
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

VITÓRIA LOUREJAN FERREIRA

**EVOLUÇÃO MOLECULAR DOS
CROMOSSOMOS SEXUAIS DE *Piezodorus
guildinii* COM BASE NOS DNAs SATÉLITES
(HETEROPTERA, PENTATOMIDAE)**



Rio Claro - SP
2022

VITÓRIA LOUREJAN FERREIRA

**EVOLUÇÃO MOLECULAR DOS CROMOSSOMOS SEXUAIS DE
Piezodorus guildinii COM BASE NOS DNAs SATÉLITES
(HETEROPTERA, PENTATOMIDAE)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de bacharela em ciências biológicas.

Orientador: Diogo Cavalcanti Cabral de Mello

Coorientador: Vanessa Bellini Bardella

Rio Claro - SP
2022

F383e Ferreira, Vitoria Lourejan
Evolução molecular dos cromossomos sexuais de *Piezodorus guildinii* com base nos dnas satélites (Heteroptera, Pentatomidae) / Vitoria Lourejan Ferreira. -- Rio Claro, 2022
27 p. : tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientador: Diogo Cavalcanti Cabral de Mello
Coorientadora: Vanessa Bellini Bardella

1. Genética. 2. DNAs satélites. 3. Cromossomos holocêntricos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

VITÓRIA LOUREJAN FERREIRA

**EVOLUÇÃO MOLECULAR DOS CROMOSSOMOS SEXUAIS DE
Piezodorus guildinii COM BASE NOS DNAs SATÉLITES
(HETEROPTERA, PENTATOMIDAE)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro, da
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita
Filho", para obtenção do grau de Bacharela em
Ciências Biológicas.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Diogo Cavalcanti Cabral de Mello (orientador)

Prof. Dr. Vanessa Bellini Bardella (coorientador)

Prof. Dr. Patricia Pasquali Parise Maltempo

Mestre Marcelo João da Silva

Aprovado em: 28 de NOVEMBRO de 2022

VITÓRIA LOUREJAN FERREIRA
Assinatura do discente

Diogo C. Cabral de Mello
Assinatura do(a) orientador(a)

Vanessa Bellini Bardella
Assinatura do(a) coorientador(a)

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer minha mãe, Shirlei Maria, e minha tia, Lourdes, por todo apoio e amor durante minha graduação e elaboração desse projeto.

Agradeço também aos amigos que já tinha antes de ingressar na minha jornada na Unesp, que continuaram me apoiando mesmo estando longe.

Agradeço os professores e docentes que aceitaram ser da comissão avaliadora desse projeto, Patrícia Pasquali Parise Maltempi, Marcelo João da Silva, Maria Aparecida Marin Morales e Carolina Crepaldi.

Agradeço ao meu orientador Diogo, por me dar a oportunidade de aprender e trabalhar nesse projeto com os DNAs satélites.

Agradeço a Vanessa, por estar comigo em todos os experimentos, me guiando no aprendizado tanto na parte experimental, quanto na parte de escrita e bioinformática. Devido ao seu apoio e incentivo, decidi tentar continuar na carreira acadêmica e por isso agradeço muito.

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPQ.

RESUMO

DNAs repetitivos são muito comuns no genoma de eucariotos e um dos tipos que mais ocorrem são os DNAs satélites. A família Pentatomidae da subordem Heteroptera exibe vários representantes classificados como inseto praga de muitas lavouras de importância agrícola. Nesse sentido, desvendar a evolução molecular de seus cromossomos sexuais com base nos DNAs satélites concretiza-se como uma ferramenta tanto para desvendar a evolução molecular desses cromossomos, quanto para a realização de futuros controles biológicos dessas espécies. Desse modo, foram analisados o genoma de baixa cobertura do macho e da fêmea dentro da plataforma RepeatExplorer. Este forneceu arquivos de saída com os prováveis DNAs satélites, bem como uma estimativa da porcentagem destes em cada amostra utilizada para a busca dos DNA satélites dentro dos genomas analisados. Isso forneceu um direcionamento para a seleção de DNA satélites provavelmente exclusivos ou muito abundantes nos cromossomos sexuais. Com a delimitação desses DNA satélites foi realizada a busca destes monômeros em todo o genoma, por meio do RepeatMasker. Além disso, foram geradas a variação de nucleotídeos dentro em cada DNA satélite tendo como parâmetro a divergência de Kimura (K2P). Todos os DNAs satélites previamente selecionados foram localizados nos cromossomos através da hibridização in situ, tendo-se como sonda os monômeros consenso de cada DNA satélite. Todo o comprometimento desses DNAs satélites na evolução dos cromossomos sexuais de *Piezodorus guildinii* foi discutido.

Palavras-chave: DNA satélite; Pentatomidae; cromossomos sexuais.

ABSTRACT

Repetitive DNA are very common in the genome of eukaryotes and one of the most common types in satellite DNA. The family Pentatomidae of the suborder Heteroptera exhibits several representatives classified as insect pests of many crops of agriculture importance. In this sense, unraveling the molecular evolution of these chromosomes and to carry out future biological control of these species. Thus, the low coverage genome of male and female were analyzed within the RepeatExplorer platform. This provided output files with probable satellite DNA, as well as an estimate of the percentage of these in each sample used to search for satellite DNAs within the analyzed genomes. This provided guidance for the selection of likely exclusive or very abundant satellite DNAs in the sex chromosomes. With the delimitation of these satellite DNAs, the search for these monomers was carried out throughout the genome, using RepeatMasker. In addition, the nucleotide variation within each satellite DNA was generated using the Kimura divergence (K2P) parameter. All previously selected satellite DNAs were located in the chromosomes through in situ hybridization, using the consensus monomers of each satellite DNA as a probe. The entire involvement of these satellite DNAs in the evolution of *Piezodorus guildinii* sex chromosomes was discussed.

Keywords: Satellite DNA; Pentatomidae; Sex chromosomes.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO...	06
2	OBJETIVOS.....	08
2.1	Objetivo geral.....	08
2.2	Objetivos específicos	08
3	METODOLOGIA... ..	09
3.1	Material biológico e preparo de lâminas	09
3.2	Prospecção, isolamento e mapeamento cromossômico de DNAs repetitivos.....	09
4	RESULTADOS	11
5	DISCUSSÃO.....	21
6	CONCLUSÃO.....	23
	REFERÊNCIAS.....	24

1 INTRODUÇÃO

Os DNAs repetitivos compreendem considerável proporção no genoma dos eucariotos (Charlesworth et al. 1994, Nowak 1994). Diferentes estudos destas sequências têm apontado para o envolvimento desta fração do genoma na codificação de proteínas e RNAs, organização e atividade dos centrômeros, telômeros, segregação cromossômica, regulação gênica, reparo e replicação do DNA e diferenciação de cromossomos sexuais (Anleitner e Haymer 1992, Kraemer e Schmid 1993). Com relação à distribuição no genoma são observados DNAs repetitivos dispersos (elementos de transposição) ou em tandem (repetidos um após o outro). Os DNAs repetidos em tandem são principalmente os DNAsat que variam em sequência de nucleotídeos, tamanho da sequência, número de cópias e organização cromossômica (Charlesworth et al. 1994). Essas sequências também são o principal componente da heterocromatina e se encontram localizadas nas regiões pericentroméricas e teloméricas dos cromossomos monocêntricos, que possuem centrômero localizado (Yunis e Yasmineh 1971).

A subordem Heteroptera apresenta mais de 40.000 espécies descritas e é um dos grupos com maior sucesso na radiação adaptativa de insetos (Weirauch e Schuh 2011). Esses insetos destacam-se na citogenética pela presença de cromossomos holocêntricos (sem centrômero localizado) e pela meiose invertida nos cromossomos sexuais (Papeschi e Bressa 2006). O número cromossômico em Heteroptera varia de $2n = 4$ (*Lethocerus sp.*, *Belostomatidae*) a $2n = 80$ (quatro espécies de *Lopidea* Uhler, *Miridae*), com o predomínio de cinco números cromossômicos (números modais): i) $2n = 14$ (460 espécies), ii) $2n = 16$ (186 espécies), iii) $2n = 34$ (92 espécies), iv) $2n = 12$ (89 espécies) e v) $2n = 13$ (80 espécies) (Ueshima 1979, Papeschi e Bressa 2006). Tal diversidade pode ser atribuída à variação no número de autossomos ou aos cromossomos sexuais. Neste caso, foram descritos diferentes sistemas cromossômicos de determinação sexual, nos quais os sistemas múltiplos estão presentes em 13,5% das espécies (Papeschi e Bressa 2006).

Com relação à distribuição heterocromática são observados nos heterópteros bandas-C positivas sobretudo nos terminais cromossômicos (Bressa et al. 2005; Papeschi e Bressa 2006; Bressa et al. 2008). Dentro da família Pentatomidae, o gênero *Edessa*, exibe essa distribuição heterocromática para diferentes espécies. Entretanto, essas regiões divergem entre as espécies de acordo com a riqueza de pares de bases AT e CG (Bardella et al. 2014a). Há também blocos intersticiais em diferentes famílias de heterópteros. Estas muitas vezes são correlacionadas às regiões organizadoras nucleolares (RONS) que podem estar tanto em autossomos e cromossomos sexuais. Essas bandas foram descobertas em famílias como Pentatomidae, Coreidae, Reduviidae e Belostomatidae (Bardella, 2014).

A evolução de cromossomos autossômicos para cromossomos sexuais ocorreu mais de uma vez para vários grupos de animais. Mesmo sendo uma evolução independente, existem várias características convergentes nesses cromossomos sexuais, como a determinação sexual feita pela determinação de um gene presente nesse cromossomo sexual. Com essa característica se descobriu o sistema heterogamético, em que um dos cromossomos determinam o sexo do indivíduo e apresentam uma diferença genética entre os sexos. Podem ocorrer casos de cromossomos XY ou ZW no caso de machos e XX e ZZ no caso de fêmeas. Em Orthoptera existem variações no cariótipo em decorrência do sistema de determinação cromossômica sexual. Mas diversas espécies dentro desta ordem exibem frequentemente o sistema sexual X0/XX, o qual provavelmente evoluiu do sistema XY/XX pela perda do cromossomo Y (Ferreti et al. 2020). Em Lepidoptera, o sistema de determinação sexual mais comum é o WZ/ZZ, juntamente com o sistema Z/ZZ. Este é encontrado em linhagens mais basais mostrando assim que o cromossomo W foi adquirido posteriormente (Silva, 2021)

A família Pentatomidae apresenta mais de 4.700 espécies, sendo sua maioria fitófagos que causam danos permanentes às plantas (brotos, sementes ou flores) gerando um prejuízo econômico em diferentes lavouras agrícolas (Yamanaka et al. 1990, Grazia et al. 2015). Embora bastante importante do ponto de vista econômico, não existe conhecimento sobre a evolução molecular dos cromossomos sexuais em Pentatomídeos.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Compreender o padrão de enriquecimento de DNA satélites na evolução no sistema de determinação sexual cromossômico de *P. guildinii*.

2.1 Objetivos específicos

- Comparar os genomas do macho e da fêmea de *P. guildinii* visando DNAs satélites abundantes do ponto de vista molecular em cada sexo;
- Realizar o mapeamento físico dos DNA satélites recorrentes em cada sexo em busca de sequências marcantes tanto no cromossomo Y quanto no cromossomo X.

3 METODOLOGIA

3.1 Material biológico e preparo de lâminas

Machos adultos de *Piezodorus guildinii* foram obtidos da empresa Pragas (Piracicaba, São Paulo/Brasil). Os testículos foram dissecados e fixados em etanol: ácido acético (3:1) e conservados em freezer -20 °C. Os corpos de machos adultos e fêmeas foram preservados em etanol 100% para extração do DNA genômico. As lâminas foram preparadas pela técnica maceração e espalhamento dos testículos com uma gota de ácido acético 50%, a qual foi evaporada em chapa aquecida. Em seguida as lâminas foram estocadas em freezer -20 °C até a aplicação das técnicas de citogenética clássica e molecular.

3.2 Prospecção, isolamento e mapeamento cromossômico de DNAs repetitivos

O DNA genômico de machos e fêmeas foram isolados utilizando o kit “Wizard® Genomic DNA Purification Kit” (Promega). O sequenciamento de baixa cobertura do genoma do macho e da fêmea de *P. guildinii* foi realizado pela empresa Novogene (USA). Os dados obtidos (sequências cruas = reads) foram selecionados por qualidade e tamanho por meio de comandos presentes na plataforma RepeatExplorer (Galaxy). Em seguida, foi realizada a clusterização dos DNAs satélites em cada genoma, sendo realizado ao mesmo tempo uma comparação entre os genomas para a visualização dos DNAs satélites recorrentes em cada sexo, tais processos foram realizados com uma amostra dos “reads” sequenciados. Os arquivos de saída do RepeatExplorer foram analisados, sendo selecionados os DNA satélites exclusivos ou muito abundante em cada sexo. Estes foram encaminhados, juntamente com os genomas de cada sexo, para o software RepeatMasker. Este realizou a varredura dos monômeros de cada DNA satélite frente ao total de “reads” obtidos no sequenciamento, resultando assim, no retorno das quantidades

aproximadas de cada DNA satélite em cada genoma. Isso forneceu uma ferramenta apurada para a seleção dos possíveis DNA satélites enriquecidos em cada cromossomo sexual. Além disso, a divergência genética entre os monômeros das sequências foi estimada considerando o modelo de Kimura 2-parameter implementado no RepeatMasker (Smit et al. 2013, Ruiz-Ruano et al. 2016). Estes dados permitiram a caracterização molecular e entendimento da evolução dos DNAs satélites.

Posteriormente, os DNA satélites selecionados foram isolados por meio da construção de iniciadores específicos para cada monômero junto ao programa Primer3. Para a amplificação dos monômeros foi usada a reação em cadeia da polímerase (PCR). Os produtos da PCR foram marcados com nucleotídeos específicos (Biotina 11-dUTP ou Digoxigenina 11-dUTP) por meio do sistema de marcação da Nick translation. A hibridização in situ fluorescente (FISH) seguiu o protocolo descrito por Cabral-de-Mello et al (2010). As sondas foram detectadas com anti-digoxigenin-Rhodamine ou alexafluor-488 e os cromossomos contracolorados com DAPI. As lâminas foram montadas com meio VECTASHIELD. As preparações foram observadas e fotografadas (em escala de cinza) em um microscópio Olympus BX61. As imagens foram sobrepostas e otimizadas em brilho e contraste usando-se Adobe Photoshop.

4 RESULTADOS

Os dados de saída (*output*) do programa *RepeatExplorer* exibiram 15 DNAs satélites (8 de baixa confiabilidade e 7 de alta confiabilidade) (Tabela 1). Neste programa também foi gerada uma abundância parcial dos DNA satélites por meio da proporção de “reads” obtidos em cada sexo (Tabela 1). A partir desse índice foi estipulado que DNAs satélites com o dobro de “reads” em um dos sexos seriam selecionados para a análise de abundância frente a todos os “reads” sequenciados, bem como a divergência de Kimura.

Desse modo, foram habilitados os satélites PguSat20, PguSat 112, PguSat157 e PguSat172 (Tabela 1). Estes DNAsats foram selecionados por exibirem abundância maior no genoma do macho do que na fêmea. Por outro lado, o PguSat138 exibiu o dobro da proporção de “reads” na fêmea do que no macho, sendo por isso, selecionado para as próximas análises (Tabela 1).

No *RepeatMasker* foram prospectados a abundância para os satélites perante todos os “reads” disponíveis pelo sequenciamento de baixa cobertura. Com isso, foram descobertos a abundância dos satélites presentes nos genomas dos machos e das fêmeas. Além disso, foi calculada a proporção efetiva de cada DNA satélite entre esses genomas. Também foram calculados a divergência de Kimura (K2P) para ambos os genomas como mostrados nas Figura 1(a-c) e na Tabela 2.

Dentre os 5 DNAsats analisados profundamente no *RepeatMasker* devido a relevância para os cromossomos sexuais, foi notado que o mais abundante em ambos os sexos foi o PguSat138 (Tabela 2). Já a proporção entre as abundâncias de macho e fêmea possibilitou a identificação do DNAsat mais relevante em cada sexo. Com isso, para o genoma do macho obtiveram destaque os DNAsat PguSat157 e PguSat112, sendo esses 1463x e 17x mais abundante no genoma do macho, respectivamente (Tabela 2). Já no genoma da fêmea apenas o PguSat138 teve destaque (Tabela 2).

Já os dados para a divergência nucleotídica apontaram uma similaridade neste índice para o PguSat138, PguSat172 e PguSat20 (Tabela 2). Porém, tanto

PguSat112 quanto PguSat157 exibiram uma proporção de variação maior no genoma da fêmea, sendo mais acentuada em PguSat157 com o genoma da fêmea apresentando um índice 4 vezes maior em relação ao genoma do macho (Tabela 2).

No gráfico da abundância versus a divergência nucleotídica de Kimura dos DNA satélites da fêmea exibiu o predomínio da composição de DNA satélites por poucos representantes (Figura 1a). O DNAsat que se sobressaiu devido à alta abundância foi PguSat20, sendo observado neste uma curva única. Já o PguSat138 foi o segundo mais abundante exibindo três extremidades de curvas. Os demais DNA satélites menos aparentes no gráfico devido à abundância reduzida (Figura 1a).

Já no gráfico do macho, foi notado um perfil de DNA satélites mais diferenciado, visto a observação clara de todos os DNAsat pesquisados (Figura 1b). Apesar disso, o PguSat20 continuou exibindo uma única curva preponderante em relação aos demais DNA satélites analisados (Figura 1b). Similarmente o PguSat138 apresentou três picos de curvas. Entretanto, foram notadas mais duas extremidades de curvas referentes ao PguSat172 e PguSat157, sendo a curva de PguSat112 menos acentuada.

No gráfico subtrativo, foram evidenciadas as diferenças entre os genomas do macho e da fêmea quanto a composição dos DNAs satélites, sendo em cima o genoma do macho e embaixo o genoma da fêmea. Nele podemos ver a maior diversidade de satélites no macho com os clusters PguSat112 e PguSat157 (Figura 1c). Além disso, podemos observar que os DNA satélites PguSat20 e PguSat138 são muito mais abundantes no genoma da fêmea (Figura 1c). Semelhantemente, a proporção subtrativa da abundância dos DNA satélites apontou um predomínio do PguSat112 e PguSat157 no genoma do macho (Figura 1c). Tais DNA satélite também exibiram apenas no genoma do macho dois picos de curva distintos quando plotados separadamente. Destaca-se que a curva para esses mesmos DNA satélites na fêmea não apresentou a presença de dois picos (Figura 2a e b). Em tal procedimento, ressaltou-se a abundância de PguSat112 e PguSat157 no genoma do macho.

No procedimento de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) foi possível ver em quais cromossomos os satélites estavam presentes, como mostrado nas figuras 3 e 4. O PguSat20 foi marcado no cromossomo sexual X e em quatro cromossomos bivalentes (Figura 3a-b). Similarmente, o PguSat138 também foi exibido no cromossomo sexual X, entretanto evidenciado em cinco cromossomos bivalentes (Figura 3e-f). Já no PguSat112 foram notados sinais de hibridização apenas no cromossomo sexual Y (Figura 3c-d). Mesmo cenário apresentado pelo PguSat157 (Figura 4a-b). Entretanto, o PguSat172 não apresentou sinal de hibridização (Figura 4c-d).

Tabela 1. DNA satélites de *P. guildinii* prospectados por meio do programa RepeatExplorer. Note o tamanho dos monômeros e a proporção de “reads” entre o genoma da fêmea e o do macho.

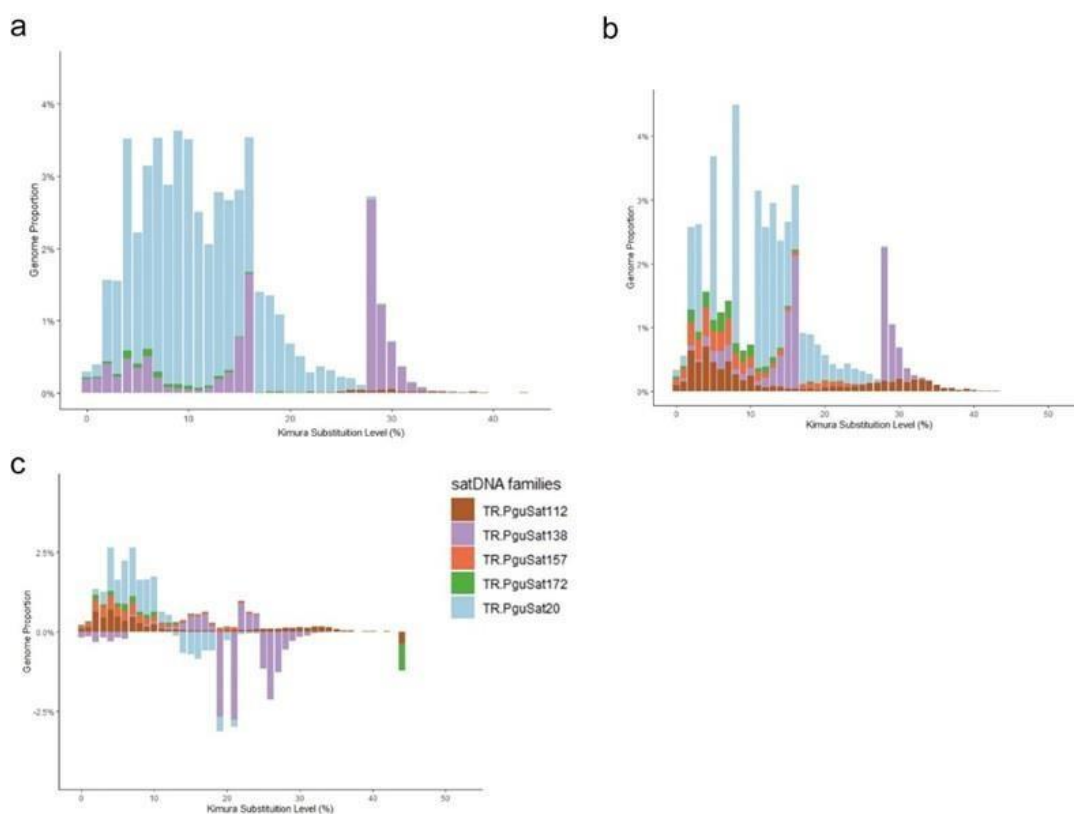
DNA satélite	Confiabilidade	Tamanho (Pares de base)	Proporção fêmea/macho
PguSat05	Baixa	163	3225/2584
PguSat12	Alta	162	834/800
PguSat20	Baixa	310	96/1061
PguSat42	Baixa	3603	199/187
PguSat62	Baixa	351	93/143
PguSat93	Alta	669	85/45
PguSat103	Baixa	187	44/61
PguSat112	Baixa	231	0/101
PguSat138	Alta	163	56/24
PguSat157	Baixa	550	0/72

PguSat172	Alta	77	13/50
PguSat188	Alta	340	32/22
PguSat217	Alta	292	24/21
PguSat227	Baixa	330	17/26
PguSat242	Alta	116	15/26

Tabela 2. Dados moleculares dos DNA satélites de *P. guildinii* em relação a todos os “reads” sequenciados no genoma da fêmea e do macho.

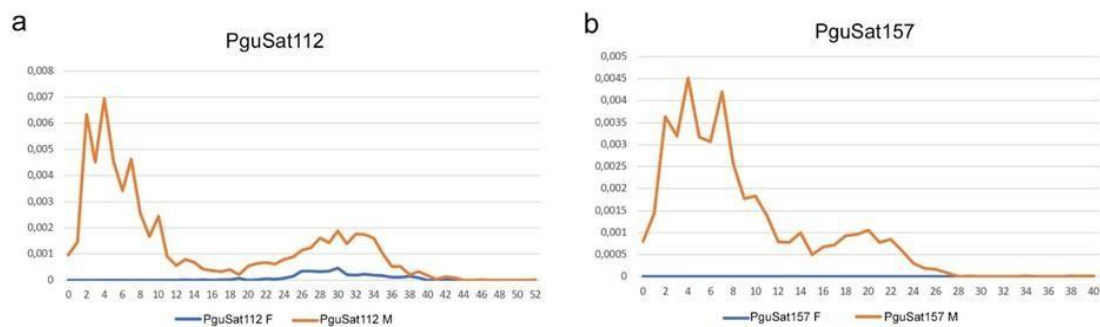
Satélite	Abundância fêmea (%)	Abundância macho (%)	Proporção Macho/fêmea	K2P fêmea	K2P macho
PguSat20	0,424384888	0,470675526	1,10907702	11.24	9.85
PguSat11 2	0,003680788	0,065099993	17,6864279	30.59	13.99
PguSat13 8	2,363819567	2,224246791	0,94095456	22.32	22.35
PguSat15 7	2,86875E-05	0,041984506	1463,51185	36.32	9.02
PguSat17 2	0,00843025	0,023187974	2,75056768	8.77	7.60

Figura 1. Gráficos comparativos entre a abundância e a divergência de Kimura para cada DNA satélite selecionado de *P. guildini* no genoma da fêmea (a), do macho (b), bem como a comparação entre fêmea e macho (c).



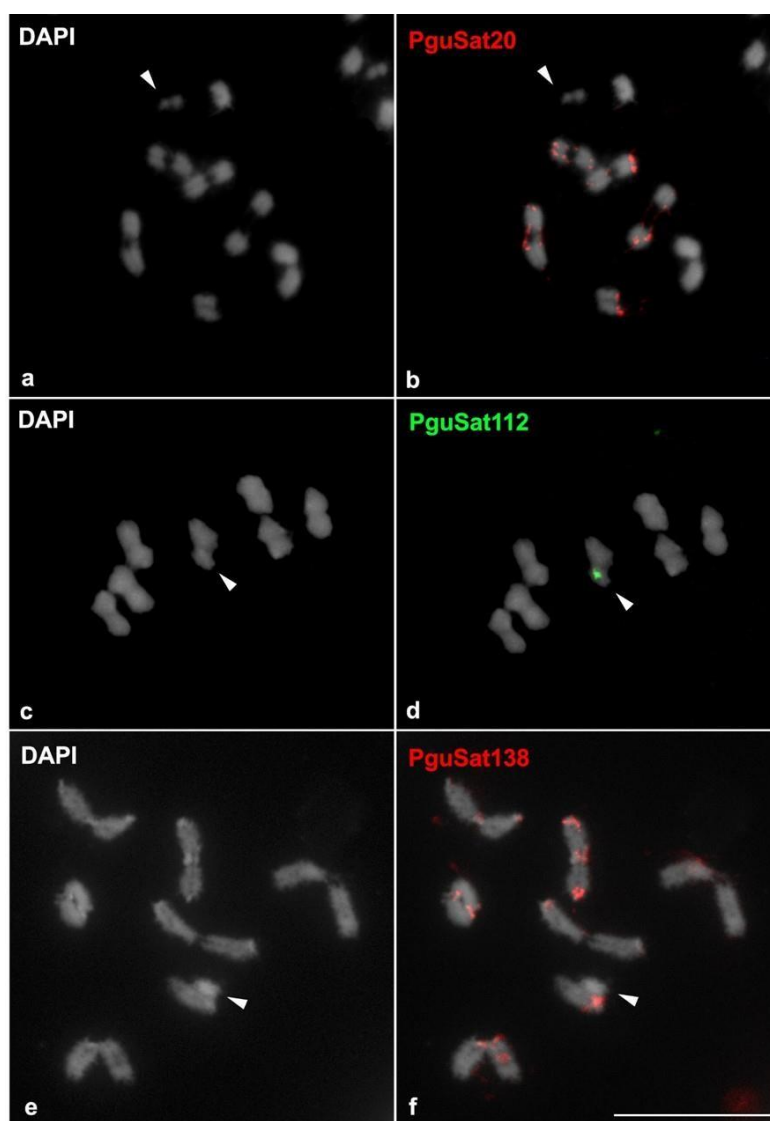
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 2. Gráfico em linha da abundância versus a divergência de Kimura para PguSat112 (a) e PguSat157 (b). Note a presença de dois picos em ambos os gráficos.



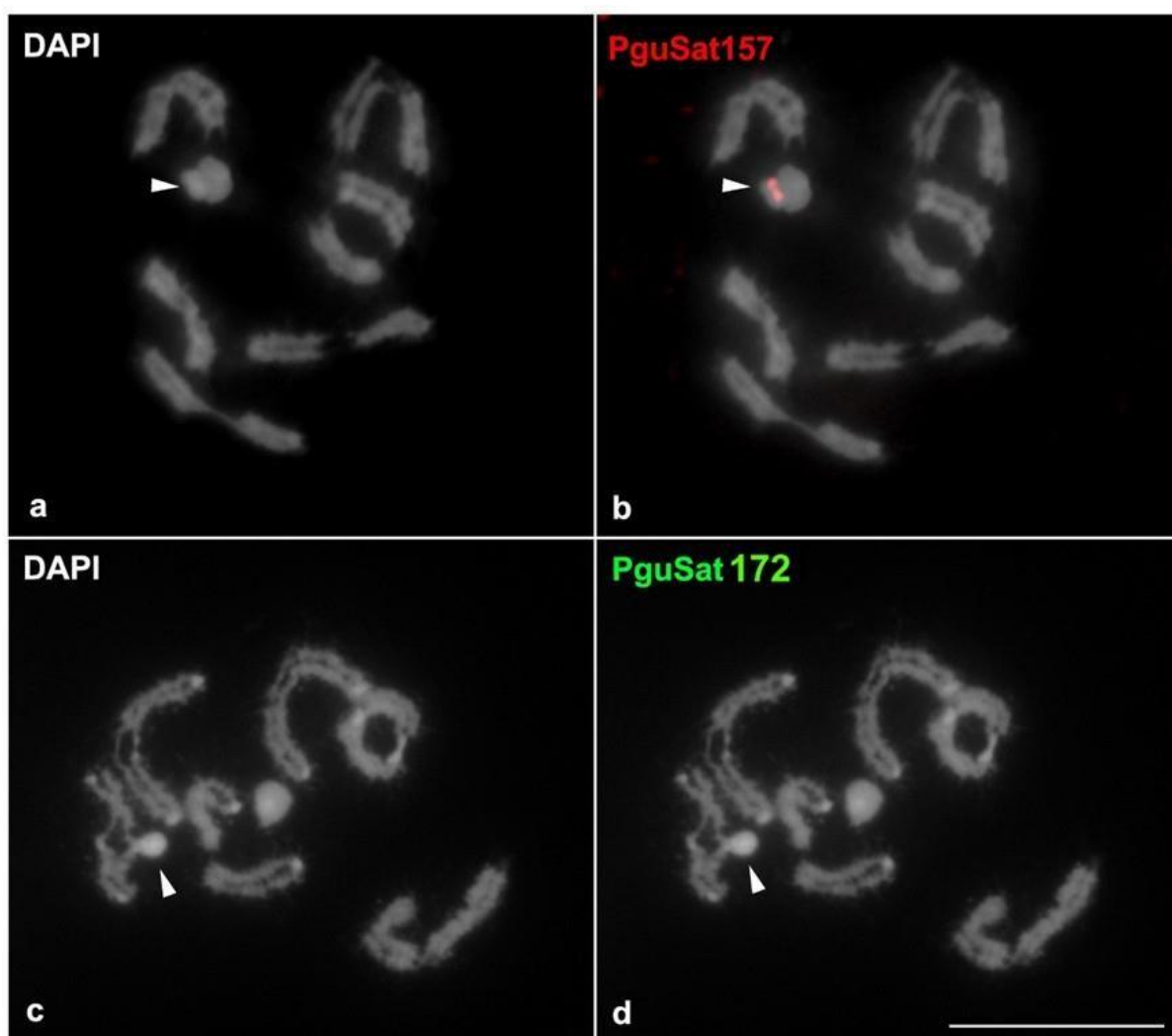
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 3. Hibridização *in situ* fluorescentes dos DNA satélites PguSat20 (a-b), PguSat112 (c-d) e PguSat138 (e-f) em células meióticas de *P. guildinii*. Ponta de setas indicam o cromossomo sexual Y. Observe a distribuição do PguSat20 e PguSat138 no cromossomo X e em alguns bivalentes. Note a presença de PguSat112 no cromossomo Y. Barra = 10µm.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 4. Hibridização *in situ* fluorescentes dos DNA satélites PguSat157 (a-b) e PguSat172 (c-d) em células meióticas de *P. guildinii*. Ponta de setas indicam o cromossomo sexual Y. Observe a presença de sinal no cromossomo Y de PguSat157. Barra = 10µm.



Fonte: Elaborada pelo autor.

5 DISCUSSÃO

Analizando a diferença de DNAs satélites entre os sexos de *P. guildinii* obtivemos um modo de traçar a evolução da composição dos cromossomos sexuais frente a esse tipo de DNA repetitivo. Dentro de Heteroptera há apenas estudos focados na comparação geral dos cariótipos frente aos DNAs satélites (Bardella et al. 2020; Pita et al 2017). Porém, o acompanhamento da evolução cromossômica com auxílio dos DNAs satélites vêm sendo recorrente dentro da ordem Orthoptera (Ferreti et al. 2020; Palacios-Gimenez et al. 2018). Na família Pentatomidae (Heteroptera), na qual está inserido *P. guildinii*, há o predomínio de espécies com o sistema de determinação sexual XX/XY (fêmea/macho) (Papeschi and Bressa 2006). Em diferentes tribos é recorrente a presença de heterocromatina nos cromossomos sexuais (Bressa et al 2005; Bardella et al 2014). Este fato torna viável a exploração de DNAs repetitivos nestes cromossomos, como feito no presente trabalho.

Os dados genômicos evidenciaram 15 DNAs satélites distribuídos na composição genômica de *P. guildinii*. Focando nos dados moleculares dos DNAsat de *P. guildinii*, observou-se uma similaridade destes dados com outros insetos que também exibem cromossomos holocêntricos, como por exemplo os representantes da ordem Lepidoptera (Cabral-de-Mello et al 2022). Além disso, houve ainda a semelhança do ponto de vista molecular com os insetos com cromossomos monocêntricos (Camacho et al 2022; Milani et al 2018; Palacios-Gimenez et al 2020; Silva 2021). Isso mostra que a natureza holocinética dos cromossomos de *P. guildinii*, isto é, distribuição das proteínas cinetocóricas por toda a extensão cromossômica (Hughes-Schrader and Schrader 1961), não influenciou as características moleculares dos DNAsat.

Focando nos DNAsat com concentração em algum sexo, foi notado a presença de cinco relevantes, seja no genoma feminino ou no masculino. A prospecção das abundâncias genômicas totais apontaram para um destaque do PguSat112 e PguSat157 no genoma do macho, sendo assim esse dado referente à composição do cromossomo Y visto os índices maiores presentes na proporção do genoma do macho frente o genoma da fêmea. Em contrapartida, o genoma da

fêmea mostrou-se enriquecido apenas com o PguSat138, sendo assim, um reflexo da composição cromossômica do cromossomo X. Ambos os dados adicionados aos perfis de *landscape* diferenciais em cada sexo (gráficos da abundância versus a divergência nucleotídica de Kimura) indicaram uma composição dos DNAsat diferencial associada para cada cromossomo sexual. Fato confirmado também pelo gráfico subtrativo. Essas informações conduzem a distintos graus de amplificação dos 5 DNA satélites, configurando composições repetitivas diferentes para os cromossomos sexuais, fato recorrente em outros organismos (Bachtrog 2013; Giovannotti et al 2018; Escudeiro et al. 2019; Ferreti et al 2020).

Com relação ao tempo de dispersão dos DNA satélites apresentados nos cromossomos sexuais de *P. guildinii*, foi notado que os dois DNA satélites abundantes no Y exibiram as maiores abundâncias de monômeros em valores baixos de divergência de Kimura. Isso sugere que a maioria dos monômeros desses DNAsat se diferenciaram pouco frente à sequência consenso de cada DNAsat. Desse modo, estima-se que houve uma massiva amplificação recente desses DNA satélites no genoma de *P. guildinii*. Adicionalmente, essa expansão recente é associada sobretudo ao cromossomo Y, visto o mapeamento cromossômico desses DNAsat detectados apenas neste cromossomo sexual. A amplificação diferencial e recente para os cromossomos sexuais já foi relatada para outros organismos com o sistema de determinação sexual XX/XY, assim como para outros sistemas de determinação sexual, tais como o neo-XY em *Ronderosia bergii* (Orthoptera) (Ferreti et al. 2020) e $WZ_1Z_2/Z_1Z_1Z_2Z_2$ em *Diatraea saccharalis* (Lepdoptera) (Silva 2021). Destaca-se que o acompanhamento da dispersão temporal do único DNAsat mapeado no cromossomo X (PguSat138) foi inviabilizada pelo compartilhamento desse DNA satélite com diferentes autossomos. Por meio do gráfico subtrativo obteve-se apenas um leve indício de amplificação tardia, devido às altas concentrações de monômeros em regiões com índice de diversidade nucleotídica de Kimura acentuada.

6 CONCLUSÃO

Em *Piezodorus guildini* dois DNA satélites foram encontrados abundantemente no cromossomo Y, enquanto o X compartilhou dois DNA satélites com os autossomos. Isso indica que nos cromossomos sexuais houve uma ruptura na composição repetitiva, resultando em caminhos evolutivos distintos para cada cromossomo sexual. Além disso, os DNAs satélites mostraram-se como uma ferramenta eficiente para a localização física assertiva para o cromossomo Y em *P. guildinii*. Ampliando esses achados para Heteroptera, supostamente poderemos finalmente identificar o cromossomo Y de forma precisa, visto que se tem acesso facilitado apenas ao material dos indivíduos machos.

REFERÊNCIAS

ANLEITNER J.E.; HAYMER D.S.Y. Enriched and Y specific DNA sequences from the genome of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. **Chromosoma**, Alemanha, 101: 271-8,1992. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1533581/> Acesso em:05 de jun. 2022.

BRESSA M.J.; FRANCO M.J.; TOSCANI M.A. Heterochromatin heteromorphism in *Holhymenia rubiginosa* (Heteroptera: Coreidae). **European Journal of Entomology**, República Checa, 65-72, 2008. Disponível em:<http://www.eje.cz/artkey/eje-200801-0009.php> Acesso em: 05 de jun. 2022.

BRESSA M.J.; LARRAMENDY M.; PAPESCHI A.G. Heterochromatin characterization in five species of Heteroptera. **Genetica**, Holanda, 124:307–317,2005. Disponível em:<https://link.springer.com/article/10.1007/s10709-005-4524-3> Acesso em: 05 de jun. 2022.

BARDELLA V.B.; GRAZIA J., FERNANDES J.A.M.; VANZELA A.L.L. High diversity in CMA3/DAPI-banding patterns in heteropterans. **Cytogenet Genome Research**, Suíça, 142(1):43–53,2014.Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24060939/> Acesso em: 05 de jun. 2022.

BARDELLA V.B. **Comportamento e organização dos cromossomos holocêntricos de heterópteros da região Sul do Brasil baseados em sequências repetitivas DNA, meiose e análise ultraestrutural**, 2014. 124 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2014. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/122183> Acesso em: 05 de jun. 2022.

BARDELLA V.B.; FERNANDES J.A.M.; CABRAL-DE-MELLO D.C. Chromosomal evolutionary dynamics of four multigene families in Coreidae and Pentatomidae (Heteroptera) true bugs. **Molecular Genetics and Genomics**, Suíça, 291:1919-1925,2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27380138/> Acesso: 05 de jun. 2022.

CABRAL-DE-MELLO DIOGO C.; ZRZAVÁ M.; KUBÍČKOVÁ S.; RENDÓN P.; MAREC F. The Role of Satellite DNAs in Genome Architecture and Sex Chromosome Evolution in Crambidae Moths. **Frontiers in Genetics**, Suíça ,Vol 12, 2021. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2021.661417/full> Acesso em: 05 de jun 2022.

CABRAL-DE-MELLO D.C.; MOURA R.C.; MARTINS C. Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the beetle *Dichotomius geminatus* provides the first evidence for an association of 5S rRNA and histone H3 genes in insects, and repetitive DNA similarity between the B chromosome and A complement. **Heredity**, Londres, 104: 333-400,2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19756039/> Acesso em: 05 de jun. 2022.

CAMACHO, J. P. M.; CABRERO, J.; LÓPEZ-LEÓN, M. D.; MARTÍN-PECIÑA, M.; PERFECTI, F.; GARRIDO-RAMOS, M. A.; RUIZ-RUANO, F. J., Satelliteome comparison of two oedipodine grasshoppers highlights the contingent nature of satellite DNA evolution. **BMC Biology**, Londres, 20:36,2022. Disponível em: <https://bmcbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12915-021-01216-9> Acesso em: 05 de jun. 2022

CHARLESWORTH B., SNIEGOWSKI P., STEPHAN W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**, Londres, 371: 215-220,1994. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/371215a0> Acesso em: 05 de jun. 2022.

FERRETI, A.B.S.M. DNAs satélites e evolução do sistema sexual neo-xy do gafanhoto *Ronderosia bergii*: uma abordagem citogenômica 2020. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/192750> Acesso em: 05 de jun. 2022.

GRAZIA J.; PANIZZI A.R.; GREVE C.; SCHWERTNER C.F.; ET AL. Chapter 22 Stink Bugs (Pentatomidae), **True Bugs (Heteroptera) of the Neotropics** 682-756, 2015. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/282818200_Stink_Bugs_Pentatomidae Acesso em: 05 de jun. 2022.

HUGHES-SCHRADER S.; SCHRADER F. The kinetochore of the Hemiptera. **Chromosoma**, Alemanha, 12(1):327–350,1961. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13716663/> Acesso em: 05 de jun. 2022.

IJDO J.W.; WELLS R.A.; BALDINI A.; REEDERS S.T. Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. **Nucleic Acids Research**, Londres, 19(17):4780,1991. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article/19/17/4780/1156582> Acesso em: 05 de jun. 2022.

KRAEMER C.; SCHMIDT E.R. The sex determining region of *Chironomus thummi* is associated with highly repetitive DNA and transposable elements. **Chromosoma**, Alemanha, 102: 553–562,1993. Disponível em: https://www.academia.edu/7652712/The_sex_determining_region_of_Chironomus_thummi_is_associated_with_highly_repetitive_DNA_and_transposable_elements Acesso em: 05 de jun. 2022.

NOVÁK P.; NEUMANN P.; PECH J.; STEINHÄSL J.; MACAS J. RepeatExplorer: a galaxy-based web server for genome-wide characterization of eukaryotic repetitive elements from next-generation sequence reads. **Bioinformatics** 29(6):792-793,2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23376349/> Acesso em: 05 de jun. 2022.

NOWAK R. Mining Treasures From “Junk DNA”. **Science**, Washinton 263:608–610,1994. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.7508142> Acesso em: 05 de jun. 2022.

PALACIOS-GIMENEZ, O.M.; MILANI, D.; LEMOS, B. ET AL. Uncovering the evolutionary history of neo-XY sex chromosomes in the grasshopper *Ronderosia bergii* (Orthoptera, Melanoplinae) through satellite DNA analysis. **BMC Evolutionary**

Biology, Londres, 18, 2 2018. Disponível em:
<https://doi.org/10.1186/s12862-017-1113-x> Acesso em: 05 de jun. 2022.

PALACIOS-GIMENEZ, O. M.; MILANI, D.; SONG, H.; MARTI, D. A.; LÓPEZ-LEÓN, M. D.; RUIZ-RUANO, F. J.; CAMACHO, J. P. M.; CABRAL-DE-MELLO, D. C. Eightmillion years of satellite DNA evolution in grasshoppers of the genus *Schistocerca* illuminate the ins and outs of the library hypothesis. **Genome Biology and Evolution**, Oxford, 12(3): 88–102,2020. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/198669> Acesso: 05 de jun. 2022.

PAPESCHI A.G.; BRESSA M.J. Evolutionary cytogenetics in Heteroptera. **Journal of Biological Research** 5: 3-21,2006. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/257918803_Evolutionary_cytogenetics_in_Heteroptera Acesso em: 05 de jun. 2022.

REBAGLIATI P.J.; MOLA L.M.; PAPESCHI A.G.; GRAZIA J. Cytogenetic studies in Pentatomidae (Heteroptera): A review. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**,Alemnha, 43(3):199-213,2005. Disponível em: https://www.academia.edu/33989655/Cytogenetic_studies_in_Pentatomidae_Heteroptera_A_review Acesso em: 05 de jun. 2022.

RUIZ-RUANO F.J.; LÓPEZ-LEÓN M.D.; CABRERO J.; CAMACHO J.P.M. High-throughput analysis of the satellitome illuminates satellite DNA evolution.**Nature**,Londres , Rep 6:28333,2016. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/srep28333> Acesso em: 05 de jun. 2022.

SILVA A.E.G. Caracterização cromossômica de *Diatraea saccharalis* (crambidae,lepidoptera) com ênfase nos cromossomos sexuais e DNAs repetitivos, 2021. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/234736> Acesso em: 05 de jun. 2022.

SMIT A.F.A.; HUBLEY R.; GREEN P. RepeatMasker Open-4.0, 2013. Disponível em: <http://www.repeatmasker.org>

UESHIMA N. Hemiptera II: Heteroptera. In: John B,ed. **Animal cytogenetics**.Gebrüder Borntraeger, Ber-lin-Stuttgart: Vt117,1979.

WEIRAUCH C.; SCHUH R. Systematics and evolution of Heteroptera. **Annual Review of Entomology**, California, 56: 487-510,2011. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-ento-120709-144833> Acessoem: 05 de jun. 2022.

YAMANAKA M.; TAKEMOTO H.; TAKASAKI T. The annual fluctuation of the rate of damaged seeds by several pod feeders and seasonal occurrence of three species ofstink bugs in autumn soybean. **Bull Fukuoka Agriculture**

Research Center 10:47-52,1990.

YUNIS J.J.; YASMINEB W.G. Heterochromatin, Satellite DNA, and Cell Function. **Science**, Washinton, 174:1200–1209,1971. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.174.4015.1200> Acesso em: 05 de jun.