



INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

ANELISE FERNANDES E SILVA

**MARCADORES MOLECULARES E CITOGENÉTICOS PARA INFERÊNCIA
DE RELAÇÕES FILOGENÉTICAS EM QUATRO ESPÉCIES NEOTROPICAIS
DE GRILOS *Oecanthus* SERVILE, 1831 (ORTHOPTERA, GRYLLIDAE)**

PORTO ALEGRE

2020

ANELISE FERNANDES E SILVA

**MARCADORES MOLECULARES E CITOGENÉTICOS PARA INFERÊNCIA
DE RELAÇÕES FILOGENÉTICAS EM QUATRO ESPÉCIES NEOTROPICAIS
DE GRILOS *Oecanthus* SERVILLE, 1831 (ORTHOPTERA, GRYLLIDAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Área de concentração: Biologia Comparada

Orientador: Dr.^a Maríndia Deprá

Coorientador: Dr. Edison Zefa

PORTO ALEGRE

2020

ANELISE FERNANDES E SILVA

**MARCADORES MOLECULARES E CITOGENÉTICOS PARA INFERÊNCIA
DE RELAÇÕES FILOGENÉTICAS EM QUATRO ESPÉCIES NEOTROPICAIS
DE GRILOS *Oecanthus* SERVILLE, 1831 (ORTHOPTERA, GRYLLIDAE)**

Aprovada em ____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Monica Laner Blauth

Profa. Dra. Eliane Kaltchuk dos Santos

Profa. Dra. Vera L. S. Valente

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado durante os dois anos de Pós-Graduação. Segundamente, agradeço a Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela disponibilidade do Laboratório de *Drosophila* e infraestrutura oferecida. Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal pela oportunidade de realizar este trabalho.

Gostaria de agradecer a minha orientadora, Maríndia Deprá, por todo o apoio e disponibilidade nesses dois anos de mestrado. Obrigada por ter aceitado me orientar em uma área que não é a sua, utilizando um organismo completamente diferente. Agradeço também, ao meu coorientador, Edison Zefa, que me acompanha desde a graduação e que mesmo longe sempre esteve disponível e disposto a me ajudar.

Gostaria de agradecer aos integrantes do Laboratório de *Drosophila* (UFRGS) por todo o apoio e convívio durante o mestrado. A professora Vera Valente por sempre se colocar à disposição para qualquer necessidade. As técnicas, Bere, Helena e Dani pelo convívio, preparo de meios e o cafezinho que nunca faltou. Aos meus colegas de laboratório, por toda ajuda, conselhos e risadas nestes dois anos.

Agradeço também, ao Laboratório de Citogenética e Evolução (UFRGS) pelo uso do microscópio para a realização das fotos de citogenética neste trabalho. E ao Laboratório de Invertebrados da Universidade Federal de Pelotas pela disponibilidade dos espécimes utilizados na pesquisa.

Agradeço muito a minha família por todo o apoio, carinho e alegrias que fizeram com que o mestrado fosse mais tranquilo. Agradeço, principalmente a minha mãe, Alayde, e minha irmã, Caroline, por sempre me acalmarem em momentos complicados e por estarem ao meu lado sempre que precisei. O apoio delas foi de extrema importância para mim nessa fase de mudanças.

Aos meus amigos agradeço pelos momentos que passamos juntos, tomando uma cerveja ou apenas compartilhando coisas do dia-a-dia. As minhas amigas Sandra e Liana, que desde a graduação estão presentes na minha vida, e agradeço por todos os momentos que passamos juntas. A Heloiza e Suellen que mesmo estando longe sempre me apoiaram e torceram pelo meu sucesso. Aos meus colegas de apartamento, Thamiris, Renan e Carolina, que me acompanharam de Pelotas para Porto Alegre, fazendo com que momentos difíceis fossem

aliviados com uma simples conversa e uma cervejinha. Agradeço a Natasha, Thays, Henrique e Mayara por sempre poder contar com eles e pelas alegrias que essas novas amizades me trouxeram.

Agradeço a todos os amigos e professores que acima não foram citados, mas que de alguma forma contribuíram e fizeram diferença para o meu mestrado, serão recordados com muito carinho.

SUMÁRIO

Resumo.....	6
Abstract.....	7
Capítulo I – Introdução Geral.....	8
1.1 Filogenética.....	8
1.2 Citogenética.....	11
1.3 Objetivos.....	13
Referências.....	14
Capítulo II - Molecular and Cytogenetic markers for inference of phylogenetic relationships in four Neotropical species of <i>Oecanthus</i> SERVILLE, 1831 (Orthoptera, Gryllidae).....	18
Abstract.....	19
Introduction.....	19
Material and Methods.....	21
Results.....	25
Discussion.....	35
References.....	40
Capítulo III – Considerações Finais.....	44
Anexo I – Normas de Submissão de Artigo.....	46

RESUMO

A ordem Orthoptera apresenta distribuição mundial e foi utilizada como organismo modelo em diversos estudos, principalmente nas áreas de filogenética e citogenética. Este grupo se divide nas subordens Caelifera e Ensifera, sendo o último considerado o mais antigo. As primeiras filogenias de Ensifera se basearam em taxonomia e bioacústica, e depois a utilização de genes permitiram maior suporte às pesquisas. Em Ensifera, o táxon Grylloidea é considerado o mais basal, sendo composto por 13 subfamílias, dentre elas Oecanthinae. Os grilos desta subfamília são conhecidos como grilos arbóreos, e o gênero *Oecanthus*, é o principal representante, com 72 espécies descritas e ampla distribuição mundial. O gênero é considerado recente na história evolutiva dos grilos, tendo suas relações filogenéticas estudadas apenas para algumas espécies com ocorrência na China. Além disso, os estudos citogenéticos são escassos, uma vez que apenas seis espécies tiveram seus cariótipos descritos, sendo estas: *O. indicus*, *O. nigricornis* e *O. quadripunctatus* com $2n=19$, X0, *O. longicauda* e *O. pellucens* com $2n=20$, XY, e *O. valensis* com $2n=18$, XY. Todos os cariótipos compartilham a mesma assimetria, incluindo cromossomos grandes e pequenos. Assim, o objetivo deste trabalho foi descrever os cariótipos das espécies Neotropicais dos grilos *O. valensis*, *O. pictus*, *O. pallidus* e *O. lineolatus*, e analisar as relações filogenéticas destas espécies empregando marcadores moleculares e os dados disponíveis nos bancos de dados, de espécies do gênero *Oecanthus*. As filogenias foram reconstruídas por Inferência Bayesiana utilizando os genes COI, 12S, 16S e 18S rDNA. Para as análises citogenéticas foram realizadas técnicas de coloração convencional e Bandeamento C; a técnica de FISH foi empregada em *O. pictus*, utilizando o marcador 18S rDNA. As relações filogenéticas das espécies foram bem suportadas, mostrando que as espécies Neotropicais são as menos derivadas do gênero. Os cariótipos apresentaram variações quanto ao número, morfologia e mecanismo sexual; e as marcações de bandeamento mostraram diferenças principalmente entre os cromossomos grandes. Em *O. pictus* dois pares autossômicos foram marcados pela sonda 18S rDNA. As relações filogenéticas e a descrição dos cariótipos das espécies indicam que estes caracteres estão derivando de forma independente. Os dados mostram um padrão filogenético de separação clara entre grupos Neártico, Paleártico e Neotropical, enquanto os padrões cromossômicos se misturam em relação a morfologia e mecanismo de determinação do sexo.

Palavras chave: Cromossomos, cariótipos, filogenia, Inferência Bayesiana, insetos.

ABSTRACT

The order Orthoptera has a worldwide distribution and has been used as a model organism in several studies, such as the areas of phylogenetics and cytogenetics. This group is divided into the sub-orders Caelifera and Ensifera, the latter being considered the most basal. The first phylogenies of Ensifera were based on taxonomy and bioacoustics, and then the use of molecular genes allowed greater support for research. In Ensifera, the Grylloidea taxon is considered the most basal, being composed of 13 subfamilies, including Oecanthinae. The crickets of this subfamily are known as tree crickets, and the genus *Oecanthus*, is the main representative, with 72 described species and worldwide distribution. The genus is considered recent in the evolutionary history of crickets, having its phylogenetic relationships studied only for some species occurring in China. In addition, cytogenetic studies are scarce, since only six species had their karyotypes described, which are *O. indicus*, *O. nigricornis*, and *O. quadripunctatus* with $2n=19$, X0, *O. longicauda* and *O. pellucens* with $2n=20$, XY, and *O. valensis* $2n=18$, XY. All karyotypes share the same asymmetry, including large and small chromosomes. The objective of this work was to describe the karyotypes of Neotropical species of the crickets *O. valensis*, *O. pictus*, *O. pallidus* and *O. lineolatus*, and to analyze the phylogenetic relationships of these species using molecular markers and the available data of the genus *Oecanthus*. Phylogenies were reconstructed by Bayesian Inference using the COI, 12S, 16S and 18S rDNA genes. For cytogenetic analyzes, conventional staining and C-Banding techniques were performed; the FISH technique was used in *O. pictus*, using the 18S rDNA marker. The phylogenetic relationships of the species were well supported, showing that Neotropical species are the least derived from the genus. Karyotypes showed variations in number, morphology and sexual mechanism; and the banding markings showed differences mainly between the large chromosomes. In *O. pictus* two autosome pairs were marked by the probe 18S rDNA. The Phylogenetic relationships and description of karyotypes indicate that these characters are deriving independently. The data show a phylogenetic pattern of clear separation between Neartic, Palearctic and Neotropical groups, while chromosomal patterns are mixed in relation to morphology and sex determination mechanism.

Keywords: Chromosomes, karyotypes, phylogeny, Bayesian Inference, insect.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Filogenética

1.1.1. Ordem Orthoptera

A Ordem Orthoptera é considerada uma das mais diversas e antigas em Insecta, constituída por mais de 28.000 espécies válidas (FLOOK E ROWELL, 1998; CIGLIANO et al., 2019). Estima-se que essa ordem tenha origem no Carbonífero e suas duas subordens, Caelifera (gafanhotos) e Ensifera (grilos e esperanças), tenham divergido no Permiano (LEGENDRE et al., 2010; SONG et al., 2015; CIGLIANO et al., 2019), sendo Ensifera o grupo mais antigo em Orthoptera, com mais de 16.000 espécies válidas (GWYNNE, 1995, ZHOU et al., 2017, CIGLIANO et al., 2019).

As primeiras filogenias realizadas para a ordem Orthoptera foram baseadas em diferentes caracteres morfológicos, como nervuras das asas, escleritos fálcos, aparelho estridulatório, entre outros (SHAROV, 1971; DESUTTER-GRANDCOLAS, 2003). Estas foram muito utilizadas para inferir as primeiras espécies com capacidade de produzir som e como essa característica se manteve ou foi perdida em diferentes gêneros (ALEXANDER, 1962; DESUTTER-GRANDCOLAS, 2003; ROBILLARD et al., 2007). Já para Ensifera, as primeiras filogenias foram propostas por Gwynne (1995) e Desutter-Grandcolas (2003), ambas utilizando caracteres morfológicos, e a partir do trabalho de Jost e Shaw (2006) marcadores moleculares passaram a ser inseridos nos estudos. Foi observado que existe um grande conflito entre dados morfológicos e moleculares disponíveis para Ensifera (SONG et al., 2015).

As infraordens que compõem Ensifera são Tettigoniidea e Gryllidea, sendo esta dividida nas superfamílias Grylloidea e Gryllotalpoidae (DESUTTER-GRANDCOLAS, 2003; GÄDE et al., 2003; ZHOU et al., 2017; CIGLIANO et al., 2019). Grylloidea pode ser considerado um grupo basal na linhagem dos ensíferas, sendo o primeiro a se diversificar no início do Triássico, continuando a diversificação no decorrer do Mesozoico (FLOOK et al., 1999; SONG et al., 2015). Esta superfamília é composta por seis famílias válidas, sendo uma delas Gryllidae dividida em treze subfamílias, onde se encontra Oecanthinae. Dentro desta, se dispõem os gêneros *Oecanthodes*, *Viphyus*, *Oecanthus*, *Xabea*, *Neoxabea* e *Paraphasius* (CIGLIANO et al., 2019).

O DNA mitocondrial é comumente utilizado como marcador molecular em estudos de filogenia e genética de populações (ZHANG E HEWITT, 1997). Seus genes, em geral, evoluem em taxas mais rápidas do que os nucleares (LIN E DANFORTH, 2004). O gene Citocromo c Oxidase (COI) é considerado um dos mais conservados no genoma animal, decorrente disso, é amplamente utilizado em estudos de diferenciação de espécies (FOLMER et al., 1994). Por outro lado, os genes das subunidades 12S e 16S do DNA ribossomal são considerados informativos em níveis subapical e apical das filogenias. Em estudos na subfamília Eneopterinae o 12S apresenta menos variação, sendo mais informativo em nível basal, e o 16S é informativo para nós mais intermediários (ROBILLARD E DESUTTER-GRANDCOLAS, 2006).

Os genes nucleares tendem a evoluir de forma mais lenta do que os mitocondriais (LIN E DANFORTH, 2003). O marcador 18S rDNA é uma das sequências mais bem estudadas em insetos, e geralmente, é utilizado para reconstrução de níveis mais basais das filogenias (FLOOK E ROWELL, 1998). Em Orthoptera, o táxon Grylloidea apresenta sequências do gene 18S rDNA disponíveis em banco de dados, e que são extremamente divergentes das encontradas em outras espécies da ordem (FLOOK et al., 1999).

1.1.2. Subfamília Oecanthinae

Os indivíduos da subfamília Oecanthinae, foco deste trabalho, são comumente conhecidos como grilos arbóreos, contudo, muitas espécies são encontradas em gramíneas e arbustos. Este táxon se distingue de outros Gryllidae por apresentar corpo delgado, cabeça quase prognata e pernas posteriores muito delgadas (WALKER, 1962). Dentro deste grupo, o gênero *Oecanthus*, apresenta distribuição mundial com 72 espécies válidas, sendo sua origem considerada recente na história evolutiva dos grilos (SHAROV, 1971; CIGLIANO et al., 2019).

Os grilos desta subfamília apresentam hábito onívoro e podem ser considerados benéficos por atacarem insetos que danificam plantas, e prejudiciais por causarem danos em flores e frutos em desenvolvimento (WALKER, 1962). Foi observado que espécies Neárticas, causam danos por ovipositar nas hastes de árvores frutíferas e arbustos, podendo transmitir fungos que atacam macieiras (WALKER, 1962; EISEMAN et al., 2010).

As espécies de *Oecanthus* em geral são facilmente identificadas por caracteres morfológicos, porém algumas espécies do grupo *nigricornis* geram dúvidas quanto ao seu reconhecimento (WALKER, 1963). Este grupo ocorre na Região Neártica e é considerado um dos mais difíceis de analisar suas relações taxonômicas (COLLINS et al., 2014; WALKER,

1963), sendo necessária a utilização de marcadores moleculares em alguns casos, como na confirmação da divergência entre as espécies *O. symesi* e *O. pini* (COLLINS et al., 2014).

No estudo de Liu et al. (2018) foram inferidas as relações filogenéticas das espécies de *Oecanthus* com ocorrência na China. Na filogenia, a primeira separação ocorreu entre o grupo *Oecanthus* spp. e *Xabea levíssima*, pertencentes a mesma subfamília (LIU et al., 2018; CIGLIANO et al., 2019), sendo *O. antennalis* a primeira espécie a divergir dentro do gênero. Foi visto que *O. euryelytra* é um grupo monofilético, e as espécies *O. longicauda* e *O. similator* mostraram ser filogeneticamente próximas, sendo provável que *O. similator* tenha derivado a partir do grupo de *O. longicauda* (Figura 01) (LIU et al., 2018).

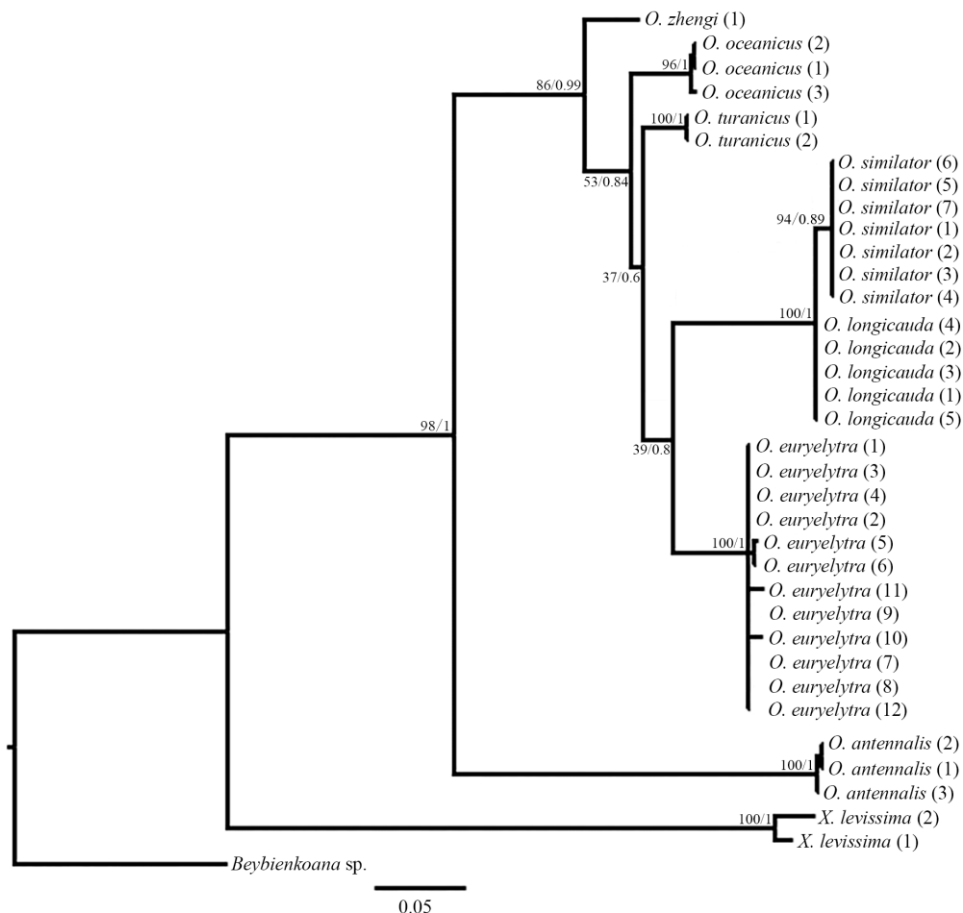


Figura 01 – Árvore de Maximum-likelihood de grilos do gênero *Oecanthus* com ocorrência na China baseada no gene COI. Indicado em cada nó o suporte de Bootstrap (esquerda) e a probabilidade posterior Bayesiana (direita) (Liu et al., 2018).

A utilização de marcadores moleculares nucleares e mitocondriais pode permitir melhor entendimento sobre evolução e relações filogenéticas entre as espécies de *Oecanthus*. Permitindo assim um avanço no conhecimento deste grupo que apresenta ampla distribuição

global. Além disso, este trabalho servirá de base para futuros estudos sobre o gênero e grupos relacionados.

1.2. Citogenética

A ordem Orthoptera se destaca pela grande contribuição para o entendimento da biologia cromossômica e citogenética, em geral por apresentar cromossomos grandes e número diploide baixo (HEWITT, 1979; BLACKMON et al., 2017; CIGLIANO et al., 2019). Nesta ordem, a subfamília Oecanthinae apresenta 172 espécies válidas, e dentro desta ordem, encontra-se o gênero *Oecanthus* sp. (Serville, 1831) com 72 espécies descritas e uma distribuição mundial (CIGLIANO et al., 2019). Neste gênero, apenas seis espécies tiveram seus cromossomos estudados, focando em descrições do número cromossômico e sistema de determinação do sexo (OHMACHI, 1927, 1935; JOHNSON, 1931; MAKINO, 1932; KITADA, 1949; HEWITT, 1979; MILACH et al., 2016).

Dentre as espécies estudadas citologicamente, *O. indicus*, *O. nigricornis* e *O. quadripunctatus* apresentam $2n=19$, X0 (Figura 02) (JOHNSON, 1931; OHMACHI, 1935; KITADA, 1949; BEAUDRY, 1973), *O. longicauda* e *O. pellucens* (Figura 02) $2n=20$, XY (OHMACHI, 1927, 1935; MAKINO, 1932, HEWITT, 1979), e *O. valensis* $2n=18$, XY (Figura 02) (MILACH et al., 2016). Essas espécies compartilham a mesma assimetria cariotípica, incluindo autossomos grandes, junto com o cromossomo sexual X, e autossomos pequenos, incluindo Y, quando presente (JOHNSON, 1931; MAKINO, 1932; OHMACHI, 1927, 1935; KITADA, 1949; MILACH et al., 2016).

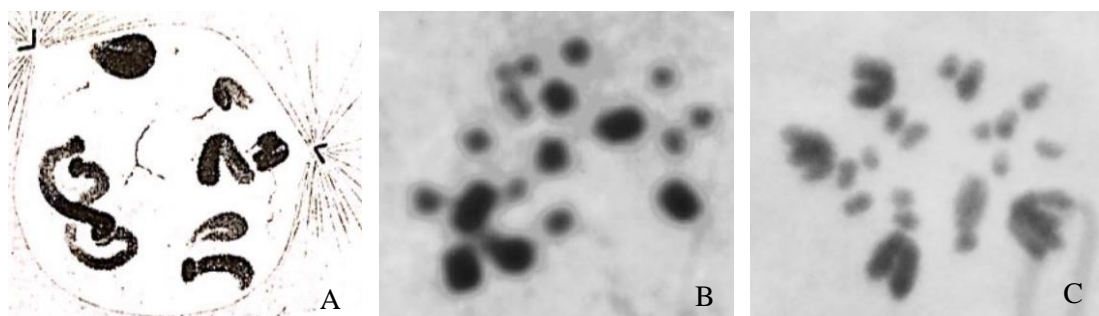


Figura 02 – Cromossomos de *Oecanthus nigricornis* com $2n= 19$, X0 (A) (JOHNSON, 1931), *O. longicauda* com $2n= 20$, XY (B) (YOU et al, 2007) e *O. valensis* com $2n= 18$, XY (C) (MILACH et al, 2016).

Em Orthoptera o mecanismo sexual considerado mais comum e menos derivado é o $X0^{\text{♂}}-XX^{\text{♀}}$ e, geralmente, o cromossomo X apresenta heteropicnose positiva em relação aos autossomos (WHITE, 1978, HEWITT, 1979). A diferença de picnose permite a identificação

dos cromossomos sexuais em relação aos autossomos durante o processo meiótico, principalmente nas fases iniciais da Prófase I (SAEZ, 1963). A conversão do mecanismo XX-X0 para XX-XY em Orthoptera provavelmente ocorreu inúmeras vezes no processo evolutivo das espécies, sendo possível observar que, quando o neo-Y tem origem recente, ele pode não ter sido fixado na população apresentando um estado eucromático. A eucromatina consiste em regiões geneticamente ativas no cromossomo, que podem se tornar heterocromatina, ou seja, regiões inertes e estáveis de DNA (SWANSON et al., 1981).

Rearranjos entre o cromossomo X e cromossomos autossomos podem originar diferentes mecanismos de determinação do sexo (WHITE, 1954, 1957; SAEZ, 1963), como é o caso do mecanismo neo-XY formado pela fusão entre o cromossomo sexual X e um cromossomo de um par autossômico (OHMACHI, 1927; SAEZ, 1963; KAISER E BACHTROG, 2010; CASTILLO, 2010); o mecanismo X_1X_2Y , originado a partir de dois rearranjos subsequentes entre o cromossomo X e autossomos (MESA E BRAN, 1964; FERREIRA E CELLA, 2006); e também, o mecanismo X_1X_20 , derivado da dissociação do cromossomo X original como primeiro passo, e a ocorrência de inversão pericêntrica ou adição de cromatina como segundo passo (MESA et al., 2002; PALACIOS-GIMENEZ E CABRAL-DE-MELLO, 2014; ZEFA et al., 2014).

As técnicas clássicas de bandeamento cromossômico, como banda C e Regiões organizadoras nucleolares (NOR), são vastamente utilizadas em estudos citogenéticos para descrever translocações e inversões, processos de translocação eucromática e amplificação de sequências de DNA (MANSUETO, 1989; WARCHALOWSKA-ŚLIWA E MARYAŃSKA-NADACHOWSKA, 1992; WARCHALOWSKA-ŚLIWA et al., 1994). Com a utilização do bandeamento C é possível realizar uma detalhada caracterização do cariótipo, sendo uma ferramenta importante na detecção de polimorfismos de segmentos pequenos de heterocromatina. Em geral a técnica utiliza cromossomos mitóticos, porém o uso de cromossomos meióticos permite a observação de diferenças morfológicas entre homólogos, como em casos de condições heterozigóticas (VILARDI, 1986).

Além das técnicas de bandeamento, a utilização de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) se tornou uma importante ferramenta para análises comparativas de cromossomos, melhor entendimento da organização genômica e identificação de rearranjos cromossômicos em diferentes organismos (CABRAL-DE-MELLO et al., 2011). Marcadores como o 18S rDNA podem gerar informações importantes quanto a organização genômica e variações entre espécies (WARCHALOWSKA-ŚLIWA et al., 2013; PALACIOS-GIMENEZ E CABRAL-DE-MELLO, 2015).

Apesar do amplo conhecimento em citogenética de Orthoptera, as espécies do gênero *Oecanthus* apresentam poucos dados gerados até o momento. Portanto este trabalho permitirá incrementar o conhecimento sobre os conjuntos cromossômicos do grupo, abrindo caminho para compreender a evolução cariotípica em Oecanthinae.

OBJETIVOS

2.1. Geral

Caracterizar o cariótipo das espécies neotropicais dos grilos *O. lineolatus*, *O. valensis*, *O. pallidus* e *O. pictus*, com destaque ao número e morfologia cromossômica, bem como o mecanismo sexual. Assim como, estabelecer as relações filogenéticas entre as espécies do gênero *Oecanthus* utilizando marcadores moleculares.

Específicos

- Determinar o número cromossômico diploide de quatro espécies de *Oecanthus*;
- Elaborar cariótipos e caracterizar a morfologia dos cromossomos, com base no índice centromérico;
- Caracterizar a morfologia e descrever o comportamento dos segmentos heterocromáticos dos cromossomos sexuais durante a Prófase I;
- Reconstruir as relações filogenéticas de espécies de *Oecanthus* juntamente com os dados disponíveis em banco de dados públicos.

Referências

- ALEXANDER, R. D. Evolutionary Change in Cricket Acoustical Communication. **Evolution**, v. 16, n. 4, p. 443, 1962.
- BEAUDRY, J. R. Une analyse des complements chromosomiques de certains orthopteres du Quebec et sa signification taxonomique et evolutionnaire. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, v. 15, n. 1, p. 155-170, 1973.
- BLACKMON, H.; ROSS, L.; BACHTROG, Doris. Sex determination, sex chromosomes, and karyotype evolution in insects. **Journal of Heredity**, v. 108, n. 1, p. 78-93, 2017.
- CABRAL-DE-MELLO, D. C.; MARTINS, C.; SOUZA, M. J.; MOURA, R. C. Cytogenetic mapping of 5S and 18S rRNAs and H3 histone genes in 4 ancient Proscopiidae grasshopper species: contribution to understanding the evolutionary dynamics of multigene families. **Cytogenetic and Genome Research**, v.132, n.1-2, p.89-93, 2011.
- CASTILLO, E. R.; MARTI, D. A.; BIDAU, C. J. Sex and neo-sex chromosomes in Orthoptera: a review. **Journal of Orthoptera Research**, v. 19, n. 2, p. 213-231, 2010.
- CHINTAUAN-MARQUIER, I. C.; Legendre, F.; Hugel, S.; Robillard, T.; Grandcolas, P.; Nel, A.; Zuccon, D.; DESUTTER-GRANDCOLAS, L. Laying the foundations of evolutionary and systematic studies in crickets (Insecta, Orthoptera): A multilocus phylogenetic analysis. **Cladistics**, v. 32, n. 1, p. 54–81, 2016.
- CIGLIANO, M.M., BRAUN H., EADES D.C.; OTTE D. *Orthoptera Species File*. Version 5.0/5.0. <<http://Orthoptera.SpeciesFile.org>> Acesso em: janeiro, 2019.
- COLLINS, N.; BERGHE, E. V. den; CARSON, L. Two New Species of *Neoxabea*, Three New Species of *Oecanthus*, and Documentation of Two Other Species in Nicaragua (Orthoptera: Gryllidae: Oecanthinae). **Transactions of the American Entomological Society**, v. 140, n. 1, p. 163–184, 2014.
- DESUTTER-GRANDCOLAS, L. Phylogeny and the evolution of acoustic communication in extant Ensifera (Insecta, Orthoptera). **Zoologica Scripta**, v. 32, n. 6, p. 525–561, 2003.
- DESUTTER-GRANDCOLAS, L.; ROBILLARD, T. Phylogeny and the evolution of calling songs in *Gryllus* (Insecta, Orthoptera, Gryllidae). **Zoologica Scripta**, v. 32, n. 2, p. 173–183, 2003.
- EISEMAN, C.; CHARNEY, N.; CARLSON, J. **Tracks & Sign of Insects & Other Invertebrates: A Guide to North American Species**. Stackpole Books, 2010.
- FERREIRA, A.; CELLA, D. M. Chromosome structure of *Eneoptera surinamensis* (Orthoptera, Grylloidea, Eneopterinae) as revealed by C, NOR and N banding techniques. **Chromosome Science**, v. 9, n. 2, p. 47–51, 2006.
- FLOOK, P. K.; KLEE, S.; ROWELL, C. H. F. Combined molecular phylogenetic analysis of the Orthoptera (Arthropoda, Insecta) and implications for their higher systematics. **Systematic Biology**, v. 48, n. 2, p. 233–253, 1999.
- FLOOK, P. K.; ROWELL, C. H. F. Inferences about orthopteroid phylogeny and molecular evolution from small subunit nuclear ribosomal DNA sequences. **Insect Molecular Biology**, v. 7, n. 2, p. 163-178, 1998.
- FOLMER, O; BLACK, M; HOEH, W.; LUTZ, R. VRIJENHOEK, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, v. 3, n. 5, p. 294-299, 1994.
- GÄDE, G.; MARCO, H. G.; DESUTTER-GRANDCOLAS, L. A phylogenetic analysis of the adipokinetic neuropeptides of Ensifera. **Physiological Entomology**, v. 28, n. 4, p. 283–289, 2003.
- GWYNNE, D. T. Phylogeny of the Ensifera (Orthoptera): a hypothesis supporting multiple origins of acoustical signalling, complex spermatophores and maternal care in crickets, katydids, and weta. **Journal of Orthoptera Research**, p. 203-218, 1995.

- HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; deWAARD, J. R. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 270, n. 1512, p. 313-321, 2003.
- HEWITT, G. M. Orthoptera: Grasshoppers and crickets. In: Jolui, B. (Ed.), **Animal Cytogenetics 3**. Insecta I. Gebrüder-Borntraeger, Berlin-Stuttgart, p. 170, 1979.
- JOHNSON, H. H. Centrioles and other Cytoplasmic components of the male germ cells of the Gryllidae. Nova Iorque. **Akad. Verlag Ges**, p. 116-162, 1931.
- JOST, M. C.; SHAW, K. L. Phylogeny of Ensifera (Hexapoda: Orthoptera) using three ribosomal loci, with implications for the evolution of acoustic communication. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 38, n. 2, p. 510-530, 2006.
- KAISER, V. B.; BACHTROG, D. Evolution of sex chromosomes in insects. **Annual review of genetics**, v. 44, p. 91-112, 2010.
- KITADA, S. Preliminary notes on the chromosomes of *Oecanthus indicus*. **Kromosomo**, v. 5, n. 6, p. 227-228, 1949.
- LEGENDRE, F.; ROBILLARD, T.; SONG, H.; WHITING, M. F.; DESUTTER-GRANDCOLAS, L. One hundred years of instability in ensiferan relationships. **Systematic Entomology**, v. 35, n. 3, p. 475-488, 2010.
- LIN, C.; DANFORTH, B. N. How do insect nuclear and mitochondrial gene substitution patterns differ? Insights from Bayesian analyses of combined datasets. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 30, n. 3, p. 686-702, 2004.
- LIU, X. T.; JING, J.; XU, Y.; LIU, Y. F.; HE, Z. Q. Revision of the tree crickets of China (Orthoptera: Gryllidae: Oecanthinae). **Zootaxa**, v. 4497, n. 4, p. 535-546, 2018.
- MAKINO, S. An Unequal Pair of Idiochromosomes in the tree-cricket, *Oecanthus longicauda* Mats. **Journal of Faculty of Science**, Hokkaijo Imperial Univ., Ser. VI., v. 2, n. 1, 1932.
- MANSUETO, C.; VITTURI, R. NORs location and C-banding pattern in spermatogenesis of *Pamphagus ortolanii* (Orthoptera, Acrididae). **Caryologia**, v. 42, n. 3-4, p. 303-311, 1989.
- MESA, A.; BRAN, E. J. Acerca de los cromosomas de *Eneoptera surinamensis*. **Ann. II. Congr. Latinoam. de Zool**, v. 1, p. 9-16, 1964.
- MESA, A.; GARCÍA-NOVO, P.; DOS SANTOS, D. X1X20 (male)–X1X1X2X2 (female) chromosomal sex determining mechanism in the cricket *Ciclotyloides americanus* (Orthoptera, Grylloidea, Mogoplistidae). **Journal of Orthoptera Research**, v. 11, n. 1, p. 87-90, 2002.
- MILACH, E. M., DA COSTA, M. K. M., MARTINS, L. D. P., NUNES, L. A., SILVA, D. S. M., GARCIA, F. R. M., DE OLIVEIRA, E. C.; ZEFA, E. New species of tree cricket *Oecanthus* Serville, 1831 (Orthoptera: Gryllidae: Oecanthinae) from Reserva Natural Vale, Espírito Santo, Brazil, with chromosome complement. **Zootaxa**, v. 4173, n 2, p.137-146, 2016.
- OHMACHI, F. Preliminary note on cytological studies on Grylloidea. **Proceedings of the Imperial Academy**, v. 3, n. 7, p. 451-456, 1927.
- OHMACHI, F. A. Comparative Study of Chromosome Complements in the Grylloidea in Relation to Taxonomy. **Bulletin of Mie Imperial College of Agriculture and Forestry**, v. 5, p. 1-48, 1935.
- PALACIOS-GIMENEZ, O. M.; CABRAL-DE-MELLO, D. C. Repetitive DNA chromosomal organization in the cricket *Cycloptiloides americanus*: a case of the unusual X1X20 sex chromosome system in Orthoptera. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 290, n. 2, p. 623-631, 2015.
- ROBILLARD, T.; DESUTTER-GRANDCOLAS, L. Phylogeny of the cricket subfamily Eneopterinae

- (Orthoptera, Grylloidea, Eneopteridae) based on four molecular loci and morphology. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 40, n. 3, p. 643-661, 2006.
- ROBILLARD, T.; GRANDCOLAS, P.; DESUTTER-GRANDCOLAS, L. A shift toward harmonics for high-frequency calling shown with phylogenetic study of frequency spectra in Eneopterinae crickets (Orthoptera, Grylloidea, Eneopteridae). **Canadian Journal of Zoology**, v. 85, n. 12, p. 1264-1274, 2007.
- SAEZ, F. A. Gradient of heterochromatinization in the evolution of the sexual system "neo-X neo-Y". **Portugaliae Acta Biologica**, ser A, v.7, p. 111-138, 1963.
- SHAROV, A. G. A. G. **Phylogeny of the orthopteroidea**. 1971.
- SONG, H.; AMÉDÉGNATO, C.; CIGLIANO, M. M.; DESUTTER-GRANDCOLAS, L.; HEADS, S. W.; HUANG, Y.; OTTE, D.; WHITING, M. F. 300 million years of diversification: Elucidating the patterns of orthopteran evolution based on comprehensive taxon and gene sampling. **Cladistics**, v. 31, n. 6, p. 621-651, 2015.
- SWANSON, C. P.; MERZ, T.; YOUNG, W. J. **Cytogenetics. The chromosome in division, inheritance and evolution**. Prentice-Hall., 1981.
- VILARDI, J. C. Parallel polymorphisms for interstitial C-bands and B-chromosomes in *Zoniopoda tarsata* (Orthoptera: Romaleidae). **Caryologia**, v. 39, n. 3-4, p. 365-380, 1986.
- WARCHAŁOWSKA-ŚLIWA, E.; MARYAŃSKA-NADACHOWSKA, A. Karyotype, C-bands, and NORs locations in spermatogenesis of *Isophya brevipennis* brunner (Orthoptera: Phaneropteridae). **Caryologia**, v. 45, n. 1, p. 83-89, 1992.
- WARCHAŁOWSKA-ŚLIWA, E.; GRZYWACZ, B.; MARYAŃSKA-NADACHOWSKA, A.; KARAMYSHEVA, T. V.; HELLER, K. G.; LEHMANN, A. W.; LEHMANN, G. U.C.; CHOBANOV, D. P. Molecular and classical chromosomal techniques reveal diversity in bushcricket genera of *Barbitistini* (Orthoptera). **Genome**, v. 56, n. 11, p. 667-676, 2013.
- WARCHAŁOWSKA-ŚLIWA, E.; MARYAŃSKA-NADACHOWSKA, A.; MASSA, B. Some new data on C-bands and NORs in three species of Pamphagidae (Orthoptera). **Folia Biologica (Cracow)**, v. 42, n. 1/2, p. 13-18, 1994.
- WALKER, T. J. The Taxonomy and Calling Songs of United States Tree Crickets (Orthoptera: Gryllidae: Oecanthinae). I. The Genus *Neoxabea* and the *niveus* and *varicornis* Groups of the Genus *Oecanthus*. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 55, n. 6, p. 303-322, 1962.
- WALKER, T. J. The Taxonomy and Calling Songs of United States Tree Crickets (Orthoptera: Gryllidae: Oecanthinae). II. The *nigricornis* Group of the Genus *Oecanthus*. **Annals of the Entomological Society of America**, [s. l.], v. 56, n. 6, p. 772-789, 1963.
- WHITE, M. J. D. **Animal cytology and evolution**. 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge, England. 1954.
- WHITE, M. J. D. Cytogenetics and Systematic Entomology. **Annual Rev. Entomology**, v. 2, p. 71-90, 1957.
- WHITE, M. J. D. Chain processes in chromosomal speciation. **Systematic Biology**, v. 27, n. 3, p. 285-298, 1978.
- YOU, J.; LI, N.; REN, B. Z.; YUAN, H.; SHANG, L. The study on karyotypes of five Grylloidea species (Orthoptera: Grylloidea) in Northeast China. **Zootaxa**, v. 1611, n. 1, p. 63-68, 2007.
- ZEFA, E.; REDÜ, D. R.; DA COSTA, M. K. M.; FONTANETTI, C. S.; GOTTSCHALK, M. S.; PADILHA, G. B.; SILVA, A. F.; MARTINS, L. P. A new species of *Endecous* Saussure, 1878 (Orthoptera, Gryllidae) from northeast Brazil with the first X1X20 chromosomal sex system in Gryllidae. **Zootaxa**, v. 3847, n. 1, p. 125-132, 2014.
- ZHANG, D. X.; HEWITT, G. M. Assessment of the universality and utility of a set of conserved mitochondrial COI primers in insects. **Insect Molecular Biology**, v. 6, n. 2, p. 143-150, 1997.

ZHOU, Z.; ZHAO, L.; LIU, N.; GUO, H. GUAN, B. DI, J.; SHI, F. Towards a higher-level Ensifera phylogeny inferred from mitogenome sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 108, p. 22–33, 2017.

ZHOU, Z.; SHI, F.; ZHAO, L. The first mitochondrial genome for the superfamily Hagloidea and implications for its systematic status in Ensifera. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. 1–8, 2014.

CAPÍTULO III

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho visou o estudo filogenético e citogenético de quatro espécies do gênero *Oecanthus*, sendo estas *O. valensis*, *O. pallidus*, *O. lineolatus* e *O. pictus*. Filogeneticamente as relações dessas espécies com os dados disponíveis na literatura foram bem suportadas pelas análises, e mostrou que possivelmente as espécies Neotropicais sejam menos derivadas do que as que ocorrem nas Regiões Neártica e Paleártica. Nas análises citogenéticas as espécies mostraram variações cromossômicas quanto ao número, morfologia e mecanismo sexual, e foram observadas diferenças quanto às marcações utilizando técnicas de bandeamento C.

As análises filogenéticas mostraram alto suporte dos ramos, e apesar de se formarem politomias na reconstrução de genes mitocondriais, foi possível observar padrões interessantes que poderão ser melhor abordados em trabalhos futuros. Além disso, os dados moleculares gerados incrementam o conhecimento genético do gênero, acrescentando dados de espécies Neotropicais, o que não existia até então. Além disso, o aumento de estudos moleculares com outras espécies do gênero permitirá esclarecimentos sobre a história evolutiva do grupo.

O gênero *Oecanthus* apresentava seis cariótipos descritos das 72 espécies taxonomicamente válidas, sendo com este trabalho três novos conjuntos cromossômicos foram descritos. Porém, são poucos os dados gerados para o grupo, mesmo apresentando variações cromossômicas importantes relacionadas à evolução cariotípica. Também é importante ressaltar a necessidade de reanálises de algumas espécies com descrições antigas, e a dificuldade de gerar dados citogenéticos decorrente do tamanho pequeno dos cromossomos. Tornando assim, as informações geradas neste trabalho de grande importância para o estudo evolutivo dos cariótipos do grupo.

Neste trabalho foram utilizadas análises citogenéticas e filogenéticas para melhor compreensão das relações entre as espécies do gênero *Oecanthus*. As relações filogenéticas e a descrição dos cariótipos das espécies, até o momento, indicam que estes caracteres estão derivando de forma independente. Eles estão mostrando um padrão filogenético de separação clara entre grupos Neárticos, Paleárticos e Neotropicais, enquanto os padrões cromossômicos são diferentes, em relação a morfologia e mecanismo de determinação do sexo.

Portanto, a continuidade deste trabalho poderá auxiliar na compreensão dos processos evolutivos que ocorrem nessas espécies, principalmente com relação aos rearranjos cromossômicos. A falta de dados gerados para o gênero dificulta as análises atuais, gerando *gaps* nos sequenciamentos e podendo levar a distorções ou erros posicionais nas reconstruções filogenéticas. Além disso, a utilização de análises integrativas permitirá um suporte maior para as futuras filogenias, e informações importantes quanto a história biogeográfica do grupo.

ANEXO I

NORMAS DE SUBMISSÃO DE ARTIGO

Chromosome Research (Springer Link) – Disponível em:

<https://link.springer.com/journal/10577> [Acessado em: Fevereiro de 2020]

Normas de submissão disponíveis em: <https://www.springer.com/journal/10577/submission-guidelines> [Acessado em: Fevereiro de 2020]