome sites may favor the occurrence of chromosomal rearrangements like fissions, reciprocal translocations and inversions, as reported in yeast (Fischer et al. 2000), nematodes (Coghlan and Wolfe 2002), insects (Cáceres et al. 1999; Rousselet et al. 2000) and mammals (Eichler and Sankoff 2003; Bailey et al. 2004). In addition, repetitive sequences are often associated to ectopic recombination events (Cáceres et al. 1999; Coghlan and Wolfe 2002; Paço et al. 2015) and may cause mutations in repetitive sequence blocks or arrangements among different sequences, thus reorganizing chromosomal structure (Paço et al. 2015).

The 45S (18S-5.8S-28S) rDNA is a multigene family that evolves through birth-and-dead and/or in concerted manner through unequal crossover and gene conversion mechanisms (Nei and Rooney 2005; Eickbush and Eickbush 2007). This sequence presents a low level of variability between copies within an organism and across organisms as taxonomically diverse as plants and animals (Nei and Rooney 2005; Eickbush and Eickbush 2007). It has been proposed that concerted evolution also drive the evolution of satDNA repeats within species (Dover 1982; Sawamura 2012). Furthermore, meiotic drive may cause biased transmission of chromosomes harboring a particular kind of satDNA and may influence the rate and type of chromosomal changes that are selectively inherited (Brown and O'Neill 2010; Crespi and Nosil 2013; Lindholm et al. 2016). These sequences could evolve independently and originate lineage-specific modifications (in sequence identity, copy number and chromosomal localization) generating incompatibilities both between species or within populations of the same species (Henikoff et al. 2001; Ferree and Barbash 2009; Pavlek et al. 2015). For example, rapid turnover of satDNA sequences clustered within heterochromatin has been involved in post zygotic

isolation among *Drosophila* species demonstrating the crucial role of satDNA in hybrid incompatibilities (Ferree and Barbash 2009).

Among beetles (Coleoptera), the 45S rDNA is the repetitive sequence most mapped at cytogenetic point of view in some families, revealing from two up to 16 sites with variable patterns of chromosomal distribution in both autosomes and sex chromosomes (Colomba et al. 2004; Arcanjo et al. 2009; Almeida et al. 2010; Cabral-de-Mello et al. 2011; Goll et al. 2015). On the other hand, satDNA were poorly studied and data of structure and evolution of these sequences are available only for species of Tenebrionidae, Chrysomelidae and Coccinelidae families (Juan et al. 1993; Ugarković et al. 1996a; Ugarković et al. 1996b; Lorite et al. 2001; Lorite et al. 2002; Mravinac and Plohl 2010; Lorite et al. 2013; Pavlek et al. 2015; Mora et al. 2017). Usually, these sequences are enriched in pericentromeric region and comprises from 20-50% of the genome.

Euchroma is a monospecific genus to *E. gigantea* (Linnaeus) 1758 of Buprestidae family that occurs in Neotropical region (Bellamy 2003). Brazilian individuals show high intriguing variable karyotypes with $2n = 22$ up to $2n = 36$, multiple sex mechanism ($X_1Y_1X_2Y_2X_3$, $X_1Y_1X_2Y_2X_3Y_3$ or $X_1Y_1X_2Y_2X_3Y_3X_4Y_4$), and B chromosomes with number varying from one to 32 (Mesa and Fontanetti 1984; Moura et al. 2008; Xavier et al. 2018). The karyotype variation in the species is attributed to centric fissions and fusions, translocations and pericentric inversions, which is supposed to have been triggered by ectopic recombination of repetitive sequences (Xavier et al. 2018). Recently, based in mitochondrial gene COI (cytochrome oxidase subunit I) analysis it was noticed the occurrence of at least three chromosomally polymorphic lineages of *E. gigantea* distributed in Brazil corresponding to three geographic groups, i.e. North, Northeast and Southeast/Midwest (Xavier et al. 2018).

Although the intriguing chromosomal polymorphism is well documented in *E. gigantea* there are few information concerning the chromosomal organization of repetitive DNAs in this species, which could be prone to be involved with karyotype variation. In this way, the aims of this work was to understand the chromosomal organization of 18S rDNA and most satDNAs in the species and their possible involvement with chromosomal variability. For this purpose, we isolated and characterized three satDNAs by using deep Illumina sequencing reads, graph-based clustering, and cytogenetic mapping

them and 18S rDNA within different population of *E. gigantea* with diploid number ranging from $2n = 22$ to $2n = 36$ with five, six or eight sex chromosomes.

Material and methods

Samples

Euchroma gigantea adult male specimens were manually collected on Malvaceae tree of *Pachira*, *Sterculia* and *Ceiba* genera. The sampling have been made in urban Brazilian areas of Belém, Pará state (PA) (01°28'13.55" S 48°26'49.98" W), Ribeirão Preto, São Paulo state (SP) (21°10'16.22" S 47°51'19.67" W), Brasília, Federal District (15°46'44.7"S 47°55'20.4"W), Recife, Pernambuco state (PE) (08°03'060" S 34°57'200" W) and Maceió, Alagoas state (AL) (09°33'4.11"S 35°46'6.74" W), Brazil (Table 1). The sampling was done between 2012-2016 in accordance with Brazilian laws of environmental protection and IBAMA/SISBIO license (No. 16278-1). Voucher specimens are deposited in the reference collection at the Laboratory of Biodiversity and Genetics of Insects, University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

DNA extraction, identification of satDNAs

Genomic DNA of *E. gigantea* individuals were extracted from femur tissue following phenol:chloroform method (Sambrook and Russel 2001). The genome of one individual with $2n = 34$, $X_1Y_1X_2Y_2X_3Y_3$ from Pernambuco was sequenced through Illumina HiSeq 2000 platform (paired-ends reads 2x100) using the service of Macrogen Inc, Korea. DNA-seq reads were preprocessed to check reads quality, filtered and joined using FASTQC and FASTX-Toolkit suit available in the web server Galaxy (<http://repeatexplorer.umbr.cas.cz>). In order to find out satDNAs the joined reads were clustered and assembled by similarity using Repeat Explorer pipeline (Novák et al. 2013), set default parameters. Assembled contigs belonging to every cluster were submitted to Tandem Repeat Finder (TRF) (Benson 1999) to identify DNA sequences that maximized the alignment scores among distinct monomers that could be arranged in tandem. Furthermore, tandem organization was confirmed by dotplot graphic alignment tool in Dotlet (Junier and Pagni 2000) and p distance was calculated in MEGA 6.0 (Tamura et al. 2013).

PCR amplification and sequence analysis

After satDNAs identification, they were amplified through Polymerase Chain Reaction (PCR) from genomic DNA of *E. gigantea*. Convergent (Egig1, Egig2) and divergent (Egig3) primers for PCR were designed using the Primer3plus or manually, Egig1F 5'-TACCTACCTACCTACCTACC-3', Egig1R 5'-GGTAGGTAGGTAGGTAGGTA-3', Egig2F 5'-GCTCGCACCGAACTGTTA-3', Egig2R 5'-GTTGTGGCCTCCGTGCA-3' and Egig3F 5'-TGTCGATGTCGGCCGTTCT-3' Egig3R 5'-TCCGTTACCTTCCTCCACAC-3'. PCRs were performed in 50µL containing 1x *Taq* DNA polymerase recombinant buffer (Invitrogen), 1.5 mM MgCl₂, 0.02 mM of dNTP, 0.4 µM of each primer and 0.1 units of *Taq* DNA polymerase. The PCR for Egig1 followed an initial denaturation of 5 min at 94 °C, then 10 cycles of 1 min at 94 °C, 30 s at 55 °C and 60 s at 72 °C, and 35 cycles of 1 min at 94 °C, 30 s at 60 °C and 90 s at 72 °C, with a final extension of 5 min at 72 °C. SatDNA Egig2 and Egig3 were amplified following an initial denaturation of 5 min at 94 °C, 30 cycles of 30 sec at 94 °C, 30s at 55 °C and 1 min at 72 °C with a final extension of 5 min at 72 °C.

To variability analysis the sequences Egig2 and Egig3 were amplified from three pools of genomic DNA corresponding to lineages North (Belém – PA), Northeast (Recife – PE and Maceió – AL) and Southeast/Midwest (Brasília – DF and Ribeirão Preto – SP). Were used genomic DNA from four individuals belonging to each lineage. PCR products were visualized in agarose gel electrophoresis (1%) and monomers bands were recovered, purified (Zimoclean™ Gel DNA Recovery Kit-Sinapse) and cloned in pGEM-T Easy vector (Promega). Sixteen colonies of Egig2 and Egig3 sequences from each lineage were Sanger sequenced by Macrogen (South Korea) facility.

Sequences were analyzed using Pregap4 software, STADEN package (Bonfield et al. 1995) and submitted to Vecscreen (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecscreen>) to remove regions of cloning vector. Sequences were used as query in GenBank and Repbase to search similarity with other sequences. The alignments were done using Muscle algorithm (Edgar 2004) and were displayed in logos format using Weblogo 3.3 software (Crooks et al. 2004). Haplotype analysis was done in Network 5.0 (<http://www.fluxus-engineering.com>) using median joining approach. To show

sequences as logos and to Network analysis, sequences of the primers were removed to minimize a possible bias.

Chromosomal preparations and Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH)

Chromosomal preparations were obtained for 14 *E. gigantea* specimens from five populations (Table 1) by the classical method of testicular spreading. In order to detect chromosomal location of satDNA and 18S rDNA, FISH experiment were carried out as previously described in Pinkel et al. (Pinkel et al. 1986) with modifications proposed by (Cabral-de-Mello 2015). To obtain the 18S rDNA it was used the primers described by Cabral-de-Mello et al. (2010) using genomic DNA from the beetle *Dichotomius semisquamosus*. The Egig1 and Egig3 probes were labeled with dUTP-digoxigenin by PCR and detected with Anti-Digoxigenin-Rhodamine (Roche), while 18S rDNA and Egig2 probes were labeled by Nick translation using biotin-14-dATP and detected with avidin-FITC (fluorescein isothiocyanate) (Invitrogen, San Diego, CA, USA). Cells were visualized using Olympus microscope BX61 equipped with a fluorescent lamp and captured images using a DP70 cooled digital camera. The brightness and contrast of photographs were optimized using Photoshop CC 2014.

Results

satellite DNAs

The three satDNAs recovered from *E. gigantea* genome (Egig1, Egig2 and Egig3) sequences correspond to clusters CL1, CL44 and CL83 identified by RepeatExplorer, which are in decreasing order according to their genome proportion, i.e., 9.71%, 0.299% and 0.09%, respectively. Egig1 corresponds to a short motif (TACC)_n and is the most abundant satellite sequence identified in *E. gigantea* genome, while Egig2 and Egig3 are 172 and 202 bp long, respectively and were the longest monomers identified. The long sequences were deposited in GenBank under the follow access number: MH844826 for Egig2 and MH844827 for Egig3. They did not show significant similarities with other sequences deposited in Genbank or Repbase databases. Egig2 and Egig3 are different families, since they showed less than 80% identity (42%). Monomers found in the sequenced genome showed 9.6% of nucleotide divergence (*p*-distance) within four monomers of Egig2 and 6% within three monomers of Egig3.

The analysis of sequenced clones from three lineages revealed nucleotide divergence of 7% and 1% for Egig2 and Egig3, respectively. Thirty-nine haplotypes were recognized to Egig2, and nine haplotypes to Egig3. The haplotype network showed sharing haplotypes among lineages for both sequences and reveals the high haplotype diversity of 0.9823 to Egig2 while in Egig3 it was 0.3750. Sequence logos and Network haplotypes (Fig 1) illustrates the levels of identity and haplotypes relationship of these sequences within and among the three DNA pools analyzed.

Chromosomal location of 18S rDNA and satDNAs

The specimens analyzed showed karyotypes with $2n = 22$, $2n = 26$, $2n = 32$, $2n = 34$, $2n = 35$ and $2n = 36$ with multiple sex mechanism composed by five, six or eight chromosomes and plus punctiform B chromosomes present in all karyotypes except in $2n=22$ (Table 1) (Fig 3). All these karyotypes were previously described by Xavier et al. (2018).

The mapping of 18S rDNA revealed variable number of sites all present in pericentromeric region of chromosomes. Patterns of distribution were variable and sites were found exclusively in autosomes or dispersed in autosomes and sex chromosome (Fig. 2, S1). Karyotypes with $2n = 22$, $2n = 26$, $2n = 34$ and $2n = 36$ presented sites of 18S rDNA in one autosomal pair (Fig. 2a-d, g, k). However, in specimens with $2n = 22$, one site per chromosome was observed in the metacentric pair 4 (Fig. 2a-c), while in karyotypes $2n = 26$, $2n = 34$ and $2n = 36$ the sites were present in pair one, that is acrocentric (Fig. 2d, g, k). Furthermore, two individuals with $2n = 32$ presented variable site number, with one presenting sites of 18S rDNA in pairs 1, 2 and 4 (Fig 2e), while the second one showed sites in pairs 1, 2, 3, 4 and 5 (Fig 2f). In both cases, the 18S rDNA was homomorphic for pair 4 and heteromorphic for the other pairs i.e., only one of the homologs was labeled. In karyotypes with $2n = 35$, distribution of 18S rDNA sites were also variable and clusters were found in autosomes and X_3 chromosome (Fig. 2i-k). Among $2n = 35$ karyotypes three patterns were observed (i) sites only in pair 1, (ii) sites in pair 9 and in X_3 , and (iii) sites in pair 2, pair 9 (heteromorphic) and in X_3 (Fig. 2h, i, j).

The satDNA Egig1 showed identical pattern of chromosomal distribution in all tested karyotypes and it was localized in pericentromeric region of all

chromosomes (Fig 3). Egig2 and Egig3 were co-localized in two or four sites per diploid genome in all karyotypes (Fig. 4). In all tested karyotypes, the pattern of distribution of Egig2 and Egig3 was the same to those observed for 18S rDNA and it was demonstrated to karyotypes $2n = 26$ and $2n = 35$ (Fig. 5), except for one individual with $2n = 22$, $X_1Y_1X_2Y_2X_3Y_3$ that show two sites of 18S rDNA, but exhibited four sites of Egig2 and Egig3 (Fig. 3b, 4b).

Discussion

The interesting intra and interpopulational chromosomal polymorphism observed in *Euchroma gigantea* was previously described (Mesa and Fontanetti 1984; Moura et al. 2008; Xavier et al. 2018). There are evidences that chromosomal evolutionary history of this species started from a set with $2n = 20$, Xy , which underwent centric fissions and fusions, pericentric inversions, autosome-autosome (A-A) and sex chromosome-autosome (A-X) translocation and Y loss (Xavier et al. 2018). Because repetitive sequences could be hotspots for chromosome breakage that precede rearrangements like fission, reciprocal translocations and inversions (Cáceres et al. 1999; Fischer et al. 2000; Coghlan and Wolfe 2002; Paço et al. 2015) these sequences were suggested as promoter of chromosomal rearrangements in *E. gigantea* karyotypes (Xavier et al. 2018). On the other hand, these chromosomal rearrangements could act repatterning distribution of another sequences involved in rearranged areas (Hirai et al. 1996; Paço et al. 2015).

Although *E. gigantea* presented highly diverse karyotypes, presence of two sites of 18S rDNA per diploid genome in $2n = 22$, $2n = 26$, $2n = 34$, $2n = 35$ and $2n = 36$ karyotypes is a conserved condition. This suggests that rearrangements involved in the increase of diploid number does not caused dispersion of 18S rDNA in these karyotypes. However, the variable morphology of chromosomes bearing 18S rDNA sites in karyotypes aforementioned could be consequence of chromosomal rearrangements experienced by distinct populations. In addition, dispersion of this sequence with no alteration of chromosomal morphologies or increase of diploid numbers, as observed in $2n = 32$ and 35 karyotypes, suggesting that chromosomal rearrangements are not unique mechanism that triggered the repatterning distribution of 18S rDNA.

The presence of two sites per diploid genomes is the most common pattern for major rDNA in Coleoptera as a whole, including representatives of Polyphaga (Schneider et al. 2007; Almeida et al. 2010; Cabral-de-Mello et al. 2011; Goll et al. 2015; Lopes et al. 2017). However, an increasing of major rDNA cluster and repositioning of them among different autosomes and sex chromosomes was also reported in this order (Cabral-de-Mello et al. 2011). In Coleoptera and other insect orders, both chromosomal rearrangements and ectopic recombination have been proposed to dispersion of rDNA sequences (Hirai et al. 1996; Nguyen et al. 2010; Cabral-de-Mello et al. 2011; Pita et al. 2016).

Considering that the ancestral sites of 18S rDNA in *E. gigantea* may be those in pair 4 of the $2n = 22$, which is the putative ancestral karyotype of the species (Xavier et al. 2018), the most parsimonious scenario for rDNA reshuffling in this species involves chromosomal rearrangements and events of ectopic recombination. Two patterns of 18S rDNA dispersion were observed, i.e. only in autosomes ($2n = 32$) or in autosomes and sex chromosomes ($2n = 35$), and this scenario indicate the existence of independent process for rDNA dispersion as well as chromosomal repositioning of these sequences in these karyotypes.

Presence and abundance of Egig1, Egig2 and Egig3 in distinct karyotypes from all analyzed populations suggest that they originated before karyotype diversification of *E. gigantea*. Occurrence of Egig1, in pericentromeric region of all chromosomes in different karyotypes reveals that this sequence is probable involved with structural components of heterochromatin (Plohl et al. 2012). In addition, as well as histone sequences that are abundant in pericentromeric region (Xavier et al. 2018), Egig1 may favor the occurrence of ectopic recombination contributing to chromosomal rearrangements (Rousselet et al. 2000; Coghlan et al. 2005) and to repatterning of rDNA (Nguyen et al. 2010).

Proportion of Egig1, Egig2 and Egig3 in genome, at least in part, reflect in abundance divergences in number of chromosome sites of these sequences. Egig1 was most abundant and highly represented in all karyotypes while Egig2/Egig3 were less abundant and showed only two sites in most of karyotypes. Dispersion of Egig2 and Egig3 together with 18S rDNA and restrict

to pericentromeric region of few chromosomes is uncommon in Coleoptera. In this order, various satDNA cytogenetically studied are dispersed in constitutive heterochromatin (CH) of all or almost all chromosomes (Juan et al. 1993; Ugarković et al. 1996a; Ugarković et al. 1996b; Lorite et al. 2001; Lorite et al. 2002; Mravinac and Plohl 2010). However, restriction of satDNA in specific chromosomes was also observed in *Tribolium castaneum* (Tenebrionidae) and could be indicative of sequences diversity in CH of species, beyond the possible existence of different chromosome-specific satDNA families (Pavlek et al. 2015). The presence of two sites of rDNA 18S, but four sites of Egig2 and Egig3 in karyotype $2n = 22$, $X_1Y_1X_2Y_2X_3Y_3$ indicate that dispersion of these satDNA sequences could also be independent (Macas et al. 2003; Jo et al. 2009) and that possibly not all arrays of these sequences are intermingled with rDNA sequences.

Some differences in sequence dynamics of Egig2 and Egig3 were evident by nucleotide divergence and haplotype diversity. Nevertheless, both sequences reveal high level of sequence conservation within and among populations belongs to three lineages of *E. gigantea* described by Xavier et al. (2018). The homogeneity of these sequences was evident in the haplotype network, where haplotypes were shared among three lineages and haplotypes from different lineages are located in the same branches without any pattern of lineage-specific variation. As predict in concerted evolution model some satDNA accumulate mutations rapidly, while others possess a low rate of modifications. As consequence of low rates of evolution, many satDNA may be found in different populations of one species or in a species group (Plohl et al. 2012). It suggest that Egig2 and Egig3 sequences suffered low differentiation and were conserved along lineage differentiation process of *E. gigantea*.

Conclusions

Dispersion of 18S rDNA, Egig2 and Egig3 in *E. gigantea* possibly started in sites presents in metacentric pair 4 in karyotypes with $2n = 22$, and were dispersed in other karyotypes through events of chromosomal rearrangements and ectopic recombination. Dispersion and repositioning of these sequences seems follow independent paths in different populations/karyotypes. However, despite the different patterns distribution and dispersion of Egig2 and Egig3,

they do not have significant differentiation in sequence level among the three studied Brazilian lineages. Abundant distribution of Egig1 in pericentromeric regions of chromosomes in all tested karyotypes reveals its origin before chromosomal diversification of *E. gigantea* and may indicate an important role of this sequence in chromosomal evolutionary history of *E. gigantea*.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgements

We are grateful to Dr. Fernando A. B. Silva and M.Sc. Amanda Arcanjo for providing samples from Belém-PA. This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco-FACEPE (APQ process number 0777-2.02/15), Fundação de Amparo à Ciência do Estado de São Paulo - FAPESP (2014/11763-8) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq-Brazil (PQ-2 of RCM process number 305298/2014-3).

References

- Almeida MC, Goll LG, Artoni RF, et al (2010) Physical mapping of 18S rDNA cistron in species of the *Omophoita* genus (Coleoptera, Alticinae) using fluorescent in situ hybridization. *Micron* 41:729–34. doi: 10.1016/j.micron.2010.06.008
- Arcanjo AP, Cabral-de-Mello DC, Barros e Silva AE, Moura R de C (2009) Cytogenetic characterization of *Eurysternus caribaeus* (Coleoptera: Scarabaeidae): evidence of sex-autosome fusion and diploid number reduction prior to species dispersion. *J Genet* 88:177–82.
- Bailey JA, Baertsch R, Kent WJ, et al (2004) Hotspots of mammalian chromosomal evolution. *Genome Biol* 5:R23. doi: 10.1186/gb-2004-5-4-r23
- Bellamy C (2003) An illustrated summary of the higher classification of the superfamily Buprestoidea (Coleoptera). *Folia Heyrovskiana* 10:44.
- Benson G (1999) Tandem repeats finder: a program to analyze DNA

- sequences. *Nucleic Acids Res* 27:573–580.
- Bonfield JK, Smith KF, Staden R (1995) A new DNA sequence assembly program. *Nucleic Acids Res* 24:4992–4999.
- Brown JD, O'Neill RJ (2010) Chromosomes, conflict, and epigenetics: chromosomal speciation revisited. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 11:291–316. doi: 10.1146/annurev-genom-082509-141554
- Cabral-de-Mello DC (2015) Beetles (Coleoptera). In: Sharakhov I V (ed) *Protocols for Cytogenetic Mapping of Arthropod Genomes*, I. CRC press, Boca Raton, pp 171–217
- Cabral-de-Mello DC, Moura RC, Martins C (2010) Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the beetle *Dichotomius geminatus* provides the first evidence for an association of 5S rRNA and histone H3 genes in insects, and repetitive DNA similarity between the B chromosome and A complement. *Heredity (Edinb)* 104:393–400. doi: 10.1038/hdy.2009.126
- Cabral-de-Mello DC, Oliveira SG, de Moura RC, Martins C (2011) Chromosomal organization of the 18S and 5S rRNAs and histone H3 genes in Scarabaeinae coleopterans: insights into the evolutionary dynamics of multigene families and heterochromatin. *BMC Genet* 12:88. doi: 10.1186/1471-2156-12-88
- Cáceres M, Ranz JM, Barbadilla A, et al (1999) Generation of a widespread *Drosophila* inversion by a transposable element. *Science (80-)* 285:415–418. doi: 10.1126/science.285.5426.415
- Charlesworth B, Sniegowski P, Stephan W (1994) The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* 371:215–220.
- Coghlan A, Eichler EE, Oliver SG, et al (2005) Chromosome evolution in eukaryotes: A multi-kingdom perspective. *Trends Genet* 21:673–682. doi: 10.1016/j.tig.2005.09.009
- Coghlan A, Wolfe KH (2002) Fourfold faster rate of genome rearrangement in nematodes than in *Drosophila*. *Genome Res* 12:857–867. doi: 10.1101/gr.172702
- Colomba M, Vitturi R, Volpe N, et al (2004) Karyotype, banding and rDNA FISH in the scarab beetle *Anoplotrupes stercorosus* (Coleoptera Scarabaeoidea: Geotrupidae). Description and comparative analysis. *Micron* 35:717–20. doi: 10.1016/j.micron.2004.04.004

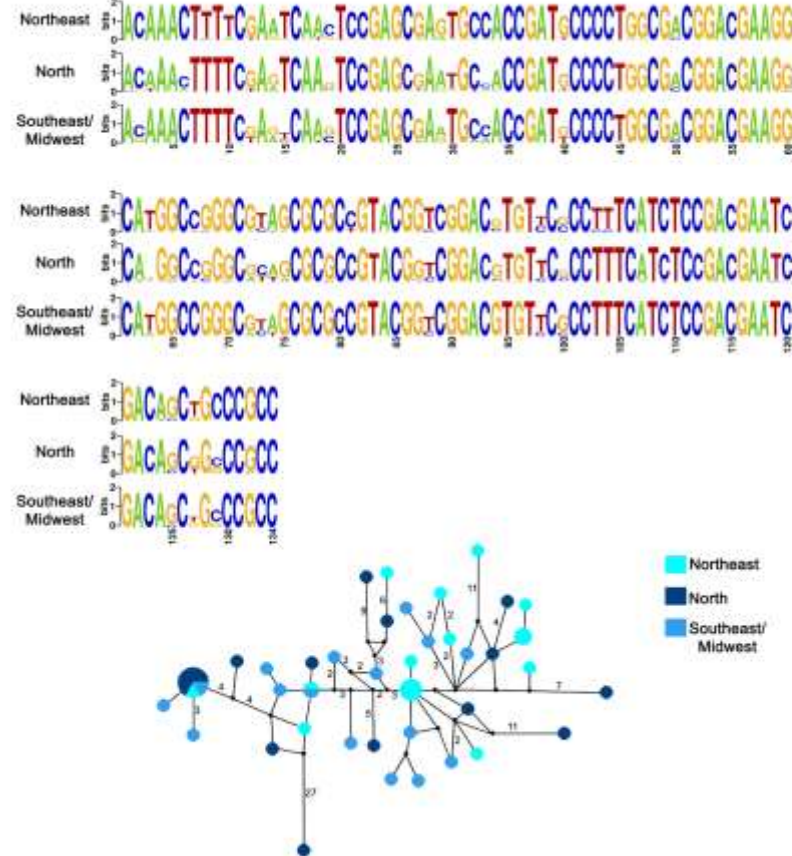
- Crespi B, Nosil P (2013) Conflictual speciation: Species formation via genomic conflict. *Trends Ecol Evol* 28:48–57. doi: 10.1016/j.tree.2012.08.015
- Crooks GE, Hon G, Chandonia J-M, Brenner S (2004) WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res* 14:1188–1190. doi: 10.1101/gr.849004.1
- Dover G (1982) Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. *Nature* 299:111–117.
- Edgar RC (2004) MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32:1792–1797. doi: 10.1093/nar/gkh340
- Eichler EE, Sankoff D (2003) Structural dynamics of eukaryotic chromosomes evolution. *Science* (80-) 301:793–797. doi: 10.1126/science.1086132
- Eickbush TH, Eickbush DG (2007) Finely orchestrated movements: Evolution of the ribosomal RNA genes. *Genetics* 175:477–485. doi: 10.1534/genetics.107.071399
- Ferree PM, Barbash DA (2009) Species-specific heterochromatin prevents mitotic chromosome segregation to cause hybrid lethality in *Drosophila*. *PLoS Biol.* doi: 10.1371/journal.pbio.1000234
- Fischer G, James S, Roberts I, et al (2000) Chromosomal evolution in *Saccharomyces*. *Nature* 25:451–4.
- Goll LG, Matiello RR, Artoni RF, et al (2015) High-Resolution physical chromosome mapping of multigene families in *Lagria villosa* (Tenebrionidae): Occurrence of interspersed ribosomal genes in Coleoptera. *Cytogenet Genome Res* 146:64–70. doi: 10.1159/000382047
- Henikoff S, Ahmad K, Malik HS (2001) The centromere paradox: Stable inheritance with rapidly evolving DNA. *Science* (80-) 293:1098–1102. doi: 10.1126/science.1062939
- Hirai H, Yamamoto MT, Taylor RW, Imai HT (1996) Genomic dispersion of 28S rDNA during karyotypic evolution in the ant genus *Myrmecia* (Formicidae). *Chromosoma* 105:190–196. doi: 10.1007/s004120050174
- Jo S-H, Koo D-H, Kim JF, et al (2009) Evolution of ribosomal DNA-derived satellite repeat in tomato genome. *BMC Plant Biol* 9:1–14. doi: 10.1186/1471-2229-9-42
- Juan C, Pons J, Petitpierre E (1993) Localization of tandemly repeated DNA sequences in beetle chromosomes by fluorescent in situ hybridization.

- Chromosom Res 1:167–74.
- Junier T, Pagni M (2000) Dotlet: diagonal plots in a web browser. *Bioinformatics* 16:178–179. doi: 10.1093/bioinformatics/16.2.178
- Kim YB, Oh JH, Mclver LJ, et al (2014) Divergence of *Drosophila melanogaster* repeatomes in response to a sharp microclimate contrast in Evolution Canyon, Israel. *Proc Natl Acad Sci* 111:10630–10635. doi: 10.1073/pnas.1410372111
- Lindholm AK, Dyer KA, Firman RC, et al (2016) The ecology and evolutionary dynamics of meiotic drive. *Trends Ecol Evol* 31:315–326. doi: 10.1016/j.tree.2016.02.001
- Long EO, Dawid IB (1980) Repeated genes in eukaryotes. *Annu Rev Biochem* 49:727–764.
- Lopes AT, Fernandes FR, Schneider MC (2017) Chromosome mapping of 28S ribosomal genes in 11 species of Cassidinae (Coleoptera: Chrysomelidae). *Eur J Entomol* 114:546–553. doi: 10.14411/eje.2017.069
- Lorite P, Carrillo JA, Garnería I, et al (2002) Satellite DNA in the elm leaf beetle, *Xanthogaleruca luteola* (Coleoptera, Chrysomelidae): characterization, interpopulation analysis, and chromosome location. *Cytogenet Genome Res* 98:302–307. doi: 10.1159/000071053
- Lorite P, Palomeque T, Garnería I, Petitpierre E (2001) Characterization and chromosome location of satellite DNA in the leaf beetle *Chrysolina americana* (Coleoptera, Chrysomelidae). *Genetics* 110:143–150.
- Lorite P, Torres MI, Palomeque T (2013) Characterization of two unrelated satellite DNA families in the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera, Chrysomelidae). *Bull Entomol Res* 103:538–546. doi: 10.1017/S0007485313000060
- Macas J, Navrátilová A, Mészáros T (2003) Sequence subfamilies of satellite repeats related to rDNA intergenic spacer are differentially amplified on *Vicia sativa* chromosomes. *Chromosoma* 112:152–158. doi: 10.1007/s00412-003-0255-3
- Mesa A, Fontanetti CS (1984) Multiple Sex-Chromosomes, autosomal polymorphism and a high number of S chromosomes in *Euchroma gigantea* L 1735 (Coleoptera, Buprestidae). *Rev. Bras. Genet.* 7:629–637.
- Mora P, Vela J, Ruiz-Mena A, et al (2017) Characterization and transcriptional

- analysis of a subtelomeric satellite DNA family in the ladybird beetle *Henosepilachna argus* (Coleoptera: Coccinellidae). *Eur J Entomol* 114:481–487. doi: 10.14411/eje.2017.028
- Moura R de C, Melo NF, Souza MJ (2008) High levels of chromosomal differentiation in *Euchroma gigantea* L. 1735 (Coleoptera, Buprestidae). *Genet Mol Biol* 31:431–437. doi: 10.1590/S1415-47572008000300007
- Mravinac B, Plohl M (2010) Parallelism in evolution of highly repetitive DNAs in sibling species. *Mol Biol Evol* 27:1857–67. doi: 10.1093/molbev/msq068
- Nei M, Rooney AP (2005) Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. *Annu Rev Genet* 39:121–152. doi: 10.1002/nbm.3066.Non-invasive
- Nguyen P, Sahara K, Yoshido A, Marec F (2010) Evolutionary dynamics of rDNA clusters on chromosomes of moths and butterflies (Lepidoptera). *Genetica* 138:343–354. doi: 10.1007/s10709-009-9424-5
- Novák P, Neumann P, Pech J, et al (2013) RepeatExplorer: A Galaxy-based web server for genome-wide characterization of eukaryotic repetitive elements from next-generation sequence reads. *Bioinformatics* 29:792–793. doi: 10.1093/bioinformatics/btt054
- Paço A, Adegá F, Meštrović N, et al (2015) The puzzling character of repetitive DNA in *Phodopus* genomes (Cricetidae, Rodentia). *Chromosom Res* 23:427–440. doi: 10.1007/s10577-015-9481-9
- Pavlek M, Gelfand Y, Plohl M, Meštrović N (2015) Genome-wide analysis of tandem repeats in *Tribolium castaneum* genome reveals abundant and highly dynamic tandem repeat families with satellite DNA features in euchromatic chromosomal arms. *DNA Res* 22:387–401. doi: 10.1093/dnares/dsv021
- Pinkel D, Straume T, Gray JW (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci* 83:2934–2938.
- Pita S, Lorite P, Nattero J, et al (2016) New arrangements on several species subcomplexes of *Triatoma* genus based on the chromosomal position of ribosomal genes (Hemiptera - Triatominae). *Infect Genet Evol* 43:225–231.
- Plohl M, Meštrović N, Mravinac B (2012) Satellite DNA Evolution. In: Garrido-Ramos MA (ed) *Repetitive DNA*. Karger, Basel, pp 126–152

- Rousselet J, Monti L, Auger-Rozenberg M a, et al (2000) Chromosome fission associated with growth of ribosomal DNA in *Neodiprion abietis* (Hymenoptera: Diprionidae). *Proc Biol Sci* 267:1819–23. doi: 10.1098/rspb.2000.1216
- Sambrook J, Russel DW (2001) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Third Edit. Cold Spring Harbor, New York
- Sawamura K (2012) Chromatin evolution and molecular drive in speciation. *Int J Evol Biol* 2012:1–9. doi: 10.1155/2012/301894
- Schneider MC, Rosa SP, Almeida MC, et al (2007) Chromosomal similarities and differences among four Neotropical Elateridae (Conoderini and Pyrophorini) and other related species, with comments on the NOR patterns in Coleoptera. *J Zool Syst Evol Res* 45:308–316.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al (2013) MEGA6 : Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30:2725–2729. doi: 10.1093/molbev/mst197
- Ugarković D, Durajlija S, Plohl M (1996a) Evolution of *Tribolium madens* (Insecta , Coleoptera) satellite DNA through DNA inversion and insertion. *J Mol Evol* 42:350–358.
- Ugarković D, Podnar M, Plohl M (1996b) Satellite DNA of the red flour beetle *Tribolium castaneum*-comparative study of satellites from the genus *Tribolium*. *Mol Biol Evol* 13:1059–66.
- Xavier C, Soares RVS, Amorim IC, et al (2018) Insights into the karyotypic evolution and speciation of the beetle *Euchroma gigantea* (Coleoptera: Buprestidae). *Chromosom Res* 1–16.

Egig2



Egig3

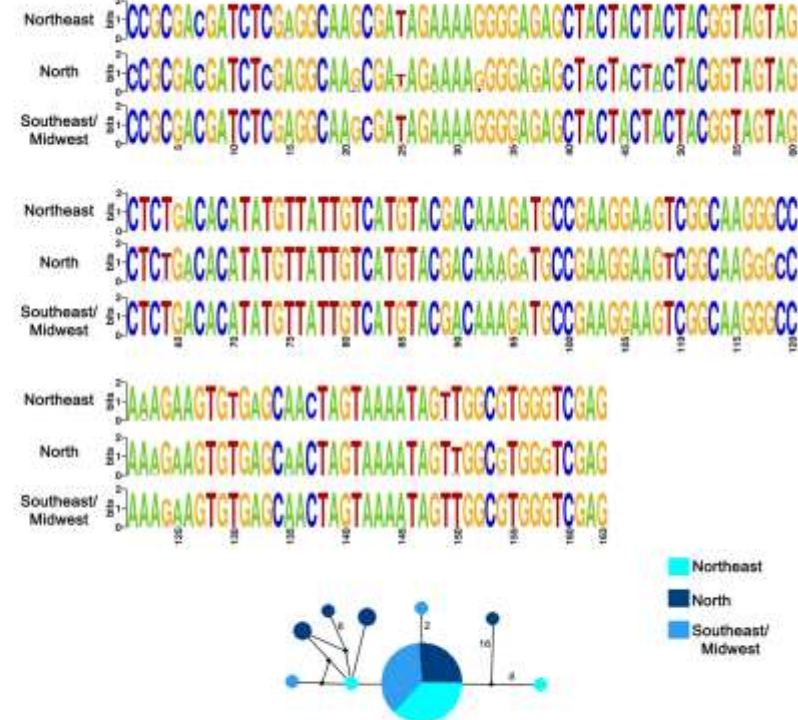


Fig 1. Egig2 and Egig3 sequence logos (upper) and haplotype networks (bottom). In the logos each line represents sequence variation in lineages Northeast, North and Southeast/Midwest. In nodes with more than one mutation between haplotypes, the number of steps are indicated. Small black circles correspond to unsampled haplotypes and circles are proportional to the haplotypes frequencies.

Table 1. Chromosomal data of *Euchroma gigantea* analyzed individuals per sampling site. Note: “-” identify individuals with no result to Egig2/Egig3 probes.

Localities	Nº of individuals	Karyotypes	B chromosome	rDNA Sites	Egig2/Egig3
Distrito	1	$2n = 22, X_1Y_1X_2Y_2X_3Y_3X_4Y_4$	0	2	2
	2	$2n = 22, X_1Y_1X_2Y_2X_3Y_3$	0	2	4
	1	$2n = 22, X_1Y_1X_2Y_2X_3$	0	2	-
Ribeirão Preto	2	$2n = 26, X_1Y_1X_2Y_2X_3Y_3$	10/ 21	2	2
Belém - PA	2	$2n = 32, X_1Y_1X_2Y_2X_3Y_3$	3/ 4	4/6	4/-
Recife - PE	2	$2n = 34, X_1Y_1X_2Y_2X_3Y_3$	2, 5	2	2
	1	$2n = 36, X_1Y_1X_2Y_2X_3Y_3$	3	2	-
Maceió - AL	3	$2n = 35, X_1Y_1X_2Y_2X_3$	3/ 3/ 6	2/ 3/ 4	-/-/4

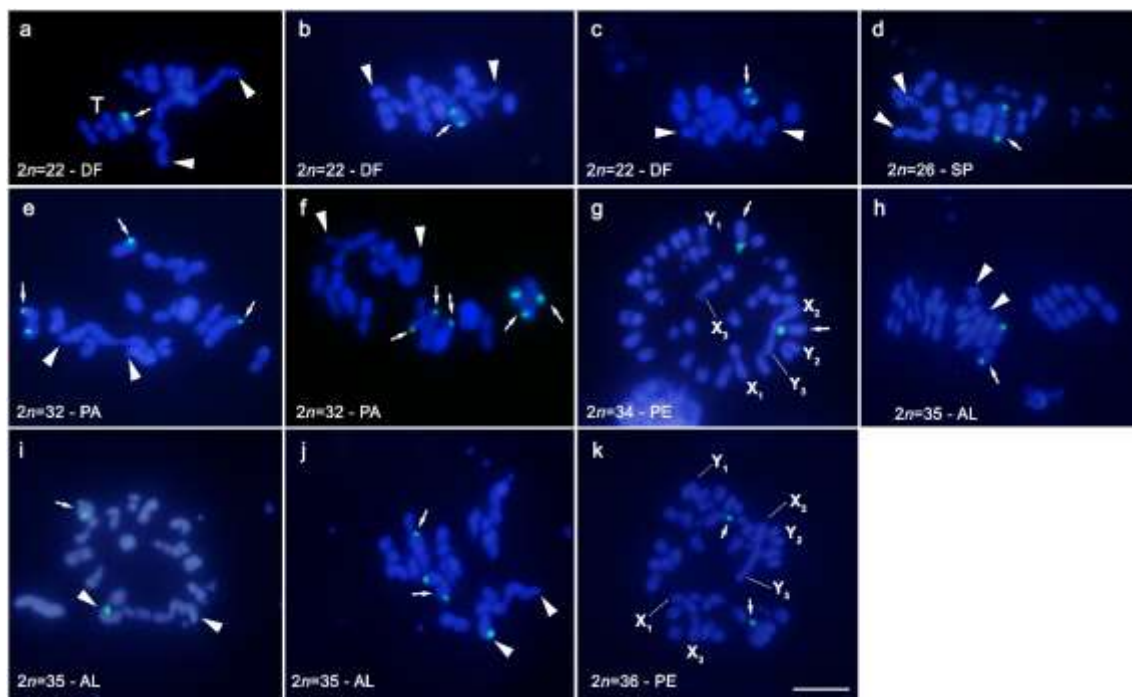


Fig 2. Fluorescence *in situ* hybridization with 18S rDNA probe on meiotic (a-f, h-j) and mitotic (g,k) cells of *Euchroma gigantea*. The arrows indicate 18S rDNA sites and arrowheads indicate the ends of sex chromosome chain with five (a, h-j), six (b, d-f) or eight chromosomes (c). Note in (a) the presence of an autosomal trivalent – T. See the dot B chromosomes in (d, g-k). The diploid numbers and location of sampling are indicated in each image. Bar = 10µm

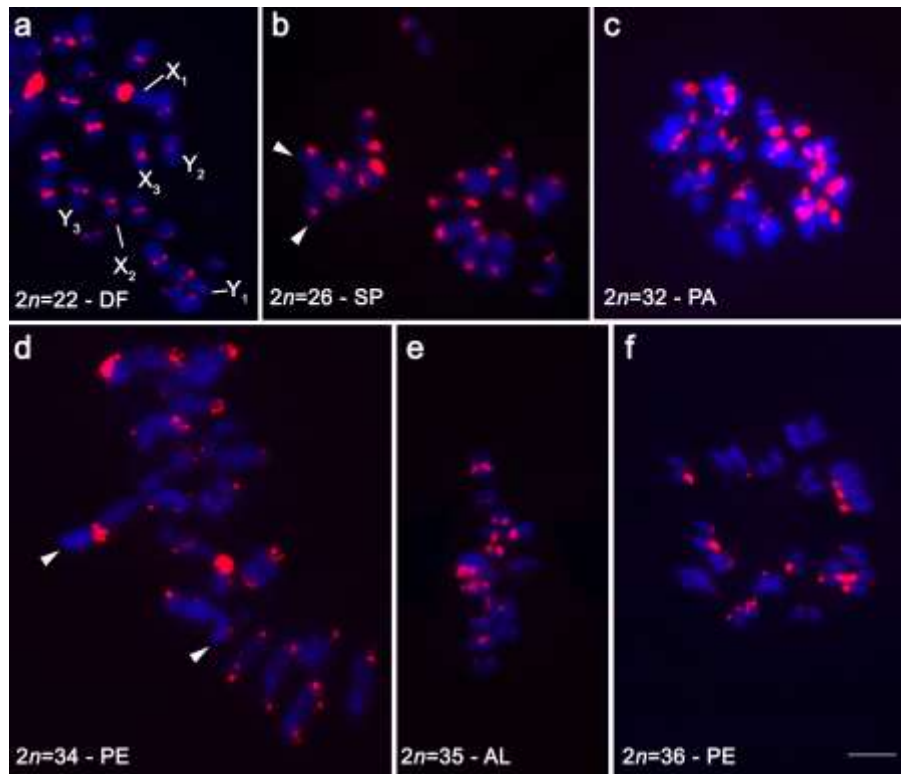


Fig 3. FISH mapping of Egig1 in spermatogonial metaphases (a, c), metaphases I (b, d) and metaphases II (e, f) of *Euchroma gigantea*. Note the location of signals in pericentromeric regions of all chromosomes independent of diploid number. The diploid numbers and location of sampling are indicated directly in each cell. Bar: 5 μ m.

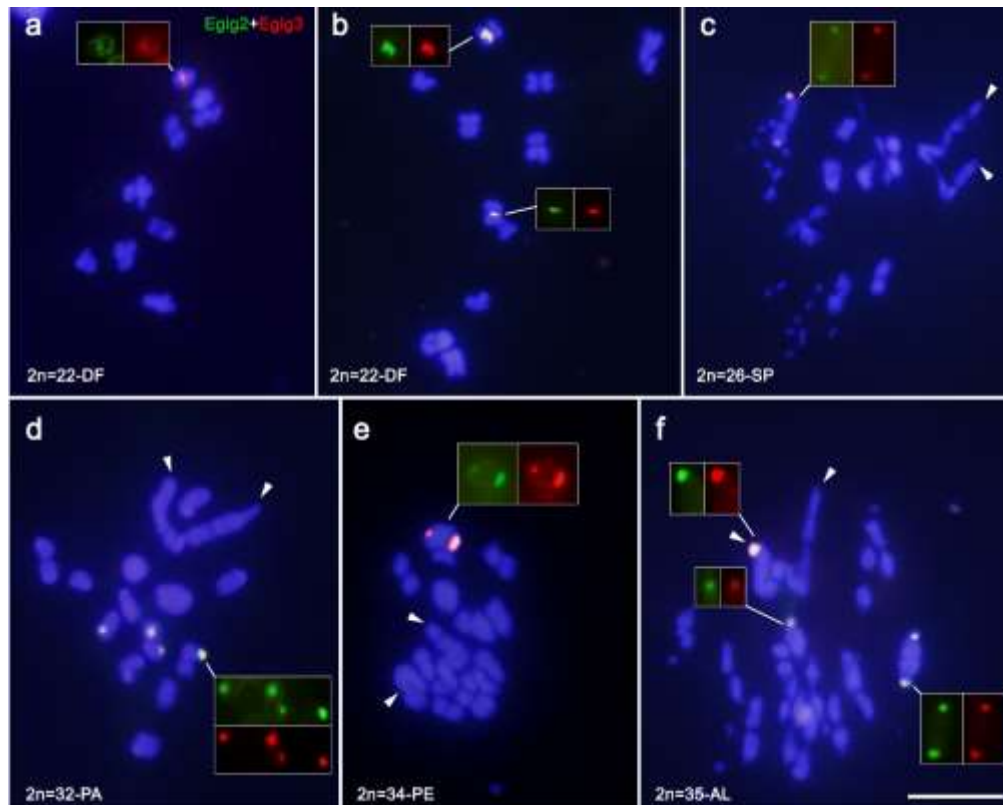


Fig. 4 Meiotic cells in metaphases II (a, b) and metaphases I (c-f) of *Euchroma gigantea* probed for Egig2 (green) and Egig3 (red) through FISH. Inserts show separated signals. The diploid numbers and location of sampling are indicated directly in each image. Bar = 10μm

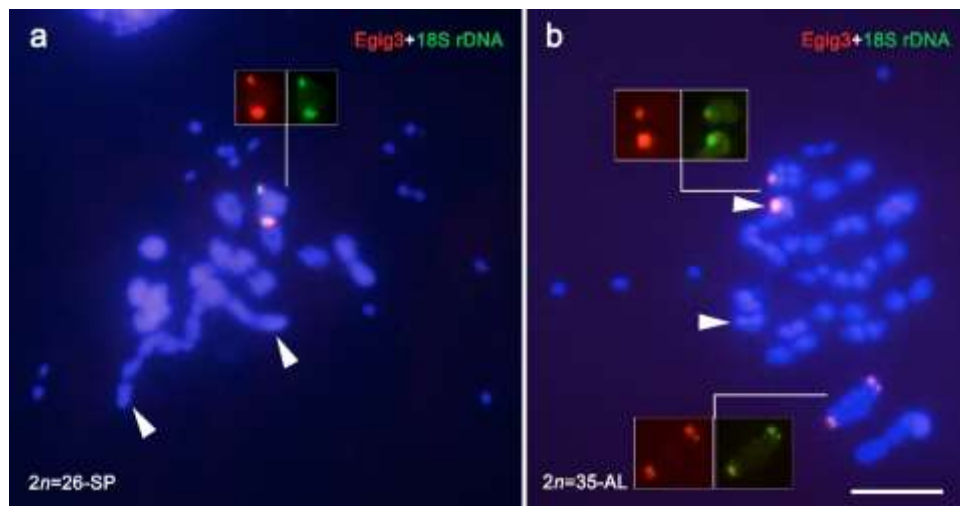


Fig. 5 Chromosomal mapping through FISH of Egig3 and 18S rDNA in *Euchroma gigantea* metaphases I showing the co-location of both sequences. Inserts show the signals separately. Bar 10 μm

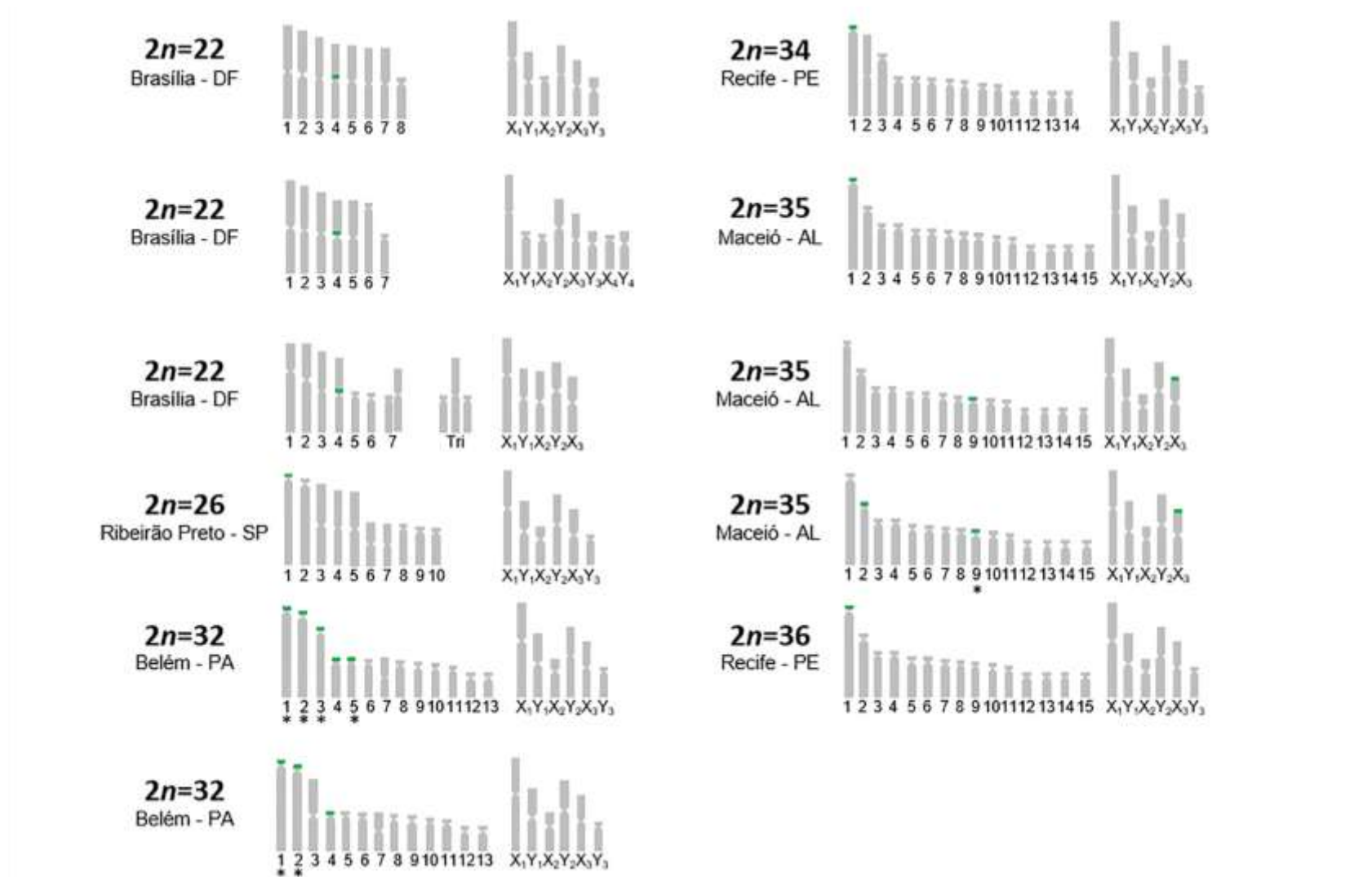


Fig S1. Idiograms showing results of FISH with rDNA probe. The asterisks (*) identify heteromorphous pairs.

5 MITOGENOMA DE *EUCHROMA GIGANTEA* (COLEOPTERA: BUPRESTIDAE) REVELA REDUÇÃO DO GENE *COII*, SEQUÊNCIA NÃO CODIFICANTE E DUPLICAÇÃO DE GENES DE RNAT

Crislaine Xavier¹; Igor Costa Amorim¹; Diogo Cavalcanti Cabral-de-Mello²; Gabriel da Luz Wallau³; Rita de Cássia de Moura¹

¹Universidade de Pernambuco (UPE), Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Biodiversidade e Genética de Insetos, Recife, Pernambuco, Brasil

²Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Departamento de Biologia, Rio Claro, São Paulo, Brasil

³Departamento de Entomologia, Instituto Aggeu Magalhães - FIOCRUZ-IAM, Recife, Pernambuco, Brasil

*Rita de Cássia de Moura

Universidade de Pernambuco (UPE), Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Biodiversidade e Genética de Insetos, Recife, Pernambuco, Brasil

E-mail: ritamoura.upe@gmail.com

Este manuscrito será submetido à revista: Mitochondrial DNA part A

Fator de impacto: 3.350

Resumo

Euchoma é um gênero considerado monoespecífico para *E. gigantea*, apesar de apresentar polimorfismos morfológicos ao longo de sua ocorrência na região Neotropical. Além disso, *E. gigantea* possui três linhagens cromossomicamente polimórficas descritas no Brasil. Neste trabalho, o mitogenoma de *E. gigantea* foi montado e analisado quanto a sua estrutura. O mitogenoma apresentou a redução do gene COII e uma região altamente variável entre os genes *RNA^tAsp* e *ATP8*, apesar de possuir uma estrutura típica do genoma mitocondrial animal. A análise dessa região entre indivíduos das três linhagens da espécie evidenciou a ocorrência de três padrões de organização nesta região, a qual apresentou uma sequência não codificante e a duplicação do gene *RNA^tAsp* ou genes putativos de *RNA^tAsn* ou *RNA^tTyr*. A análise filogenética realizada utilizando mitogenomas de espécies da ordem Coleoptera revelou a estreita relação de *E. gigantea* com uma espécie da subfamília Chrysochroinae. Os resultados deste trabalho demonstram que o mitogenoma de *E. gigantea* possui um considerável nível de variação intraespecífico e apresenta características que podem ser consideradas sinapomorfias no gênero.

Palavras-chave: besouro joia, buprestídeo gigante, polimorfismo, linhagens mitocondriais, rearranjo molecular.

Introdução

O genoma mitocondrial apresenta particularidades em relação ao nuclear. Em animais, por exemplo, a sua herança é predominantemente uniparental (materna), o tamanho é relativamente pequeno (~16kb), apresenta baixa taxa de recombinação e alta taxa de mutação (Wolstenholme 1992; Boore 1999). Na maioria dos animais, incluindo os insetos, este genoma é composto por uma região não codificante, 13 genes codificantes de proteínas, dois genes de RNA ribossomal e 22 genes codificantes de RNA transportador (Boore 1999; Ladoukakis & Zouros 2017). Com raras exceções, além da região não codificante que contém os elementos controladores da replicação e transcrição, regiões não codificantes são curtas e pouco frequentes no mitogenoma (Ladoukakis & Zouros 2017).

Em algumas espécies de animais o mitogenoma varia deste padrão, sendo observadas perdas de genes de RNAt (Song et al. 2010; Nan et al. 2016; Tang et al. 2017), duplicações gênicas (Liu et al. 2017) e fragmentação do mitogenoma em duas ou mais moléculas de DNA circular ou linear (Smith et al. 2011; Shao et al. 2012; Wei et al. 2012). Esses mitogenomas multipartidos variam de dois até 20 minicromossomos em espécies de piolho (Shao et al. 2012; Wei et al. 2012). Em Coleoptera, grande parte das espécies com mitogenoma caracterizado mantém o arranjo proposto como ancestral para insetos, o qual inclui 13 genes codificantes de proteínas, 22 genes de RNAt e dois genes de RNA ribossomal (Timmermans & Vogler 2012; Song et al. 2017).

Nos besouros da família Buprestidae, o sequenciamento de porções de genes mitocondriais têm sido úteis em estudos de identificação molecular de espécies (Wu et al. 2017), análises filogenéticas (Evans et al. 2015) e estudos populacionais (Lopez et al. 2014). Entretanto, apenas oito espécies desta família tiveram a descrição parcial (*Antaxia* sp., *Agrilus* sp., *A. bigutatus*, *Acmaeodera* sp., *Perotis lugubris*) ou completa (*Acmaeodera* sp., *Agrilus planipennis*, *Chrysochroa fulgidíssima*) do seu mitogenoma (Hong et al. 2009; Timmermans et al. 2015; Duan et al. 2017). Nestes mitogenomas, a quantidade, orientação e ordem dos genes mostroaram-se idênticas ao observado em outros insetos (Hong et al. 2009; Timmermans et al. 2015), exceto o mitogenoma do buprestídeo *Chrysochroa fulgidíssima* que apresentou sequências similares aos genes de RNAt^{Leu} e RNAt^{Asn} na região controle (Hong et al. 2009). Estas sequências

possuem o anticódon e o potencial de gerar estruturas secundárias, porém, a divergência de 50-58% dos genes originais e a presença de muitos *mismatches* nas regiões do anticódon e aminoacil, põem em questão a funcionalidade dessas sequências (Hong et al. 2009).

Euchroma é um gênero de Buprestidae considerado monoespecífico para *E. gigantea* e com descrição de quatro subespécies com variações morfológicas ao longo da sua distribuição (Blackwelder 1944; Bellamy 2008). Análises citogenéticas revelaram polimorfismos cariotípicos entre indivíduos de seis diferentes populações do Brasil. Foram descritos cariótipos com $2n = 22, 24, 26, 28, 32, 33, 34, 35$ e 36 , todos apresentando mecanismo de determinação sexual múltiplo com cinco, seis ou oito cromossomos e dois tipos de cromossomos B, os quais foram ausentes apenas em espécimes oriundos de uma das localidades (Mesa & Fontanetti 1984; Moura et al. 2008; Xavier et al. 2018).

Análises filogenéticas utilizando um fragmento de 751 pb do gene da subunidade I da Citocromo oxidase de *E. gigantea* revelou a ocorrência de três linhagens no Brasil (Xavier et al. 2018). Além da incerteza taxonômica a nível específico, existem ainda divergências sobre a posição de *E. gigantea* dentro das subfamílias de Buprestidae, pois apesar de ser atualmente classificada na subfamília Chrysochroinae (Bellamy 2003), em um estudo filogenético molecular esta espécie formou um subclado inesperado dentro de um clado que agrupa tanto espécies das subfamílias Chrysochroinae e Buprestinae (Evans et al. 2015).

As incertezas taxonômicas da espécie *E. gigantea*, além do seu alto polimorfismo morfológico e cromossômico incitam o interesse na realização de estudos sobre a sua diversificação e tornam esta espécie um interessante modelo para estudos evolutivos. Neste trabalho, foi realizada a montagem do genoma mitocondrial de *E. gigantea*, a fim de utilizar estas sequências em análises que contribuam para o entendimento da diversificação da espécie e para posicionar filogeneticamente o gênero *Euchroma* em relação a espécies de diferentes gêneros da infraordem Elateriformia.

Material e métodos

Amostras

Os espécimes de *Euchroma gigantea* analisados neste trabalho foram coletados em áreas urbanas do Distrito Federal e de quatro estados brasileiros

(Alagoas, Pará, Pernambuco e São Paulo). Estes indivíduos foram previamente cariotipados por Xavier et al. (2018) (Tabela 1). Os espécimes foram depositados na coleção científica do Laboratório de Biodiversidade e Genética de Insetos da Universidade de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

Extração de DNA e sequenciamento de nova geração

O DNA total dos espécimes foi obtido do tecido muscular das pernas. A extração foi realizada seguindo método fenol-clorofórmio (Sambrook & Russel 2001). As amostras foram analisadas em gel de agarose 1% para verificação da integridade do DNA obtido.

O sequenciamento de nova geração do DNA genômico de um indivíduo com $2n=34$, $X_1Y_1X_2Y_2X_3Y_3$ oriundo da população de Recife, Pernambuco (CII8) foi realizado em plataforma Illumina Hiseq 2000 (*paired-ends* e *reads* 2x100). Todo o procedimento foi realizado pela empresa Macrogen, Seoul Korea.

Montagem e análise do genoma

Os *reads* obtidos do sequenciamento foram filtrados por qualidade usando o *software* Trimmomatic (Bolger et al. 2014) e montados utilizando o pacote MITObim (Hahn et al. 2013). Para a montagem do genoma mitocondrial de *E. gigantea* duas estratégias foram realizadas: (1) utilizando como *seed* o mitogenoma da espécie *Melanotus* sp (Coleoptera: Elateridae) (KT8769041.1) e a outra (2) utilizando um fragmento de 150 pb do gene da subunidade II da Citocromo oxidase identificado no mitogenoma de *E. gigantea* a partir da primeira estratégia. A caracterização das sequências e a anotação do genoma foram realizadas no *web server* MITOS (Bernt et al. 2013) e *software* UGENE (Okonechnikov et al. 2012), respectivamente. O código genético mitocondrial de invertebrados foi utilizado como padrão. A ordem e tamanhos dos genes nas duas montagens foram comparados. Os *reads* foram mapeados utilizando o programa Bowtie2 (Langmead & Salzberg 2012) e o mapa do mitogenoma foi gerado utilizando o pacote de programas *BRIG software* (Alikhan et al. 2011).

Análise da região RNAt^{Asp} – ATP8 por reação em cadeia da polimerase (PCR)

Após as duas montagens, divergências relacionadas ao comprimento do COII foram observadas. Além disso, a identificação de uma região não codificante

após o gene *RNA^tAsp* e a duplicação deste gene, fizeram com que esta região fosse estudada com maior detalhamento. Dessa forma, foram desenhados os seguintes *primers* para o isolamento de um fragmento entre o gene *COII* e qualquer uma das cópias do gene *RNA^tAsp*: L2-COII F
 5'TGGCAGAATAGTGCAATGGA e D-COII R
 5'GGACATTTCTCGGCTTCTT. As sequências foram amplificadas em reações de PCR de 50 µL, contendo tampão de *Taq* polimerase 1x, 1,5 mM MgCl₂, 0,02 mM de dNTP, 0,4 µM de cada primer e 0,1 U de *Taq* DNA polimerase recombinante (Invitrogen). O programa de PCR foi realizado da seguinte forma: uma desnaturação inicial de 5 min a 94 °C, e 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 30 s a 55 °C e 1 min 72 °C, com uma extensão final de 5 min a 72 °C. Os produtos amplificados foram purificados (ExoSAP-IT - Affymetrix/USB) e sequenciados pela Macrogen, Seoul Korea (ABI3730XL (ABI, CA, USA)).

As sequências foram analisadas no software Pregap4 do pacote STADEN (Bonfield et al. 1995) e foram caracterizadas usando o *web server* MITOS (Bernt et al. 2013) com a configuração padrão e código genético mitocondrial de invertebrados. As sequências nucleotídicas e de aminoácidos foram alinhadas utilizando o servidor MAFFT (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>).

Análise filogenética

Na análise filogenética foram utilizadas as sequências nucleotídicas e de aminoácidos dos genomas mitocondriais completos ou parcialmente completos de 46 espécies da infraordem Elateriformia, depositadas no National Center for Biotechnology Information (NCBI). As sequências do DNAm_t de quatro espécies de *Scirtiformia* disponíveis no GenBank foram utilizadas como grupo externo. O alinhamento das sequências foi realizado no servidor MAFFT (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>).

A árvore filogenética foi construída a partir de inferência Bayesiana no programa Mr Bayes 3.2 (Ronquist et al. 2012) disponível no servidor CIPRES (Miller et al. 2010), e de máxima verossimilhança no servidor PhyML 3.0 (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>). Nessas filogenias foram utilizados os modelos de substituição GTR+I+G para sequências nucleotídicas e MtREV+I+G para as sequências de aminoácidos. Esses modelos foram selecionados pelo critério Akaike (AIC) implementado no JModelTest (Posada 2008) e ProtTest

(Abascal et al. 2005). Na análise por máxima verossimilhança foi utilizada a estatística aLRT para avaliar o suporte de ramos. Na análise Bayesiana, quatro MCMCs (Markov chain Monte Carlo) foram executadas com 10.000.000 gerações, amostragem a cada 1.000 gerações e um descarte de 20% das cadeias. Nesse último caso, o suporte de ramos foi avaliado pela probabilidade posterior das árvores amostradas remanescentes. A árvore foi visualizada e personalizada no Figtree v. 1.4.0 (Rambaut 2009).

Resultados

*Caracterização do genoma mitocondrial de *Euchroma gigantea**

O DNA mitocondrial completo de *E. gigantea* nas duas montagens foi similar. Na estratégia 1, o genoma apresentou 17701 pb, sendo 3032pb destes correspondentes à região controle. Na estratégia 2, o genoma total apresentou 16294 pb, sendo 1200 pb correspondentes a região controle. Nestas duas montagens houve diferenças quanto à região do gene COII. Na primeira montagem este gene apresentou 150 pb mais um espaçador intergênico de 65 pb, enquanto na segunda montagem os comprimentos foram de 618 pb e 22 pb, respectivamente. Considerando que o tamanho do gene COII com 618 pb foi confirmado, a região codificante do mitogenoma de *E. gigantea* abrange 15094 pb (Figura 1, Tabela S1) com conteúdo A+T de 65,5%. Um total de 128440 reads foram mapeados, alcançando uma média de profundidade de sequenciamento de 722 vezes (X) e máxima cobertura de 2302 X.

O mitogenoma de *E. gigantea* contém 13 genes codificantes de proteínas [Subunidades 1-6 e 4I da NADH desidrogenase (ND1-6, 4L), Subunidades I, II, e III da citocromo oxidase (COI, COII, COIII), subunidades 6 e 8 da enzima ATP sintase (ATP6 e ATP8) e Citocromo b (CYTB)], 22 genes de RNA transportador (RNAt) e dois genes de RNA ribossomal (rRNA) (Figura 1 e S1). O gene da subunidade II da citocromo oxidase apresentou divergências entre as duas montagens realizadas. Na primeira, o seu tamanho foi de apenas 150 pb e 50 aminoácidos, e na segunda montagem o COII apresentou 618 pb, correspondente a 206 aminoácidos (Figuras S2 e S3). Além disso, nas duas montagens, após o gene *RNAt^{Asp}* foi identificada uma região não codificante de 370 pb seguida da duplicação do gene *RNAt^{Asp}* (Figura 1), o qual apesar de ter sofrido mutações,

manteve seu anticódon e o potencial de formar a estrutura secundária similar (Figura S1).

Análise da região variável do mitogenoma de E gigantea

Os fragmentos amplificados nas 15 amostras apresentaram tamanhos entre 859 pb e 1108 pb, com média de 902 pb. Foi possível identificar em todos os fragmentos: parte do gene *RNA^tL²* e os genes completos de *COII*, *RNA^tLys* e *RNA^tAsp*. O tamanho de 618 pb para o gene *COII* foi confirmado para todos os espécimes testados. Além disso, foram identificados três diferentes padrões de organização para a região entre o gene *RNA^tAsp* e o *ATP8* (Figura 3). Estes padrões foram identificados nas amostras CII08 de Recife-PE (Tipo I) através da montagem do genoma, e nas amostras CII04 (Tipo II) e CII06 (tipo III) de Belém-PA através dos fragmentos amplificados por PCR.

Na amostra CII8, o gene *RNA^tAsp* foi duplicado dando origem a *RNA^tAsp²*, enquanto em CII04, a sequência duplicada do gene *RNA^tAsp* sofreu mutações dando origem a um gene putativo *RNA^tAsn²*. No fragmento da amostra CII06, foi identificado um gene putativo *RNA^tTyr²* (Figuras 2 e 3). Para as demais amostras não foi possível analisar a região após o gene *RNA^tAsp*. As sequências do gene *RNA^tAsp* de todas as amostras foram comparadas entre si sendo observadas variações nucleotídicas e de tamanho (Figura 3). Além disso, a sequência do gene *RNA^tAsp* foi comparada com suas variantes (Figura 4), denominadas de *RNA^tAsp²* e *RNA^tAsn²*, sendo observado que as distâncias *p* entre essas sequências variou de 6 a 15% (Tabela 3).

Análises filogenéticas

As árvores filogenéticas de inferência bayesiana e máxima verossimilhança apresentaram topologias similares. Os resultados para as duas análises com as sequências nucleotídicas estão resumidos na figura 5 e os resultados para as análises com aminoácidos estão resumidos na figura 6. Em ambas as árvores foi observada a monofilia de Elateriformia e o agrupamento das espécies em suas respectivas superfamílias. As espécies representantes de todas as famílias foram corretamente agrupadas, exceto Elateridae e Omethidae. *Euchroma gigantea* foi agrupada com as espécies de Buprestoidea, apresentando estreita relação com a espécie *Chrysochroa fulgidissima* (Chrysochroinae).

Discussão

Euchroma gigantea apresentou um mitogenoma com características incomuns em Coleoptera e insetos em geral. O gene *COII* apresentou 618 pb correspondente a 206 aminoácidos, quando o esperado para esta sequência em insetos é entre 226-229 aminoácidos (Liu & Beckenbach 1992). Além disso, uma região polimórfica entre os genes *RNA^tAsp* e *ATP8* foi identificada. Apesar desta variação, o tamanho do mitogenoma de *E. gigantea*, bem como a estrutura condizem com o observado para animais, especialmente representantes de Coleoptera, nos quais a região codificante, que compreende os 37 genes mitocondriais, é relativamente estável e possui cerca de 14700 pb (Sheffield et al. 2009; Cameron 2014).

O gene *COII* com 618 pb, identificado em todos os indivíduos das diferentes populações testadas pode indicar uma sinapomorfia do gênero *Euchroma*. A sequência possui uma redução de pelo menos 20 aminoácidos da sequência proteica deste gene em relação à maioria dos insetos (Liu & Beckenbach 1992), sendo 16 aminoácidos ausentes na região N terminal e 4, na extremidade C terminal. No entanto, algumas características foram conservadas. O códon iniciador ATA, foi previamente identificado como variante ao ATG em Coleoptera e duas regiões conservadas em insetos ao nível de aminoácido foram encontradas no *COII* de *Euchroma*. A primeira (I), que é envolvida no sistema de transferência de elétrons, corresponde as posições 101 a 113. A segunda região (II), entre as posições 193 a 203, inclui um sítio de ligação a cobre (Figura S3) (Liu & Beckenbach 1992). Ademais, sítios conservados entre vertebrados, levedura, milho e insetos incluem histidina (24, 161), ácido glutâmico (62 e 202) e ácido aspártico (88, 139, 158 e 173) (Figura S3) (Liu & Beckenbach 1992). Estas características conservadas indicam que, apesar de sua redução, o gene *COII* no mitogenoma de *E. gigantea* pode não ter perdido sua função.

A sequência espaçadora entre os genes *RNA^tAsp* e *ATP8* observada no mitogenoma de *E. gigantea* é uma característica incomum em Coleoptera. Em geral, em espécies desta ordem apresentam apenas 1 pb entre estes dois genes (Sheffield et al. 2009; Song et al. 2010; Liu et al. 2014; Timmermans et al. 2015; Duan et al. 2017), com exceção da espécie *Chryschoa fulgidissima* (Buprestidae; Chrysochroinae), que apresentou uma sequência de 37 pb entre *RNA^tAsp* e *ATP8*.

(Hong et al. 2009). No mitogenoma de *E. gigantea*, esta região foi mais de 10 vezes maior, sendo uma sequência variável inter e intrapopulacionalmente. Considerando que dois tipos de organização diferentes foram identificados em amostras de indivíduos do Norte (Belém-PA) e um terceiro tipo em uma amostra do Nordeste (Recife-PE), a variação encontrada nesta região do mitogenoma pode representar padrões linhagem-específicos e o potencial de variação desta região ainda pode estar subestimado.

Chrysochroa fulgidissima e *E. gigantea* pertencem à subfamília Chrisochroinae e são as únicas espécies da família Buprestidae com mitogenomas sequenciados que possuem um espaçador intergênico entre *RNA^t_{Asp}* e *ATP8*. Isto sugere que esta região do mitogenoma destas espécies pode estar propensa a ocorrência e manutenção de rearranjos. Isto difere das outras espécies de Buprestidae, nas quais apenas 1 pb separa o gene espaçador *RNA^t_{Asp}* do *ATP8* (Hong et al. 2009; Sheffield et al. 2009; Timmermans et al. 2015). Assim, uma investigação abrangente desta região no mitogenoma de outras espécies de Buprestidae, especialmente da subfamília Chrysochroinae pode fornecer indícios sobre a origem e evolução desta região espaçadora.

Considerando a análise de distância dos genes *RNA^t_{Asp}*, *RNA^t_{Asp2}* e *RNA^t_{Asn2}*, provavelmente a duplicação do gene *RNA^t_{Asp}* ocorreu antes na linhagem Norte e foi dispersa para a linhagem Nordeste. Ao longo do tempo, esta cópia sofreu mutações independentemente nas duas linhagens. Na linhagem Nordeste a sequência deu origem ao gene *RNA^t_{Asp2}*, enquanto na linhagem Norte a sequência acumulou mutações inclusive na região do anticódon, dando origem ao gene *RNA^t_{Asn2}*. Dessa forma, é possível que apesar de *RNA^t_{Asp2}* e *RNA^t_{Asn2}* serem originados de uma mesma sequência, apresentem taxas evolutivas distintas nas linhagens Norte e Nordeste da espécie *E. gigantea*. Por outro lado, visto que aparentemente existe uma predisposição à ocorrência de rearranjos nesta região, estas duplicações podem ter sido originadas a partir de eventos independentes.

Alguns estudos revelaram a duplicação de genes de *RNA^t* em insetos (Lessinger et al. 2004; Beckenbach 2011; Cameron 2014; Amaral et al. 2016). Um dos mecanismos que podem explicar a duplicação desses genes no mitogenoma de *E. gigantea* é o modelo conhecido como *tandem duplication–random loss* (TDRL). Neste modelo uma parte do genoma é duplicada através de replicação

slippage ou recombinação, por exemplo (Beckenbach 2011; Cameron 2014). Uma vez duplicado, a ocorrência de mutações eventualmente torna um dos genes não funcional e então a pressão seletiva tende a eliminar o gene não funcional para redução do tamanho do genoma (Cameron 2014). Por outro lado, *RNA^t_{Tyr2}* não apresentou similaridade significativa com a sequência regular do gene *RNA^t_{Tyr}* e sua origem permanece não identificada. Maiores estudos são necessários para elucidar a origem e funcionalidade destes possíveis genes (*RNA^t_{Asp2}*, *RNA^t_{Asn2}* e *RNA^t_{Tyr2}*) na transferência de seus respectivos aminoácidos.

A sequência de 370 pb identificada no mitogenoma de *E. gigantea* entre os dois genes de *RNA^t_{Asp}* não produziu qualquer resultado significativo no BLAST, não apresentou potencial de gerar estrutura secundária de *RNA^t* e não incluiu ORFs em nenhuma direção, sugerindo que provavelmente esta sequência não é codificante, nem funcional, visto que é dispensável em outras espécies. Embora sequências espaçadoras intergênicas não codificantes tenham sido descritas em vários mitogenomas de insetos, elas são pouco frequentes em espécies de Coleoptera (Sheffield et al. 2009; Amaral et al. 2016). Nesta ordem as sequências intergênicas variam de poucas unidades a centenas de pares de bases e suas origens frequentemente permanecem desconhecidas (Hong et al. 2009; Amaral et al. 2016).

As análises filogenéticas apresentaram o grupamento esperado entre as superfamílias de Elateriformia (Timmermans et al. 2015), bem como a inserção de *E. gigantea* na superfamília Buprestoidea (Bellamy 2008). A estreita relação de *E. gigantea* com *C. fulgidissima*, reflete uma relação esperada entre estas espécies visto que as duas pertencem à subfamília Chrysochroinae (Buprestidae). Estes resultados demonstram que o mitogenoma de *E. gigantea* representa uma informação útil para estabelecer a posição filogenética da espécie.

Considerando a variabilidade da região entre os genes *RNA^t_{Asp}* e *ATP8* em espécimes de *E. gigantea*, bem como o posicionamento da espécie na análise filogenética, o mitogenoma da *E. gigantea* constitui uma importante ferramenta para o estudo da espécie em diferentes níveis taxonômicos. De acordo com o nível taxonômico que se pretende estudar, é possível adequar a utilização de fragmentos gênicos ou do mitogenoma completo, sendo o primeiro muito útil e acessível especialmente em estudos a nível de espécie e o segundo em níveis superiores.

Conclusões

O mitogenoma de *E. gigantea* apresenta singularidades que podem ser consideradas sinapomorfias no gênero, como tamanho reduzido do gene COII e a presença de uma região não codificante entre os genes *RNA^t_{Asp}* e *ATP8*. Esta região, que apresentou três padrões de organização, aparentemente linhagem-específicos, pode ser útil na investigação da diversificação das linhagens anteriormente identificadas em *E. gigantea*. Em um gênero considerado monoespecífico como *Euchroma* que sabidamente possui distintas linhagens, a separação de grupos geneticamente distintos pode direcionar análises de taxonomia alfa. Ademais, o mitogenoma completo desta espécie constitui um importante instrumento para estudos filogenéticos que visem investigar o posicionamento de *E. gigantea* em diferentes níveis taxonômicos.

Referências

- Abascal F, Zardoya R, Posada D. 2005. ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics*. 21:2104–5.
- Alikhan N, Petty N, Ben Zakour N, Beatson S. 2011. BLAST Ring Image Generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons. *BMC Genomics*. 14:402.
- Amaral DT, Mitani Y, Ohmiya Y, Viviani VR. 2016. Organization and comparative analysis of the mitochondrial genomes of bioluminescent Elateroidea (Coleoptera: Polyphaga). [place unknown]: Elsevier B.V. Beckenbach AT. 2011. Mitochondrial genome sequences of representatives of three families of scorpionflies (Order Mecoptera) and evolution in a major duplication of coding sequence. *Genome [Internet]*. 54:368–376.
- Bellamy C. 2003. An illustrated summary of the higher classification of the superfamily Buprestoidea (Coleoptera). *Folia Heyrovskiana*. 10:44.
- Bellamy CL. 2008. A world catalogue and bibliography of the jewel beetles (Coleoptera: Buprestoidea). Sofia-Moscow: Pensoft Publisher.
- Bernt A, Donath F, Jühling F, Externbrink C, Florentz C, Fritsch C, Pütz J, Middendorf M, Stadler P. 2013. MITOS: Improved de novo metazoan

- mitochondrial genome annotation. *Mol Phylogenet Evol.* 69:313–319.
- Blackwelder RE. 1944. Checklist of the coleopterous insects of Mexico, Central America, The West Indies, and South America. *Bull United States Natl Museum.* 185:189–341.
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B. 2014. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 30:2114–2120.
- Bonfield JK, Smith KF, Staden R. 1995. A new DNA sequence assembly program. *Nucleic Acids Res.* 24:4992–4999.
- Boore J. 1999. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res.* 27:1767–80.
- Cameron SL. 2014. Insect mitochondrial genomics: Implications for evolution and phylogeny. *Annu Rev Entomol [Internet].* 59:95–117.
- Duan J, Quan G, Mittapalli O, Cusson M, Krell PJ, Doucet D. 2017. The complete mitogenome of the Emerald Ash Borer (EAB), *Agrilus planipennis* (Insecta: Coleoptera: Buprestidae). *Mitochondrial DNA Part B.* 2:134–135.
- Evans AM, Mckenna DD, Bellamy CL, Farrell BD. 2015. Large-scale molecular phylogeny of metallic wood-boring beetles (Coleoptera: Buprestoidea) provides new insights into relationships and reveals multiple evolutionary origins of the larval leaf-mining habit. *Syst Entomol.* 40:385–400.
- Hahn C, Bachmann L, Chevreu B. 2013. Reconstructing mitochondrial genomes directly from genomic next-generation sequencing reads—a baiting and iterative mapping approach. *Nucleic Acids Res.* 41:E129.
- Hong MY, Jeong HC, Kim MJ, Jeong HU, Lee SH, Kim I. 2009. Complete mitogenome sequence of the jewel beetle, *Chrysochroa fulgidissima* (Coleoptera : Buprestidae). *Mitochondrial DNA.* 20:46–50.
- Ladoukakis ED, Zouros E. 2017. Evolution and inheritance of animal mitochondrial DNA : rules and exceptions. *J Biol Res.* 24:1–7.
- Langmead B, Salzberg S. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods.* 9:357–359.
- Lessinger AC, Junqueira ACM, Conte FF, Azeredo Espin AML. 2004. Analysis of a conserved duplicated tRNA gene in the mitochondrial genome of blowflies. *Gene.* 339:1–6.
- Liu F-F, Li Y-P, Jakovlic I, Yuan X-Q. 2017. Tandem duplication of two tRNA genes in the mitochondrial genome of *Tagiades vajuna* (Lepidoptera: Hesperidae). *Eur J Entomol.* 114:407–415.

- Liu H, Beckenbach AT. 1992. Evolution of the mitochondrial cytochrome oxidase II gene among 10 orders of insects. *Mol Phylogenetics Evol.* 1:41–52.
- Liu Q-N, Bian D-D, Jiang S-H, Li Z-X, Ge B-M, Xuan F-J, Yang L, Li C-F, Zhang D-Z, Zhou C-L, Tang B-P. 2014. The complete mitochondrial genome of the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Mitochondrial DNA [Internet]*. 27:1525–1527.
- Lopez VM, Rugman-Jones PF, Coleman TW, Hoddle MS, Stouthamer R. 2014. Population genetics of goldspotted oak borer, *Agrilus auroguttatus* Schaeffer (Coleoptera: Buprestidae): investigating the origin of an invasive pest of native oaks in California. *Biol Invasions.* 16:2393–2402.
- Mesa A, Fontanetti CS. 1984. Multiple Sex-Chromosomes, autosomal polymorphism and a high number of S chromosomes in *Euchroma gigantea* L 1735 (Coleoptera, Buprestidae). *Rev Bras Genet.* 7:629–637.
- Miller MA, Pfeiffer W, Schwartz T. 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for Inference of Large Phylogenetic Trees. In: *Gatew Comput Environ Work.* [place unknown]; p. 1–8.
- Moura R de C, Melo NF, Souza MJ. 2008. High levels of chromosomal differentiation in *Euchroma gigantea* L. 1735 (Coleoptera, Buprestidae). *Genet Mol Biol.* 31:431–437.
- Nan X, Wei C, He H. 2016. The complete mitogenome of *Eucryptorrhynchus brandti* (Harold) (Insecta: Coleoptera: Curculionidae). *Mitochondrial DNA Part A, DNA mapping, Seq Anal [Internet]*. 27:2060–2061.
- Okonechnikov K, Golosova O, Fursov M, Team U. 2012. Unipro UGENE : a unified bioinformatics toolkit. *Bioinfor.* 28:1166–1167.
- Posada D. 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol.* 25:1253–6.
- Rambaut A. 2009. FigTree version 1.4.2 . Available from: <http://tree.bio.ed.ac.uk>
- Ronquist F, Teslenko M, Van Der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP. 2012. Mrbayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst Biol.* 61:539–542.
- Sambrook J, Russel DW. 2001. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Third Edit. Cold Spring Harbor Laboratory Press, editor. New York: Cold Spring Harbor.

- Shao R, Zhu X, Barker SC, Herd K. 2012. Evolution of extensively fragmented mitochondrial genomes in the lice of humans. *Genome Biol Evol.* 4:1088–1101.
- Sheffield NC, Song H, Cameron SL, Whiting MF. 2009. Nonstationary evolution and compositional heterogeneity in beetle mitochondrial phylogenomics. *Syst Biol.* 58:381–394.
- Smith DR, Kayal E, Yanaguhara AA, Collins AG, Pirro S, Keeling PJ. 2011. First complete mitochondrial genome sequence from a box jellyfish reveals a highly fragmented linear architecture and insights into telomere evolution. *Genome Biol Evol.* 4:52–58.
- Song HJ, Sheffield NC, Cameron SL, Miller KB, Whiting MF. 2010. When phylogenetic assumptions are violated: base compositional heterogeneity and among-site rate variation in beetle mitochondrial phylogenomics. *Syst Entomol.* 35:429–448.
- Song N, Yin X, Zhao X, Chen J, Yin J. 2017. Reconstruction of mitogenomes by NGS and phylogenetic implications for leaf beetles. *Mitochondrial DNA Part A.* 1394:1–10.
- Tang P-A, Zhang L, Li X-P, Li F-F, Yuan M-L. 2017. The complete mitochondrial genome of *Sympiezomias velatus* (Coleoptera: Curculionidae). *Mitochondrial DNA Part B [Internet].* 2:449–450.
- Timmermans MJTN, Barton C, Haran J, Ahrens D, Culverwell CL, Ollikainen A, Dodsworth S, Foster PG, Bocak L, Vogler AP. 2015. Family-level sampling of mitochondrial genomes in Coleoptera: Compositional heterogeneity and phylogenetics. *Genome Biol Evol.* 8:161–175.
- Timmermans MJTN, Vogler AP. 2012. Phylogenetically informative rearrangements in mitochondrial genomes of Coleoptera, and monophyly of aquatic elateriform beetles (Dryopoidea). *Mol Phylogenet Evol.* 63:299–304.
- Wei D, Shao R, Yuan M, Dou W, Barker S, Wang J. 2012. The multipartite mitochondrial genome of *Liposcelis bostrychophila*: insights into the evolution of mitochondrial genomes in bilateral animals. *PLoS One.* 7:e33973.
- Wolstenholme DR. 1992. Genetic novelties in mitochondrial genomes of multicellular animals. *Curr Opin Genet Dev.* 2:918–925.
- Wu Y, Trepanowski NF, Molongoski JJ, Reagel PF, Lingafelter SW, Nadel H, Myers SW, Ray AM. 2017. Identification of wood-boring beetles

- (Cerambycidae and Buprestidae) intercepted in trade- associated solid wood packaging material using DNA barcoding and morphology. Sci Rep. 7:1–12.
- Xavier C, Soares RVS, Amorim IC, Cabral-de-Mello DC, Moura RDC. 2018. Insights into the karyotypic evolution and speciation of the beetle *Euchroma gigantea* (Coleoptera: Buprestidae). Chromosom Res.:1–16.

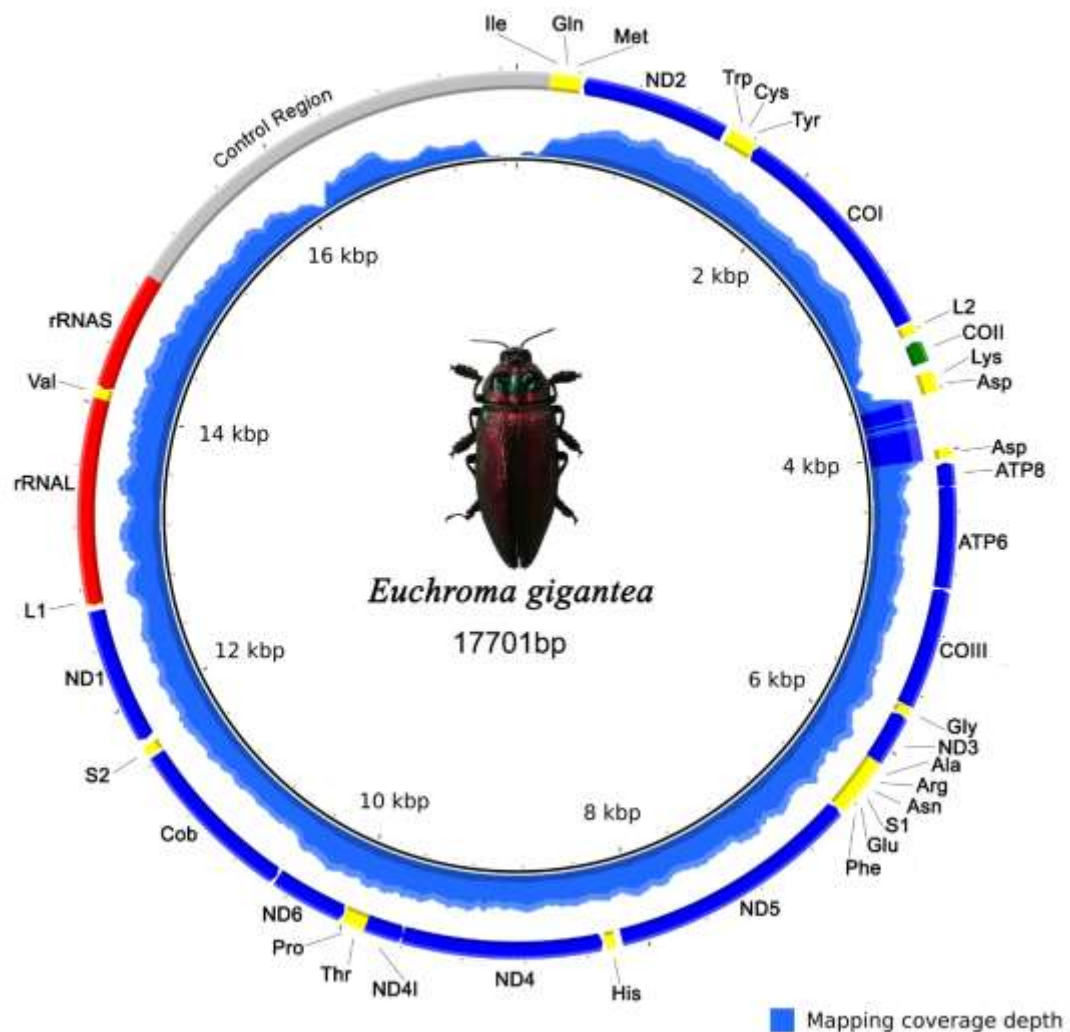


Figura 1. Mapa circular do mitogenoma de *Euchroma gigantea*. Os genes de RNAt estão indicados de acordo com o código de três letras para o aminoácido segundo a IUPAC. Abreviações: *ATP6*, *ATP8*, genes das subunidades 6 e 8 da ATP sintase; *Cob*, gene da citocromo oxidase b; *COI*, *COII*, *COIII*, genes das subunidades 1-3 da citocromo C oxidase; *ND1-6*, *ND4L*, genes das subunidades 1-6 e 4L da NADH desidrogenase; *rRNAL*, *rRNAS*, subunidades do RNA ribossomal. O círculo interno em azul representa a cobertura de *reads* para cada nucleotídeo. Azul mais escuro marca regiões onde a profundidade de sequenciamento foi maior que 1000x. O círculo externo indica as regiões anotadas pelo MITOS com RNAt em amarelo, genes codificantes de proteínas em azul com exceção do *COII* em verde. Os genes de RNAr estão marcados em vermelho e a região controladora em cinza.



Figura 2. Esquema do fragmento entre o gene *RNAt^{L2}* e *ATP8*. Os genes de RNA^t estão indicados de acordo com o código de três letras para o aminoácido segundo a IUPAC. Note o tamanho do gene *COII* conservado (618 pb) e três tipos de organização na região após o gene *RNAt^{Asp}*. No tipo I, uma duplicação do gene *RNAt^{Asp}*, está separada da sua cópia por uma região não codificante de 370 pb; no tipo II, presença de um gene *RNAt^{Asn2}* e uma região não codificante de 171 pb; no tipo III, presença do gene *RNAt^{Tyr}*, no sentido inverso, que se sobrepõem em 1 pb ao gene de *RNAt^{Asp}*.

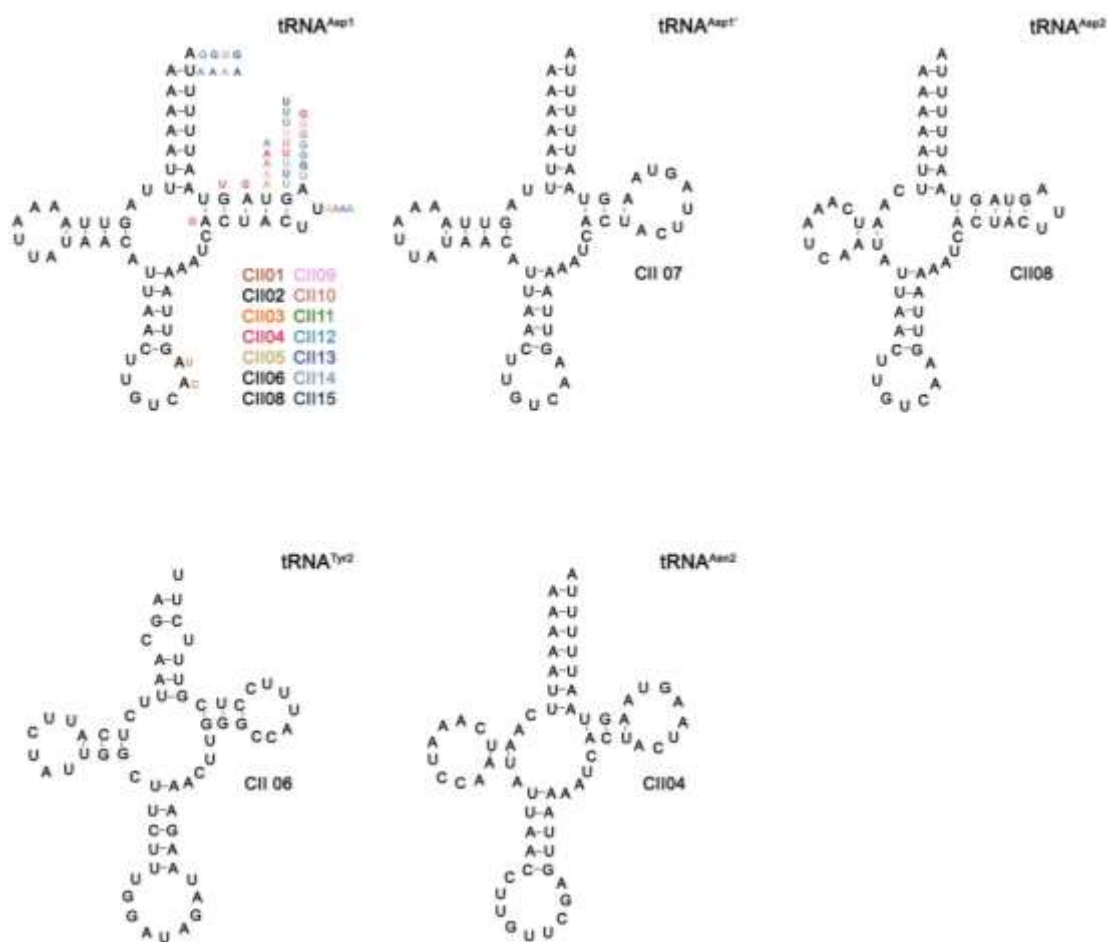


Figura 3. Predição de estruturas secundárias dos genes de *RNAt^{Asp}*, *RNAt^{Tyr2}* e *RNAt^{Asn2}* identificadas no mitogenoma de *Euchroma gigantea*. Variações em cada sítio do *RNAt^{Asp1}* foram indicadas próximo ao nucleotídeo correspondente. Cada amostra com mutações foi identificada com uma cor e as que foram idênticas à sequência identificada na montagem do mitogenoma foram mantidas em preto. Note em *RNAt^{Asp1}* e *RNAt^{Asp1'}* que a diferença em 1pb alterou o tamanho do loop TψU.

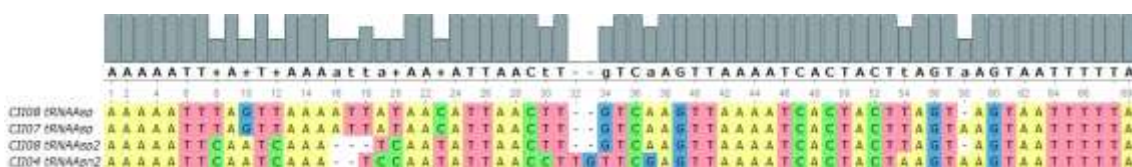


Figura 4. Alinhamento entre as sequências variantes do gene *RNA^tAsp* e do gene putativo *RNA^tAsn2*.

Tabela 1. Localidades de coleta dos espécimes analisados e cariótipos.2

Amostras	Cariótipos	Localidades	Coordenadas
CII01	22, X ₁ Y ₁ X ₂ Y ₂ X ₃	Brasília, DF	15°46'44.7"S 47°55'20.4"W
CII02	22, X ₁ Y ₁ X ₂ Y ₂ X ₃ Y ₃		
CII03	26, X ₁ Y ₁ X ₂ Y ₂ X ₃ Y ₃	Ribeirão Preto, SP	21°10'16.22" S 47°51'19.67" W
CII04	32, X ₁ Y ₁ X ₂ Y ₂ X ₃ Y ₃	Belém, PA	
CII05	32, X ₁ Y ₁ X ₂ Y ₂ X ₃ Y ₃		01°28'13.55" S 48°26'49.98" W
CII06	32, X ₁ Y ₁ X ₂ Y ₂ X ₃ Y ₃		
CII07	32, X ₁ Y ₁ X ₂ Y ₂ X ₃ Y ₃		
CII08*	34, X ₁ Y ₁ X ₂ Y ₂ X ₃ Y ₃	Recife, PE	08°03'060" S 34°57'200" W
CII09	36, X ₁ Y ₁ X ₂ Y ₂ X ₃ Y ₃		
CII10	35, X ₁ Y ₁ X ₂ Y ₂ X ₃	Maceió, AL	09°33'4.11"S 35°46'6.74" W
CII11	36, X ₁ Y ₁ X ₂ Y ₂ X ₃ Y ₃		
CII12	36, X ₁ Y ₁ X ₂ Y ₂ X ₃ Y ₃		
CII13	35, X ₁ Y ₁ X ₂ Y ₂ X ₃		
CII14	36, X ₁ Y ₁ X ₂ Y ₂ X ₃ Y ₃		
CII15	36, X ₁ Y ₁ X ₂ Y ₂ X ₃ Y ₃		

*Amostra utilizada para sequenciamento genômico.

Tabela 2. Distância par a par entre as sequências variantes do gene *RNA^tAsp* e o gene *RNA^tAsn2*.

RNA ^t genes			
	CII08_ RNA ^t Asp	CII07_ RNA ^t Asp	CII08_ RNA ^t Asp2
CII08_ RNA ^t Asp	-		
CII07_ RNA ^t Asp	0	-	
CII08_ RNA ^t Asp2	0.08	0.08	-
CII04_ RNA ^t Asn2	0.15	0.15	0.06

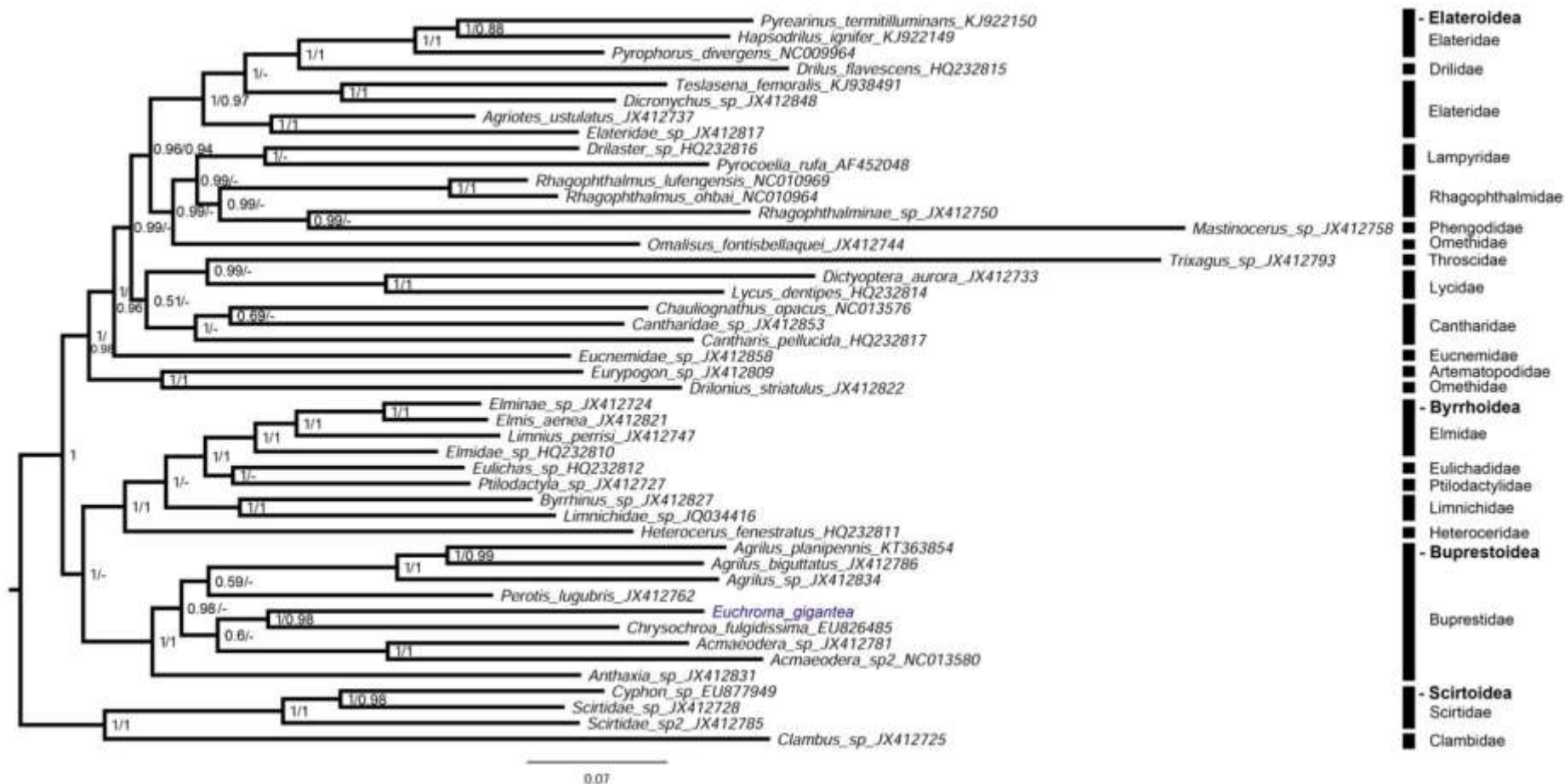


Figura 5. Árvore filogenéticas bayesiana para as sequências de nucleotídeos dos genes codificantes de proteínas de *Euchroma gigantea* e outras espécies da ordem Coleoptera. Os valores de probabilidade posterior/aLRT estão indicados próximos aos nós. A barra de escala indica o número de mutações por sítio.

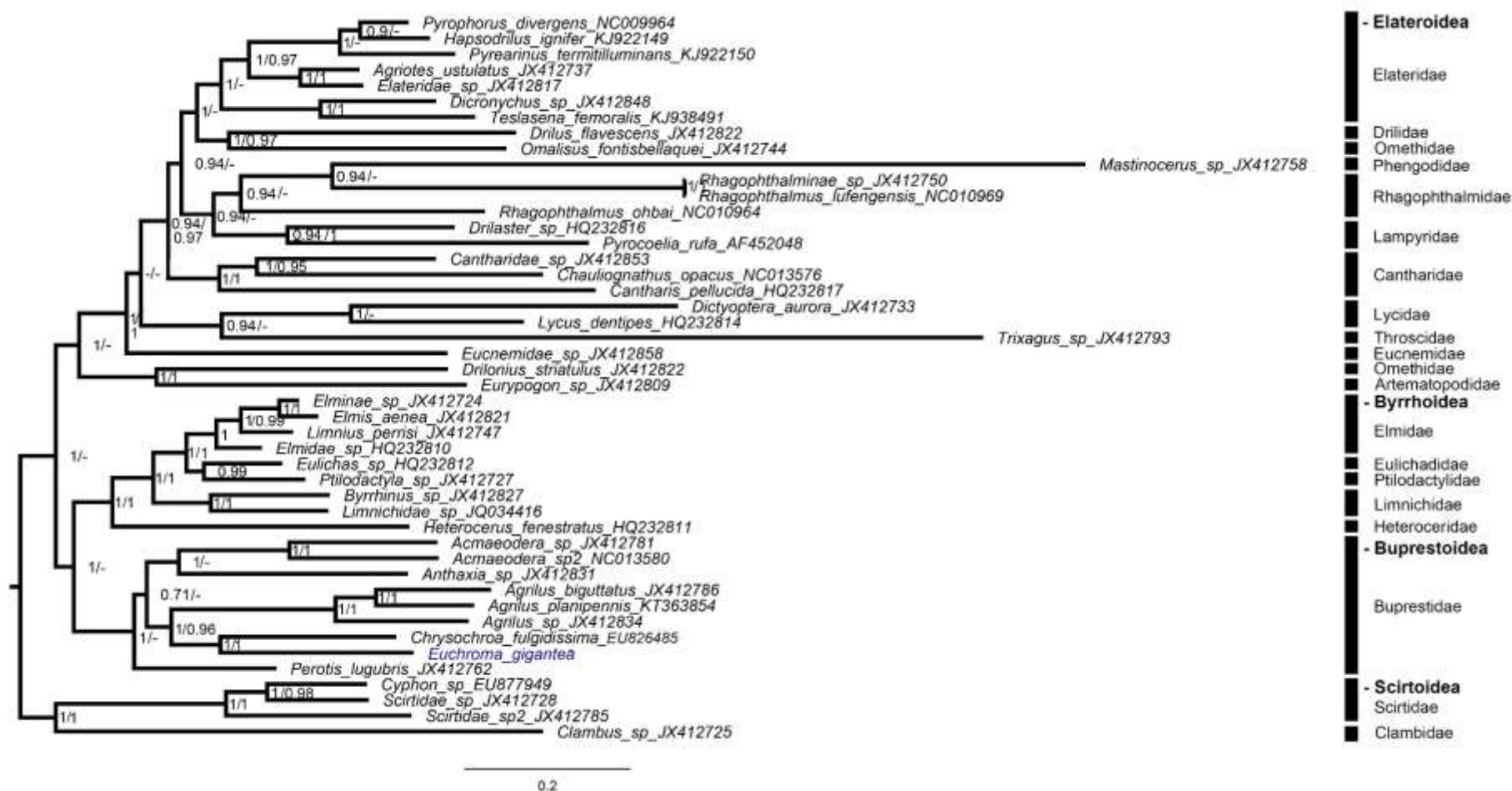


Figura 6. Árvore filogenética bayesiana para as sequências de aminoácidos dos genes codificantes de proteínas de *Euchroma gigantea* e outras espécies da ordem Coleoptera. Os valores de probabilidade posterior/aLTR estão indicados próximos aos nós. A barra de escala indica o número de mutações por sítio.

Tabela S1. Resumo do mitogenoma de *Euchroma gigantea*.

Name	Start	Stop	Strand	Length
tRNA ^{Ile} (atc)	222	284	+	63
tRNA ^{Gln} (caa)	282	350	-	69
tRNA ^{Met} (atg)	350	418	+	69
NAD2	437	1405	+	969
tRNA ^{Trp} (tga)	1441	1507	+	67
tRNA ^{Cys} (tgc)	1500	1563	-	64
tRNA ^{Tyr} (tac)	1565	1627	-	63
COI	1632	3140	+	1509
tRNA ^{L2} (tta)	3160	3223	+	64
COII	3272	3421	+	150
tRNA ^{Lys} (aag)	3486	3555	+	70
tRNA ^{Asp1} (gac)	3556	3621	+	66
tRNA ^{Asp2} (gac)	3991	4053	+	63
ATP8	4082	4234	+	153
ATP6	4231	4896	+	666
COIII	4905	5690	+	786
tRNA ^{Gly} (gga)	5692	5754	+	63
NAD3	5761	6102	+	342
tRNA ^{Ala} (gca)	6107	6169	+	63
tRNA ^{Arg} (cga)	6169	6232	+	64
tRNA ^{Asn} (aac)	6232	6295	+	64
tRNA ^{S1} (aga)	6296	6362	+	67
tRNA ^{Glu} (gaa)	6363	6427	+	65
tRNA ^{Phe} (ttc)	6426	6488	-	63
NAD5	6499	8160	-	1662
tRNA ^{His} (cac)	8206	8268	-	63
NAD4	8288	9604	-	1317
NAD4I	9604	9855	-	252
tRNA ^{Thr} (aca)	9885	9947	+	63
tRNA ^{Pro} (cca)	9948	10010	-	63
NAD6	10016	10507	+	492
Cob	10519	11637	+	1119
tRNA ^{S2} (tca)	11657	11723	+	67
NAD1	11761	12654	-	894
tRNA ^{L1} (cta)	12691	12756	-	66
rrnL	12693	14072	-	1380
tRNA ^{Val} (gta)	14037	14105	-	69
rrnS	14106	14890	-	785

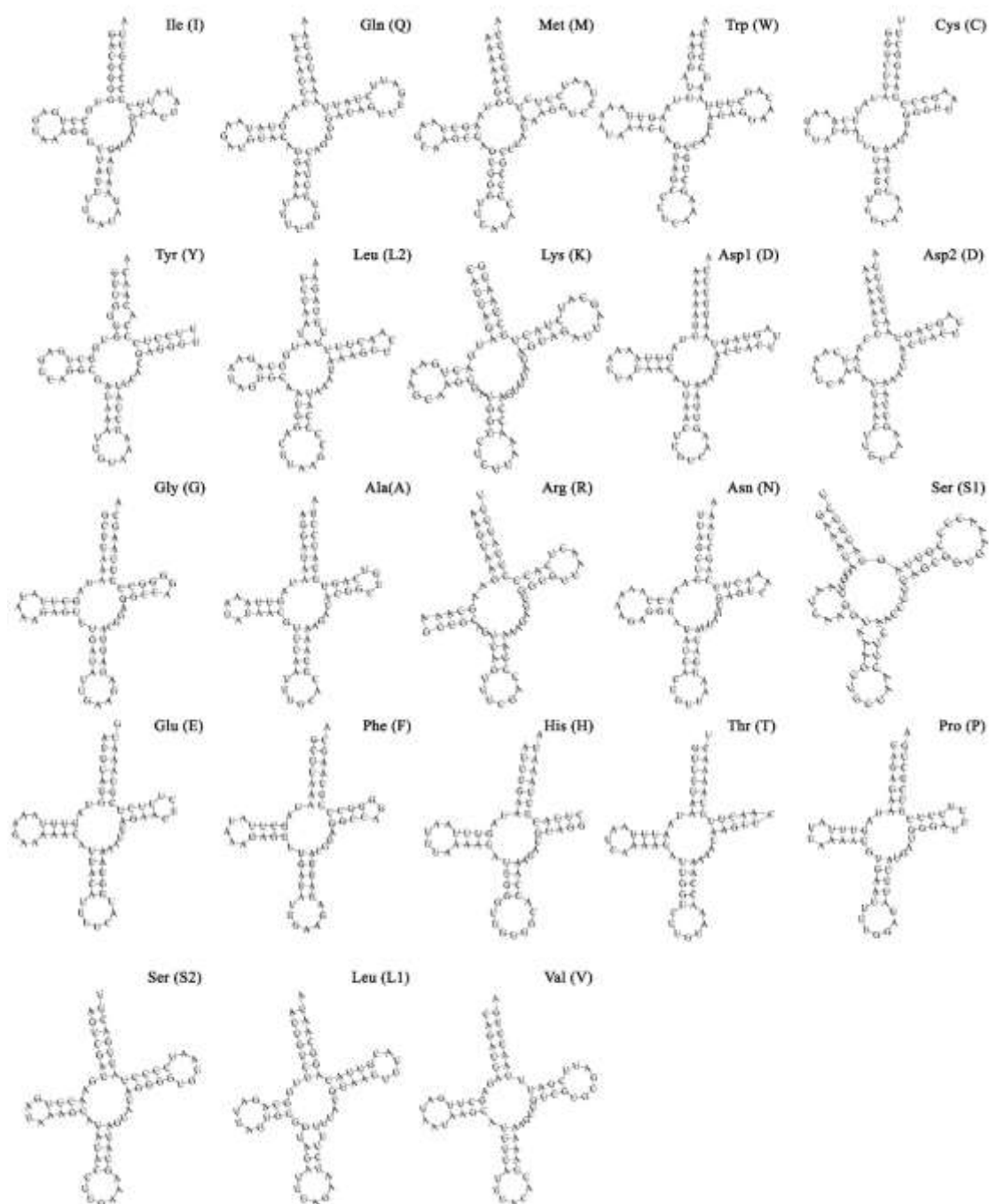


Figura S1. Estruturas secundárias previstas para os 23 genes de tRNA do mitogenoma de *Euchroma gigantea*.

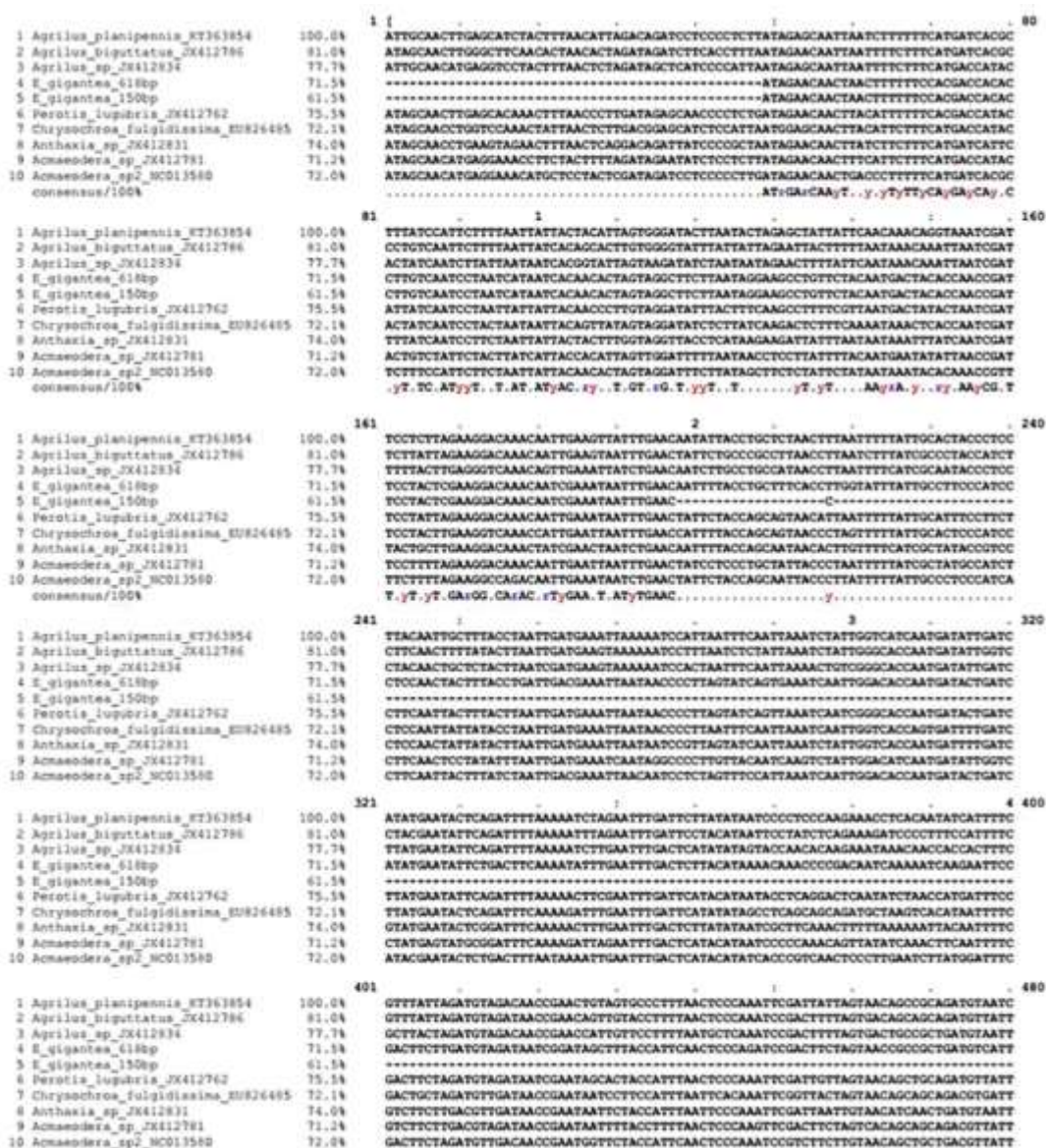


Figura S2. Comparação da sequência de nucleotídeos do gene COII entre espécies de Buprestoidea.

		481	5	560
1	<i>Agrilus planipennis</i> _KT363854	100.0%	CACCTCTGAACTGTACCTTCCTTAGGAGTAAAAATGACGCAACACCGAGGACGACTAAATCAAAATTAGATTTTAAACAAA	
2	<i>Agrilus biguttatus</i> _JX412786	81.0%	CATTGATGGACTATTCCTTCCTTAGGAGTAAAAATGACGCTACACCGAGGACGATTAACCAAAATTAGATTTTAACTAAA	
3	<i>Agrilus</i> _sp._JX412834	77.7%	CATTCTTGGACTATTTCCTTCCTTAGGAGTAAAAATGATGCTACCCCTGGACGATTAATCAAAATTAGATTTTAAATTA	
4	<i>E. gigantea</i> _618bp	71.5%	CACCTGAACTATTTCATCAGTAGGGGTCAAAAGTTGATGCTACCCCGAGGACGACTTAATCAGGCAAGATTCATTTTAAA	
5	<i>E. gigantea</i> _150bp	61.5%	-----	
6	<i>Perotis lugubris</i> _JX412762	75.5%	CACCTGAACTATTTCATCATTAGGAGTAAAAATGATGCAACACCTGGACGACTAAACAGGTCAGGTTCTTAATTAA	
7	<i>Chrysobothris fulgidissima</i> _EU826485	72.1%	CATTGATGGACAGTACCATCAATCGGAGTAAAAATGATGCAACACCGAGGTCGGTTAAACAGGTCAGATTTCTTATCAA	
8	<i>Anthaxia</i> _sp._JX412831	74.0%	CATTGATGAACTATTTCCTTCCTTAGGAGTAAAAATGACGCTACCCCGAGGACGACTCAACAGGTTAGTTTAAATTAA	
9	<i>Acmaeodera</i> _sp._JX412781	71.2%	CACCTGAACTGTGCGCGCAGCTAGGTTGAAAAATGATGCTACACCGAGGACGACTAAATCAACAGGATTTATTATCAA	
10	<i>Acmaeodera</i> _sp2_NC013580	72.0%	CACCTCTGAACTATTCCTTCCTTCCTTAGGAGTAAAAATGATGCAACACCGGTCGATTAAACAGGAGCTTTATTATTA	
		561	6	640
1	<i>Agrilus planipennis</i> _KT363854	100.0%	TGGCTCTGGTTATTTTTTGGTCAATGTTCAAGAAATTCGGAGCAAAACACAGATTCACTATTGTTCTAGAAAGAA	
2	<i>Agrilus biguttatus</i> _JX412786	81.0%	TGGATCTGGATTATTTTTTGGACAATGCTCAGAAATTTGGAGCAAAATCATAGATTATACCTATTGTACTAGAAAGAA	
3	<i>Agrilus</i> _sp._JX412834	77.7%	CGGTCAGGCTATTTTTTGGGCAATGCTCAGAAATCTGTGGGCTAATCAGAGTTTATACCTATTGTAGTGGAAAGAG	
4	<i>E. gigantea</i> _618bp	71.5%	TGGACAGGAATCTTCTTGGACAATGTTCAAGAGATTGTGGGCAAAACACAGATTCACTCAATCTTAATAGAAAGAA	
5	<i>E. gigantea</i> _150bp	61.5%	-----	
6	<i>Perotis lugubris</i> _JX412762	75.5%	TGGATCAGGATTATTTTATGGACAATGCTCTGAGATTGTGGAGCAAAATCATAGATTCACTCAATTTGTTGGAAAGAA	
7	<i>Chrysobothris fulgidissima</i> _EU826485	72.1%	CGGTCAGGATTATTTCTTGGACAATGTTCAAGAAATTCGGGGGCAAAATCATAGATTATGCAATGCCAATAGAAAGAG	
8	<i>Anthaxia</i> _sp._JX412831	74.0%	TGGTACAGGACTATTTTATGGGCAATGTTCAAGAAATTCGGGCAAAATCATAGTTTATACCTATTGTTATAGAAAGTA	
9	<i>Acmaeodera</i> _sp._JX412781	71.2%	CAAGCCAGGTATTTCTTTGGACAATGCTCTGAAATTCGGAGCAAAATCATAGCTTTATGCCATTGTTATAGAAAGAA	
10	<i>Acmaeodera</i> _sp2_NC013580	72.0%	CGGACAGGTCATTCTATGCGCAATGCTCTGAAATCTGTGGTCAATCAGAGATTCACTATTGTTCTAGAAAGAG	
		641	7	682
1	<i>Agrilus planipennis</i> _KT363854	100.0%	TTTCCCCACAATATTCTATTAATGAATTTCAAAAATATTT	
2	<i>Agrilus biguttatus</i> _JX412786	81.0%	TTTCACTAAATTTATTTATTAATGAATTTCAACCCAA----	
3	<i>Agrilus</i> _sp._JX412834	77.7%	TCTCTCTCAAGCTTTTATTAATGAATTTCTAAGCAA----	
4	<i>E. gigantea</i> _618bp	71.5%	TTAGACCCAGGCATTATCACTGA-----	
5	<i>E. gigantea</i> _150bp	61.5%	-----	
6	<i>Perotis lugubris</i> _JX412762	75.5%	TTAGAACTCAAGCTTTTATCACTGAGTAACAAATATA----	
7	<i>Chrysobothris fulgidissima</i> _EU826485	72.1%	TTAGACCCAGGCATTCTTGAATGAATTAACCTCAATA----	
8	<i>Anthaxia</i> _sp._JX412831	74.0%	TTAATGTGAAAAATTTATTAATGAATCAGACAAAAA----	
9	<i>Acmaeodera</i> _sp._JX412781	71.2%	CTAATATTTTGAATTTATTAATGAGTACAAAAATCT----	
10	<i>Acmaeodera</i> _sp2_NC013580	72.0%	TTAATATTTCTCAATTCATTAATGAATTTCTCAAAATTT----	

Figura S2. Continuação.

```

1 [
1 Agrilus planipennis AMV73987 MATWASTLTLDSSSPLEQLIFFHDHALSILLIITTLVGYLMLLELLFNKQVNRFLLEGQTIIVIWTMLPALTLIFIALPS 80
2 Agrilus biguttatus JX412786 MATWASTLTLDSSSPLEQLIFFHDHALSILLIITLVGYLLELLFNKQINRFLLEGQTIIVIWTILPALTLIFIALPS
3 Agrilus_sp_JX412834 IATWGPTLTLDSSSPLEQLIFFHDHTLSILLIMITVLVSYLMMELLFNKQINRFLLEGQTVETIWTILPAMTLIFIAMPS
4 Anthaxia_sp_JX412831 MATWSSTLTQDLSPLMEQLIFFHDHSLIILLIITTLVGYLMSLFFNNKFINRLLLEGQTIELIWTILPAMTLVFIAMPS
5 Perotis lugubris JX412762 MATWAQTLTLDSATPLMEQLTFFHDHTLSILIIIITTLVGYLLSSLFVNDYTNRFLLEGQTIEMIWTILPAVTLIFIAFPS
6 E_gigantea_618bp -----MEQLTFFHDHTLSILIMITTLVGFLMGSLFYNDYTNRFLLEGQTIEMIWTILPAFTLVFIAFPS
7 E_gigantea_150bp -----MEQLTFFHDHTLSILIMITTLVGFLMGSLFYNDYTNRFLLEGQTIEMIWT-----
8 Chrysocroa fulgidissima EU826485 MATWSKLLTLDGASPLMEQLTFFHDHTLSILLIMITVMVGYLSSLFQNKLTNRFLLEGQTIELIWTILPAVTLVFIAMPS
9 Acmaeodera_sp_JX412781 MATWGNLLLLDSSSPLEQLSFFHDHTLSILLIITTLVGFIAMTSLFYNEYINRFLLEGQTIELIWTILPAITLIFIAMPS
10 Acmaeodera_sp2_NC013580 MATWGNMILLDSSSPLEQLTLFHDHALSILLIITTLVGFIAMSLFYNKYTNRFLLEGQTIEMIWTILPAITLIFIALPS

81 |
1 QLLYLIIDEIKNPLISIKSIGHQWYSYEYSDFKNLEFDSYMIQSQTSQYHFRLLDVTNRVVPFNSQIRLLVTAADVI 160
2 QLLYLIIDEVKNPLISIKSIGHQWYSYEYSDFKNLEFDSYMIPISESSPFHFRLLDVTNRVVPFNSQIRLLVTAADVI
3 QLLYLIIDEVKNPLISIKTVGHQWYSYEYSDFKNLEFDSYMVPTQEMNNHFRLLDVTNRVVPFNAQIRLLVTAADVI
4 QLLYLIIDEINNPLVSISIKSIGHQWYSYEYSDFKNFEFDSYMIASNFLKNYNFRLLDVTNRMLPFNSQIRLLVTAADVI
5 QLLYLIIDEINNPLVSIVKSIGHQWYSYEYSDFKNFEFDSYMPQDSMSNHDFTLLDVTNRMLPFNSQIRLLVTAADVI
6 QLLYLIIDEINNPLVSIVKSIGHQWYSYEYSDFKMFEFDSYMKQTPTIKNQEFRLDVTNRMLPFNSQIRLLVTAADVI
7 -----
8 QLLYLIIDEINNPLISIKSIGHQWYSYEYSDFKSFEFDSYMASAADAKSHNFRLLDVTNRMLPFNSQIRLLVTAADVI
9 QLLYLIIDEINPLVTIKSIGHQWYSYEYADFKSLEFDSYMIPTVMSNFRLLDVTNRMLPFNSQVRLVTAADVI
10 QLLYLIIDEINNPLVSISIKSIGHQWYSYEYSDFNKIEFDSYSPVNSLESYGRLLDVTNRMLPFNSQIRLLVTAADVI

161 II 227
1 HSWTVPSLGVKIDATPGRLNQISFLTNRSGLFFGQCSEICGANHSFMPIVLESISPQLFIKWISKMI
2 HSWTIPSLGVKIDATPGRLNQISFLTNRSGLFFGQCSEICGANHSFMPIVLESISPQLFIKWISTQ-
3 HSWTIPSLGMKIDATPGRLNQISFLINRSGLFFGQCSEICGANHSFMPIVLESISPQAFIKWISKQ-
4 HSWTIPSLGVKIDATPGRLNQVSFLINRTGLFYGCSEICGTNHSFMPIVLESINVKNFIKWISQK-
5 HSWTIPSLGVKIDATPGRLNQVSFLINRSGLFYGCSEICGANHSFMPIVLESISTQAFINWVTNM-
6 HSWTIPSGVKVDATPGRLNQASFILNRTGIFFGQCSEICGANHSFMPIVLESISPQAFINW-----
7 -----
8 HSWTVPSIGVKIDATPGRLNQASFLINRSGLFFGQCSEICGANHSFMPIVLESISPQAFIEWINSM-
9 HSWTVPALGVKIDATPGRLNQTFGIINKPGIFFGQCSEICGANHSFMPIVLESSTNILEFIKWVQKS-
10 HSWTIPALGVKVDATPGRLNQASFIINRPGLFYGCSEICGANHSFMPIVLESVNISQFIKWILKI-

```

Figura S3. Comparação da sequência de aminoácidos do gene *COII* entre espécies de Buprestoidea. Note as regiões I e II, e os sítios evolutivamente conservados entre vertebrados, levedura, milho e insetos: histidina (24, 161) em verde, ácido glutâmico (62 e 202) em rosa e ácido aspártico (88, 139, 158 e 173) em azul.

6 DISCUSSÃO GERAL

Diversidade e evolução cromossômica em *Euchroma gigantea*

A descrição de novos cariótipos com $2n = 22$, $2n = 28$ e $2n = 35$ em *E. gigantea*, a descoberta de variação morfológica entre cariótipos com mesmo número diploide, bem como a variação de número e morfologia dos cromossomos que compõem o mecanismo de determinação sexual múltiplo expandiram a visão existente até então sobre o polimorfismo cromossômico nesta espécie. Estes resultados representam uma variação cromossômica mais ampla do que foi observada anteriormente por MESA; FONTANETTI (1984) e MOURA *et al.* (2008) e sugerem que esta diversificação cromossômica na espécie poderia ser resultante de especiação críptica no gênero *Euchroma*.

Em espécies da subordem Polyphaga, alguns rearranjos como fissões e fusões cêntricas, translocações e perda do cromossomo Y geraram polimorfismos cromossômicos em algumas espécies (BLACKMON; DEMUTH, 2015; DE JULIO *et al.*, 2010). No entanto, o polimorfismo observado em *E. gigantea* é mais amplo do que o até então descrito ao nível de espécie na família Buprestidae e em Coleoptera. Além disso, em Buprestidae, a presença de cromossomos B e mecanismo de determinação sexual múltiplo são características incomuns e restritas a *E. gigantea* (KARAGYAN; KUZNETSOVA, 2000; KARAGYAN; KUZNETSOVA; LACHOWSKA, 2004; KARAGYAN; LACHOWSKA, 2007; KARAGYAN; LACHOWSKA; KALASHIAN, 2012).

A análise comparativa dos diferentes cariótipos aliada à análise filogenética de um fragmento do gene da subunidade I da citocromo oxidase (COI) forneceram subsídios para a proposição de um modelo de diversificação

cromossômica para *E. gigantea*. Neste modelo, a partir de um cariótipo com $2n = 20$, Xy, o qual é considerado plesiomórfico para Coleoptera, uma fissão autossômica teria originado o cariótipo com $2n = 22$, Xy, o qual é modal na família Buprestidae (KARAGYAN; KUZNETSOVA, 2000; KARAGYAN *et al.*, 2004; 2012). A partir deste, o mecanismo de determinação sexual múltiplo com seis cromossomos teria se originado através de eventos de translocação entre autossomos e cromossomos sexuais. Visto que esta condição está presente em todas as localidades amostradas e é predominante entre os espécimes analisados, ela provavelmente representa uma condição ancestral para *E. gigantea* (MESA; FONTANETTI 1984) e sua formação ocorreu antes de outras reorganizações cromossômicas como o aumento do número diploide.

Após a origem da cadeia com seis cromossomos sexuais, a ocorrência de eventos de translocação, fusão, bem como a perda do Y_3 provavelmente foram responsáveis pela alteração de número de cromossomos envolvidos neste mecanismo de determinação sexual múltiplo. Inversões pericêntricas foram responsáveis pela alteração da morfologia dos cromossomos sexuais.

A ocorrência de translocações autossomo-autossomo, fissões, fusões e inversões pericêntricas, bem como amplificação ou perda de heterocromatina constitutiva possivelmente moldaram a diversificação cromossômica de *E. gigantea*, dando origem à formação de multivalentes autossômicos, ao aumento do número diploide, à formação de pares heteromórficos e alteração da morfologia cromossômica (Fig. 6 do Cap. 1).

Cadeias meióticas como observadas em *E. gigantea* são também encontradas em outros animais (GALIÁN; PROENÇA; VOGLER, 2007; RENS *et al.*, 2004; ROWELL, 1990; SHARP; ROWELL, 2007; SYREN; LUYKX, 1977;

WHITE, 1973). No entanto, polimorfismos nestas cadeias não são bem tolerados, visto que podem alterar a correta segregação dos cromossomos e assim a formação de gametas balanceados (GRUETZNER et al., 2006; SHARP; ROWELL, 2007). Em *E. gigantea*, porém, a orientação alternada dos cromossomos X e Y na meiose I pode ter favorecido a segregação correta e consequente produção de gametas balanceados.

A presença de cromossomos B puntiformes em todas as localidades amostradas, exceto em Brasília – DF, e a presença de grandes cromossomos B exclusivamente em indivíduos de Belém – PA suportam ainda mais a extensiva variabilidade cromossômica da espécie. Além disso, indicam que diferentes fatores podem estar atuando na manutenção e dispersão destes cromossomos em *E. gigantea*. Tais fatores podem ser mecanismos de origem, composição desses cromossomos e a possível pressão seletiva a qual os indivíduos estão sujeitos de acordo com diferentes condições ambientais (CAMACHO, 2005).

A origem de cromossomos B em *E. gigantea* pode ser diversa. Estes cromossomos podem ser resultado de rearranjos cromossômicos como descrito para *Drosophila albomicans* (ZHOU et al., 2012), bem como do cruzamento entre indivíduos de linhagens diferentes, como foi experimentalmente testado em *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera), na qual quebras cromossômicas ocorreram após sete sucessivas gerações de cruzamentos entre *N. vitripennis* e *N. giraulti* (PERFECTTI; WERREN, 2001).

A presença de indivíduos com pares morfologicamente heteromórficos na linhagem Nordeste (Recife-PE e Maceió-AL) e de cariótipos polimórficos com $2n = 22$ na linhagem Sudeste/Centro Oeste (Ribeirão Preto-SP e Brasília-DF) indicam a possibilidade de cruzamento entre espécimes parentais com mesmo número

diploide, mas citogeneticamente distintos. No entanto, o decaimento de sobrevivência entre os estágios larvais de *E. gigantea* observado em indivíduos de Goiânia – GO (GARCIA, 1998), que provavelmente apresentam polimorfismos como observado na linhagem Sudeste/Centro Oeste na qual indivíduos desta localidade foram incluídos (dados não mostrados), pode estar relacionado com a fertilização de gametas não balanceados.

O agrupamento dos espécimes em três clados indicam a existência de pelo menos três linhagens e sugere que a divergência cromossômica pode estar envolvida no processo de especiação cromossômica de *E. gigantea*, como visto em outras espécies de insetos (COLUZZI et al., 2002; MILLS; COOK, 2014). Além disso, as três linhagens observadas foram formadas por indivíduos oriundos de localidades que pertencem a distintos domínios fitogeográficos. Deste modo, rearranjos cromossômicos podem estar correlacionados com diferenças fenotípicas que conferem *fitness* variado em diferentes habitats (COGHLAN et al., 2005).

Mapeamento de sequências repetitivas e contribuições ao entendimento dos rearranjos cromossômicos

As sequências repetitivas mapeadas nos distintos cariótipos de *E. gigantea* foram localizadas na região pericentromérica dos cromossomos e apresentaram três padrões de distribuição para as sequências de DNAr 18S e os DNAsat Egig2 e Egig3: (I) localização restrita a um par autossômico; (II) dispersão apenas em cromossomos autossômicos; (III) dispersão em autossomos e cromossomo X₃.

Para os genes de histonas e DNAsat Egig1 o padrão observado foi de dispersão das sequências em todos os cromossomos do complemento.

A co-localização dos genes de histona H3 e H4 observada nos cariótipos de *E. gigantea* foi esperada. Em Coleoptera e várias ordens de insetos estes genes encontram-se arranjados em um quinteto que se repete em tandem juntamente com os genes de histona H1, H2A e H2B (NAGODA et al., 2005; ROEHRDANZ et al., 2010). No entanto, a dispersão dos genes de histonas em todos os cromossomos dos diferentes cariótipos foi surpreendente, visto que em Coleoptera a maioria das 15 espécies estudadas para este marcador apresentaram apenas dois sinais em pares autossômicos (CABRAL-DE-MELLO et al., 2011a; GOLL et al., 2015). A dispersão destes genes foi observada em apenas três espécies da família Scarabaeidae, nas quais os genes de histonas variaram de um a dois sítios em cromossomos sexuais ou seis sítios em autossomos e no cromossomo X (CABRAL-DE-MELLO et al., 2011a). A dispersão destas sequências também foi observada nos gafanhotos *Rhammathocerus brasiliensis* (OLIVEIRA et al., 2011) e *Abracris flavolineata* (BUENO; PALACIOS-GIMENEZ; CABRAL-DE-MELLO, 2013). Porém, nestas espécies esta característica é variável entre diferentes indivíduos com o mesmo cariótipo (BUENO; PALACIOS-GIMENEZ; CABRAL-DE-MELLO, 2013; OLIVEIRA et al., 2011; PINE et al., 2017), enquanto que em *E. gigantea* a dispersão foi observada em todos os indivíduos e em distintos cariótipos testados.

A presença das sequências de histonas nas regiões pericentroméricas de todos os cromossomos contribuiu para a definição de polimorfismos morfológicos de cromossomos autossomos. Além disso, inversões pericêntricas provavelmente ocorreram no cromossomo Y₂ do cariótipo $2n = 22$, X₁Y₁X₂Y₂X₃ e no cromossomo

X_2 do cariótipo $2n = 26$, $X_1Y_1X_2Y_2X_3Y_3$, originando um bloco de histonas que ocupa a região pericentromérica/região proximal do braço curto e um segundo bloco no braço longo dos cromossomos Y_2 e X_2 nos cariótipos com $2n = 22$ e $2n = 26$, respectivamente (Fig 3b, k Cap1).

A dispersão dos genes de histonas geralmente é atribuída a mecanismos que mantêm sequências altamente repetitivas em regiões centroméricas, tais como a mobilidade de elementos de transposição, recombinação ectópica ou DNA circular extracromossômico, os quais são também propostos para explicar a dispersão de outras classes de DNA repetitivo (BIONE; CAMPAROTO; SIMÕES, 2005; COHEN et al., 2010; FITCH; STRAUSBAUGH; BARRETT, 1990; NGUYEN et al., 2010; RASKINA; BELYAYEV; NEVO, 2004).

A presença de Egid1 em todos os cromossomos dos cariótipos testados foi de acordo com o mapeamento de sequências de DNAsat com monômeros curtos em cariótipos de Coleoptera, os quais são predominantes na região pericentromérica de cada cromossomo (ROSOLEN et al., 2016). Além disso, sua presença e abundância em diferentes cariótipos sugere que Egid1 foi originado e dispersou antes da diversificação cariotípica de *E. gigantea*, assim como os genes de histonas.

Sequências repetitivas podem ser *hotspots* para quebras cromossômicas que antecedem translocações (COGHLAN; WOLFE, 2002), fissões (ROUSSELET et al., 2000) e inversões pericêntricas (PAÇO et al., 2015), rearranjos cromossômicos que são frequentes na história evolutiva de *E. gigantea*. Por outro lado, estes rearranjos cromossômicos podem originar novos padrões de distribuição de sequências envolvidas em áreas rearranjadas (HIRAI et al., 1996; PAÇO et al., 2015).

A dispersão dos genes de histonas, bem como a de *Egig1*, nos cariótipos de *E. gigantea* deve ter ocorrido antes da diversificação cromossômica da espécie, considerando que foi observada em todas as populações. Assim, a presença de um grande número de cópias de genes de histonas e do DNAsat *Egig1* na região pericentromérica de todos os cromossomos nos cariótipos testados pode ter promovido a ocorrência de recombinação ectópica contribuindo para a origem de rearranjos cromossômicos (COGHLAN et al., 2005; ROUSSELET et al., 2000), bem como para a dispersão das sequências de DNAr (NGUYEN et al., 2010).

A conservação de dois sítios de DNAr 18S observada nos cariótipos com $2n = 22, 26, 34, 35$ e 36 é comum em várias espécies de Coleoptera (ALMEIDA et al., 2010; CABRAL-DE-MELLO et al., 2011a; GOLL et al., 2015) e tem sido sugerida como a condição ancestral neste grupo. Em *E. gigantea*, os sítios de DNAr 18S no par 4 dos indivíduos com $2n = 22$ parecem ser os sítios mais primitivos, visto que o $2n = 22, X_1Y_1X_2Y_2X_3Y_3$ foi considerado o mais primitivo baseado no cariótipo ancestral de Coleoptera e família Buprestidae.

Analizando os diferentes padrões de distribuição do DNAr 18S, o qual foi coincidente com a maioria dos padrões observados para *Egig2* e *Egig3*, foi possível propor que a alta taxa de rearranjos cromossômicos pode atuar na reorganização dos padrões de distribuição destas sequências. Isto ficou evidente visto que existe variação na morfologia dos cromossomos portadores dos sítios de DNAr 18S nos cariótipos com apenas dois *clusters*, ou seja, $2n = 22, 26, 34$ e 36 .

No entanto, a dispersão desta sequência sem alteração na morfologia cromossômica ou aumento do número diploide foi observada em espécimes com

$2n = 32$ (Belém – PA) e $2n = 35$ (Maceió – AL), indicando que os rearranjos cromossômicos não são os únicos mecanismos envolvidos na distribuição do DNAr 18S. Em outros insetos, tanto rearranjos cromossômicos como recombinações ectópicas são propostos para a dispersão de sequências de DNAr (HIRAI et al., 1996; NGUYEN et al., 2010; PITA et al., 2016). Assim, considerando que o sítio primitivo de DNAr 18S está no par 4 de um cariótipo com $2n=22$, foi proposto que o cenário mais parcimonioso para a dispersão do DNAr envolve rearranjos cromossômicos como inversões pericêntricas e translocações robertsonianas, além de eventos de recombinação ectópica.

Assim como Egig1, a presença de Egig2 e Egig3 nos distintos cariótipos das amostras analisadas sugerem que estas sequências também foram originadas antes da diversificação cariotípica de *E. gigantea*. A dispersão destas sequências em conjunto com o DNAr 18S e restrita a região pericentromérica de poucos cromossomos é incomum em Coleoptera, visto que nesta ordem vários DNAsat mapeados cromossomicamente são dispersos na heterocromatina constitutiva (HC) de todos ou quase todos os cromossomos (JUAN; PONS; PETITPIERRE, 1993; LORITE et al., 2001, 2002; MRAVINAC; PLOHL, 2010; UGARKOVIĆ; PODNAR; PLOHL, 1996). Porém, restrição de DNAsat em cromossomos específicos foi também observada em *Tribolium castaneum* (Tenebrionidae) e pode ser indicativo de diversidade de sequências na HC da espécie, além da possível existência de diferentes famílias de DNAsat cromossomo-específicas (PAVLEK et al., 2015).

Apesar da idêntica distribuição de Egig2, Egig3 e DNAr 18S, similaridades significativas entre estas sequências não foram observadas. Assim, considerando a relação física entre estas sequências é possível que Egig2 e Egig3 estejam

relacionadas com o espaçador intergênico (IGS), como observado em espécies dos gêneros *Phaseolus* (ALMEIDA et al., 2012), *Solanum* (JO et al., 2009) e *Vicia* (MACAS; NAVRÁTILOVÁ; MÉSZÁROS, 2003).

Embora Egig2 e Egig3 tenham diferentes padrões de distribuição entre as amostras de diferentes linhagens de *E. gigantea*, estas sequências apresentaram alto nível de conservação dentro e entre as linhagens Norte, Nordeste e Sudeste/Centro Oeste da espécie. Isto sugere que estas sequências sofreram pouca diferenciação e foram conservadas ao longo do processo de especiação.

Mitogenoma de *Euchroma gigantea*

Inicialmente, a análise filogenética de um fragmento do COI de *E. gigantea* revelou o agrupamento de espécimes citogeneticamente polimórficos em três clados. O agrupamento coincidiu com as regiões geográficas do Brasil (Norte, Nordeste e Sudeste/Centro Oeste) e os clados apresentaram entre si uma média de 3% de distância genética. Resultados similares em espécies da família Buprestidae foram suficientes para sugerir a especiação críptica ou pseudocríptica nos gêneros *Chrysochroa* (HAN et al., 2012) e *Chrysobothris* (HANSEN et al., 2015).

O agrupamento dos espécimes em três linhagens, bem como a distância genética encontrada entre elas permitiu o direcionamento de estudos morfológicos entre os espécimes analisados neste trabalho e outros oriundos de mais seis localidades brasileiras. Neste estudo, foram identificadas três espécies para gênero *Euchroma* no Brasil: *Euchroma* sp.1, com ocorrência na região Nordeste, exceto Maranhão; *Euchroma* sp.2 ocorrente no Maranhão, regiões

Sudeste e Centro-Oeste; e *Euchroma* sp.3 no Norte (RÓGEAN VINÍCIUS SANTOS SOARES, 2018). Desse modo, as informações obtidas através das análises apenas de um fragmento do mitogenoma forneceram indícios fundamentais para a resolução do *status* taxonômico de *E. gigantea*.

Informações obtidas através da análise de apenas um fragmento do mitogenoma impulsionaram avanços tanto no entendimento da diversificação do gênero *Euchroma*, quanto no entendimento da evolução cromossômica observada no gênero. Desse modo, a análise da estrutura do mitogenoma completo da espécie de modo intra e interindividual apresentam potencial informativo para entender a evolução do mitogenoma na espécie, bem como no processo de especiação.

Apesar de o mitogenoma de *E. gigantea* possuir o número de genes e estrutura geral do mitogenoma típico de insetos (BOORE, 1999; CAMERON, 2014), apresentou características incomuns tanto em Coleoptera quanto em insetos em geral, tais como a redução do tamanho do gene *COII* e uma região variável entre os genes *RNA^t_{Asp}* e *ATP8*.

O gene *COII* com 618 pb, identificado em todos os indivíduos das diferentes populações testadas pode indicar uma sinapomorfia do gênero *Euchroma*. A sequência possui uma redução de pelo menos 20 aminoácidos da sequência proteica deste gene em relação a várias espécies de insetos (LIU; BECKENBACH, 1992). Dezesesseis aminoácidos estão ausentes na região N terminal e quatro na extremidade C terminal. No entanto, algumas características como o códon iniciador ATA e duas regiões conservadas a nível de aminoácido entre insetos foram conservadas no *COII* de *E. gigantea*. Além disso, sítios conservados entre levedura, milho, insetos e mamíferos (LIU; BECKENBACH,

1992) também foram observados, indicando que apesar de ter sofrido redução, o gene *COII* em *E. gigantea* não deve ter perdido sua função.

A sequência entre os genes *RNA^{tAsp}* e *ATP8* observada no mitogenoma de *E. gigantea* é uma característica incomum em Coleoptera (DUAN et al., 2017; LIU et al., 2014; SHEFFIELD et al., 2009; SONG et al., 2010; TIMMERMANS et al., 2015). Esta sequência foi variável intra e interpopulacionalmente, sendo identificados três diferentes padrões de organização, dois em amostras de Belém - PA e um em Recife – PE. Em Buprestoidea, apenas a espécie *Chrysochroa fulgidissima* (Buprestidae; Chrysochroinae) apresentou uma sequência intergênica de 37 pb entre *RNA^{tAsp}* e *ATP8* (HONG et al., 2009). O fato de *E. gigantea* pertencer a mesma subfamília, pode indicar que neste grupo, esta região pode estar propensa a rearranjos.

A duplicação de genes de RNA^t no mitogenoma de *E. gigantea* pode ser explicada pelo modelo conhecido como *tandem duplication–random loss* (TDRL), no qual uma parte do genoma é duplicada através de replicação *slippage* ou recombinação, e uma vez duplicado, a ocorrência de mutações eventualmente torna um dos genes não funcional. A partir de então, a pressão seletiva tende a eliminar o gene não funcional para redução do tamanho do genoma (CAMERON, 2014). Dessa forma, o gene *RNA^{tAsp}* teria sido duplicado na linhagem Norte e disperso para a Nordeste. Nestas linhagens, a cópia deste gene sofreu mutações independentemente e deu origem a genes putativos *RNA^{tAsn2}* e *RNA^{tAsp2}* nas linhagens Norte e Nordeste, respectivamente. Assim, aparentemente embora *RNA^{tAsp2}* e *RNA^{tAsn2}* possam ser oriundos da mesma sequência, provavelmente apresentam taxas evolutivas distintas em cada linhagem.

O posicionamento de *E. gigantea* na superfamília Buprestoidea, bem como a sua estreita relação *C. fulgidissima*, refletiram o resultado esperado para a análise filogenética do mitogenoma, visto que as duas pertencem à mesma subfamília. Este resultado indica o potencial informativo do mitogenoma, que constitui uma importante ferramenta para estudos que visem ampliar o conhecimento acerca das relações filogenéticas de *E. gigantea*. Além de contribuir para esclarecer o seu *status* taxonômico, fornecendo ainda subsídios para o melhor entendimento da relação entre os rearranjos cromossômicos e o processo de especiação no gênero *Euchroma*.

7 CONCLUSÕES

1. Eventos de translocações autossomo-autossomo, fissões, fusões e inversões pericêntricas, bem como amplificação ou perda de heterocromatina constitutiva moldaram a diversificação cromossômica da espécie.
2. A cadeia de cromossomos sexuais, apesar de ser antiga e conservada quanto ao número de cromossomos, continuou se diferenciando através de translocações A-sexuais, inversões pericêntricas, perda do cromossomo Y além de recombinação ectópica.
3. Existem pelo menos três linhagens cromossomicamente polimórficas de *E. gigantea* no Brasil.
4. O acúmulo e fixação de diferentes rearranjos cromossômicos em *E. gigantea* podem constituir barreira pós-zigótica entre as três linhagens da espécie.
5. A dispersão dos sítios de histona e Egi1 ocorreu antes do processo de diversificação cariotípica da espécie, enquanto que o DNAr 18S, Egi2 e Egi3 provavelmente ocorreu concomitantemente ao processo.
6. Os diferentes padrões de distribuição do DNAr 18S deve-se a rearranjos cromossômicos e recombinação ectópica. Tendo ocorrido independentemente nas populações de Belém-PA e Maceió-AL.
7. A região entre os genes mitocondriais *RNA^t_{Asp}* e *ATP8*, a qual é variável inter e intrapopulacionalmente, pode ser considerada uma sinapomorfia no gênero e possivelmente apresenta padrões linhagem-específicos.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, R. et al. Hybridization and speciation. **Journal of Evolutionary Biology**, [s. l.], v. 26, p. 229–246, 2013.
- ALMEIDA, C. et al. Contrasting evolution of a satellite DNA and its ancestral IGS rDNA in *Phaseolus* (Fabaceae). **Genome**, [s. l.], v. 55, n. 9, p. 683–9, 2012.
- ALMEIDA, M. C. et al. Physical mapping of 18S rDNA cistron in species of the *Omophoita* genus (Coleoptera, Alticinae) using fluorescent in situ hybridization. **Micron Oxford England** **1993**, [s. l.], v. 41, n. 7, p. 729–734, 2010.
- AMORIM, I. C. et al. Characterization and population mapping of the DiMarMITE element in *Dichotomius* (*Luederwaldtinia*) *sericeus* species complex (Coleoptera: Scarabaeidae). **Comparative Cytogenetics**, [s. l.], v. (Submitted, 2016).
- ARCANJO, A. P. et al. Cytogenetic characterization of *Eurysternus caribaeus* (Coleoptera: Scarabaeidae): evidence of sex-autosome fusion and diploid number reduction prior to species dispersion. **Journal of genetics**, [s. l.], v. 88, n. 2, p. 177–82, 2009.
- ARGUEDAS, M. Clasificación de tipos de daños producidos por insectos forestales . Segunda parte. **Kurú: Revista Forestal**, [s. l.], v. 3, n. 9, p. 1–8, 2006.
- BECKENBACH, A. T. Mitochondrial genome sequences of representatives of three families of scorpionflies (Order Mecoptera) and evolution in a major duplication of coding sequence. **Genome**, [s. l.], v. 54, n. 5, p. 368–376, 2011.
- BELLAMY, C. An illustrated summary of the higher classification of the superfamily Buprestoidea (Coleoptera). **Folia Heyrovskiana**, [s. l.], v. 10, p. 44, 2003.
- BELLAMY, C. L. **A world catalogue and bibliography of the jewel beetles (Coleoptera: Buprestoidea)**. Sofia-Moscow: Pensoft Publisher, 2008.
- BELLAMY, C. L.; VOLKOVITSH, M. G. Buprestoidea Crowson, 1955. In: BEUTEL LESCHEN, R. A. (Ed.). **Arthropoda: Insecta, Part 38, Coleoptera, Beetles, Volume 1: Morphology and Systematics**. Walter de ed. New York. v. IVp. 461–468.
- BERGSTEN, J. et al. Sympatry and colour variation disguised well-differentiated sister species: *Suphrodytes* revised with integrative taxonomy including 5 kbp of housekeeping genes (Coleoptera: Dytiscidae). **DNA Barcodes**, [s. l.], v. 1, p. 1–18, 2012.
- BERTI FILHO, E.; MENDES FILHO, J. M. A.; KRUGNER, T. L. Pragas e doenças de *Eucalyptus* na região do Mato Grosso do Sul. **Instituto de Pesquisas e Estudos florestais Circular Técnica nº106**, [s. l.], p. 12, 1980.

BICKFORD, D. et al. Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends in Ecology and Evolution**, [s. l.], v. 22, n. 3, p. 148–155, 2007.

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

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

BLACKWELDER, R. E. Checklist of the coleopterous insects of Mexico, Central America, The West Indies, and South America. **Bulletin of the United States National Museum**, [s. l.], v. 185, p. 189–341, 1944.

BOORE, J. Animal mitochondrial genomes. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 27, n. 8, p. 1767–80, 1999.

BROWN, J. D.; O'NEILL, R. J. Chromosomes, conflict, and epigenetics: chromosomal speciation revisited. **Annual review of genomics and human genetics**, [s. l.], v. 11, n. April, p. 291–316, 2010.

BUENO, D.; PALACIOS-GIMENEZ, O. M.; CABRAL-DE-MELLO, D. C. Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the grasshopper *Abracris flavolineata* reveal possible ancestry of the B chromosome and H3 histone spreading. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 8, n. 6, 2013.

CABRAL-DE-MELLO, D. C. et al. Karyotype differentiation patterns in species of the subfamily Scarabaeinae (Scarabaeidae, Coleoptera). **Micron (Oxford, England : 1993)**, [s. l.], v. 39, n. 8, p. 1243–1250, 2008.

CABRAL-DE-MELLO, D. C. et al. Chromosomal organization of the 18S and 5S rRNAs and histone H3 genes in Scarabaeinae coleopterans: insights into the evolutionary dynamics of multigene families and heterochromatin. **BMC genetics**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 88, 2011. a.

CABRAL-DE-MELLO, D. C. et al. Evolutionary dynamics of heterochromatin in the genome of *Dichotomius* beetles based on chromosomal analysis. **Genetica**, [s. l.], v. 139, n. 3, p. 315–25, 2011. b.

CABRAL-DE-MELLO, D. C.; MOURA, R. C.; MARTINS, C. Cytogenetic mapping of rRNAs and histone H3 genes in 14 species of *Dichotomius* (Coleoptera, Scarabaeidae, Scarabaeinae) beetles. **Cytogenetic and genome research**, [s. l.], v. 134, n. 2, p. 127–35, 2011.

CAMACHO, J. P. M. B Chromosomes. In: **Gregory TR editor. The evolution of the genome. Elsevier, San Diego.**, [s. l.], p. 223–286, 2005.

CAMERON, S. L. Insect mitochondrial genomics: Implications for evolution and phylogeny. **Annual Review of Entomology**, [s. l.], v. 59, n. 1, p. 95–117, 2014.

CASARI, S.; IDE, S. Coleoptera Linnaeus, 1758. In: RAFAEL, J. A. et al. (Ed.). **Insetos do Brasil : diversidade e taxonomia**. Ribeirão Preto: Editora Holos, 2012. p. 454–535.

COGHLAN, A. et al. Chromosome evolution in eukaryotes: A multi-kingdom perspective. **Trends in Genetics**, [s. l.], v. 21, n. 12, p. 673–682, 2005.

COGHLAN, A.; WOLFE, K. H. Fourfold faster rate of genome rearrangement in nematodes than in *Drosophila*. **Genome Research**, [s. l.], v. 12, n. 6, p. 857–867, 2002.

COHEN, S. et al. Extrachromosomal circles of satellite repeats and 5S ribosomal DNA in human cells. **Mobile DNA**, [s. l.], v. 1, p. 11, 2010.

COLOMBA, M. et al. Karyotype, banding and rDNA FISH in the scarab beetle *Anoplotrupes stercorosus* (Coleoptera Scarabaeoidea: Geotrupidae). Description and comparative analysis. **Micron (Oxford, England : 1993)**, [s. l.], v. 35, n. 8, p. 717–20, 2004.

COLOMBA, M. S.; VITTURI, R.; ZUNINO, M. Chromosome analysis and rDNA FISH in the stag beetle *Dorcus parallelipipedus* L. (Coleoptera : Scarabaeoidea : Lucanidae). **Hereditas**, [s. l.], v. 133, p. 249–253, 2000.

COLUZZI, M. et al. A polytene chromosome analysis of the *Anopheles gambiae* species complex. **Science**, [s. l.], v. 298, n. November, p. 1415–1418, 2002.

COSTA LIMA, A. Coleoptera. In: **Insetos do Brasil**. Rio de Janeiro. v. 329p. 470.

COUTINHO, L. M. O conceito de bioma. **Acta Botanica Brasilica**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 13–23, 2006.

COYNE, J. a; ORR, H. a. The evolutionary genetics of speciation. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, [s. l.], v. 353, n. 1366, p. 287–305, 1998.

CREÃO-DUARTE, A. J. et al. Damages caused by the *Nasutitermes* spp. (Isoptera: Termitidae) in *Eriotheca crenulaticalyx* (Bombaceae) at the Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa (PB), Brazil. In: XXI INTERNATIONAL CONGRESS OF ENTOMOLOGY 2000, Iguassu Falls, Brazil. **Anais...** Iguassu Falls, Brazil: Abstract book, 2000.

CRESPI, B.; NOSIL, P. Conflictual speciation: Species formation via genomic conflict. **Trends in Ecology and Evolution**, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 48–57, 2013.

DE JULIO, M. et al. Mechanisms of karyotype differentiation in Cassidinae sensu lato (Coleoptera , Polyphaga , Chrysomelidae) based on seven species of the Brazilian fauna and an overview of the cytogenetic data. **Micron**, [s. l.], v. 41, p. 26–38, 2010.

DUAN, J. et al. The complete mitogenome of the Emerald Ash Borer (EAB), *Agrilus planipennis* (Insecta: Coleoptera: Buprestidae). **Mitochondrial DNA Part B**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 134–135, 2017.

EVANS, A. M. et al. Large-scale molecular phylogeny of metallic wood-boring beetles (Coleoptera: Buprestoidea) provides new insights into relationships and reveals multiple evolutionary origins of the larval leaf-mining habit. **Systematic Entomology**, [s. l.], v. 40, n. 2, p. 385–400, 2015.

FARIA, R.; NAVARRO, A. Chromosomal speciation revisited: Rearranging theory with pieces of evidence. **Trends in Ecology and Evolution**, [s. l.], v. 25, n. 11, p. 660–669, 2010.

FITCH, D. H. a.; STRAUSBAUGH, L. D.; BARRETT, V. On the origins of tandemly repeated genes: Does histone gene copy number in *Drosophila* reflect chromosomal location? **Chromosoma**, [s. l.], v. 99, n. 2, p. 118–124, 1990.

FONSECA, A. P. P. Da. **Aspectos biológicos de *Euchroma gigantea* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera:Buprestidae) em *Pachira aquatica* Aubl. (1775)(Bombacaceae)**. 2010. Universidade Federal de Alagoas, [s. l.], 2010.

FRYDRYCHOVÁ, R.; MAREC, F. Repeated losses of TTAGG telomere repeats in evolution of beetles (Coleoptera). **Genetica**, [s. l.], v. 115, n. 2, p. 179–87, 2002.

GALIAN, J.; HUDSON, P. Cytogenetic analysis of Australian tiger beetles (Coleoptera: Cicindelidae): chromosome number, sex-determining system and localization of rDNA genes. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, [s. l.], v. 37, n. 1, p. 1–6, 1999.

GALIÁN, J.; PROENÇA, S. J. R.; VOGLER, A. P. Evolutionary dynamics of autosomal-heterosomal rearrangements in a multiple-X chromosome system of tiger beetles (Cicindelidae). **BMC evolutionary biology**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 158, 2007.

GARCIA, A. H. Aspectos sobre a biologia de *Euchroma gigantea* (L., 1758) (Coleoptera - Buprestidae) em *Pachira aquatica* AUBLET (Bombaceae). **Anais da Escola Agronomia e Veterinária**, [s. l.], v. 28, p. 69–73, 1998.

GARCIA, A. H. Levantamento, identificação e avaliação dos danos de insetos em árvores ornamentais na área urbana de Goiânia (GO). **Pequisa Agropecuária Tropical**, [s. l.], v. 29, n. 1, p. 77–81, 1999.

GARCÍA, D. M. Á.; PÉREZ, W. Y. A.; IRIARTE, L. E. N. Registro De *Euchroma gigantea* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera: Buprestidae) para tres departamentos de la región Caribe Colombiana. **Acta Zoologica Mexicana**, [s. l.], v. 30, n. 3, p. 727–730, 2014.

GOLL, L. G. et al. High-Resolution physical chromosome mapping of multigene families in *Lagria villosa* (Tenebrionidae): Occurrence of interspersed ribosomal genes in Coleoptera. **Cytogenetic and Genome Research**, [s. l.], v. 146, n. 1, p. 64–70, 2015.

GRUETZNER, F. et al. How did the platypus get its sex chromosome chain? A comparison of meiotic multiples and sex chromosomes in plants and animals. **Chromosoma**, [s. l.], v. 115, n. 2, p. 75–88, 2006.

HAJIBABAEI, M. et al. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. **Trends in Genetics**, [s. l.], v. Apr;23, n. 4, p. 167–72, 2007.

HAN, T. et al. Pseudocryptic speciation of *Chrysochroa fulgidissima* (Coleoptera: Buprestidae) with two new species from Korea, China and Vietnam. **Zoological Journal of the Linnean Society**, [s. l.], v. 164, n. 1, p. 71–98, 2012.

HANSEN, J. A. et al. Molecular Systematics of the *Chrysobothris femorata* Species Group (Coleoptera: Buprestidae). **Annals of the Entomological Society of America**, [s. l.], v. 108, n. 5, p. 950–963, 2015.

HIRAI, H. et al. Genomic dispersion of 28S rDNA during karyotypic evolution in the ant genus *Myrmecia* (Formicidae). **Chromosoma**, [s. l.], v. 105, n. 3, p. 190–196, 1996.

HONG, M. Y. et al. Complete mitogenome sequence of the jewel beetle, *Chrysochroa fulgidissima* (Coleoptera : Buprestidae). **Mitochondrial DNA**, [s. l.], v. 20, n. 3, p. 46–50, 2009.

INPA, I. N. de P. da A. **Ciência para todos**, 2013.

JO, S.-H. et al. Evolution of ribosomal DNA-derived satellite repeat in tomato genome. **BMC plant biology**, [s. l.], v. 9, n. 42, p. 1–14, 2009.

JUAN, C.; PONS, J.; PETITPIERRE, E. Localization of tandemly repeated DNA sequences in beetle chromosomes by fluorescent in situ hybridization. **Chromosome Research**, [s. l.], v. 1, n. 3, p. 167–74, 1993.

KAJTOCH, Ł. et al. Evolutionary units of *Coraebus elatus* (Coleoptera:Buprestidae) in central and eastern Europe – implications for origin and conservation. **Insect Conservation and Diversity (2014)**, [s. l.], v. 7, p. 41–54, 2014.

KARAGYAN, G. Ag-banded karyotypes in six species of jewel-beetles (Coleoptera , Buprestidae). **Folia Biologica**, [s. l.], v. 49, n. January 2001, p. 43–47, 2001.

KARAGYAN, G.; KUZNETSOVA, K. G. Chromosome numbers and sex chromosome systems in buprestid beetles (Coleoptera, Buprestidae). **Entomological Review**, [s. l.], v. 80, n. October 2016, p. 38–49, 2000.

KARAGYAN, G.; KUZNETSOVA, V. G.; LACHOWSKA, D. New cytogenetic data on Armenian Buprestids (Coleoptera, Buprestidae) with a discussion of karyotype variation within the family. **Folia Biologica (Kraków)**, [s. l.], v. 52, n. 3–4, p. 151–158, 2004.

KARAGYAN, G.; LACHOWSKA, D. Karyotypes of five species of jewel-beetles

and presumptive ancestral state of karyotypes of the subfamilies Polycestinae, Chrysochroinae and Buprestinae (Insecta: Coleoptera: Buprestidae).

Comparative Cytogenetics, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 121–127, 2007.

KARAGYAN, G.; LACHOWSKA, D.; KALASHIAN, M. Karyotype analysis of four jewel-beetle species (Coleoptera, Buprestidae) detected by standard staining, C-banding, agnor-banding and CMA3/DAPI staining. **Comparative Cytogenetics**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 183–197, 2012.

KAWAKAMI, T.; BUTLIN, R. K.; COOPER, S. J. B. Chromosomal speciation revisited: Modes of diversification in Australian morabine grasshoppers (Vandiemenella, viatica species group). **Insects**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 49–61, 2011.

KEKKONEN, M.; HEBERT, P. D. N. DNA barcode-based delineation of putative species: Efficient start for taxonomic workflows. **Molecular Ecology Resources**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 706–715, 2014.

KIM, S. K.; HWANG, U. W.; KWON, O. Three different genetic lineages of the jewel beetle *Chrysochroa fulgidissima* (Buprestidae; Chrysochroinae) inferred from mitochondrial COI gene. **Journal of Ecology and Environment**, [s. l.], v. 37, n. 1, p. 35–39, 2014.

KOBAYASHI, N. et al. Two cryptic species of the phytophagous ladybird beetle *Epilachna vigintioctopunctata* (Coleoptera: Coccinellidae) detected by analyses of mitochondrial DNA and karyotypes, and crossing experiments. **Zoological science**, [s. l.], v. 17, n. 8, p. 1159–1166, 2000.

LADOUKAKIS, E. D.; ZOUROS, E. Evolution and inheritance of animal mitochondrial DNA : rules and exceptions. **Journal of Biological Research-Thessalonik**, [s. l.], v. 24, n. 2, p. 1–7, 2017.

LANDE, R. The fixation of chromosomal rearrangements in a subdivided population with local extinction and colonization. **Heredity**, [s. l.], v. 54, n. October 1984, p. 323–332, 1985.

LIMA, R.; SOUZA, T. D. S.; LHANO, M. G. Catálogo de espécies de Coleoptera depositados no museu de zoologia da Universidade Federal do Reconcavo da Bahia, Cruz das Almas, Brasil. In: (G. Pereira, R. Maneyro, Eds.) III CONGRESO URUGUAYO DE ENTOMOLOGIA 2014, Montevideo - Uruguay. **Anais...** Montevideo - Uruguay

LIU, F.-F. et al. Tandem duplication of two tRNA genes in the mitochondrial genome of *Tagiades vajuna* (Lepidoptera: Hesperiiidae). **European Journal of Entomology**, [s. l.], v. 114, p. 407–415, 2017.

LIU, H.; BECKENBACH, A. T. Evolution of the mitochondrial cytochrome oxidase II gene among 10 orders of insects. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 41–52, 1992.

LIU, Q.-N. et al. The complete mitochondrial genome of the red flour beetle,

Tribolium castaneum (Coleoptera: Tenebrionidae). **Mitochondrial DNA**, [s. l.], v. 27, n. 2, p. 1525–1527, 2014.

LIVINGSTONE, K.; RIESEBERG, L. H. Chromosomal evolution and speciation: a recombination-based approach. **New Phytologist**, [s. l.], v. 161, n. 1, p. 107–112, 2004.

LOPES, C. M. et al. The role of chromosomal rearrangements and geographical barriers in the divergence of lineages in a South American subterranean rodent (Rodentia: Ctenomyidae: *Ctenomys minutus*). **Heredity**, [s. l.], v. 111, n. 4, p. 293–305, 2013.

LOPEZ, V. M. et al. Population genetics of goldspotted oak borer, *Agrilus auroguttatus* Schaeffer (Coleoptera: Buprestidae): investigating the origin of an invasive pest of native oaks in California. **Biological Invasions**, [s. l.], v. 16, p. 2393–2402, 2014.

LORITE, P. et al. Characterization and chromosome location of satellite DNA in the leaf beetle *Chrysolina americana* (Coleoptera, Chrysomelidae). **Genetics**, [s. l.], v. 110, p. 143–150, 2001.

LORITE, P. et al. Satellite DNA in the elm leaf beetle, *Xanthogaleruca luteola* (Coleoptera, Chrysomelidae): characterization, interpopulation analysis, and chromosome location. **Cytogenetic and Genome Research**, [s. l.], v. 98, n. 4, p. 302–307, 2002.

LORITE, P.; TORRES, M. I.; PALOMEQUE, T. Characterization of two unrelated satellite DNA families in the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera, Chrysomelidae). **Bulletin of Entomological Research**, [s. l.], v. 103, n. 05, p. 538–546, 2013.

MACAS, J.; NAVRÁTILOVÁ, A.; MÉSZÁROS, T. Sequence subfamilies of satellite repeats related to rDNA intergenic spacer are differentially amplified on *Vicia sativa* chromosomes. **Chromosoma**, [s. l.], v. 112, n. 3, p. 152–158, 2003.

MAGRO, A. et al. Phylogeny of ladybirds (Coleoptera: Coccinellidae): are the subfamilies monophyletic? **Molecular phylogenetics and evolution**, [s. l.], v. 54, p. 833–48, 2010.

MECKE, R. **Insects of Brazilian pine**. Tübingen, Germany: Attempto Service, 2002.

MENDES-NETO, E. de O. et al. Cytogenetic analysis of *Astylus antis* (Perty, 1830) (Coleoptera, Melyridae): Karyotype, heterochromatin and location of ribosomal genes. **Genetics and molecular biology**, [s. l.], v. 33, n. 2, p. 237–43, 2010.

MESA, A.; FONTANETTI, C. S. **Multiple Sex-Chromosomes, autosomal polymorphism and a high number of S chromosomes in *Euchroma gigantea* L 1735 (Coleoptera, Buprestidae)**, 1984.

MILLS, P. J.; COOK, L. G. Rapid chromosomal evolution in a morphologically cryptic radiation. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, [s. l.], v. 77, p. 126–135, 2014.

MONNÉ, M.; MONNÉ, M.; SOUZA, D. **Buprestidae**. 2018. Disponível em: <<http://fauna.jbrj.gov.br/fauna/faunadobrasil/141186>>. Acesso em: 10 mar. 2018.

MORA, P. et al. Molecular cytogenetic studies in the ladybird beetle *Henosepilachna argus* Geoffroy, 1762 (Coleoptera, Coccinellidae, Epilachninae). **Comp Cytogenet**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 423–434, 2015.

MORENO, G. **Besouro força derrubada de árvores na quadra 216 da Asa Norte**. 2010. Disponível em: <http://correio braziliense.com.br/app/noticia/cidades/2010/10/23/interna_cidadesdf,219553/index.shtml>. Acesso em: 9 ago. 2015.

MOURA, R. de C.; MELO, N. F.; SOUZA, M. J. High levels of chromosomal differentiation in *Euchroma gigantea* L. 1735 (Coleoptera, Buprestidae). **Genetics and Molecular Biology**, [s. l.], v. 31, n. 2, p. 431–437, 2008.

MRAVINAC, B. et al. TCAGG, an alternative telomeric sequence in insects. **Chromosoma**, [s. l.], v. 120, n. 4, p. 367–76, 2011.

MRAVINAC, B.; PLOHL, M. Parallelism in evolution of highly repetitive DNAs in sibling species. **Molecular biology and evolution**, [s. l.], v. 27, n. 8, p. 1857–67, 2010.

NAGODA, N. et al. Molecular characterization and evolution of the repeating units of histone genes in *Drosophila americana*: Coexistence of quartet and quintet units in a genome. **Insect Molecular Biology**, [s. l.], v. 14, n. 6, p. 713–717, 2005.

NAN, X.; WEI, C.; HE, H. The complete mitogenome of *Eucryptorrhynchus brandti* (Harold) (Insecta: Coleoptera: Curculionidae). **Mitochondrial DNA. Part A, DNA mapping, sequencing, and analysis**, [s. l.], v. 27, n. 3, p. 2060–2061, 2016.

NGUYEN, P. et al. Evolutionary dynamics of rDNA clusters on chromosomes of moths and butterflies (Lepidoptera). **Genetica**, [s. l.], v. 138, n. 3, p. 343–354, 2010.

NOOR, M. A. et al. Chromosomal inversions and the reproductive isolation of species. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 98, n. 21, p. 12084–12088, 2001.

OLIVEIRA, N. L. et al. Chromosomal mapping of rDNAs and H3 histone sequences in the grasshopper *Rhammatocerus brasiliensis* (acrididae, gomphocerinae): extensive chromosomal dispersion and co-localization of 5S rDNA/H3 histone clusters in the A complement and B chromosome. **Molecular cytogenetics**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 24, 2011.

OLIVEIRA, S. G. et al. Cytogenetic analysis of two *Coprophanæus* species

(Scarabaeidae) revealing wide constitutive heterochromatin variability and the largest number of 45S rDNA sites among Coleoptera. **Micron (Oxford, England : 1993)**, [s. l.], v. 41, n. 8, p. 960–5, 2010.

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

OLIVEIRA, S. G.; MOURA, R. C.; MARTINS, C. B chromosome in the beetle *Coprophanaeus cyanescens* (Scarabaeidae): emphasis in the organization of repetitive DNA sequences. **BMC genetics**, [s. l.], v. 13, p. 96, 2012.

PAÇO, A. et al. The puzzling character of repetitive DNA in *Phodopus* genomes (Cricetidae, Rodentia). **Chromosome Research**, [s. l.], v. 23, n. 3, p. 427–440, 2015.

PAVLEK, M. et al. Genome-wide analysis of tandem repeats in *Tribolium castaneum* genome reveals abundant and highly dynamic tandem repeat families with satellite DNA features in euchromatic chromosomal arms. **DNA Research**, [s. l.], v. 22, n. 6, p. 387–401, 2015.

PENTINSAARI, M.; MUTANEN, M.; KAILA, L. Cryptic diversity and signs of mitochondrial introgression in the *Agrilus viridis* species complex (Coleoptera: Buprestidae). **European Journal of Entomology**, [s. l.], v. 111, n. 4, p. 475–486, 2014.

PEREIRA, M. L. L. et al. Inventário preliminar dos besouros (Insecta: Coleoptera) que ocorrem no Cariri. In: I ENCONTRO UNIVERSITÁRIO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CARIRI 2013, Juazeiro do Norte - Ceará. **Anais...** Juazeiro do Norte - Ceará

PERFECTTI, F.; WERREN, J. H. The interspecific origin of B chromosomes: Experimental evidence. **Evolution**, [s. l.], v. 55, n. 5, p. 1069–1073, 2001.

PETITPIERRE, E. Cytogenetics, cytotaxonomy and chromosomal evolution of Chrysomelinae revisited (Coleoptera, Chrysomelidae). **ZooKeys**, [s. l.], v. 79, n. 157, p. 67–79, 2011.

PFEILER, E. et al. Phylogenetic relationships of Sonoran Desert cactus beetles in the tribe Hololeptini (Coleoptera: Histeridae: Histerinae), with comments on the taxonomic status of *Iliotona beyeri*. **Molecular phylogenetics and evolution**, [s. l.], v. 56, n. 1, p. 474–9, 2010.

PFENNINGER, M.; SCHWENK, K. Cryptic animal species are homogeneously distributed among taxa and biogeographical regions. **BMC evolutionary biology**, [s. l.], v. 7, p. 121, 2007.

PINE, M. B. et al. Chromosome mapping in *Abracris flavolineata* (De geer, 1773) (Orthoptera) from the Iguaçu National Park - Foz do Iguaçu, Paraná, Brazil. **Comparative Cytogenetics**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 203–212, 2017.

- PITA, S. et al. New arrangements on several species subcomplexes of *Triatoma* genus based on the chromosomal position of ribosomal genes (Hemiptera - Triatominae). **Infection, Genetics and Evolution**, [s. l.], v. 43, n. September, p. 225–231, 2016.
- RASKINA, O.; BELYAYEV, A.; NEVO, E. Activity of the En/Spm-like transposons in meiosis as a base for chromosome repatterning in a small, isolated, peripheral population of *Aegilops speltoides* Tausch. **Chromosome Research**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 153–161, 2004.
- RAUPACH, M. J.; HANNIG, K.; WÄGELE, J.-W. Identification of Central European ground beetles of the genus *Bembidion* (Coleoptera: Carabidae) using DNA barcodes: A case study of selected species. **Angewandte Carabidologie**, [s. l.], v. 9, n. October 2015, p. 63–72, 2011.
- RENS, W. et al. Resolution and evolution of the duck-billed platypus karyotype with an $X_1Y_1X_2Y_2X_3Y_3X_4Y_4X_5Y_5$ male sex chromosome constitution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 101, n. 46, p. 16257–16261, 2004.
- RIESEBERG, L. H. Chromosomal Rearrangements and Speciation in Animals. **Trends in Ecology and Evolution**, [s. l.], v. 16, n. 7, p. 351–358, 2001.
- RODRIGUES-NETTO, S. M.; CAMPOS, T. B. De; IDE, S. *Euchroma gigantea* (Linnaeus) (Coleoptera, Buprestidae) como causa da queda de *Chorisia speciosa* St. Hil. (Bombacaceae). **Arq. Inst. Biol., São Paulo**, [s. l.], v. 70, n. 3, p. 381–384, 2003.
- ROEHRDANZ, R. et al. Histone and ribosomal RNA repetitive gene clusters of the boll weevil are linked in a tandem array. **Insect Molecular Biology**, [s. l.], v. 19, n. 4, p. 463–471, 2010.
- RÓGEAN VINÍCIUS SANTOS SOARES. **Estudo taxonômico na espécie *Euchroma gigantea* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera: Buprestidae) utilizando análise morfológica e DNA barcode**. 2018. Universidade de Pernambuco, [s. l.], 2018.
- ROSOLEN, L. et al. Molecular mapping of microsatellites and Retrotransposons: Evidence of evolutionary mechanisms involved in the differentiation of giant sex chromosomes in *Omophoita* (Coleoptera: Alticinae). **Cytogenetic and Genome Research**, [s. l.], v. 148, p. 83–155 (100), 2016.
- ROUSSELET, J. et al. Chromosome fission associated with growth of ribosomal DNA in *Neodiprion abietis* (Hymenoptera: Diprionidae). **Proceedings. Biological sciences / The Royal Society**, [s. l.], v. 267, n. 1455, p. 1819–23, 2000.
- ROWELL, D. M. Fixed fusion heterozygosity in *Delena cancerides* Walck. (Araneae: Sparassidae): an alternative to speciation by monobrachial fusion. **Genetica**, [s. l.], v. 80, n. 2, p. 139–157, 1990.

- ROZEK, M. et al. C-bands on chromosomes of 32 beetle species (Coleoptera: Elateridae, Cantharidae, Oedemeridae, Cerambycidae, Anthicidae, Chrysomelidae, Attelabidae and Curculionidae). **Hereditas**, [s. l.], v. 140, n. 3, p. 161–170, 2004.
- SAHARA, K.; MAREC, F.; TRAUT, W. TTAGG telomeric repeats in chromosomes of some insects and other arthropods. **Chromosome research**, [s. l.], v. 7, n. 6, p. 449–460, 1999.
- SÁNCHEZ-GEA, J. F.; SERRANO, J.; GALIÁN, J. Variability in rDNA loci in Iberian species of the genus *Zabrus* (Coleoptera: Carabidae) detected by fluorescence *in situ* hybridization. **Genome**, [s. l.], v. 43, n. 1, p. 22–28, 2000.
- SHARP, D. XVI. On the species of the genus *Euchroma*. **Transactions of the Royal Entomological Society of London**, [s. l.], v. 29, n. 3, p. 289–295, 1881.
- SHARP, H. E.; ROWELL, D. M. Unprecedented chromosomal diversity and behaviour modify linkage patterns and speciation potential: Structural heterozygosity in an Australian spider. **Journal of Evolutionary Biology**, [s. l.], v. 20, n. 6, p. 2427–2439, 2007.
- SHEFFIELD, N. C. et al. Nonstationary evolution and compositional heterogeneity in beetle mitochondrial phylogenomics. **Systematic Biology**, [s. l.], v. 58, n. 4, p. 381–394, 2009.
- SONG, H. J. et al. When phylogenetic assumptions are violated: base compositional heterogeneity and among-site rate variation in beetle mitochondrial phylogenomics. **Syst Entomol**, [s. l.], v. 35, p. 429–448, 2010.
- SYREN, R. M.; LUYKX, P. Permanent segmental interchange complex in the termite *Incisitermes schwarzi*. **Nature**, [s. l.], v. 266, p. 167–168, 1977.
- TANG, P.-A. et al. The complete mitochondrial genome of *Sympiezomias velatus* (Coleoptera: Curculionidae). **Mitochondrial DNA Part B**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 449–450, 2017.
- TIMMERMANS, M. J. T. N. et al. Family-level sampling of mitochondrial genomes in Coleoptera: Compositional heterogeneity and phylogenetics. **Genome biology and evolution**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 161–175, 2015.
- TIMMERMANS, M. J. T. N.; VOGLER, A. P. Phylogenetically informative rearrangements in mitochondrial genomes of Coleoptera, and monophyly of aquatic elateriform beetles (Dryopoidea). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, [s. l.], v. 63, n. 2, p. 299–304, 2012.
- UGARKOVIĆ, D.; DURAJLIJA, S.; PLOHL, M. Evolution of *Tribolium madens* (Insecta, Coleoptera) satellite DNA through DNA inversion and insertion. **Journal of Molecular Evolution**, [s. l.], v. 42, p. 350–358, 1996.

UGARKOVIĆ, D.; PODNAR, M.; PLOHL, M. Satellite DNA of the red flour beetle *Tribolium castaneum*-comparative study of satellites from the genus *Tribolium*. **Molecular biology and evolution**, [s. l.], v. 13, n. 8, p. 1059–66, 1996.

VICHIATO, M. R. M. et al. Ocorrência de *Euchroma gigantea* (Coleoptera : Buprestidae) em Belo Horizonte , Minas Gerais. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, [s. l.], v. 8, p. 7–11, 2014.

VOLKOVITSH, M. ark G. The comparative morphology of antennal structures in Buprestidae (Coleoptera): evolutionary trends, taxonomic and phylogenetic implications. Part 1. **Acta Musei Moraviae, Scientiae Biologicae**, [s. l.], v. 86, p. 43–169, 2001.

WHITE, M. J. D. Models of Speciation. **Science**, [s. l.], v. 159, n. 3819, p. 1065–1070, 1968.

WHITE, M. J. D. **Animal cytology and evolution**. London: Cambridge University Press, 1973.

WU, Y. et al. Identification of wood-boring beetles (Cerambycidae and Buprestidae) intercepted in trade- associated solid wood packaging material using DNA barcoding and morphology. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. January, p. 1–12, 2017.

XAVIER, C.; CABRAL-DE-MELLO, D. C.; MOURA, R. de C. Heterochromatin and molecular characterization of DsmarMITE transposable element in the beetle *Dichotomius schiffleri* (Coleoptera: Scarabaeidae). **Genetica**, [s. l.], v. 142, n. 6, p. 575–581, 2014.

ZHOU, Q. et al. Deciphering neo-sex and B chromosome evolution by the draft genome of *Drosophila albomicans*. **BMC Genomics**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 109, 2012.

ANEXO A – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

Instructions for Authors

Molecular Genetics and Genomics

ISSN: 1617-4615 (print version)

ISSN: 1617-4623 (electronic version)

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

English Language Support

For editors and reviewers to accurately assess the work presented in your manuscript you need to ensure the English language is of sufficient quality to be understood. If you need help with writing in English you should consider:

Asking a colleague who is a native English speaker to review your manuscript for clarity.

Visiting the English language tutorial which covers the common mistakes when writing in English.

Using a professional language editing service where editors will improve the English to ensure that your meaning is clear and identify problems that require your review. Two such services are provided by our affiliates Nature Research Editing Service and American Journal Experts.

- English language tutorial
- Nature Research Editing Service
- American Journal Experts

Please note that the use of a language editing service is not a requirement for publication in this journal and does not imply or guarantee that the article will be selected for peer review or accepted.

If your manuscript is accepted it will be checked by our copyeditors for spelling and formal style before publication.

Text

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.

- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

Scientific style

- Please always use internationally accepted signs and symbols for units (SI units).
- Genus and species names should be in italics.
- Generic names of drugs and pesticides are preferred; if trade names are used, the generic name should be given at first mention

References

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).

This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).

This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995a, b; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999, 2000).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work. Order multi-author publications of the same first author alphabetically with respect to second, third, etc. author. Publications of exactly the same author(s) must be ordered chronologically.

Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329

Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086

Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

Dissertation

Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

ISSN LTWA

If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

EndNote style (zip, 2 kB)

Tables

- each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

Artwork

For the best quality final product, it is highly recommended that you submit all of your artwork – photographs, line drawings, etc. – in an electronic format. Your art will then be produced to the highest standards with the greatest accuracy to detail. The published work will directly reflect the quality of the artwork provided.

Electronic Figure Submission

- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MS Office files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art

- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.

- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art

- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

- Color art is free of charge for print and online publication.
- Color illustrations should be submitted as RGB.

Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (color-blind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

Electronic Supplementary Material

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Before submitting research datasets as electronic supplementary material, authors should read the journal's Research data policy. We encourage research data to be archived in data repositories wherever possible.

Submission

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

- Aspect ratio: 16:9 or 4:3
- Maximum file size: 25 GB
- Minimum video duration: 1 sec
- Supported file formats: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxf, mts, m4v, 3gp

Text and Presentations

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

- Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.
- If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).
- Specialized Formats

- Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., “... as shown in the animation (Online Resource 3)”, “... additional data are given in Online Resource 4”.
- Name the files consecutively, e.g. “ESM_3.mpg”, “ESM_4.pdf”.

Captions

For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

- The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

Ethical Responsibilities of Authors

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its

presentation can be achieved by following the rules of good scientific practice, which include:

- The manuscript has not been submitted to more than one journal for simultaneous consideration.
- The manuscript has not been published previously (partly or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work (please provide transparency on the re-use of material to avoid the hint of text-recycling (“self-plagiarism”).
- A single study is not split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (e.g. “salami-publishing”).
- No data have been fabricated or manipulated (including images) to support your conclusions
- No data, text, or theories by others are presented as if they were the author’s own (“plagiarism”). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks are used for verbatim copying of material, and permissions are secured for material that is copyrighted.
- Important note: the journal may use software to screen for plagiarism.
- Consent to submit has been received explicitly from all co-authors, as well as from the responsible authorities - tacitly or explicitly - at the institute/organization where the work has been carried out, before the work is submitted.
- Authors whose names appear on the submission have contributed sufficiently to the scientific work and therefore share collective responsibility and accountability for the results.

Compliance with Ethical Standards

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial), informed consent if the research involved human

participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals.

Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled “Compliance with Ethical Standards” when submitting a paper:

- Disclosure of potential conflicts of interest
- Research involving Human Participants and/or Animals
- Informed consent

Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. single or double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the instructions following this section carefully.

The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.

The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned guidelines.

Authors must disclose all relationships or interests that could have direct or potential influence or impart bias on the work. Although an author may not feel there is any conflict, disclosure of relationships and interests provides a more complete and transparent process, leading to an accurate and objective assessment of the work. Awareness of a real or perceived conflicts of interest is a perspective to which the readers are entitled. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate. Examples of potential conflicts of interests that are directly or indirectly related to the research may include but are not limited to the following:

Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number)

- Honoraria for speaking at symposia
- Financial support for attending symposia
- Financial support for educational programs
- Employment or consultation

- Support from a project sponsor
- Position on advisory board or board of directors or other type of management relationships
- Multiple affiliations
- Financial relationships, for example equity ownership or investment interest
- Intellectual property rights (e.g. patents, copyrights and royalties from such rights)
- Holdings of spouse and/or children that may have financial interest in the work

In addition, interests that go beyond financial interests and compensation (non-financial interests) that may be important to readers should be disclosed. These may include but are not limited to personal relationships or competing interests directly or indirectly tied to this research, or professional interests or personal beliefs that may influence your research.

The corresponding author collects the conflict of interest disclosure forms from all authors. In author collaborations where formal agreements for representation allow it, it is sufficient for the corresponding author to sign the disclosure form on behalf of all authors. Examples of forms can be found [here](#):

The corresponding author will include a summary statement in the text of the manuscript in a separate section before the reference list, that reflects what is recorded in the potential conflict of interest disclosure form(s).

See below examples of disclosures:

Funding: This study was funded by X (grant number X).

Conflict of Interest: Author A has received research grants from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company X and owns stock in Company Y. Author C is a member of committee Z.

If no conflict exists, the authors should state:

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Research involving human participants and/or animals

2) Statement on the welfare of animals

The welfare of animals used for research must be respected. When reporting experiments on animals, authors should indicate whether the international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals have been

followed, and that the studies have been approved by a research ethics committee at the institution or practice at which the studies were conducted (where such a committee exists).

For studies with animals, the following statement should be included in the text before the References section:

Ethical approval: “All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.”

If applicable (where such a committee exists): “All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted.”

If articles do not contain studies with human participants or animals by any of the authors, please select one of the following statements:

“This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors.”

“This article does not contain any studies with animals performed by any of the authors.”

“This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.”

After Acceptance

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer’s web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice and offprints.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Publication of color illustrations is free of charge.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Instructions for Authors

Mitochondrial DNA part A

Print ISSN: 2470-1394 Online ISSN: 2470-1408

About the Journal

Mitochondrial DNA Part A is an international, peer-reviewed journal publishing high-quality, original research. Please see the journal's Aims & Scope for information about its focus and peer-review policy.

Please note that this journal only publishes manuscripts in English.

Mitochondrial DNA Part A accepts the following types of article: Original Articles, Review Articles, Book Reviews, Letters to the Editor.

Peer Review

Taylor & Francis is committed to peer-review integrity and upholding the highest standards of review. Once your paper has been assessed for suitability by the editor, it will then be single blind peer reviewed by independent, anonymous expert referees. Find out more about what to expect during peer review and read our guidance on publishing ethics.

Preparing Your Paper

All authors submitting to medicine, biomedicine, health sciences, allied and public health journals should conform to the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals, prepared by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE).

Structure

Your paper should be compiled in the following order: title page; abstract; keywords; main text introduction, materials and methods, results, discussion; acknowledgments; declaration of interest statement; references; appendices (as appropriate); table(s) with caption(s) (on individual pages); figures; figure captions (as a list).

Word Limits

Please include a word count for your paper. There are no word limits for papers in this journal.

Style Guidelines

Please refer to these quick style guidelines when preparing your paper, rather than any published articles or a sample copy.

Please use American spelling style consistently throughout your manuscript.

Please use single quotation marks, except where 'a quotation is "within" a quotation'. Please note that long quotations should be indented without quotation marks.

Periodical abbreviations. Periodical abbreviations should follow the style given by Index Medicus

Latin terminology. Latin terminology, including microbiological and species nomenclature, should be italicized.

Proprietary brands. Proprietary brands should be eschewed in favour of generic drug names. If authors use proprietary brand names alongside generic drug names, please include them in parentheses.

Use standard convention for human and animal genes and proteins: italics for genes and regular font for proteins, and upper case for human products and lower case for animal products.

Genetic notation. Please use the genetic notation and symbols approved by the HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC). Nomenclature guidelines are available and the Gene Name Proposal form may be completed on the NGNC Web page (<http://www.genenames.org/cgi-bin/request>).

Nucleotide depositing. Please refer to the MIBBI Portal for prescriptive checklists for reporting biological and biomedical research. Any novel nucleotide sequences that are mentioned in submission require depositing with the Data Bank of Japan (DDBJ), European Molecular Biology Laboratory (EMBL/EBI) Nucleotide Sequence Database, or GenBank (National Centre for Biotechnology Information). Please use GenBank Accession numbers and be sure to include them in the final version of the manuscript. Single nucleotide polymorphisms that require

nomenclature should be submitted to the NCBI SNP database. Please include ID numbers in the manuscript.

Formatting and Templates

Papers may be submitted in Word or LaTeX formats. Figures should be saved separately from the text. To assist you in preparing your paper, we provide formatting template(s).

Word templates are available for this journal. Please save the template to your hard drive, ready for use.

A LaTeX template is available for this journal. Please save the LaTeX template to your hard drive and open it, ready for use, by clicking on the icon in Windows Explorer.

If you are not able to use the template via the links (or if you have any other template queries) please contact authortemplate@tandf.co.uk.

References

Please use this reference guide when preparing your paper.

An EndNote output style is also available to assist you.

Checklist: What to Include

1. **Author details.** Please ensure everyone meeting the International Committee of Medical Journal Editors (ICJME) requirements for authorship is included as an author of your paper. Please include all authors' full names, affiliations, postal addresses, telephone numbers and email addresses on the cover page. Where available, please also include ORCiDs and social media handles (Facebook, Twitter or LinkedIn). One author will need to be identified as the corresponding author, with their email address normally displayed in the article PDF (depending on the journal) and the online article. Authors' affiliations are the affiliations where the research was conducted. If any of the named co-authors moves affiliation during the peer-review process, the new affiliation can be given as a footnote. Please note that no changes to affiliation can be made after your paper is accepted. Read more on authorship.

2. Should contain an unstructured abstract of between 100 and 150 words.
3. **Graphical abstract** (optional). This is an image to give readers a clear idea of the content of your article. It should be a maximum width of 525 pixels. If your image is narrower than 525 pixels, please place it on a white background 525 pixels wide to ensure the dimensions are maintained. Save the graphical abstract as a .jpg, .png, or .gif. Please do not embed it in the manuscript file but save it as a separate file, labelled GraphicalAbstract1.
4. You can opt to include a **video abstract** with your article. Find out how these can help your work reach a wider audience, and what to think about when filming.
5. Between 3 and 6 **keywords**. Read making your article more discoverable, including information on choosing a title and search engine optimization.
6. **Funding details**. Please supply all details required by your funding and grant-awarding bodies as follows:
For single agency grants
 This work was supported by the [Funding Agency] under Grant [number xxxx].
For multiple agency grants
 This work was supported by the [Funding Agency #1] under Grant [number xxxx]; [Funding Agency #2] under Grant [number xxxx]; and [Funding Agency #3] under Grant [number xxxx].
7. **Disclosure statement**. This is to acknowledge any financial interest or benefit that has arisen from the direct applications of your research. Further guidance on what is a conflict of interest and how to disclose it.
8. **Biographical note**. Please supply a short biographical note for each author. This could be adapted from your departmental website or academic networking profile and should be relatively brief (e.g. no more than 200 words).
9. **Geolocation information**. Submitting a geolocation information section, as a separate paragraph before your acknowledgements, means we can index your paper's study area accurately in JournalMap's geographic literature

database and make your article more discoverable to others. More information.

10. **Supplemental online material.** Supplemental material can be a video, dataset, fileset, sound file or anything which supports (and is pertinent to) your paper. We publish supplemental material online via Figshare. Find out more about supplemental material and how to submit it with your article.
11. **Figures.** Figures should be high quality (1200 dpi for line art, 600 dpi for grayscale and 300 dpi for colour, at the correct size). Figures should be supplied in one of our preferred file formats: EPS, PS, JPEG, GIF, or Microsoft Word (DOC or DOCX). For information relating to other file types, please consult our Submission of electronic artwork document.
12. **Tables.** Tables should present new information rather than duplicating what is in the text. Readers should be able to interpret the table without reference to the text. Please supply editable files.
13. **Equations.** If you are submitting your manuscript as a Word document, please ensure that equations are editable. More information about mathematical symbols and equations.
14. **Units.** Please use SI units (non-italicized).

Using Third-Party Material in your Paper

You must obtain the necessary permission to reuse third-party material in your article. The use of short extracts of text and some other types of material is usually permitted, on a limited basis, for the purposes of criticism and review without securing formal permission. If you wish to include any material in your paper for which you do not hold copyright, and which is not covered by this informal agreement, you will need to obtain written permission from the copyright owner prior to submission. More information on requesting permission to reproduce work(s) under copyright.

Disclosure Statement

Please include a disclosure statement, using the subheading “Disclosure of interest.” If you have no interests to declare, please state this (suggested wording: *The authors report no conflict of interest*). For all NIH/Wellcome-funded papers,

the grant number(s) must be included in the declaration of interest statement. Read more on declaring conflicts of interest.

Clinical Trials Registry

In order to be published in a Taylor & Francis journal, all clinical trials must have been registered in a public repository at the beginning of the research process (prior to patient enrolment). Trial registration numbers should be included in the abstract, with full details in the methods section. The registry should be publicly accessible (at no charge), open to all prospective registrants, and managed by a not-for-profit organization. For a list of registries that meet these requirements, please visit the WHO International Clinical Trials Registry Platform (ICTRP). The registration of all clinical trials facilitates the sharing of information among clinicians, researchers, and patients, enhances public confidence in research, and is in accordance with the ICMJE guidelines.

Complying With Ethics of Experimentation

Please ensure that all research reported in submitted papers has been conducted in an ethical and responsible manner, and is in full compliance with all relevant codes of experimentation and legislation. All papers which report in vivo experiments or clinical trials on humans or animals must include a written statement in the Methods section. This should explain that all work was conducted with the formal approval of the local human subject or animal care committees (institutional and national), and that clinical trials have been registered as legislation requires. Authors who do not have formal ethics review committees should include a statement that their study follows the principles of the Declaration of Helsinki.

Consent

All authors are required to follow the ICMJE requirements on privacy and informed consent from patients and study participants. Please confirm that any patient, service user, or participant (or that person's parent or legal guardian) in any research, experiment, or clinical trial described in your paper has given written consent to the inclusion of material pertaining to themselves, that they acknowledge that they cannot be identified via the paper; and that you have fully anonymized them. Where someone is deceased, please ensure you have written

consent from the family or estate. Authors may use this Patient Consent Form, which should be completed, saved, and sent to the journal if requested.

Health and Safety

Please confirm that all mandatory laboratory health and safety procedures have been complied with in the course of conducting any experimental work reported in your paper. Please ensure your paper contains all appropriate warnings on any hazards that may be involved in carrying out the experiments or procedures you have described, or that may be involved in instructions, materials, or formulae.

Please include all relevant safety precautions; and cite any accepted standard or code of practice. Authors working in animal science may find it useful to consult the International Association of Veterinary Editors' Consensus Author Guidelines on Animal Ethics and Welfare and Guidelines for the Treatment of Animals in Behavioural Research and Teaching. When a product has not yet been approved by an appropriate regulatory body for the use described in your paper, please specify this, or that the product is still investigational.

Submitting Your Paper

This journal uses ScholarOne Manuscripts to manage the peer-review process. If you haven't submitted a paper to this journal before, you will need to create an account in ScholarOne. Please read the guidelines above and then submit your paper in the relevant Author Centre, where you will find user guides and a helpdesk.

If you are submitting in LaTeX, please convert the files to PDF beforehand (you will also need to upload your LaTeX source files with the PDF).

Please note that *Mitochondrial DNA Part A* uses Crossref™ to screen papers for unoriginal material. By submitting your paper to *Mitochondrial DNA Part A* you are agreeing to originality checks during the peer-review and production processes.

On acceptance, we recommend that you keep a copy of your Accepted Manuscript. Find out more about sharing your work.

Publication Charges

There are no submission fees or page charges for this journal.

Colour figures will be reproduced in colour in your online article free of charge. If it is necessary for the figures to be reproduced in colour in the print version, a charge will apply.

Charges for colour figures in print are £300 per figure (\$400 US Dollars; \$500 Australian Dollars; €350). For more than 4 colour figures, figures 5 and above will be charged at £50 per figure (\$75 US Dollars; \$100 Australian Dollars; €65). Depending on your location, these charges may be subject to local taxes.

Copyright Options

Copyright allows you to protect your original material, and stop others from using your work without your permission. Taylor & Francis offers a number of different license and reuse options, including Creative Commons licenses when publishing open access. Read more on publishing agreements.

Complying with Funding Agencies

We will deposit all National Institutes of Health or Wellcome Trust-funded papers into PubMedCentral on behalf of authors, meeting the requirements of their respective open access policies. If this applies to you, please tell our production team when you receive your article proofs, so we can do this for you. Check funders' open access policy mandates [here](#). Find out more about sharing your work.

Open Access

This journal gives authors the option to publish open access via our Open Select publishing program, making it free to access online immediately on publication. Many funders mandate publishing your research open access; you can check open access funder policies and mandates [here](#).

Taylor & Francis Open Select gives you, your institution or funder the option of paying an article publishing charge (APC) to make an article open access. Please contact openaccess@tandf.co.uk if you would like to find out more, or go to our Author Services website.

For more information on license options, embargo periods and APCs for this journal please go [here](#).

ANEXO B - CURRICULUM VITAE (LATTES)**Crislaine Xavier da Silva**

Curriculum Vitae restrito ao período de 03/2014 a 03/2018

Dados pessoais**Nome** Crislaine Xavier da Silva

Formação acadêmica/titulação

- 2014** Doutorado em Genética.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: Estudo da diversidade genética de *Euchroma gigantea* (Coleoptera: Buprestidae): contribuições à elucidação do status taxonômico e mecanismos evolutivos
Orientador: Dra. Rita de Cássia de Moura
Co-orientador: Dr. Diogo Cavalcanti Cabral de Mello
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2011 - 2013** Mestrado em Biologia Celular e Molecular Aplicada.
Universidade de Pernambuco, UPE, Recife, Brasil
Título: Mapeamento físico de sequências de DNAs repetidos e análise do transposon *MarMITE* no genoma de *Dichotomius schiffleri* (Coleoptera; Scarabaeidae), Ano de obtenção: 2013
Orientador: Dra. Rita de Cássia de Moura
Co-orientador: Dr. Diogo Cavalcanti Cabral de Mello
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco
- 2007 - 2010** Graduação em Ciências Biológicas.
Universidade de Pernambuco, UPE, Recife, Brasil
Título: Caracterização cariotípica de *Coprophanaeus (Metallophanaeus) pertyi* (Coleoptera: Scarabaeidae) com ênfase em aspectos cromossômico-evolutivos
Orientador: Dra. Rita de Cássia de Moura
Bolsista do(a): Programa de Fortalecimento Acadêmico da Universidade de Pernambuco

Formação complementar

- 2016 - 2016** Marcadores moleculares em genética e genômica, filogenia e taxonomia. (Carga horária: 88h).
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA, Brasília, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Vínculo institucional

2014 - Atual Vínculo: Estudante, Enquadramento funcional: Estudante de doutorado, Regime: Dedicação exclusiva

2. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP

Vínculo institucional

2016 - 2016 Vínculo: Visitante, Enquadramento funcional: Estudante de doutorado, Regime: Dedicação exclusiva

Atividades

04/2016 - 10/2016 Outra atividade técnico-científica, Instituto de Biociências de Rio Claro
Especificação:
*Realização de experimentos do projeto "Estudo da diversidade genética de *Euchroma gigantea* (Coleoptera: Buprestidae): contribuições à elucidação do status taxonômico e mecanismos evolutivos"*

Projetos

Projetos de pesquisa

2015 - Atual Diversidade genética de *Dichotomius schiffleri* e dinâmica evolutiva de elementos transponíveis no complexo sericeus (Coleoptera: Scarabaeidae): contribuições conservacionistas e cromossômico evolutivas

Descrição: Os besouros escarabeíneos são considerados bons bioindicadores de conservação ambiental e merecem destaque devido à sua importância para o funcionamento do ecossistema (reciclagem de matéria orgânica), à abundância de seus representantes nos diferentes habitats, à formação de grupos ecológicos bem definidos e aos métodos de captura facilmente padronizados. Algumas espécies desse grupo são encontradas em regiões de restinga, que são áreas de mata próximas ao litoral e que desde a colonização vem sofrendo degradação pela ação do homem, principalmente devido à alta especulação imobiliária. A espécie *Dichotomius schiffleri* (popularmente conhecida como rola-bosta), por exemplo, está em perigo de extinção e a principal causa disso é a perda do habitat. A realização de estudos de diversidade genética de populações dessa

espécie é imprescindível, pois visa compreender como esta espécie se comporta diante da degradação do seu habitat, o que é fundamental para futuro planejamento de áreas de manejo e trabalhos de conservação da espécie. Além disso, saber a localização de algumas sequências de DNA nos cromossomos contribuem para conhecer melhor o genoma de *D. schiffleri* e outras espécies evolutivamente próximas. Portanto, neste trabalho, diferentes populações da espécie *D. schiffleri* serão coletadas em regiões do litoral brasileiro, incluindo Pernambuco, e serão analisadas com base em suas sequências de DNA quanto à diversidade genética populacional e a localização de algumas dessas sequências nos cromossomos. Os dados obtidos serão úteis no direcionamento dos esforços de conservação da espécie, pois contribuirão para melhor entendimento da sua diversidade, organização genômica e estrutura genética das populações analisadas. Por fim, é importante destacar que o presente projeto está em sintonia com propostas baseadas em políticas públicas ambientais designadas pelos governos federal e de Pernambuco. Desta forma, este trabalho atende alguns princípios e objetivos firmados nestas políticas, tais como: preservação e conservação da biodiversidade, uso sustentado dos recursos naturais, proteção da flora e fauna, dos processos ecológicos essenciais à promoção do manejo ecológico das espécies e ecossistemas, preservação da biodiversidade e integridade do patrimônio genético e estímulo ao estudo, à pesquisa e ao desenvolvimento de tecnologias orientadas para o uso racional e a proteção de florestas e demais formas de vegetação.

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (1); Mestrado acadêmico (1); Doutorado (2);

Integrantes: Crislaine Xavier da Silva; Rita de Cássia de Moura (Responsável); Diogo Cavalcanti Cabral-de-Mello; Aline Priscila Felix; Geyner Alvez dos Santos Cruz ; Rafaelle Grazielle Coelho da Costa; Igor Costa Amorim; Fernando Augusto Barbosa Silva

Financiador(es): Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco-FACEPE

2014 - Atual Estudo da diversidade genética de *Euchroma gigantea* (Coleoptera: Buprestidae): contribuições à elucidação de status taxonômico e mecanismos evolutivos

Descrição: O gênero *Euchroma* Solier, 1833, faz parte da família da família Buprestidae (Coleoptera) e é monotípico para *Euchroma gigantea*. Devido a sua alta capacidade de reprodução e voracidade das larvas *E. gigantea*, vulgarmente conhecida como mãe-de-sol, tem sido considerada praga em espécies arbóreas, tanto ornamentais quanto de importância agrícola, causando prejuízos diretos na própria planta, que cai facilmente pela ação dos ventos devido a perda do sistema de sustentação, e indiretos, resultantes de danos causados pela queda das árvores. Foram descritas seis variedades para *E. gigantea* e análises citogenéticas nesta espécie revelaram a presença de seis citótipos com número diploide variando de $2n = 24$ a $2n = 36$, todos com mecanismo de determinação sexual múltiplo $X_1Y_1X_2Y_2X_3Y_3$ e a presença de cromossomos supernumerários (5 a 32). Até o presente não foram realizados estudos correlacionando as variedades de *E. gigantea* com as variações citogenéticas, bem como dados cariotípicos com o resultado de outros marcadores genéticos em diferentes populações. Propomos estudar sete populações de *E. gigantea* utilizando marcadores moleculares, o que contribuirá efetivamente para verificação do

status de espécie e conhecimento de padrões de diversidade genômica das populações, e marcadores citogenéticos, que permitirão estudar a diversidade cariotípica e organização genômica da espécie, contribuindo para elucidação dos mecanismos cromossômicos evolutivos presentes no gênero *Euchroma*.

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico (1); Doutorado (1);

Integrantes: Crislaine Xavier da Silva; Rita de Cássia de Moura (Responsável); Diogo Cavalcanti Cabral-de-Mello; Rógean Soares

Financiador(es): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES

Prêmios e títulos

2017 3º Lugar - Modelo evolutivo de diversificação cromossômica na espécie *Euchroma gigantea* (Buprestidae, Coleoptera), VII Jornada de Pós-Graduação de Genética - Universidade Federal de Pernambuco

2016 1º Lugar - Prêmio Jovem Geneticista - Evidências cromossômicas e moleculares de especiação críptica em *Euchroma gigantea* (Buprestidae, Coleoptera), XXI Encontro de Genética do Nordeste/Sociedade Brasileira de Genética

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. **XAVIER,C.**; Soares, R; Amorim, IC; Cabral-de-Melo, DC; Moura, RC
Insights into the karyotype evolution and speciation of the beetle *Euchroma gigantea* (Coleoptera: Buprestidae). Chromosome Research, 2018.V 1-16

2. **XAVIER,C.**; Cabral-De-Melo, DC; Moura, RC
Heterochromatin and molecular characterization of *DsmarMITE* transposable element in the beetle *Dichotomius schiffleri* (Coleoptera: Scarabaeidae). Genetica ('s-Gravenhage). , v.142, p.575 - 581, 2014.

Artigos aceitos para publicação

2. Igor Costa Amorim; Rafaelle Grazielle C. Costa; **XAVIER,C.**; Moura, RC
Characterization and population mapping of the *DgmarMITE* transposon in *Dichotomius (Luederwaldtinia) sericeus* species complex (Coleoptera: Scarabaeidae). Genetics and Molecular Biology, 2018.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. SILVA, J. N.; COSTA M.R.; **XAVIER C.**; AMORIM, I.C.; MOURA R.C Mapeamento cromossômico do microsatélite AG₁₅ em espécies do grupo *Dichotomius* (*Luederwaldtinia*) *sericeus* (Coleoptera: Scarabaeidae). In: **VII Jornada de pós-Graduação de Genética**, 2017
2. COSTA M.R.; CRUZ, G.A.S.; **XAVIER C.**; AMORIM, I.C.; MOURA R.C Caracterização e dinâmica evolutiva de DNA satélite em *Dichotomius schiffleri* (Coleoptera:Scarabaeidae). In: **VII Jornada de pós-Graduação de Genética**, 2017
3. **XAVIER,C.**; SOARES, R; RIBEIRO, K. C. S.; CABRAL-DE-MELO, DC; MOURA, RC
Evidências cromossômicas e moleculares de especiação críptica em *Euchroma gigantea* (Buprestidae, Coleoptera). In: Encontro de Genética do Nordeste, 2016, Recife - Pernambuco.
Anais do XXI Encontro de Genética do Nordeste, 2016. v.1. p.158 - 158
4. COSTA, C. M. Q.; **XAVIER,C.**; FERREIRA NETO, CA; BARRETO, J. W.; MOURA, RC; LOUZADA, J.
Dung beetle communities in protected and unprotected areas of northeast Brazilian coast. In: X Reunión Latinoamericana de Scarabaeoidología, 2014, Colômbia. **Anais da X Reunión Latinoamericana de Scarabaeoidología**. 2014.
5. **XAVIER,C.**; RIBEIRO, K. C. S.; CABRAL-DE-MELO, DC; MOURA, RC
Novas evidências dos mecanismos cromossômico-evolutivos ocorrentes em *Euchroma gigantea* (Coleoptera, Buprestidae). In: XX ENGENE, 2014, Camina Grande - PB.
Anais do XX encontro de Genética do Nordeste. 2014.

Apresentação de trabalho e palestra

1. **XAVIER,C.**
Alto polimorfismo cromossômico em *Euchroma gigantea* (Buprestidae: Coleoptera), 2016. (Seminário,Apresentação de Trabalho)

Orientações e Supervisões

Trabalhos de conclusão de curso de graduação

1. Rógean Vinícius Santos Soares. **Análise do status taxonômico de *Euchroma gigantea* (Coleoptera: Buprestidae) utilizando DNA barcode (Coorientação)**. 2015. Curso (Ciências Biológicas) - Universidade de Pernambuco
2. Karol Cristianne Silva Ribeiro. **Análises de polimorfismos cromossômicos em *Euchroma gigantea* (Coleoptera: Buprestidae)**. 2015. Curso (Ciências Biológicas) - Universidade de Pernambuco

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) **V Reunião Brasileira de Citogenética e Citogenômica**, 2017. (Congresso)
Caracterização e mapeamento cromossômico de duas famílias de DNA satélite em *Euchroma gigantea* (Coleoptera: Buprestidae).
2. **VII Jornada de pós-Graduação de Genética**, 2017. (Outra)
Modelo evolutivo de diversificação cromossômica na espécie *Euchroma gigantea* (Buprestidae, Coleoptera).
3. Apresentação Oral no(a) **XXI Encontro de Genética do Nordeste**, 2016. (Encontro)
Evidências cromossômicas e moleculares de especiação críptica em *Euchroma gigantea* (Buprestidae, Coleoptera).
4. Apresentação de Poster / Painel no(a) **4ª Reunião Brasileira de Citogenética**, 2015. (Congresso)
Variabilidade cariotípica e dispersão de sítios de DNAr 18S em *Euchroma gigantea* (Coleoptera: Buprestidae).
5. **V Jornada de Pós-Graduação em Genética**, 2015. (Outra)
Mapeamento cromossômico de DNAr e sequências teloméricas em *Euchroma gigantea* (Buprestidae, Coleoptera): evidências sobre a evolução cariotípica.
6. Apresentação de Poster / Painel no **XX Encontro de Genética do Nordeste**, 2014. (Encontro)
Novas evidências dos mecanismos cromossômico-evolutivos ocorrentes em *Euchroma gigantea* (Coleoptera, Buprestidae).

Organização de evento

1. **XAVIER, C.**; Comissão discente de organização
Encontro de Pós-graduação e pesquisa, 2014. (Outro, Organização de evento)

Bancas

Participação em banca de trabalhos de conclusão Graduação

1. **XAVIER, C.**; **ROCHA, M.F.**
Participação em banca de Rafaelle Grazielle Coelho da Costa. **Ocorrência, caracterização e localização cromossômica de elementos de transposição**

em *Dichotomius Aff sericeus* (Coleoptera: Scarabaeidae), 2015
(Ciências Biológicas) Universidade de Pernambuco

Participação em banca de comissões julgadoras

1. **Avaliadora Ad Hoc do II Encontro de Extensão e Cultura - ENExC**, 2016
Universidade Federal de Pernambuco

2. **Membro da comissão de avaliação dos pôsteres do Encontro de Pós-Graduação e Pesquisa da UPE**, 2014
Universidade de Pernambuco