



UNIVERSIDAD DE JAÉN

Departamento de Biología Experimental

TESIS DOCTORAL

•

**Análisis y Evolución del ADN satélite en
Coccinélidos**

**PRESENTADA POR:
Pablo Mora Ruiz**

**DIRIGIDA POR:
Pedro Lorite Martínez y Teresa A. Palomeque Messía**

**JAÉN, 27/07/2020
ISBN**



Universidad de Jaén

Facultad de Ciencias Experimentales

Departamento de Biología Experimental

Área de Genética

El Dr. Pedro Lorite Martínez y la Dra. Teresa A. Palomeque Messía, Catedráticos de la Universidad de Jaén certifican que la Tesis Doctoral titulada: “**Análisis y evolución del ADN satélite en Coccinélidos**”, que presenta Pablo Mora Ruiz para optar al Grado de Doctor con Mención Internacional, ha sido realizada bajo su dirección, reuniendo a su juicio, los requisitos exigidos para esta presentación.

Jaén, 21 de mayo de 2020

Dr. Pedro Lorite Martínez

Dra. Teresa A. Palomeque Messía

Memoria presentada por el graduado

Pablo Mora Ruiz

Mayo de 2020

Índice

Resumen de la Tesis Doctoral	1-45
Introducción.....	2
Los Coccinélidos.....	2
Citogenética de los coccinélidos.....	2
Secuencias de ADN repetitivo.....	3
Características del ADN satélite.....	6
Aislamiento del ADNsat.....	9
ADN satélite en Coleópteros y Coccinélidos.....	12
Objetivos/Aims.....	14-15
Objetivos.....	14
Aims.....	15
Resultados.....	16-21
<i>Chnootriba argus</i>	17
<i>Epilachna paenulata</i>	19
<i>Hippodamia variegata</i>	20
<i>Adalia bipunctata</i>	20
Discusión.....	22-27
Conclusiones/Conclusions.....	28-31
Conclusiones.....	28
Conclusions.....	30
Bibliografía.....	32-45
Capítulo I: Molecular cytogenetic studies in the ladybird beetle <i>Henosepilachna argus</i> Geoffroy, 1762 (Coleoptera, Coccinellidae, Epilachninae).....	47-62

Capítulo II: Characterization and transcriptional analysis of a subtelomeric satellite DNA family in the ladybird beetle <i>Henosepilachna argus</i> (Coleoptera, Coccinellidae).....	63-79
Capítulo III: Isolation of a pericentromeric satellite DNA family in <i>Chnootriba argus</i> (<i>Henosepilachna argus</i>) with an unusual short repeat unit (TTAAAA) for beetles.....	81-100
Capítulo IV: Satellitome analysis in the ladybird beetle <i>Hippodamia variegata</i> (Coleoptera, Coccinellidae).....	101-126
Capítulo V: Estudio comparativo del satelitoma de tres especies de Coccinélidos.....	127-174

RESUMEN DE LA TESIS DOCTORAL

INTRODUCCIÓN

Los Coccinélidos

El orden Coleoptera es el grupo con mayor número de especies dentro de los insectos, con alrededor de 370.000 especies divididas en cuatro subórdenes: Adepfaga, Archostemata, Myxophaga y Polyphaga (De La Fuente 1994). La familia Coccinellidae, comúnmente conocidas como mariquitas, se agrupan dentro del suborden Polyphaga en la superclase Cucujoidea (Nedved & Kovár 2012). La familia incluye unas 6.000 especies agrupadas en 360 géneros de distribución mundial (Vandenberg 2002). Los coccinélidos tienen una gran diversidad alimenticia. La gran mayoría son depredadores de áfidos o pulgones, así como de pequeños hemípteros pertenecientes a la familia Aleyrodidae, aunque hay especies que se alimentan de polen y otras especies que son estrictamente herbívoras. Las mariquitas han sido usadas como agente biológico contra el control de plagas desde hace mucho tiempo (Obrycki & Kring 1998), siendo empleadas en la lucha contra los áfidos y los cocoideos o insectos escamas, que son una superfamilia de pequeños insectos del orden de los hemípteros conocidos vulgarmente como cochinillas del nopal. Las mariquitas se han usado en el control de plagas en cultivos tan importantes como melocotón, algodón y tabaco (Rondoni et al. 2014, Skouras & Stathas 2015). En algunos estudios se ha relacionado la presencia de las mariquitas con el estado de conservación de ese ecosistema (Cotes et al. 2010) ya que estos insectos son bastante sensibles a los cambios en los niveles de contaminación y la presencia de pesticidas (Ipert 1999).

Citogenética de los coccinélidos

A pesar de la importancia económica y ecológica que pueden tener los coccinélidos, los estudios citogenéticos realizados en este taxón no superan las 200 especies analizadas (Gregory et al. 2007). Smith & Virkki (1978) en su estudio realizado sobre distintas especies del género, determinaron que el sistema sexual ancestral de los coleópteros es del tipo XX/Xy. Los números cromosómicos de las especies estudiadas varían desde $2n=12$ hasta $2n=26$ (Gregory et al. 2007). En coccinélidos, al igual que en el resto de coleópteros estudiados, el cariotipo más común está formado por 9 ó 10 parejas de autosomas junto a una pareja de cromosomas sexuales que, generalmente, presentan en meiosis I la asociación conocida como “en paracaídas” Xyp (Stevens 1906, Smith 1950). En algunas especies del género, el cromosoma Y se ha perdido y ha generado un determinismo sexual del tipo XX/XO. En otras especies el cromosoma X ha sufrido un proceso de fusión con un autosoma, dando el determinado sistema sexual “neo-XY” (Smith & Virkki 1978).

El estudio de los cromosomas se ha complementado con diversos análisis de la estructura y organización mediante técnicas de bandeo cromosómico. Los colorantes diferenciales permiten diferenciar de modo inequívoco los cromosomas de igual tamaño. El bandeo cromosómico más usado en este grupo de insectos ha sido el bandeo C, que es capaz de teñir de modo diferencial las regiones de heterocromatina de los cromosomas, zonas que se han considerado como inactivas. Las regiones heterocromáticas se localizan generalmente en las zonas pericentroméricas y en los brazos cortos de los cromosomas (Ennis 1974, Drets et al. 1983, Maffei et al. 2000, 2004, Rozek & Holecova 2002, Beauchamp & Angus 2006). El bandeo cromosómico también se ha usado para estudiar la localización cromosómica de las regiones del organizador nucleolar (NOR). Este tipo de bandeo se ha llevado a cabo mediante la tinción con nitrato de plata, ya que se considera un marcador de la actividad transcripcional de los genes del ADNr (Hubell 1985).

La existencia de cromosomas accesorios o cromosomas B se ha estudiado en algunas especies de mariquitas, describiéndose como polimorfismos poblacionales su presencia o ausencia, así como su número. Los cromosomas B, a diferencia de los autosomas, pueden estar presentes en los genomas en cantidades variables. En este grupo se han citado y además en número variable, desde 0 a 13, en *Chilocorus rubidus* (Smith & Virkki 1978), y desde 0 a 4 en *Henosepilachna vigintioctopunctata* (Tsurusaki et al. 2001). En general, los procesos de especiación dentro de los coccinélidos no parecen estar muy ligados a cambios en la morfología y/o número cromosómico. Casi todas las subfamilias de este grupo, muestran un número cromosómico parecido, con cromosomas similares en su morfología (Honěk 2012). Tsurusaki et al. (1993) describieron en su estudio la presencia de dos cariomorfos diferentes en el complejo de especies existente en *Henosepilachna vigintioctomaculata*. En el grupo A, formado por *H. vigintioctopunctata sensu stricto*, los cromosomas muestran bloques heterocromáticos pequeños; sin embargo, en el grupo B, formado por *Henosepilachna pustulosa*, *H. niponica* y *H. yasutomii*, los bloques de heterocromatina son muy grandes.

Secuencias de ADN repetitivo

Los genomas eucariotas se caracterizan por la presencia de grandes cantidades de ADN repetitivo. Estas secuencias se clasifican en dos grupos en función del número de copias existentes en el genoma: ADN altamente repetitivo o moderadamente repetitivo. Además, también

se clasifican en dos grupos dependiendo de la organización de esa repetición, diferenciándose secuencias repetidas en tándem o repeticiones dispersas (Slamovits & Rossi 2002). Dentro del ADN moderadamente repetitivo se engloban tanto secuencias de gran tamaño (hasta 5 kb) como secuencias con un tamaño menor (entre menos de 150 pb y 300 pb). Estas secuencias repetitivas se pueden encontrar dispersas en el genoma u organizadas en tándem, formando bloques de hasta varias Mb (Slamovits & Rossi 2002). Las repeticiones que se encuentran dispersas en el genoma, en general, proceden de eventos relacionados con la transposición (Miller & Capy 2004, Brown 2002). Los transposones se pueden clasificar en dos grupos dependiendo si necesitan de un intermediario de ARN o no para que se lleve a cabo el evento de transposición; Clase I o retrotransposones, que son aquellos transposones que necesitan de un intermediario de ARN, (como los *LRTs* y *non-LTRs* entre otros), y Clase II o transposones de ADN, que no necesitan de dicho intermediario como por ejemplo los elementos *mariners*. El ADN repetitivo en tándem engloba varios tipos; entre ellos el ADN microsatélite, compuesto por secuencias con un tamaño comprendido entre 7 y 2 pb (Bruford & Wayne 1993) con una gran variedad en cuanto al número de repeticiones que componen la unidad de repetición (Toth et al. 2000, Gur-Arie et al. 2000). También se los conoce como Secuencias Repetidas Simples (Simple Sequences Repeats (SSRs)) o Repeticiones Cortas en Tándem (Short Tandem Repeats). El ADN minisatélite, incluido también en el ADN repetitivo en tándem, se compone de secuencias con una unidad de repetición de un tamaño comprendido entre 7 y 100 pb (Tautz 1993). Un ejemplo bien conocido son las repeticiones que se encuentran en los extremos distales o telómeros de los cromosomas. El ADN megasatélite, está formado por secuencias repetidas en tándem que forman bloques de varias Kb. Un ejemplo de este tipo de ADN repetitivo son los genes que forman los clústeres del ADN ribosómico.

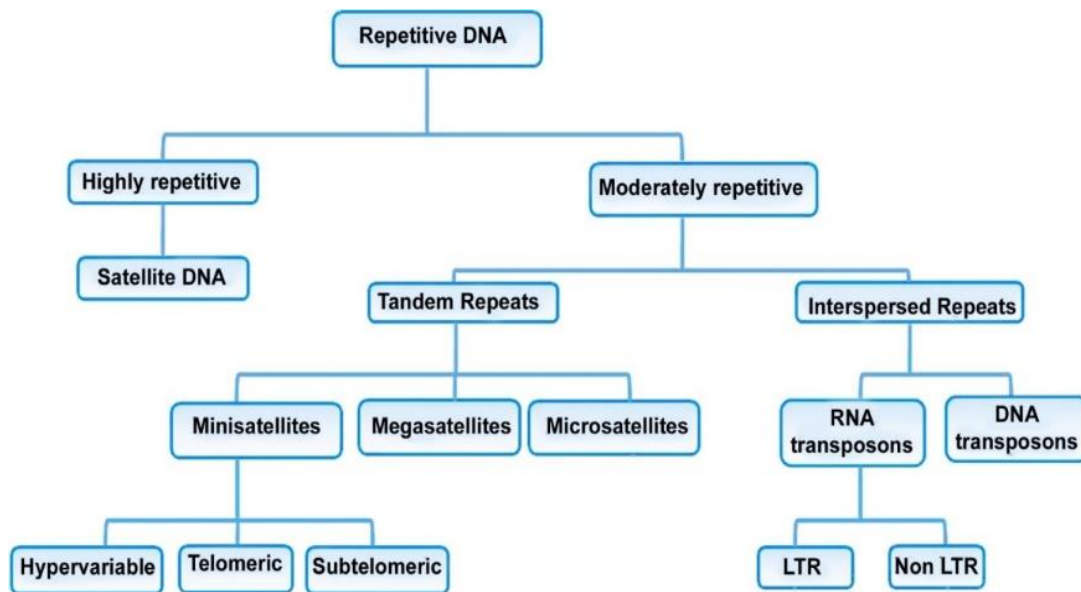


Figura 1. Clasificación del ADN repetitivo de acuerdo con Pathak & Ali (2012).

Dentro del grupo del ADN altamente repetitivo, está incluido el ADN satélite (ADNsat). Se denominó ADN satélite porque cuando el ADN genómico se centrifuga en un gradiente de densidad de cloruro de cesio, aparece como una banda que difiere en densidad de la banda principal, debido a su diferente contenido en A+T (Kit 1961). Este tipo de ADN, que está constituido por secuencias repetidas en tándem, puede ser el componente mayoritario dentro de los genomas eucariotas (Palomeque & Lorite 2008), pudiendo llegar a constituir hasta el 50% del genoma de un organismo (Plohl et al. 2012). El ADNsat forma parte normalmente de los telómeros (Pons et al. 1993, Hartley & Davidson 1994) y especialmente, de los centrómeros (Ugarković & Plohl 2002, Galián & Vogler 2003), aunque también puede tener una localización intersticial en los cromosomas de una especie (Reed & Phillips 1995).

Existen varias familias génicas que muestran una organización parecida a la del ADNsat, formadas a partir de la duplicación de genes. Los genes del ARN ribosómico son un ejemplo de estas familias génicas. El ARN ribosómico juega un papel muy importante durante la síntesis de proteínas. En la mayoría de los genomas de eucariotas, los genes del ADN_r se componen de varias repeticiones de genes que codifican el 28S, 18S y el 5.8S además de los ETS (*External Transcribed Spacers*) y las ITS 1 y 2 (*Internal Transcribed Spacers*) además de una región que no se transcribe, llamada NTS (*Non-Transcribed Spacer*). Esta unidad se repite varias veces, estando separadas unas de otras por el NTS que, junto al ETS, forman el espaciador intergénico (IGS).

Esta familia génica se puede encontrar dispuesta en un solo cromosoma o varios, localizados en los llamados NORs (*Nucleolar Organizer Regions*). Para poder determinar la localización cromosómica de los NORs clásicamente se han usado técnicas de tinción con nitrato de plata ya que se había considerado un indicador de la actividad transcripcional de esta familia génica (Hubell 1985). Sin embargo, este tipo de tinción ha sido cuestionada por varios autores (Medina et al. 1983, Jiménez et al. 1988, Lorite et al. 1997) ya que puede teñir otras regiones diferentes a los NORs. Para determinar la localización cromosómica de los NORs, actualmente son más usadas las técnicas de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) usando sondas de ADNr. Solamente existen dos trabajos acerca de la localización de las regiones NOR en la familia de los Coccinélidos. En la especie *Olla v-nigrum* la región NOR se limita a los cromosomas sexuales (Maffei et al. 2001), por el contrario, en la segunda especie estudiada, *Cycloneda sanguinea* Linnaeus, 1763, las regiones NOR están situadas en un par de autosomas (Maffei et al. 2004). Dentro de los Coleópteros, la disposición cromosómica de los NOR es muy variable. En las familias Carabidae, Melolonthidae, Tenebrionidae o Scarabaeidae las regiones NOR aparecen tanto en los cromosomas sexuales, como en autosomas e, incluso, en cromosomas sexuales y autosomas a la vez (Oliveira et al. 2012, Arcanjo et al. 2013). Especies pertenecientes al género *Zabrus* presentan un gran número de regiones NOR, estando presentes en 6 pares de autosomas (Sánchez-Gea et al. 2000). La especie *Coprophanaeus (Megaphanaeus) ensifer* (Coleoptera, Scarabaeoidea) muestra siete pares de autosomas, además del cromosoma X, con regiones NOR (Oliveira et al. 2010).

Características del ADN satélite

Debido a que normalmente, el componente mayoritario dentro de los genomas de los eucariotas es el ADNsat, su estudio se considera muy útil a la hora de comprender la evolución de los mismos. Este tipo de ADN repetitivo suele tener un monómero o unidad de repetición (UR) de unos 100-500 nucleótidos que se repiten varios cientos de veces formando bloques de varias megabases. Las unidades de repetición pueden no ser idénticas en sentido estricto, pudiendo existir polimorfismos entre los monómeros a nivel de secuencia (Ugarković 2005). La existencia de estos polimorfismos y la rápida tasa evolutiva del ADNsat, hace que este tipo de ADN sea de gran utilidad a la hora de hacer estudios de filogenias, así como estudios poblacionales (Charlesworth et al. 1994).

Una gran ventaja que tiene el ADNsat es su naturaleza repetitiva, ya que esto hace que el mapeo físico sobre cromosomas, usando técnicas como la hibridación *in situ*, sea bastante fácil.

Gracias a esto, el ADNsat es considerado como un marcador idóneo para el análisis de la estructura y organización del genoma (Cabral-de-Mello et al. 2011). En cuanto a la composición nucleotídica, en general, los ADN satélites de insectos suelen tener una alta riqueza en A+T (Palomeque & Lorite 2008), sin embargo, también existen casos en los que el ADNsat de una especie de insecto es rico en G+C, como ocurre en *Drosophila hydey* (Burgtorf & Bünemann 1993).

Las secuencias de ADN satélite evolucionan siguiendo un patrón llamado “evolución concertada” (Smith 1974), que origina la homogenización de las diversas copias del ADN satélite y su fijación en la población, mediante un conjunto de procesos que en conjunto reciben el nombre de “*Molecular Drive*”. Entre los procesos implicados en la variabilidad del ADNsat destacamos la conversión génica y el sobrecruzamiento desigual, el deslizamiento de cadenas durante la replicación, la replicación en círculo rodante y la transposición (Dover 1982, 2002). Cuando se origina una mutación puntual en uno de los monómeros del ADNsat, puede fijarse en el resto de monómeros, lo que se conoce como homogenización del ADNsat, o perderse. El conjunto de procesos indicados, evolutivamente conllevará a una variabilidad intraespecífica baja, mientras que la interespecífica tenderá a aumentar cuando las especies divergen entre sí. La meiosis tiene un papel relevante en el proceso de “*Molecular Drive*” como han indicado diversos autores (Stephan 1986, Mantovani et al. 1997, Luchetti et al. 2003).

Para explicar la dinámica evolutiva del ADNsat, Fry & Salser (1977) propusieron la llamada “*Hipótesis de la Biblioteca*”, hipótesis que postula que, en especies emparentadas evolutivamente, pueden coexistir varias familias de ADNsat, algunas ya presentes ya en el ancestro común a dichas especies. A medida que las especies van divergiendo, en cada una se amplificaría de un modo diferencial una familia de ADNsat, por lo que en cada una de las especies resultantes habría un ADNsat mayoritario y restos de otras familias, que podrían ser las mayoritarias en otras especies. Esta hipótesis fue demostrada por primera vez, en cuatro especies de coleópteros del género *Palorus* en las que cada una tenía una familia mayoritaria de ADNsat, que correspondería con el 30% del genoma, pero además presentan restos de las otras familias de ADNsat encontradas en las demás especies del estudio (Mestrovic et al. 1998). Otros estudios llevados a cabo en otros insectos coleópteros, himenópteros y fásmidos también apoyan la “*Hipótesis de la Biblioteca*” (Mravinac et al. 2002, Pons et al. 2004, Bruvo-Madaric et al. 2007, Landais et al. 2000, Cesari et al. 2003). Esta hipótesis, también está apoyada por el reciente estudio de tres familias de ADNsat en diez especies del saltamontes *Schistocerca gregaria*, utilizando datos de secuenciación y mapeo por FISH (Palacios-Gimenez et al. 2020).

El papel que juega el ADN repetitivo en general, y el ADNsat en particular, ha sido ampliamente cuestionado hasta el punto de considerar a todo el ADN repetitivo como ADN basura, parásito o “junk DNA”, algo por supuesto no compartido por la mayoría de autores (revisado en Palazzo & Gregory 2014). El ADNsat es el componente principal de la heterocromatina de los cromosomas, hecho que hace que sea indispensable para la formación de la estructura del centrómero. Los cromosomas de los eucariotas están compuestos de dos estructuras que son las responsables del mantenimiento y la integridad de los mismos, así como de evitar la pérdida de información y asegurar el reparto del material genético en cada división. Estas estructuras son los centrómeros y telómeros. El centrómero de los cromosomas tiene varias funciones; una de ellas es mantener unidas a las cromátidas hermanas y otra es asegurar una correcta segregación de los cromosomas durante la división celular. Aunque las funciones de los centrómeros son las mismas, la composición nucleotídica del ADNsat, su componente mayoritario, difiere de unas especies a otras, por lo que, la secuencia de los centrómeros podría ser no ser la determinante de su función. La función del ADNsat es uno de los temas más discutidos (Biscotti et al 2015a, 2015b). Parece estar relacionado con el mantenimiento de la cromatina y formación del centrómero, así como la del cinetocoro y en el mantenimiento de la integridad de los genomas (Ugarković 2005, Plohl et al. 2012, Rosic et al. 2014, Perea-Resa & Blower 2017, Louzada et al. 2020). Probablemente, donde más se ha estudiado este y otros aspectos, es en el satélite α humano, donde se ha establecido que su transcripción y los correspondientes ARN no codificantes, desempeñan funciones distintas e imprescindibles en el centrómero y en la región pericentromérica a lo largo del ciclo celular (McNulty et al. 2018, Gambogi et al. 2020, Ohzeki et al. 2020).

Los telómeros son las estructuras que se encuentran en los extremos de los cromosomas y están compuestos de una serie de repeticiones, generalmente de unos 5-8 nucleótidos, que son sintetizados por la telomerasa (Blackburn 1991). Los telómeros protegen al cromosoma de la pérdida de información tras cada división celular, además de proteger al ADN de la acción de las nucleasas y de evitar la unión de cromosomas no homólogos. Blackburn & Gall (1978) fueron los primeros que clonaron los telómeros de un ciliado del género *Tetrahymena*. En este protozoo, la secuencia telomérica se compone de seis nucleótidos TTGGGG. En vertebrados los telómeros se componen de la repetición TTAGGG (Meyne et al. 1989). La repetición típica encontrada en los cromosomas de los insectos es el pentanucleótido TTAGG (Frydrychová et al. 2004), aunque hay ejemplos de insectos que no tienen dicha repetición debido a la mutación de TTAGG a TCAGG como ocurre en el escarabajo *Tribolium castaneum* (Richards et al. 2008).

Numerosos trabajos han puesto de manifiesto la evidencia de transcritos de ARN que proceden de diversas familias de ADNsat en diferentes organismos, tales como vertebrados, invertebrados y plantas. En insectos, la transcripción del ADNsat se ha estudiado sobre todo en *Drosophila melanogaster*. En embriones de esta especie, así como en adultos, se pudo determinar la existencia de transcritos procedentes del ADNsat 1.688 que provienen de los cromosomas 2 y 3. Estos transcritos daban lugar a un tipo de ARN de interferencia (siRNAs) que participaba activamente en la formación de la heterocromatina de los cromosomas 2 y 3 (Usakin et al. 2007); además se ha sugerido que los transcritos de este tipo de ADN están relacionados con la fertilidad en machos (Mils et al. 2019). Rosic et al. (2014) estudiaron la transcripción del ADNsat de los cromosomas sexuales en *Drosophila* y determinaron que la transcripción de los ADNsat del cromosoma X, son indispensables para una correcta segregación cromosómica. Otras especies del género *Drosophila* (*D. buzzati*, *D. seriema* y *D. mojavensis*), se han estudiado también y presentan varias familias de ADNsat que se transcriben de modo diferencial en machos y pupas (Lima et al. 2007). Cuando un organismo se somete a una condición de estrés, se ha demostrado que la transcripción de varias familias de ADNsat, aumenta tras el estímulo que provoca dicha condición. Así, en el coleóptero *Palorus subdepressus*, se ha observado un aumento de transcritos derivados de varias familias de ADNsat tras un choque térmico, proponiéndose que dichos transcritos podrían estar implicados en la remodelación de la cromatina, participando así en la expresión génica diferencial (Pezer & Ugarkovic 2009). Además, en varias especies de Tenebriónidos se ha estudiado tanto la transcripción, como las posibles funciones de este tipo de ADN. En *Palorus ratzeburgii*, *Palorus subdepressus* y *Tribolium castaneum* las principales familias de ADNsat de cada una de estas especies (PRAT, PSUB y TCAST) se transcriben a lo largo de todas las etapas de la vida de estos insectos, desde larvas a imagos (revisado en Pezer et al. 2011). En himenópteros, se han citado varias especies en las que el ADNsat se transcribe, considerándose, posiblemente, como una característica compartida entre las hormigas (revisado en Palomeque y Lorite 2008). En ortópteros del género *Gryllus* también se ha estudiado la transcripción de hasta 7 familias diferentes de ADNsat, cuya expresión difiere en cuanto a sexos o tejidos (Palacios-Gimenez et al. 2017).

Aislamiento del ADNsat

El aislamiento y caracterización del ADNsat se puede realizar con distinta metodología, desde los llamados métodos clásicos como pueden ser la construcción de genotecas de ADN Cot o el uso de enzimas de restricción, hasta el uso de las nuevas tecnologías basadas en la

secuenciación masiva del genoma, unido a las emergentes herramientas bioinformáticas tales como RepeatExplorer o TAREAN (Novak et al. 2010, 2013, 2017).

Uno de los métodos para aislar ADN repetitivos es la clonación de secuencias obtenidas a partir de una genoteca Cot (Zwick 1997, Vicari et al. 2010) como hemos indicado. Este método está basado en la cinética de renaturalización del ADN (Ferreira & Martins 2008). Cuando se desnaturaliza el ADN de eucariotas el primer tipo de ADN que renaturaliza es el ADN repetido y el último en hacerlo es el ADN de copia única (Britten & Davidson 1971), por lo tanto, el tiempo que tarda una secuencia en concreto en reasociar, es proporcional al número de copias presentes en el genoma (Peterson et al. 2002). Esto permite obtener una primera fracción de ADN enriquecido en secuencias repetitivas que se usará para hacer la genoteca. Debido a la organización molecular del ADNsat, repeticiones dispuestas en tándem, otro método para su aislamiento es la digestión con enzimas de restricción. Cuando el ADN genómico total es digerido con un enzima de restricción cuya diana se encuentra dentro de la unidad de repetición, producirá un patrón de bandas característico al separarlo por electroforesis. Se formarán monómeros cuando la diana del enzima no ha sufrido ninguna mutación; si por el contrario se produce una mutación en la diana, el enzima no será capaz de cortar el ADN, produciendo dímeros, trímeros...etc. (Figura 2).

Paralelamente a la puesta a punto de tecnologías de secuenciación masiva o de segunda generación (*Next Generation Sequencing*, (NGS)), se han desarrollado herramientas bioinformáticas que permiten el manejo y análisis de esta secuenciación. La NGS proporciona una gran cantidad de datos y un alto rendimiento en un espacio temporal muy corto (Ansorge 2009, Shendure & Ji 2008, Schuster et al. 2008).

A partir de los datos de NGS existen varias herramientas bioinformáticas para el aislamiento y caracterización del ADN repetitivo. Entre estas herramientas "RepeatExplorer" es capaz de cuantificar de modo gráfico las similitudes entre las secuencias que son obtenidas mediante la secuenciación masiva sin necesidad de ensamblar las secuencias (Novak et al. 2010, 2013).

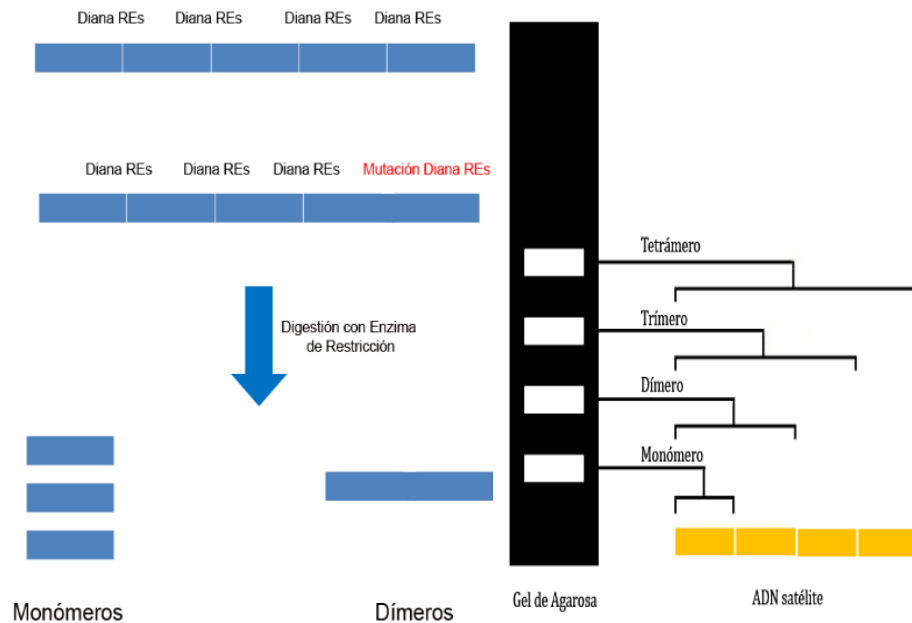


Figura 2. Imagen de formación de los dímeros y patrón típico generado por la digestión con enzimas de restricción de un ADN satélite

El primer paso que lleva a cabo es la comparación de todas las lecturas en lo que se conoce comparación “*all-to-all*”. Las similitudes son usadas para hacer un gráfico sobreponiendo las lecturas que están conectadas, separando las familias de elementos repetitivos. Esta herramienta ha sido muy útil para analizar el ADN repetitivo tanto de animales (Ruiz-Ruano et al. 2016, Pagán et al. 2012) como de plantas (Novak et al. 2010, Macas et al. 2011).

Al conjunto de todos los tipos de ADN repetidos que engloba un genoma se le conoce como “repeatoma” (Maumus & Quesneville 2014). El repeatoma comprende tanto la fracción de ADN repetitivo disperso como la fracción de ADN repetido en tándem. Dentro del “repeatoma” se distingue también la fracción del “satelitoma”, que es la fracción que corresponde únicamente al ADNsat (Ruiz-Ruano et al. 2016). El estudio de las regiones repetidas que forman parte de los genomas ha sido siempre difícil ya que, es muy complicado su ensamblaje. Las nuevas herramientas solventan, en parte, el estudio de dichas regiones y han sido usadas para el estudio, por ejemplo, del ADNsat humano. Estas nuevas tecnologías están siendo usadas para el análisis del genoma, repeatoma y satelitoma de diversos organismos tales como son mamíferos (Smalec et al. 2019), peces (Utsunomia et al. 2019) o en *Caenorhabditis* (Subirana & Messeguer 2017). Más numerosos son los estudios llevados a cabo en plantas (Robledillo et al. 2018, Ruiz-Ruano et al. 2018a, Hlouskova et al. 2019, Bolsheva et al. 2019, Pamponét et al. 2019, Deng et al. 2019, Liu

et al. 2019, Samoluk et al. 2019, Schmidt et al. 2019, Sun et al. 2019). Dentro del grupo de los insectos se han llevado a cabo multitud de estudios que han revelado la evolución del ADNsat en estos organismos. Uno de los grupos más estudiados han sido los Ortópteros (Ruiz-Ruano et al. 2016, 2017, 2018b, Palacios-Gimenez et al. 2017a, 2017b, 2017c), si bien también han sido aplicadas con éxito a otros grupos de insectos, como Hemípteros y Dípteros. (Pita et al. 2017, 2018, de Lima et al. 2017, Talbert et al. 2018.) El conjunto de datos analizados hasta el momento, indica que puede ser característico del genoma de los eucariotas, la presencia de un gran número de familias diferentes de ADNsat.

ADN satélite en Coleópteros y Coccinélidos

En el grupo de los Coleópteros la mayor parte de los estudios llevados a cabo se han realizado en los Tenebriónidos. En este grupo, el ADNsat suele representar una porción bastante abundante del genoma de las especies estudiadas. La mayor parte de estos estudios se llevaron a cabo con el uso de metodologías clásicas (Petitpierre et al. 1988, Pons et al. 1997). Los ADNsat analizados se localizan principalmente en las regiones heterocromáticas de los cromosomas (Barceló et al. 1997, 1998, Pons et al. 2002a, 2002b), aunque algunos de ellos también presentan localización subtelomérica (Pons et al. 1993, Juan et al. 1993, Pons 2004). Más recientemente se ha analizado el genoma del escarabajo *Tribolium castaneum* mediante NGS y el uso de herramientas bioinformáticas. En este estudio ponen de manifiesto que, nueve de las más abundantes familias de ADNsat, se transcriben en el genoma de esta especie (Pavlek et al. 2015).

Los Crisomélidos son otro grupo de coleópteros en el que se ha analizado el ADNsat en varias especies, como *Chrysolina americana* (Lorite et al. 2001), *C. carnifex* (Palomeque et al. 2005), *Xanthogaleruca luteola* (Lorite et al. 2002) y *Leptinotarsa decemlineata* (Lorite et al. 2013). Los ADNsat aislados en estas especies, tienen en común una localización pericentromérica. Cabe destacar dos familias más de Coleópteros donde se han descrito varias familias de ADNsat. Estas familias son Cholevidae y Cincidelidae. *Pholeuon proserpinae* presenta una familia de ADNsat de más de 250 pb rica en A+T y que presenta HORs (Pons et al. 2003). *Cicindela campestris* y *C. maroccana* presentan una familia de ADNsat de más de 380 pb con localización centromérica en todos los cromosomas de ambas especies (Galián & Vogler 2003).

En el grupo de los Coccinélidos no se ha llevado a cabo ningún estudio acerca del ADNsat, siendo por tanto esta Tesis Doctoral pionera en el estudio acerca de este tipo de ADN en el genoma de estas especies.

OBJETIVOS

- 1) Ampliar el conocimiento citogenético en especies de la familia Coccinellidae (Insecta, Coleoptera). Para ello, se pretende realizar un estudio citogenético en aquellas especies que no han sido analizadas previamente, aplicando técnicas clásicas y técnicas de citogenética molecular.
- 2) Iniciar el análisis del ADN satélite en especies de coccinélidos mediante el uso de técnicas clásicas, como el aislamiento mediante enzimas de restricción o la construcción de genotecas de ADN Cot, así como las nuevas técnicas basadas en el uso de datos obtenidos mediante secuenciación masiva y la aplicación de herramientas bioinformáticas.
- 3) Caracterizar el “satelitoma” en cada una de ellas.
- 4) Realizar un estudio comparativo de los satelitomas de las diferentes especies para estudiar el papel del ADN satélite en la evolución y diferenciación genómica en este grupo de insectos.

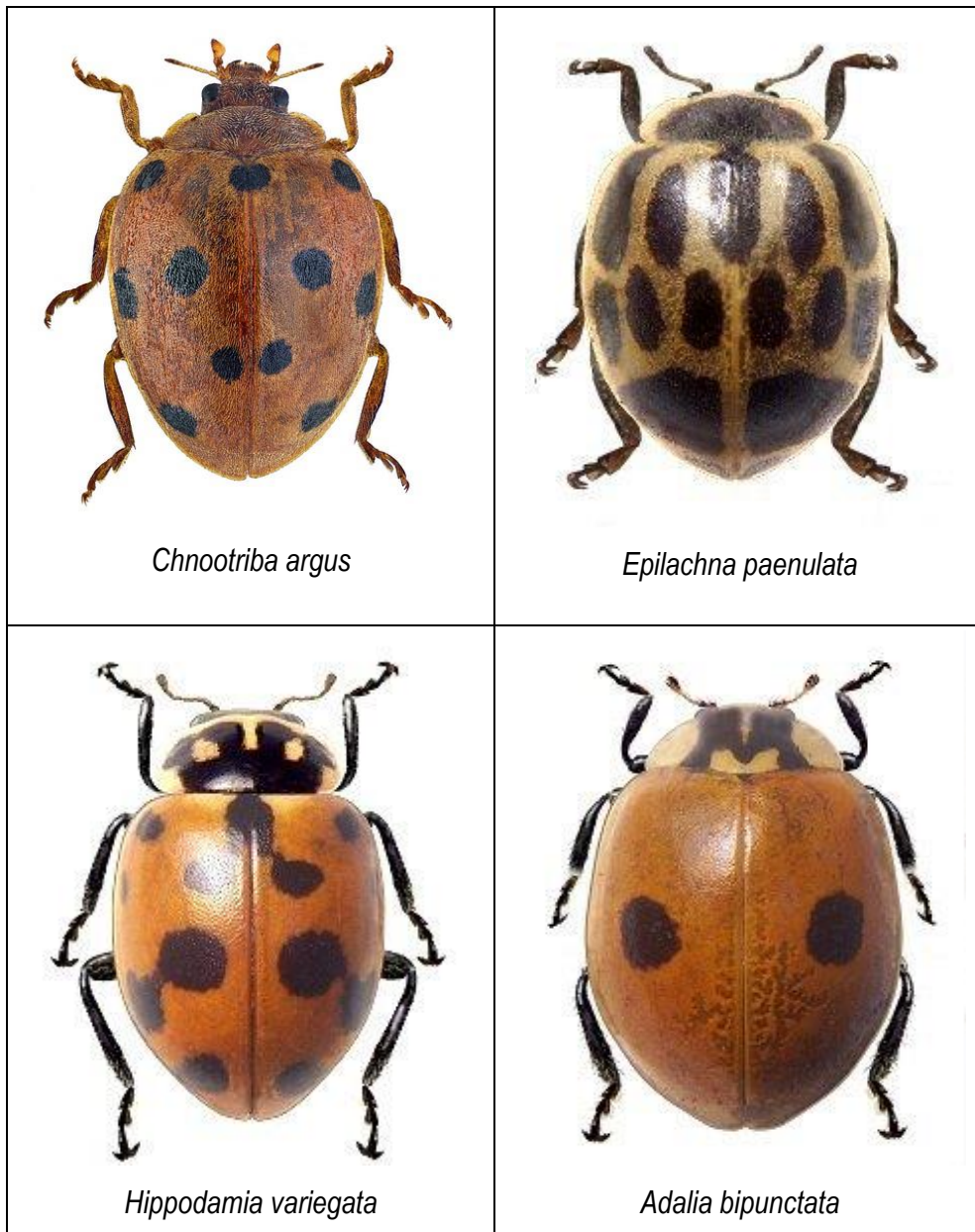
AIMS

- 1) To increase the cytogenetical knowledge in some species belonging to Coccinellidae family (Insecta, Coleoptera). In order to achieve this purpose, cytogenetic analyses will be performed in these species that have not been analyzed before using both classical and molecular cytogenetic techniques.
- 2) To start the analysis of satellite DNA in coccinellids beetles by the use of classical methods such as the use of restriction enzymes and the construction of a Cot-1 DNA library, as well as the use of the data obtained by next generation sequencing and the application of bioinformatic tools.
- 3) To characterize the satellitome in the selected species.
- 4) To perform a comparative analysis of all the satellitomes described in order to study the role of the satellite DNA in the genomic differentiation within this insects group .

RESULTADOS

Los insectos de la familia Coccinellidae, comúnmente conocidos como mariquitas, están compuestos por en torno a unas 6000 especies diferentes. Estas especies se engloban dentro del suborden Polyphaga y en la superclase Cucujoidea. En este grupo de coleópteros los estudios citogenéticos realizados son muy escasos y antiguos, no superando en 200 el número de especies analizadas a nivel cromosómico. A pesar de este escaso número de trabajos, se ha podido determinar que el número cromosómico más común es de $2n=20-22$, con 9 o 10 parejas de cromosomas autosómicos y una pareja de cromosomas sexuales XY, que en meiosis forman una asociación aquíasmática que se ha denominado paracaídas, Xyp. En lo que respecta al ADN satélite no se ha llevado a cabo ningún estudio hasta la fecha, siendo esta Tesis Doctoral pionera en el estudio del ADN satélite en coccinélidos. Para ello se han seleccionado cuatro especies de la familia: *Chnootriba argus*, *Epilachna paenulata*, *Hippodamia variegata* y *Adalia bipunctata*. En algunas de ellas, se han realizado estudios citogenéticos ya que no se habían sido estudiadas hasta el momento. Igualmente se han aplicado en algunas de ellas técnicas clásicas en el aislamiento del ADN satélite. Finalmente se ha secuenciado el genoma de las cuatro especies usando técnicas de secuenciación masiva de nueva generación (NGS). Los datos obtenidos han sido usados para hacer un análisis del ADN repetitivo de cada especie mediante el software RepeatExplorer.

Los resultados obtenidos nos han permitido ampliar y generar el conocimiento acerca del ADN satélite de estos insectos y ver la evolución que ha tenido este a lo largo de la filogenia de este grupo.



Chnootriba argus

El análisis citogenético de *Chnootriba argus* (= *Henosepilachna argus*) (CAPÍTULO I) permitió determinar que esta especie tiene un número cromosómico de $2n=18$ (16A+XY), que es el común dentro de la tribu Epilachnini, tribu a la que pertenece. El estudio de los cromosomas meióticos en profase I mostró que los cromosomas sexuales se asocian formando el llamado "paracaídas". El bandeo C mostró la existencia de bloques heterocromáticos de gran tamaño en las regiones pericentroméricas de todos los cromosomas. La tinción con DAPI muestra tinción positiva en estas regiones, indicado que se trata de heterocromatina rica en A+T. Mediante

hibridación *in situ* fluorescente (FISH) se pudo determinar que las regiones del organizador nucleolar se encuentran en el brazo corto del cromosoma X. La FISH con la secuencia telomérica reveló que en esta especie los telómeros de los cromosomas están compuestos por las repeticiones del pentanucleótido TTAGG.

La aplicación de técnicas de aislamiento de ADN satélite (ADNsat) mediante digestión con enzimas de restricción permitió aislar una familia de ADNsat organizada por repeticiones en tándem de 658 pb (HargM) y con una riqueza en A+T del 67,3% (**CAPÍTULO II**). Este ADNsat está localizado en las regiones subteloméricas de todos los cromosomas, excepto el brazo largo del cromosoma X. Este ADNsat no está presente en las otras tres especies de coccinélidos analizadas. Mediante RT-PCR se ha comprobado la existencia de transcripción de este satélite en individuos adultos.

No siendo posible aislar más familias de ADNsat mediante digestión con enzimas de restricción se aplicaron otras metodologías para hacerlo, en concreto se ha realizado una genoteca de ADN Cot (**CAPÍTULO III**). La clonación del ADN C0t-1 dio como resultado el aislamiento de un ADN repetitivo con una unidad de repetición de seis pares de bases, TTAAAA, que se localiza en las regiones pericentroméricas de todos los cromosomas. Su abundancia en el genoma (aproximadamente el 20%) sugiere que se trata del ADNsat principal en esta especie. El tamaño de este ADNsat, con sólo seis pares de bases, es inusual en los ADNsat de coleópteros, donde el ADNsat suele tener unidades de repetición de un tamaño mucho mayor. Este ADNsat está también presente en una de las especies de coccinélidos analizada, en concreto en *Epilachna paenulata*, donde al igual que en *Chnootriba argus*, está localizada en las regiones pericentroméricas de todos los cromosomas. *Epilachna paenulata*, al igual que *Chnootriba argus*, pertenece a la tribu Epilachnini. En otras especies de esta tribu no parece conservarse este ADNsat. No hay suficientes datos para determinar si la presencia del ADNsat TTAAAA es un carácter plesiomórfico de tribu Epilachnini y se ha perdido en algunas líneas evolutivas, o si es un carácter apomórfico que ha aparecido una o varias veces dentro de la tribu Epilachnini. Sería interesante realizar un amplio estudio del ADNsat TTAAAA en especies de Epilachnini para analizar su evolución.

La secuenciación del genoma de esta especie y el análisis de los resultados obtenidos con RepeatExplorer, permitió caracterizar 44 familias de ADNsat, que en conjunto suponen casi el 23% de su genoma (**CAPÍTULO V**). Esto permitió además cuantificar más precisamente las dos familias de ADNsat que se habían aislado con anterioridad. En concreto el ADNsat TTAAAA

representa el 19% del genoma y la familia HargM el 1,17%. Usando la nomenclatura propuesta por Ruiz-Ruano et al. (2016) que propone numerar las familias en función de su abundancia, incluyendo el nombre de la especie y el tamaño de la unidad de repetición, estas dos familias de ADNsats pasan a denominarse CargSat01-6 y CargSat02-656. Aunque inicialmente se consideró que en esta segunda familia la unidad de repetición era de 658 pb, el análisis más completo obtenido tras la NGS muestra que realmente la unidad de repetición es de 656 pb, por lo que este tamaño es el que aparece en el nombre. El resto de familias de ADNsats presentan abundancias mucho más bajas en el genoma, y solo una de ellas (CargSat03-149) supera, al igual que las anteriores, el 1% del genoma. Once de las familias de ADNsats tienen proporciones en el genoma entre 0.01 y el 1%, mientras que las 30 familias restantes representan menos del 0.01% del genoma. 43 de las 44 familias de ADNsats, muestran contenidos en A+T superiores al 50%. En conjunto el genoma de *Chnootriba argus* tiene una riqueza total en A+T del 74,23%, siendo este uno de los más altos descritos hasta el momento en insectos. Esto es debido en gran parte a la familia de ADNsats TTAAAA, que por sí sola, constituye el 19% del genoma. Descartando este ADNsat, el resto del genoma de esta especie tendría un contenido en A+T aproximadamente del 68%.

Epilachna paenulata

De acuerdo con Drets et al. (1983), la fórmula cromosómica de esta especie es $2n=18, 16A+Xyp$, con grandes bloques heterocromáticos pericentroméricos en todos los cromosomas. Consecuentemente, es similar al de *Chnootriba argus*. El análisis del genoma de esta especie, ha puesto de manifiesto la existencia de 19 familias de ADNsats que conforman el 15,68% del genoma (**CAPÍTULO V**). Al comparar estas familias de ADNsats con las descritas con anterioridad en *Chnootriba argus*, se pueden encontrar varias similitudes entre algunas familias. Tal como se ha comentado anteriormente ambas especies comparten el ADNsat TTAAAA, que también es el ADNsat mayoritario en *Epilachna paenulata*, si bien su frecuencia en el genoma es menor, ya que representa el 11%. Al igual que en *Chnootriba argus* el contenido total de A+T en el genoma de *Epilachna paenulata* es muy alto, 74.04%. A pesar de que *Chnootriba argus* y *Epilachna paenulata* pertenecen a la misma tribu, solo comparten esta familia de ADNsats. De las restantes familias solo se observa cierta similitud para otras dos familias EpaeSat03-528 con CargSat04-311 y EpaeSat11-311 con CargSat05-303.

Hippodamia variegata

El cariotipo de *Hippodamia variegata* (= *Adonia variegata*) fue analizado por Rozek & Holecova (2002). El número cromosómico es de $2n=20$, $18A+Xyp$. Presenta bloques heterocromáticos en todos los cromosomas, aunque son de menor tamaño a los encontrados en *Chnootriba argus* o *Epilachna paenulata*. La tinción con DAPI muestra que estas regiones son ricas en A+T. La secuenciación del genoma muestra que su contenido en A+T es algo inferior al de las especies anteriores, 63,6%. El satelitoma de esta especie se compone de un total de 29 familias de ADNsat diferentes; todas ellas componen el 14,75% del genoma de esta especie (**CAPÍTULO IV**). La familia de ADNsat principal, HvarSat01-277, tiene una unidad de repetición de 277 pb y representa el 10,76% del genoma y está localizada en las regiones pericentroméricas. El resto de familias de ADNsat representan porcentajes bajos en el genoma y solo una de las restantes familias, HvarSat02-127, supera el 1% del genoma. La familia HvarSat07-2000, con una unidad de repetición de 2 Kb es el ADNsat con mayor unidad de repetición descrita hasta ahora en coleópteros.

Adalia bipunctata

El estudio citogenético en esta especie fue realizado en los trabajos pioneros de citogenética de insectos (John & Lewis 1960). El cariotipo es $2n=20$, $18A+Xyp$. Sin embargo, el bandeo C de esta especie se ha llevado a cabo recientemente, observándose grandes bloques heterocromáticos pericentroméricos en todos los cromosomas (Dutrillaux & Dutrillaux 2019). La secuenciación del genoma de esta especie ha permitido determinar su riqueza en A+T (62,66%) e igualmente, que su satelitoma está formado por 51 familias, que en conjunto suponen casi el 15% del genoma (**CAPÍTULO V**). De ellas solo dos superan el 1%; la familia principal AbipSat01-187, con un 10,06% y la familia AbipSat02-497, que tiene una proporción en el genoma del 2,35%. Con excepción de dos familias de ADNsat, todas las demás tienen una riqueza de A+T igual o superior al 50%, pudiendo llegar hasta el 87,5%. De esta especie existen secuenciaciones de su transcriptoma que han permitido determinar la existencia de transcripción para las diferentes familias de ADNsat. Ha sido posible encontrar transcritos para 42 de las 51 familias de ADNsat presentes en esta especie, entre ellas el ADNsat más abundante. Los niveles de transcripción para las diferentes familias, medido como el número de lecturas con similitud, son variables y no parece existir correlación con la frecuencia de cada familia de ADNsat en el genoma. Así, por ejemplo, el ADNsat para el que se han encontrado mayor número de lecturas en el transcriptoma es

AbipSat06-193, que solo representa el 0,2% del genoma. Una de las familias de ADNsat de *Adalia bipunctata* (AbipSat41-169) también está presente en el genoma de *Chnootriba argus* (CargSat17-169). Ambas familias son minoritarias dentro de cada genoma; 0,005% en *Adalia bipunctata* y 0,007% en *Chnootriba argus*. La secuencia consenso de las dos familias son idénticas. La variabilidad de este ADNsat es muy baja dentro de cada especie, con similitudes por encima del 98%.

El tamaño de los monómeros que se han aislado en las cuatro especies estudiadas es muy variable, con valores que oscilan desde el mínimo de 6 pb hasta el máximo de 2.000 pb. Aunque el rango de tamaños es muy grande, parece que hay una tendencia en las cuatro especies analizadas hacia tamaños de unidades de repetición de entre 6 y 200 pb; del total de 143 familias de ADNsat diferentes caracterizadas el 68% presenta tamaños de monómero dentro de ese rango.

DISCUSION

De las 4 especies que se han analizado en la presente Tesis Doctoral, solo *Chnootriba argus* no había sido estudiada citogenéticamente con anterioridad. El número cromosómico de esta especie, $2n=18$, concuerdan con el rango de números cromosómicos de las especies de coccinélidos estudiadas (Gregory et al. 2007). Sloggett & Honěk (2012) determinaron que el número cromosómico más común en la tribu Epilachnini (grupo al cual pertenece *Chnootriba argus*) era de $2n=18-20$. En cuanto al determinismo sexual de los coleópteros, se estableció como más común el determinismo sexual de tipo XX/XY, modelo también presentado por *Chnootriba argus*. Debido a la diferencia de tamaño entre los cromosomas sexuales, en meiosis I presentan la asociación llamada en “paracaídas” (Xyp), característica que, en general, parece ser común de los coleópteros (Stevens 1906, Smith 1950). De las tres especies restantes ya se conocían sus números cromosómicos, siendo para *Epilachna paenulata* $2n=18$ (Drets et al. 1983), para *Hippodamia variegata* $2n=20$ (Rozek & Holecova 2002) y para *Adalia bipunctata* $2n=20$ (John & Lewis 1960), todas ellas con determinismo sexual del tipo XX/Xyp. En el caso de *Hippodamia variegata*, el cariotipo encontrado en las poblaciones españolas analizadas presenta discordancias con el cariotipo descrito, procedente de individuos centroeuropeos. En estas poblaciones, el número cromosómico era $2n=18$, con 7 pares de cromosomas subtelocéntricos y 2 pares de metacéntricos más el cromosoma X, también metacéntrico y un cromosoma Y de pequeño tamaño (Rozek & Holecova 2002). El análisis de individuos de España muestra que son tres los pares metacéntricos, además del cromosoma X, siendo los demás acrocéntricos o subtelocéntricos, incluyendo el cromosoma X. Esto podría deberse en parte a la existencia de polimorfismos entre las poblaciones, debidas, probablemente, a una inversión pericentromérica.

Entre las técnicas de bandeo cromosómico, ha sido el bandeo C el que más se ha aplicado en coleópteros. Esta técnica pone de manifiesto la heterocromatina. Se ha usado en tres de las cuatro especies objeto de estudio, en concreto en *Epilachna paenulata* (Drets et al. 1983), en *Hippodamia variegata* (Rozek & Holecova 2002) y en *Adalia bipunctata* (Dutrillaux & Dutrillaux 2019). El bandeo C en *Chnootriba argus* mostró que, al igual que en las otras especies de coccinélidos, existen una gran cantidad de heterocromatina pericentromérica en todos los cromosomas, incluyendo el cromosoma Y. La tinción con DAPI en los cromosomas de las especies estudiadas, ha mostrado que estas regiones son ricas en A+T.

Los estudios sobre la organización de los cromosomas, incluyen el análisis de las regiones NOR (*Nucleolar Organizer Regions*) y de los telómeros. Clásicamente, las regiones NOR se habían puesto de manifiesto mediante la tinción con nitrato de plata, pero muchos autores han cuestionado su especificidad (Medina et al. 1983, Jiménez et al. 1988, Lorite et al. 1997). En la actualidad, es más común la realización de FISH usando como sonda secuencias de ADN. Esta técnica en *Chnootriba argus*, muestra que estos genes están localizados en el brazo corto del cromosoma X. La localización cromosómica de las NOR es variable dentro del grupo de los coccinélidos, localizándose en algunas especies en los cromosomas sexuales, como en *Olla v-nigrum* (Maffei et al. 2001) o en los autosomas, como en *Cycloneda sanguinea* (Maffei et al. 2004). En conjunto, dentro de los coleópteros, también se observa esta localización variable, localizándose en los cromosomas sexuales, autosomas o ambas, dependiendo de la especie estudiada (Oliveira et al. 2012, Arcanjo et al. 2013). Para los insectos se considera que la secuencia telomérica ancestral está formada por la repetición del pentanucleótido TTAGG (Frydrychová et al. 2004). Mediante FISH se ha comprobado que esta secuencia también forma los telómeros de *Chnootriba argus*. Este ha sido el primer estudio sobre ADN telomérico en coccinélidos, mostrando que posiblemente, este grupo de insectos muestra la secuencia telomérica típica. Sin embargo, se han analizado especies de insectos en los que se ha observado la pérdida de la repetición “ancestral” en favor de la repetición TCAGG, como ocurre en *Tribolium castaneum* (Richards et al. 2008) o en otras especies de la familia Tenebrionidae, así como en especies de las familias Mycetophagidae y Meloidae (Mravinac et al. 2011).

Los estudios sobre ADNsat en el grupo de los Coleópteros se limitan a menos de 50 especies, destacando los llevados a cabo en las familias Tenebrionidae y Chrysomelidae (revisión en Palomeque & Lorite 2008). En la mayor parte de estos trabajos, se han aplicado técnicas clásicas de aislamiento de ADNsat, principalmente digestión de ADN genómico con enzimas de restricción. Dentro del grupo de los Coccinélidos no se ha descrito ninguna familia de ADNsat hasta la realización de esta Tesis Doctoral. Con el uso de técnicas clásicas, se han podido caracterizar dos familias de ADNsat en el genoma de la especie *Chnootriba argus*. Con el uso de una batería de enzimas de restricción sólo se ha podido aislar una familia de ADNsat, HargM, con una unidad de repetición de 658 pb. Este ADNsat muestra una localización subtelomérica en todos los cromosomas excepto en el brazo largo del cromosoma X. Esta familia de ADNsat es la primera descrita con localización exclusivamente subtelomérica en todos los cromosomas ya que, de modo general, las familias de ADNsat de los coleópteros suelen tener localización pericentromérica (Palomeque & Lorite 2008, Biscotti et al. 2015b) o subtelomérica, pero solo en algunos

cromosomas (Juan et al. 1993, Pons et al. 2002, Lorite et al. 2002). Mediante PCR, y en las especies *Henosepilachna vigintioctomaculata*, *Henosepilachna septima*, *Epilachna paenulata* y *Diekeana admirabilis* (= *Epilachna admirabilis*), se ha buscado la presencia de HargM. Los resultados determinan que esta familia de ADNsat no está presente en ninguna de estas especies de la tribu Epilachnini.

La existencia de grandes regiones heterocromáticas pericentroméricas, nos sugirió que deberían existir una o varias familias más de ADNsat, localizadas en estas regiones y diferentes a HargM. Para la caracterización de nuevas familias, se construyó una genoteca de ADN-Cot1. La secuenciación y análisis de todos los clones generados, demostró la existencia de una nueva familia compuesta por la repetición del hexanucleótido TTAAAA, que suponía aproximadamente el 20% del genoma de la especie. El análisis mediante FISH, mostró una señal positiva en las regiones pericentroméricas de todos los cromosomas, incluyendo ambos cromosomas sexuales. Este ADNsat, con un monómero de tan solo 6 pb, constituye la familia de ADNsat más abundante en esta especie, con el monómero más corto descrito hasta la fecha en coleópteros. Dentro de insectos, se conocen familias de ADNsat con unidades de repetición también cortas, como en varias especies del género *Drosophila*. En *D. virilis*, tres familias de ADNsat que representan hasta el 50% del genoma de esta especie, presentan unidades de repetición, compuestas de heptanucleótidos que difieren entre sí en uno o dos nucleótidos. Estas familias son SatI (ACAAACT), SatII (ATAAACT) y SatIII (ACAAATT) (Gall & Atherton 1974). En *D. melanogaster* la heterocromatina está formada por repeticiones entre 5 y 12 nucleótidos (Talbert et al. 2018). En *D. hydei* la repetición de siete nucleótidos forma parte de la heterocromatina de los autosomas (Burgtorf & Bünemann 1993). La presencia de la familia ADNsat TTAAAA, fue testada mediante dot-blot en otras especies de la tribu Epilachnini, obteniendo resultados positivos tan solo en la especie *Epilachna paenulata*, en la que también tiene una localización centromérica en todos los cromosomas. La presencia en el genoma de *Epilachna paenulata* y en el de *Chnootriba argus*, anteriormente incluida en el género *Henosepilachna* y la ausencia en los genomas de *Henosepilachna vigintioctomaculata*, *Henosepilachna septima*, y *Diekeana admirabilis*, parece estar en concordancia con el origen polifilético de los géneros *Epilachna* y *Henosepilachna* (Katoh et al. 2014).

En esta Tesis Doctoral se han caracterizado los satelitomas de cuatro especies de coccinélidos. Los datos procedentes de la secuenciación de estos genomas, han puesto de manifiesto que todos son ricos en A+T, con valores que oscilan entre el 62,66 y el 74,23%. El alto

contenido en A+T de *Chnootriba argus* (74,23%) y de *Epilachna paenulata* (70,04%) se puede deber a la presencia en sus genomas de la familia de ADNsat TTAAAA, mayoritaria en ambos genomas y que representa el 19% en *Chnootriba argus* y el 11% en *Epilachna paenulata*. Los satelitomas de estas especies presentan un número variable de familias de ADNsat, caracterizándose 29 familias en *Hippodamia variegata*, 44 en *Chnootriba argus*, 19 en *Epilachna paenulata* y un total de 51 familias en *Adalia bipunctata*. Si comparamos el número de familias de ADNsat con los datos de otros insectos, se observa que el número de familias depende de la especie, ya que existen especies con solo 11, como *Gryllus assimilis* (Palacios-Gimenez et al. 2017) hasta especies con más de 80 familias de ADNsat como *Pyrgomorpha conica* (Ruiz-Ruano et al. 2018). Lo que sí parece ser una característica común en la gran mayoría de ADNsat, es la alta proporción de A+T en la unidad de repetición, característica que ya se había determinado como común en el ADNsat de los insectos utilizando técnicas clásicas (Palomeque & Lorite 2008). Antes de la aplicación de las nuevas metodologías, se consideraba que la unidad de repetición más común estaba formada por 100-400 pb. Actualmente, se han descrito familias de ADNsat con una unidad repetitiva de solo 4 pb, como la repetición GATA descrita en *Triatoma infestans* (Pita et al. 2017) o de 6 pb como las descritas en los genomas de *Chnootriba argus* y *Epilachna paenulata* (CargSat01-6, CargSat24-6, EpaeSat01-6, EpaeSat04-6). Igualmente, las nuevas tecnologías han puesto de manifiesto la existencia de monómeros de gran tamaño. Unidades de repetición entre 1.000 y 2.000 pb, se han descrito en *Triatoma infestans*, TinfSat04-1000 (Pita et al. 2017) y en los coccinélidos, las familias CargSat06-1021, CargSat12-1844, AbipSat12-1902, AbipSat13-1239 o la familia HvarSat07-2000, siendo esta última la familia con la unidad de repetición de mayor tamaño descrita hasta la fecha en coleópteros. En general, y a pesar de que se han aislado familias de ADNsat con tamaño monomérico muy variable, en las especies de coccinélidos analizadas las unidades de repetición mayoritariamente presentan un tamaño entre 6-200 pb.

El análisis de los satelitomas permite realizar estudios comparativos sobre la organización y evolución de los genomas. Este tipo de estudios se ha llevado a cabo, por ejemplo, en los hemípteros *Triatoma infestans* y *Rhodnius prolixus*. Ambas especies, a pesar de ser especies cercanas evolutivamente, tan solo comparten 4 familias de ADNsat (Pita et al. 2018). El ADNsat parece estar implicado en procesos tales como la aparición de nuevas especies y parece estar directamente relacionado con el valor C de cada especie, como se ha demostrado en los linajes Andino y no-Andino de *Triatoma infestans*. Ambos linajes presentan el mismo número cromosómico pero tamaños de genoma muy diferentes, 1,98 y 1,5 pb, debido a las diferencias

en la cantidad de heterocromatina entre ellos (Pita et al. 2017). La comparación de los satelitomas de las cuatro especies de coccinélidos, muestra que algunas familias están compartidas entre especies, salvo en *Hippodamia variegata*, cuyas familias de ADNsat solo están presentes en su genoma. *Chnootriba argus* y *Epilachna paenulata* comparten 3 familias de ADNsat, aunque los grados de similitud entre ellas es variable. En este sentido, destacamos la familia de ADNsat compartida entre *Chnootriba argus* y *Adalia bipunctata* con una similitud del 100% entre ellas (AbipSat41-169 y CargSat17-169). Estos ADNsat son minoritarios en el genoma de estas especies ya que representan el 0,007 y 0,005% en sus respectivos genomas. El hecho de que estas especies compartan una o varias familias de ADNsat podría apoyar la “hipótesis de la librería”. Esta hipótesis sugiere que especies emparentadas entre sí, con un origen común, compartirán una o más familias de ADNsat, aunque puedan diferir en términos de su abundancia. El ancestro común tendría su propia colección de ADNsat y en el proceso de especiación, cada nueva especie amplificaría, de modo diferencial, una familia u otra, conservando restos de otras familias (Fry & Salser 1977). En el genoma de coccinélidos nuestros datos indican la existencia de un elevado número de familias de ADNsat, sin embargo, muy pocas de ellas están compartidas entre especies. *Chnootriba argus* y *Epilachna paenulata*, ambas de la tribu Epilachnini, solo comparten tres familias de ADNsat, una de ellas muy diferenciada. *Adalia bipunctata* y *Hippodamia variegata*, ambas de la tribu Coccinellini, no parecen compartir ninguna familia de ADNsat. Como se ha indicado anteriormente, entre ambas tribus sólo parece estar compartida una familia de ADNsat (AbipSat41-169 y CargSat17-169). El hecho de que entre especies de la misma familia, e incluso dentro de una misma tribu, existan muy pocas familias de ADNsat compartidas, indicaría que la diferenciación y diversificación de los coccinélidos ha ido acompañada de profundos cambios en sus genomas en relación con el ADNsat. Por supuesto, hay que tener en cuenta que el número de especies analizado es actualmente muy bajo, y que será necesario ampliarlo para poder establecer conclusiones evolutivas claramente establecidas.

La función del ADNsat es uno de los temas más controvertidos en el estudio de éste. Las posibles funciones que se le han atribuido están relacionadas con el mantenimiento de la heterocromatina, así como las regiones centroméricas o en el mantenimiento de la integridad del genoma (Biscotti et al 2015a, 2015b, Perea-Resa & Blower 2017). En las especies que forman parte de esta Tesis Doctoral, se han realizado análisis sobre la transcripción del ADNsat en dos de las especies. La transcripción del ADNsat HargM de *Chnootriba argus* se puso de manifiesto mediante RT-PCR. En *Adalia bipunctata*, gracias a la existencia de un transcriptoma disponible en las bases de datos (Vogel et al. 2017) se ha podido realizar un análisis más completo, pudiéndose

determinar la existencia de transcritos para 42 de las 51 familias de ADNsat caracterizadas en *Adalia bipunctata*. Los niveles de expresión, medidos como número totales de transcritos, no parecen estar relacionados con la abundancia del ADNsat en el genoma, ya que, las familias donde se detectan mayor número de transcritos, sólo constituyen el 0,2 y 0,04% del genoma de esta especie. En otros trabajos se ha relacionado la presencia de ciertos siRNAs en *Drosophila melanogaster* con la transcripción del ADNsat 1.688; estos siRNAs están directamente relacionados con la formación de la heterocromatina de los cromosomas 2 y 3 (Usakin et al. 2007). En otros casos la transcripción de este tipo de ADNsat está relacionada con fenómenos de estrés como choques térmicos. Por ejemplo, *Palorus subdepressus*, tras un choque térmico muestra un aumento de transcritos derivados de varias familias de ADNsat (Pezer & Ugarkovic 2009). La transcripción de los ADNsat se ha demostrado además en varias especies de himenópteros (revisado en Palomeque & Lorite 2008) y en ortópteros (Rojas et al. 2000, Palacios-Gimenez et al. 2017c). Serían necesarios realizar estudios adicionales que permitiesen determinar si alguno de los transcritos encontrados en las especies de coccinélidos tiene alguna función.

CONCLUSIONES

- 1) Los cariotipos de las especies analizadas presentan las características más comunes del grupo de los coccinélidos, con números cromosómicos de $2n=18-20$, con una pareja de cromosomas sexuales del tipo Xyp. Además, también parece ser una característica común, la existencia en los cromosomas de una gran cantidad de heterocromatina pericentromérica, rica en A+T.
- 2) Los genomas de los coccinélidos analizados muestran un elevado número de familias de ADN satélite (19 en *Epilachna paenulata*, 29 en *Hippodamia variegata*, 44 en *Chnootriba argus* y 51 en *Adalia bipunctata*). No parece existir correlación entre el número de familias y el porcentaje del genoma que representa en conjunto el ADN satélite (16.7% en *Epilachna paenulata*, 14.8% en *Hippodamia variegata*, 22.8% en *Chnootriba argus* y 14.9% en *Adalia bipunctata*).
- 3) Todas las especies analizadas tienen una familia de ADN satélite principal, mayoritario en su genoma. Este ADN satélite principal, representa entre el 10 y el 19% y está localizado en las regiones pericentroméricas de todos los cromosomas.
- 4) La familia ADN satélite TTAAAA, presente en *Chnootriba argus* y en *Epilachna paenulata*, es el ADN satélite principal cuya unidad de repetición tiene el tamaño más pequeño, descrito hasta el momento, en el orden Coleoptera. Por el contrario, la familia de ADN satélite HvarSat07-2000, de *Hippodamia variegata*, es la familia de ADN satélite con mayor tamaño de unidad repetitiva descrita en Coleópteros.
- 5) Existe una amplia variabilidad del tamaño monómero observado en el satelitoma de las cuatro especies estudiadas, oscilando entre 6 y 2000 pb, si bien la mayor parte de los ADN satélites tienen una unidad de repetición menor de 200 pb.
- 6) Los genomas de las cuatro especies son ricos en A+T, con valores que oscilan entre el 62,66 y el 74,23%. Los inusualmente altos porcentajes que presentan los genomas de *Chnootriba argus* como el de *Epilachna paenulata* (74,23 y 74,04% respectivamente) son debidos a la presencia en ambos genomas de la familia de ADN satélite TTAAAA, cuyo porcentaje en ambos genomas es del 19 y del 11% respectivamente.

- 7) A pesar del elevado número de familias de ADN satélite presente en los genomas de los coccinélidos, el número de familias que están compartidas entre especies es muy bajo. Esto indicaría que la diferenciación de los genomas en las especies de coccinélidos ha ido acompañada de profundos cambios en la composición del ADN satélite.

- 8) El análisis del transcriptoma de *Adalia bipunctata* muestra se transcriben la mayor parte de los ADN satélites presentes en su genoma. Es posible que esto sea una característica común entre los coccinélidos.

CONCLUSIONS

- 1) The karyotypes of the analyzed species show the most common features within the coccinellidae group, with a chromosome number of $2n=18-20$, with a sexual pair Xyp. Moreover, it seems to be a common feature that all the chromosomes show a big block of pericentromeric heterochromatin A+T rich.
- 2) All the analyzed genomes show a large number of satellite DNA families (19 in *Epilachna paenulata*, 29 in *Hippodamia variegata*, 44 in *Chnootriba argus* and 51 in *Adalia bipunctata*). It does not seem to be a correlation between the number of families and the percentage that they represent within the genome (16.7% in *Epilachna paenulata*, 14.8% in *Hippodamia variegata*, 22.8% in *Chnootriba argus* and 14.9% in *Adalia bipunctata*)
- 3) All the analyzed species show a main satellite DNA family in their genomes. This principal family occupies from the 10 to the 19% and it is located on the pericentromeric regions on all the chromosomes.
- 4) The TTAAAA satellite DNA family, present in *Chnootriba argus* and in *Epilachna paenulata*, is the main satellite DNA with the shortest repetition unit described until now in Coleoptera. In addition, the satellite DNA HvarSat07-2000, from *Hippodamia variegata*, is the largest satellite DNA described in Coleoptera.
- 5) There is a wide variability in the monomer size in the satellite DNA families in the four analyzed species, ranging from 6 to 2,000 bp, although most satellite DNA families have a monomer under 200 bp.
- 6) The four analyzed genomes are A+T rich (62.66 to 74.23%). The unusually high A+T riches found in *Chnootriba argus* and *Epilachna paenulata* (74.23 y 74.04%) probably are due to the presence in both genomes of the TTAAAA satellite DNA, that represents the 19 and the 11% of their genomes respectively.
- 7) Despite the high number of satellite DNA families present in the coccinellids genomes, the number of shared families between them is very low. This could indicate that in the genome differentiation has been followed by very deep changes in the satellite DNA composition.

- 8) The analysis carried out in *Adalia bipunctata* show the transcription of the most satellite DNA families present in its genome. It is possible that it could be a common characteristic in coccinellids.

BIBLIOGRAFÍA

- Ansorge WJ (2009). Next-generation DNA, sequencing techniques. *New Biotechnol.*, 25(4):195–203. doi: 10.1016/j.nbt.2008.12.009
- Arcanjo A, Cabral-de-Mello, Martins C, de Moura R & de Souza MJ (2013). Chromosomal diversification of diploid number, heterochromatin and rDNAs in two species of *Phanaeus* beetles (Scarabaeidae, Scarabaeinae). *Genet. Mol. Biol.*, 36: 341-346. doi: 10.1590/S1415-47572013005000031
- Barceló F, Pons J, Petitpierre E, Barjau I & Portugal J (1997). Polymorphic curvature of satellite DNA in three subspecies of the beetle *Pimelia sparsa*. *Eur. J. Biochem.*, 244: 318-324. doi: 10.1111/j.1432-1033.1997.00318.x
- Barceló F, Gutiérrez F, Barjau I & Portugal F (1998). A theoretical perusal of the satellite DNA curvature in Tenebrionids beetles. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 16:41-50. doi: 10.1080/07391102.1998.10508225
- Beauchamp RL & Angus RB (2006). A chromosomal analysis of the four British ladybirds of the subfamily Coccidulinae (Coleoptera: Coccinellidae). *Proc. Russian Entomol. Soc.*, 77: 18-27.
- Biscotti MA, Olmo E & Heslop-Harrison JS (2015a). Repetitive DNA in eukaryotic genomes. *Chromosome Res.*, 23: 415–420. doi: 10.1007/s10577-015-9499-z
- Biscotti MA, Canapa A, Forconi M, Olmo E & Barucca M (2015b). Transcription of tandemly repetitive DNA: functional roles. *Chromosome Res.*, 23: 463–477. doi: 10.1007/s10577-015-9494-4
- Blackburn EH (1991). Structure and function of telomeres. *Nature*, 350: 569–573. doi: 10.1038/350569a0
- Blackburn EH & Gall J (1978). A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *J. Mol. Biol.*, 12 (1): 33-53, ISSN 0022-2836. doi: 10.1016/0022-2836(78)90294-2
- Bolsheva NL, Melnikova NV, Kirov IV, Dmitriev AA, Krasnov GS, Amosova A, Samatadze T, Yurkevich O, Zoshchuk S, Kudryavtseva A & Muravenko O (2019). Characterization of repeated DNA sequences in genomes of blue-flowered flax. *BMC Evol. Biol.*, 19:49. doi: 10.1186/s12862-019-1375-6.
- Brajković J, Feliciello I, Bruvo-Madžarić B & Ugarković D (2012). Satellite DNA-like elements associated with genes within euchromatin of the beetle *Tribolium castaneum*. *G3 (Bethesda, Md.)*, 2(8): 931–941. doi: 10.1534/g3.112.003467

- Britten RJ & Kohne DE (1968). Repeated sequences in DNA. Hundreds of thousands of copies of DNA sequences have been incorporated into the genomes of higher organisms. *Science*, 161: 529–540. doi: 10.1126/science.161.3841.529
- Britten RJ & Davidson EH (1971). Repetitive and non-repetitive DNA sequences and a speculation on the origins of evolutionary novelty. *Q. Rev. Biol.*, 46: 111-138. doi: 10.1086/406830
- Britten RJ, Graham DE & Neufeld BR (1974). Analysis of repeating DNA sequences by reassociation. *Methods Enzymol.*, 29: 363–405. doi: 10.1016/0076-6879(74)29033-5
- Brown TA (2002). The repetitive DNA content of genomes. En “*Genomes*”, 2^a ed. Oxford: Wiley-Liss. pp 59-64.
- Bruford MW & Wayne RK (1993). Microsatellites and their application to population genetic studies. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 3: 939-943. doi: 10.1016/0959-437X(93)90017-J
- Bruvo-Madžarić B, Plohl M & Ugarković D (2007). Wide distribution of related satellite DNA families within the genus *Pimelia* (Tenebrionidae). *Genetica*, 130:35–42. doi: 10.1007/s10709-006-0017-2
- Burgtoft C & Bünemann H (1993). A telomere-like satellite (GGGTCAT)_n comprises 4% of genomic DNA of *Drosophila hydei* and is located mainly in centromeric heterochromatin of all large acrocentric autosomes. *Gene*, 137: 287-91. doi: 10.1016/0378-1119(93)90022-u
- Buscaino A, Allshire R & Pidoux A (2010). Building centromeres: home sweet home or a nomadic existence? *Curr. Opin. Gen. Dev.*, 20:118–126. doi: 10.1016/j.gde.2010.01.006
- Cabral-de-Mello DC, Moura RC & Martins C (2011a). 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*, 12:88. doi: 10.1186/1471-2156-12-88
- Cabral-de-Mello DC, Moura RC & Martins C (2011b). Cytogenetic mapping of rRNAs and histone H3 genes in 14 species of *Dichotomius* (Coleoptera, Scarabaeidae, Scarabaeinae) beetles. *Cytogen. Gen. Res.*, 134: 127-135. doi: 10.1159/000326803
- Camacho JPM, Ruiz-Ruano FJ, Martín-Blázquez R, López-León MD, Cabrero J, Lorite P, Cabral-de-Mello DC & Bakkali M (2015). A step to the gigantic genome of the desert locust: chromosome sizes and repeated DNAs. *Chromosoma*, 124:263–275. doi: 10.1007/s00412-014-0499-0
- Cesari M, Luchetti A, Passamonti M, Scali V & Mantovani B (2003). Polymerase chain reaction amplification of the Bag320 satellite family reveals the ancestral library and past gene conversion events in *Bacillus rossius* (Insecta Phasmatodea). *Gene*, 312: 289–295. doi: 10.1016/s0378-1119(03)00625-5

- Chapuis F (1876). In: Histoire naturelle des insectes. *Genera des Coléoptères*. Paris, 12: 1-424.
- Charlesworth B, Sniegowski P & Stephan W (1994). The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature*, 371: 215-220. doi: 10.1038/371215a0
- Chu C, Nielsen R & Wu Y (2016). REPdenovo: inferring de novo repeat motifs from short sequence reads. *PLoS ONE*, 11: e0150719. doi: 10.1371/journal.pone.0150719
- Cotes B, Campos M, Pascual F & Ruano F (2010). The ladybeetle community (Coleoptera: Coccinellidae) in Southern olive agroecosystems of Spain. *Environ. Entomol.*, 39: 79–87. doi: 10.1603/EN09160
- De La Fuente JA (1994). Zoología de artrópodos. Interamericana-McGraw-Hill, Madrid.
- de Lima LG, Svartman M & Kuhn GCS (2017). Dissecting the satellite DNA landscape in three cactophilic *Drosophila* sequenced genomes. *G3-Genes Genom. Genet.*, 7(8): 2831–2843. doi: 10.1534/g3.117.042093
- Deng H, Xiang S, Guo Q, Jin W, Cai Z & Liang G (2019). Molecular cytogenetic analysis of genome-specific repetitive elements in *Citrus clementina* Hort. Ex Tan. and its taxonomic implications. *BMC Plant Biol.*, 19:77. doi: 10.1186/s12870-019-1676-3.
- Dover G (1982). Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. *Nature*, 299: 111–117. doi: 10.1038/299111a0
- Dover G (2002). Molecular drive. *Trends Genet.*, 18: 587-589. doi: 10.1016/s0168-9525(02)02789-0
- Drets ME, Corbella E, Panzera F & Folle GA (1983) C-banding and non-homologous association II. The "parachute" Xyp sex bivalent and the behaviour of heterochromatic segments in *Epilachna paenulata*. *Chromosoma*, 88: 249-255. doi: 10.3897/CompCytogen.v9i3.5263
- Dutrillaux AM & Dutrillaux B (2009). Sex chromosome rearrangements in polyphaga beetles. *Sex. Dev.* 3: 43-54. doi: 10.1159/000200081
- Edwards AL, Voss H, Rice P, Civitello A, Stegemann J, Schwager C, Zimmermann J, Erfle H, Caskey CT & Ansorge W (1990). Automated DNA sequencing of the human HPRT locus. *Genomics*, 6(4): 593-608. doi: 10.1016/0888-7543(90)90493-E.
- Ennis TJ (1974). Chromosome structure in *Chilocorus* (Coleoptera: Coccinellidae). I. Fluorescent and Giemsa banding patterns. *Can. J. Genet. Cytol.*, 16: 651-661. doi: 10.1139/g74-071
- Erukashvily NI & Ponomartsev NV (2013). Mammalian satellite DNA: A speaking dumb. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.*, 90: 31–65. doi: 10.1016/B978-0-12-410523-2.00002-X
- Ferreira IA & Martins C (2008). Physical chromosome mapping of repetitive DNA sequences in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*: evidences for a differential distribution of repetitive elements in the sex chromosomes. *Micron* 39(4): 411-418. *Epub*. doi: 10.1016/j.micron.2007.02.010

- Fry K & Salser W (1977). Nucleotide sequences of HS- α satellite DNA from kangaroo rat *Dipodomys ordii* and characterization of similar sequences in other rodents. *Cell*, 12: 1069–1084. doi: 10.1016/0092-8674(77)90170-2.
- Frydrychova R, Grossmann P, Trubac P, Vitkova M & Marec F (2004). Phylogenetic distribution of TTAGG telomeric repeats in insects. *Genome*, 47: 163-178. doi: 10.1139/g03-100
- Galián J & Vogler AP (2003). Evolutionary dynamics of a satellite DNA in the tiger beetle species pair *Cicindela campestris* and *C. maroccana*. *Genome*, 46: 213-223. doi: 10.1139/g02-126
- Gall JG & Pardue ML (1969). Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 63: 378–383. doi: 10.1073/pnas.63.2.378
- Gall JG & Atherton DD (1974). Satellite DNA sequences in *Drosophila virilis*. *J. Mol. Biol.*, 85: 633-664. doi: 10.1016/0022-2836(74)90321-0
- Gambogi CW, Dawicki-McKenna JM, Logsdon GA & Black BE. (2020). The unique kind of human artificial chromosome: Bypassing the requirement for repetitive centromere DNA. *Exp. Cell Res.*, 1:111978. doi: 10.1016/j.yexcr.2020.111978.
- Goecks J, Nekrutenko A & Taylor J (2010). Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences. *Genome Biol.*, 11, R86. doi: 10.1186/gb-2010-11-8-r86
- Gregory TR, Nicol JA, Tamm H, Kullman B, Kullman K, Leitch IJ, Murray BG, Kapraun DF, Greilhuber J & Bennett MD (2007). Eukaryotic genome size databases. *Nucl. Acids Res.* 35(Database issue): D332–D338. doi: 10.1093/nar/gkl828
- Gur-Arie R, Cohen CJ, Eitan Y, Shelef L, Hallerman EM & Kashi Y (2000). Simple sequence repeats in *Escherichia coli*: abundance, distribution, composition, and polymorphism. *Gen. Res.*, 10: 62–71.
- Hartley SE & Davidson WS (1994). Characterization and distribution of genomic repeat sequences from arctic char (*Salvelinus alpinus*). En "*Genetics and Evolution of Aquatic Organisms*." Beamont AR (Ed). Chapman and Hall, London pp. 271-279.
- Hloušková P, Mandáková T, Pouch M, Trávníček P & Lysak MA (2019). The large genome size variation in the Hesperis clade was shaped by the prevalent proliferation of DNA repeats and rarer genome downsizing. *Ann. Bot.*, 124(1):103–120. doi: 10.1093/aob/mcz036
- Honěk A (2012) Distribution and habitats. In: Hodek I, Honěk A, van Emden HF (eds) *Ecology and behaviour of the ladybird beetles (Coccinellidae)*. Wiley, Chichester, pp 110–140.
- Hubell HR (1985). Silver staining as an indicator of active ribosomal genes. *Stain Technol.*, 60: 285-294. doi: 10.3109/10520298509113926

- Iperti G. (1999). Biodiversity of predaceous coccinellidae in relation to bioindication and economic importance. *Agric. Ecosyst Environ.*, 4: 323–342. doi: 10.1016/S0167-8809(99)00041-9
- Jiménez R, Burgos M & Díaz de la Guardia R (1988). A study of the Ag-staining significance in mitotic NOR's. *Heredity*, 60: 207-213. doi: 10.1038/hdy.1988.18
- John B & Lewis KR (1960). Nucleolar controlled segregation of the sex chromosomes in beetles. *Heredity*, 15: 431-439. doi: 10.1038/hdy.1960.107
- John H, Birnstiel M & Jones K (1969). RNA-DNA Hybrids at the Cytological Level. *Nature*, 223: 582–587. doi: 10.1038/223582a0
- Juan C, Vázquez P, Rubio JM, Petitpierre E & Hewitt GM (1993). Presence of highly repetitive DNA sequences in *Tribolium* flour-beetles. *Heredity*, 70: 1-8. doi: 10.1038/hdy.1993.1
- Katoh K, Koji S, Ishida TA, Matsubashi KW, Kahono S, Kobayashi N, Furukawa K, Viet BT, Vasconcellos-Neto J, Lange CN, Goergen G, Nakano S, Li NN, Yu GY & Katakura H (2014). Phylogeny of *Epilachna*, *Henosepilachna*, and some minor genera of phytophagous ladybird beetles (Coleoptera: Coccinellidae: Coccinellinae: Epilachnini), with an analysis of ancestral biogeography and host-plant utilization. *Zool. Sci.*, 31: 820-830. doi:10.2108/zs140088.
- Kit S (1961) Equilibrium sedimentation in density gradients of DNA preparations from animal tissues. *J. Mol. Biol.*, 3: 711–716. doi: 10.1016/S0022-2836(61)80075-2
- Kovar I (1996). Phylogeny. En: "Ecology of Coccinellidae" Hodek I & Honk A. (Eds.). *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht*, pp. 19–31.
- Landais I, Chavigny P, Castagnone C, Pizzol J, Abad P & Vanlerberghe-Masutti F (2000). Characterization of a highly conserved satellite DNA from the parasitoid wasp *Trichogramma brassicae*. *Gene*, 255(1): 65-73 doi: 10.1016/S0378-1119(00)00318-8.
- Liu Q, Li X, Zhou X, Li M, Zhang F, Schwarzacher T & Heslop-Harrison JS (2019). The repetitive DNA landscape in *Avena* (Poaceae): chromosome and genome evolution defined by major repeat classes in whole-genome sequence reads. *BMC Plant Biol.*, 19(1): 226. doi: 10.1186/s12870-019-1769-z
- Lorite P, Aranega AE, Luque F & Palomeque T (1997). Analysis of the nucleolar organizing regions in *Tapinoma nigerrimum* (Hymenoptera, Formicidae). *Heredity* 78: 578-582. doi: 10.1038/hdy.1997.96
- Lorite P, Palomeque T, Garnería I & Petitpierre E (2001). Characterization and chromosome location of satellite DNA in the leaf beetle *Chrysolina americana* (Coleoptera, Chrysomelidae). *Genetica*, 110: 143-150. doi: 10.1023/A:1017926127213

- Lorite P, Carrillo JA, Garnería I, Petitpierre E & Palomeque T (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, 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: 538-46. doi: 10.1017/S0007485313000060
- Louzada S, Lopes M, Ferreira D, Adegá F, Escudeiro A, Gama-Carvalho M & Chaves R (2020). Decoding the role of satellite DNA in genome architecture and plasticity - An evolutionary and clinical affair. *Genes*, 11(1): 72. doi:10.3390/genes11010072
- Luchetti A, Cesari M, Carrara G, Cavicchi S, Passamonti M, Scali V & Mantovani B (2003). Unisexuality and molecular drive: Bag320 sequence diversity in *Bacillus* taxa (insecta phasmatodea). *J. Mol. Evol.*, 56: 587–596. doi: 10.1007/s00239-002-2427-9.
- Lyapunova EA, Vorontsov NN, Yadav JS, Korablev VP, Yanina I & Gokhman VE (1984). Karyological investigation on seven species of coccinellid fauna of URSS (Polyphaga: Coleoptera). *Zool. Anz. Jena*, 212: 185-192.
- Macas J, Kejnovsky E, Neumann P, Novak P, Koblizkova A & Vyskot B (2011). Next generation sequencing-based analysis of repetitive DNA in the model dioecious plant *Silene latifolia*. *PLoS ONE*, 6: e27335. doi: 10.1371/journal.pone.0027335
- Maffei EM, Gasparino E & Pompolo SdG (2000). Karyotypic characterization by mitosis, meiosis and C-banding of *Eriopis connexa* Mulsant (Coccinellidae: Coleoptera: Polyphaga), a predator of insect pests. *Hereditas*, 132: 79-85. doi: 10.1111/j.1601-5223.2000.00079.x
- Maffei EM, Pompolo SG, Campos LA & Petitpierre E (2001). Sequential FISH analysis with rDNA genes and Ag-NOR banding in the lady beetle *Olla v-nigrum* (Coleoptera: Coccinellidae). *Hereditas*, 135:13-18. doi: 10.1111/j.1601-5223.2001.00013.x
- Maffei EM, Pompolo SG & Petitpierre E (2004). C-banding and fluorescent in situ hybridization with rDNA sequences in chromosomes of *Cycloneda sanguinea* Linnaeus (Coleoptera, Coccinellidae). *Genet. Mol. Biol.*, 27: 191-195. doi: 10.1590/S1415-47572004000200011
- Mantovani B, Tinti F, Bachmann L & Scalli V (1997). The Bag320 satellite DNA family in *Bacillus* stick insects (Phasmatodea): different rates of molecular evolution of highly repetitive DNA in bisexual and parthenogenetic taxa. *Mol. Biol. Evol.*, 14: 1197–1205. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a025729

- Maumus F & Quesneville H (2014). Deep investigation of *Arabidopsis thaliana* junk DNA reveals a continuum between repetitive elements and genomic dark matter. *PLoS ONE*, 9: e94101. doi: 10.1371/journal.pone.0094101
- McNulty SM & Sullivan BA (2018). Alpha satellite DNA biology: finding function in the recesses of the genome. *Chromosome Res.*, 26: 115–138. doi:10.1007/s10577-018-9582-3
- Medina FJ, Risueño MC, Sánchez-Piña MA & Fernández-Gómez ME (1983). A study of nucleolar silver staining in plant cells. The role of argyrophilic proteins in nucleolar physiology. *Chromosoma*, 88: 149-155. doi: 10.1007/BF00327336
- Mestrovic N, Plohl M, Mravinac B & Ugarkovic D (1998). Evolution of satellite DNAs from the genus *Palorus*—experimental evidence for the “library” hypothesis. *Mol. Biol. Evol.*, 15 1062–1068. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026005
- Meyne J, Ratliff RL, Moyzis RK (1989). Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)_n among vertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 7049-7053. doi: 10.1073/pnas.86.18.7049
- Miller WJ & Capy P (2004). Mobile genetic elements as natural tools for genome evolution. *Methods Mol. Biol.*, 260: 1-20. doi: 10.1385/1-59259-755-6:001
- Mills WK, Lee Y, Kochendoerfer AM, Dunleavy EM & Karpen GH (2019). RNA from a simple-tandem repeat is required for sperm maturation and male fertility in *Drosophila melanogaster*. *eLife*, 8: e48940. doi: 10.7554/eLife.48940
- Mravinac B, Plohl M, Mestrovic N & Ugarkovic D (2002). Sequence of PRAT satellite DNA ‘frozen’ in some coleopteran species. *J. Mol. Evol.* 54: 774–783. doi: 10.1007/s00239-001-0079-9
- Mravinac B, Meštrović N, Čavrak VV & Plohl M (2011). TCAGG, an alternative telomeric sequence in insects. *Chromosoma*, 120: 367–376. doi: 10.1007/s00412-011-0317-x
- Nedvěd O & Kovář I (2012). Phylogeny and classification. Pp. 1-12. En: “Ecology and Behaviour of the Ladybird Beetles (Coccinellidae)”, Hodek I, van Emden HF & Honěk A. (eds): *Blackwell Publishing Ltd., Chichester, UK*, pp 561.
- Novák P, Neumann P & Macas J (2010). Graph-based clustering and characterization of repetitive sequences in next-generation sequencing data. *BMC Bioinformatics*, 11: 378. doi: 10.1186/1471-2105-11-378
- Novák P, Neumann P, Pech J, Steinhaisl J & Macas J (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

- Novák P, Ávila-Robledillo L, Koblížková A, Vrbová I, Neumann P & Macas J (2017). TAREAN: a computational tool for identification and characterization of satellite DNA from unassembled short reads. *Nucleic Acids Res.* 45: e111. doi: 10.1093/nar/gkx257
- Obrycki JJ & Kring TJ (1998). Predaceous Coccinellidae in Biological Control. *Annu. Rev. Entomol.*, 43: 295-321. doi: 10.1146/annurev.ento.43.1.295
- Ohzeki JI, Otake K & Masumoto H. (2020). Human artificial chromosome: Chromatin assembly mechanisms and CENP-B. *Exp. Cell Res.*, 389(2): 111900. doi: 10.1016/j.yexcr.2020.111900
- Oliveira SG, Moura RC, Silva AE & Souza MJ (2010). Cytogenetic analysis of two Coprophanaeus species (Scarabaeidae) revealing wide constitutive heterochromatin variability and the largest number of 45S rDNA sites among Coleoptera. *Micron.*, 41: 960–965. doi: 10.1016/j.micron.2010.06.015
- Oliveira SG, Cabral-de-Mello, Arcanjo A, Xavier C, Souza MJ, Martins C & Moura RC (2012). Heterochromatin, sex chromosomes and rRNA gene clusters in Coprophanaeus beetles (Coleoptera, Scarabaeidae). *Cytogenet. Genome Res.*, 138: 46–55. doi: 10.1159/000339648
- Pagán HJ, Macas J, Novák P, McCulloch ES, Stevens RD & Ray DA (2012). Survey sequencing reveals elevated DNA transposon activity, novel elements, and variation in repetitive landscapes among vesper bats. *Genome Biol. Evol.* 4(4): 575–585. doi: 10.1093/gbe/evs038.
- Palacios-Gimenez OM, Bardella VB, Lemos B, and Cabral-de-Mello DC (2017a). Satellite DNAs are conserved and differentially transcribed among *Gryllus* cricket species. *DNA Res.* 25(2): 137-147. doi: 10.1093/dnares/dsx044
- Palacios-Gimenez OM, Dias GB, de Lima LG, Kuhn G, Ramos É, Martins C, and Cabral-de-Mello DC (2017b): High-throughput analysis of the satellitome revealed enormous diversity of satellite DNAs in the neo-Y chromosome of the cricket *Eneoptera surinamensis*. *Sci. Rep.*, 7: 6422. doi: 10.1038/s41598-017-06822-8.
- Palacios-Gimenez OM, Bardella VB, Lemos B, and Cabral-de-Mello DC (2017c). Satellite DNAs are conserved and differentially transcribed among *Gryllus* cricket species. *DNA Res.* 25(2):137-147. doi: 10.1093/dnares/dsx044
- Palacios-Gimenez OM, Milani D, Song H, Marti DA, López-León MD, Ruiz-Ruano FJ, Camacho J and Cabral-de-Mello DC (2020). Eight million years of satellite DNA evolution in grasshoppers of the genus *Schistocerca* illuminate the ins and outs of the library hypothesis. *Genome Biol. Evol.*, 12(3): 88–102. doi: 10.1093/gbe/evaa018

- Palazzo AF & Gregory TR (2014). The case for junk DNA. *PLoS Genet.*, 10: e1004351. doi: 10.1371/journal.pgen.1004351
- Palomeque T, Muñoz-López M, Carrillo JA & Lorite P (2005). Characterization and evolutionary dynamics of a complex family of satellite DNA in the leaf beetle *Chrysolina carnifex* (Coleoptera, Chrysomelidae). *Chromosome Res.*, 13: 795-807. doi: 10.1007/s10577-005-1013-6
- Palomeque T & Lorite P (2008). Satellite DNA in insects: a review. *Heredity*, 100: 564–573. doi: 10.1038/hdy.2008.24
- Pamponét VCC, Souza MM, Silva GS, Micheli F, Ferreira de Melo CA, Gomes de Oliveira S, Almeida E & Corrêa R (2019). Low coverage sequencing for repetitive DNA analysis in *Passiflora edulis* Sims: cytogenomic characterization of transposable elements and satellite DNA. *BMC Genomics*, 20: 262. doi: 10.1186/s12864-019-5576-6.
- Pathak D & Ali S (2012). Repetitive DNA: a tool to explore animal genomes/transcriptomes. En "Functional Genomics", Meroni G & Petrera F (Eds). pp 155-280. <http://www.intechopen.com/books/functional-genomics/repetitive-dna-a-tool-to-explore-animalgenomes-transcriptomes>.
- 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
- Perea-Resa C & Blower MD (2017). Satellite transcripts locally promote centromere formation. *Developmental Cell*, 42(3): 201-202. doi: 10.1016/j.devcel.2017.07.017
- Peterson DG, Schulze SR, Sciara EB, Lee SA, Bowers JE, Nagel A, Jiang N, Tibbitts DC, Wessler SR & Paterson AH (2002). Integration of Cot analysis, DNA cloning, and high-throughput sequencing facilitates genome characterization and gene discovery. *Genome Res.*, 12: 795–807. doi: 10.1101/gr.226102
- Petitpierre E, Gatewood JM & Schmid CW (1988). Satellite DNA from the beetle *Tenebrio molitor*. *Experientia*, 44: 498-499. doi: 10.1007/BF01958925
- Pezer Z & Ugarković D (2009). Transcription of pericentromeric heterochromatin in beetles-satellite DNAs as active regulatory elements. *Cytogenet. Genome Res.*, 12: 268-76. doi: 10.1159/000218131
- Pezer Z, Brajković J, Feliciello I and Ugarković D (2011). Transcription of satellite DNAs in insects. *Prog. Mol. Subcell. Biol.*, 51: 161–178. doi: 10.1007/978-3-642-16502-3_8

- Pita S, Panzera F, Mora P, Vela J, Cuadrado A, Sánchez A, Palomeque T & Lorite P (2017). Comparative repeatome analysis on *Triatoma infestans* Andean and Non-Andean lineages, main vector of Chagas disease. *PLoS ONE*, 12: e0181635. doi: 10.1371/journal.pone.0181635
- Pita S, Mora P, Vela J, Palomeque T, Sánchez A, Panzera F & Lorite P (2018). Comparative analysis of repetitive DNA between the main vectors of Chagas disease: *Triatoma infestans* and *Rhodnius prolixus*. *Int. J. Mol. Sci.*, 24: E1277. doi: 10.3390/ijms19051277.
- Plohl M, Meštrović N & Mravinac B (2012). Satellite DNA evolution. *Genome Dyn.*, 7: 126-152. doi: 10.1159/000337122
- Pons J (2004). Cloning and characterization of a transposable-like repeat in the heterochromatin of the darkling beetle *Misolampus goudoti*. *Genome*, 47: 769–774. doi: 10.1139/g04-019
- Pons J, Petitpierre E & Juan C (1993). Characterization of the heterochromatin of the darkling beetle *Misolampus goudoti*: cloning of two satellite DNA families and digestion of chromosomes with restriction enzymes. *Hereditas*, 119: 179-185. doi: 10.1111/j.1601-5223.1993.00179.x
- Pons J, Bruvo B, Juan C, Petitpierre E, Plohl M & Ugarković D (1997). Conservation of satellite DNA in species of the genus *Pimelia* (Tenebrionidae, Coleoptera). *Gene*, 205: 183-190. doi: 10.1016/s0378-1119(97)00402-2
- Pons J, Petitpierre E & Juan C (2002a). Evolutionary dynamics of satellite DNA family PIM357 in species of the genus *Pimelia* (Tenebrionidae, Coleoptera). *Mol. Biol. Evol.*, 19: 1329-1340.
- Pons J, Juan C & Petitpierre E (2002b). Higher-order organization and compartmentalization of satellite DNA PIM357 in species of the coleopteran genus *Pimelia*. *Chromosome Res.*, 10: 597-606. doi: 10.1023/a:1020918803675
- Pons J, Bucur R & Vogler AP (2003) Higher-order repeats in the satellite DNA of the cave beetle *Pholeuon proserpinae glaciale* (Coleoptera: Cholevidae). *Hereditas*, 139: 28-34. doi: 10.1111/j.1601-5223.2003.01760.x
- Pons J, Bruvo B, Petitpierre E, Plohl M, Ugarkovic D & Juan C (2004). Complex structural features of satellite DNA sequences in the genus *Pimelia* (Coleoptera: Tenebrionidae): random differential amplification from a common 'satellite DNA library'. *Heredity*, 92: 418–427. doi: 10.1038/sj.hdy.6800436.
- Reed KM & Phillips RB (1995). Molecular characterization and cytogenetics analysis of highly repeated DNAs of lake trout, *Salvelinus namaycush*. *Chromosoma*, 104: 242-251. doi: 10.1007/bf00352255

- Richards S, Gibbs RA, Weinstock GM, Brown SJ, Denell R et al. (2008). The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. *Nature*, 452: 949-955. 10.1038/nature06784
- Robledillo L, Koblížková A, Novák P, Böttinger K, Vrbová I, Neumann P, Schubert I & Macas J (2018). Satellite DNA in *Vicia faba* is characterized by remarkable diversity in its sequence composition, association with centromeres, and replication timing. *Sci. Rep.*, 8(1): 5838. doi: 10.1038/s41598-018-24196-3
- Rojas AA, Vazquez-Tello A, Ferbeyre G, Venanzetti F, Bachmann L, Paquin B, Sbordonni V & Cedergren R (2000). Hammerhead-mediated processing of satellite pDo500 family transcripts from *Dolichopoda* cave crickets. *Nucleic Acids Res.*, 28(20): 4037–4043. doi: 10.1093/nar/28.20.4037
- Rondoni G, Ielo F, Ricci C & Conti E (2014). Intraguild predation responses in two Aphidophagous Coccinellids identify differences among juvenile stages and aphid densities. *Insects*, 5: 974–983. doi: 10.3390/insects5040974
- Rošić S, Kohler F & Erhardt S (2014). Repetitive centromeric satellite RNA is essential for kinetochore formation and cell division. *J. Cell Biol.*, 207: 335–349. doi: 10.1083/jcb.201404097
- Rozek M & Holecova M (2002). Chromosome numbers, C-banding patterns and sperm of some ladybird species from Central Europe (Coleoptera, Coccinellidae). *Folia biol.*, (Krakow) 50:17-21.
- Ruiz-Ruano FJ, López-León MD, Cabrero J & Camacho JP (2016). High-throughput analysis of the satellitome illuminates satellite DNA evolution. *Sci. Rep.*, 6: 28333. doi: 10.1038/srep28333.
- Ruiz-Ruano FJ, Cabrero J, López-León MD, & Camacho JP (2017). Satellite DNA content illuminates the ancestry of a supernumerary (B) chromosome. *Chromosoma*, 126: 487–500. doi: 10.1007/s00412-016-0611-8
- Ruiz-Ruano FJ, Navarro-Domínguez B, Camacho JPM & Garrido-Ramos MA (2018a). Characterization of the satellitome in lower vascular plants: the case of the endangered fern *Vandenboschia speciosa*. *Ann. Bot.*, 123(4):578-599. doi: 10.1093/aob/mcy192
- Ruiz-Ruano FJ, Castillo-Martínez J, Cabrero R, Gómez J, Camacho JP & López-León MD (2018b). High-throughput analysis of satellite DNA in the grasshopper *Pyrgomorpha conica* reveals abundance of homologous and heterologous higher-order repeats. *Chromosoma*, 127: 323. doi: 10.1007/s00412-018-0666-9

- Samoluk SS, Chalup LM, Chavarro C, Robledo G, Bertoli DJ, Jackson SA & Seijo G (2019). Heterochromatin evolution in *Arachis* investigated through genome-wide analysis of repetitive DNA. *Planta*, 249:1405–1415. doi: 10.1007/s00425-019-03096-4
- Sánchez-Gea JF, Serrano J & Galián J (2000). Variability in rDNA loci in Iberian species of the genus *Zabrus* (Coleoptera: Carabidae) detected by fluorescence in situ hybridization. *Genome*, 43:22-28. doi: 10.1139/g99-097.
- Schmidt T, Heitkam T, Liedtke S, Schubert V & Menzel G (2019). Adding color to a century-old enigma: multi-color chromosome identification unravels the autotriploid nature of saffron (*Crocus sativus*) as a hybrid of wild *Crocus cartwrightianus* cytotypes. *New Phytol*, 222: 1965-1980. doi: 10.1111/nph.15715
- Schuster SC (2008). Next-generation sequencing transforms today's biology. *Nat. Methods*, 5(1):16–8. doi: 10.1038/nmeth1156
- Shendure J & Ji H (2008). Next-generation DNA sequencing. *Nat. Biotechnol.*, 26: 1135–1145. doi: 10.1038/nbt1486
- Skouras PJ & Stathas GJ (2015). Development, growth and body weight of *Hippodamia variegata* fed *Aphis fabae* in the laboratory. *Bull. Insectology*, 68(2): 193-198.
- Slamovits CH & Rossi MS (2002). Satellite DNA: agent of chromosomal evolution in mammals. *Mastozool. Neotrop.*, 9: 297-308.
- Sloggett JJ & Honek A (2012) Genetic Studies. In: Hodek, I., van Emden, H.F. and Honek, A., Eds., Ecology and behaviour of the ladybird beetles (Coccinellidae), Wiley-Blackwell, Oxford, 561 p. doi: 10.1002/9781118223208.ch2
- Smalec BM, Heider TN, Flynn BL & O'Neill R (2019). A centromere satellite concomitant with extensive karyotypic diversity across the *Peromyscus* genus defies predictions of molecular drive. *Chromosome Res.* 27, 237–252. doi: 10.1007/s10577-019-09605-1.
- Smith GP (1974). Unequal crossover and the evolution of multigene families. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 38:507-513. doi: 10.1101/sqb.1974.038.01.055
- Smith SG (1950). The cytotaxonomy of Coleoptera. *Can. Entomol.*, 82: 58-68. doi: 10.4039/Ent8258-3
- Smith SG (1960). Chromosome numbers of Coleoptera. II *Can. J. Genet. Cytol.*, 2: 67-88. doi: 10.1139/g60-007
- Smith SG (1962). Cytogenetic pathways in beetle speciation. *Can. Entomol.*, 94: 941-955
- Smith SG & Virkki N (1978). Animal Cytogenetics. 3. *Insecta*. 5. Coleoptera Gerbünder Bomtrager, Berlin, Stuttgart.

- Stephan W (1986). Recombination and the evolution of satellite DNA. *Genet. Res.*, 47(3):167–174. doi: 10.1017/S0016672300023089
- Stevens MN (1906). Studies in spermatogenesis II. *Carneg Inst. Wash. Publ.*, 86: 309-321.
- Subirana JA & Messeguer X (2017). Evolution of tandem repeat satellite sequences in two closely related *Caenorhabditis* species. Diminution of Satellites in Hermaphrodites. *Genes*, 8: 351. doi: 10.3390/genes8120351
- Sun J, Yu L, Cai Z, Zhang A, Jin W, Han Y & Li Z (2019). Comparative karyotype analysis among six *Ipomoea* species based on two newly identified repetitive sequences. *Genome*, 62(4): 243-252. doi: 10.1139/gen-2018-0169
- Talbert PB, Kasinathan S & Henikoff S (2018). Simple and complex centromeric satellites in *Drosophila* sibling species. *Genetics*, 208(3): 977–990. doi: 10.1534/genetics.117.300620
- Tautz D. (1993). Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. *EXS*, 67: 21-28. doi: 10.1007/978-3-0348-8583-6_2
- Toth G, Gaspari Z & Jurka J (2000). Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Res.*, 10: 967–981. doi: 10.1101/gr.10.7.967
- Tsurusaki N, Nakano S & Katakura H (1993). Karyotypic differentiation in the phytophagous ladybird beetles *Epilachna vigintioctomaculata* complex and its possible relevance to the reproductive isolation, with a note on supernumerary Y chromosomes found in *E. pustulosa*. *Zool. Sci.*, 10: 997–1015
- Tsurusaki N, Shirai Y & Nakano S (2001). B-chromosomes in the Indonesian populations of a phytophagous ladybird beetle *Epilachna vigintioctopunctata*. *Spec. Publ. Japan Coleopt. Soc.* 1: 65-71.
- Ugarković D (2005). Functional elements residing within satellite DNAs. *EMBO Rep.*, 6: 1035–1039. doi: 10.1038/sj.embor.7400558
- Ugarković D & Plohl M (2002). Variation in satellite DNA profiles-causes and effects. *EMBO J.*, 21: 5955-5959. doi: 10.1093/emboj/cdf612
- Usakin I, Abad J, Vagin VV, de Pablos B, Villasante A & Gvozdev VA (2007). Transcription of the 1.688 satellite DNA family is under the control of RNA interference machinery in *Drosophila melanogaster* ovaries. *Genetics*, 176: 1343–1349. doi: 10.1534/genetics.107.071720
- Utsunomia R, Silva D, Ruiz-Ruano FJ, Goes C, Melo S, Ramos LP, Oliveira C, Porto-Foresti F, Foresti F & Hashimoto DT (2019). Satellitome landscape analysis of *Megaleporinus macrocephalus* (Teleostei, Anostomidae) reveals intense accumulation of satellite sequences on the heteromorphic sex chromosome. *Sci. Rep.*, 9(1): 5856. doi: 10.1038/s41598-019-42383-8

- Vandenberg NJ (2002). Coccinellidae Latreille 1807. Pp. 371-389. En: Arnett R. H., Jr., Thomas, M. C., Squelley, P. E. and Frank, J. H. (Eds.) American Beetles, Vol. 2: Polyphaga: Scarabaeoidea through Curculionoidea. CRC Press LLC.
- Vicari MR, Nogaroto V, Noletto RB, Cestari MM, Cioffi MB, Almeida MC, Moreira-Filho O, Bertollo LAC & Artoni RF (2010). Satellite DNA and chromosomes in Neotropical fishes: methods, applications and perspectives. *J. Fish Biol.*, 76:1094–1116. doi: 10.1111/j.1095-8649.2010.02564.x
- Vogel H, Schmidtberg H & Vilcinskis A (2017). Comparative transcriptomics in three ladybird species supports a role for immunity in invasion biology. *Dev. Comp. Immunol.*, 67: 452-456. doi: 10.1016/j.dci.2016.09.015.
- Yadav JS & Gahawats S (1994). On the cytology of five species of Coccinellidae (Coleoptera: Polyphaga). *J. Cytol. Genet.*, 29: 78-83.
- Zwick MS, Hanson RE, Islam-Faridi MN, Stelly DM, Wing RA, Price HJ & McKnight TD (1997). A rapid procedure for the isolation of C0t-1 DNA from plants. *Genome*, 40: 138–142. doi: 10.1139/g97-020

CAPÍTULO I

CompCytogen 9(3): 423–434 (2015)
 doi: 10.3897/CompCytogen.v9i3.5263
<http://compcytogen.pensoft.net>

RESEARCH ARTICLE



Molecular cytogenetic studies in the ladybird beetle *Henosepilachna argus* Geoffroy, 1762 (Coleoptera, Coccinellidae, Epilachninae)

Pablo Mora¹, Jesús Vela¹, Olivia Sanllorente¹, Teresa Palomeque¹, Pedro Lorite¹

¹ Departamento de Biología Experimental. Universidad de Jaén. 23071 Jaén. Spain

Corresponding author: Pedro Lorite (plorite@ujaen.es)

Academic editor: D. Lachowska | Received 10 May 2015 | Accepted 17 June 2015 | Published 09 July 2015

<http://zoobank.org/D5BDC6E7-7BFC-46A4-A46B-6F49BB3A3BD6>

Citation: Mora P, Vela J, Sanllorente O, Palomeque T, Lorite P (2015) Molecular cytogenetic studies in the ladybird beetle *Henosepilachna argus* Geoffroy, 1762 (Coleoptera, Coccinellidae, Epilachninae). Comparative Cytogenetics 9(3): 423–434. doi: 10.3897/CompCytogen.v9i3.5263

Abstract

The ladybird *Henosepilachna argus* Geoffroy, 1762 has been cytogenetically studied. In addition we have conducted a review of chromosome numbers and the chromosomal system of sex determination available in the literature in species belonging to the genus *Henosepilachna* and in its closely related genus *Epilachna*. Chromosome number of *H. argus* was $2n=18$, including the sex chromosome pair, a common diploid chromosome number within the tribe Epilachnini. The study of prophase I meiotic chromosomes showed the typical Xy_p “parachute” bivalent as in the majority of species of Coccinellidae. C-banding and fluorescent staining with AT-specific DAPI fluorochrome dye have been carried out for the first time in *H. argus*. C-banding technique revealed that heterochromatic blocks are pericentromerically located and DAPI staining showed that this heterochromatin is AT rich.

Fluorescence in situ hybridizations using rDNA and the telomeric TTAGG sequence as probes have been carried out. FISH using rDNA showed that the nucleolar organizing region is located on the short arm of the X chromosome. FISH with the telomeric sequence revealed that in this species telomeres of chromosomes are composed of the pentanucleotide TTAGG repeats. This is the first study on the telomeric sequences in Coccinellidae.

Keywords

Henosepilachna argus, karyotype, C-banding, DAPI staining, NOR, telomeres

CAPÍTULO II

**EUROPEAN JOURNAL OF ENTOMOLOGY**ISSN (online): 1802-8829
<http://www.eje.cz>*Eur. J. Entomol.* 114: 481–487, 2017
doi: 10.14411/eje.2017.061

ORIGINAL ARTICLE

Characterization and transcriptional analysis of a subtelomeric satellite DNA family in the ladybird beetle *Henosepilachna argus* (Coleoptera: Coccinellidae)

PABLO MORA, JESÚS VELA, ARELI RUIZ-MENA, TERESA PALOMEQUE and PEDRO LORITE *

Área de Genética, Departamento de Biología Experimental, Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad de Jaén, 23071 Jaén, Spain; e-mails: pmora@ujaen.es, jvela@ujaen.es, armena@ujaen.es, tpalome@ujaen.es, plorite@ujaen.es

Key words. Coleoptera, Coccinellidae, *Henosepilachna argus*, ladybird beetle, satellite DNA, transcription, in situ hybridization

Abstract. Satellite DNAs are the major repetitive DNA components in eukaryotic genomes. Although satellite DNA has long been called "parasite DNA" there is substantial evidence that it could be associated with some functions of chromosome biology. Ladybird beetles (Coccinellidae) are one of the largest and most important groups of beetles. Many ladybirds are of economic interest as biological control agents because they eat some agricultural pests such as aphids and scale insects. However, other species are phytophagous and can damage crops. Despite the ecological importance of the latter group there are no studies on their satellite DNA. A satellite DNA family was isolated and characterized in the ladybird *Henosepilachna argus*. This satellite DNA is organized in tandem repeats of 658 bp and is A + T rich (67.3%). The recorded high sequence conservation of the monomers together with the detection of putative gene conversion processes indicate concerted evolution. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) revealed that this satellite DNA is transcribed and in situ hybridization its location in the subtelomeric regions of all chromosomes except the long arm of the X chromosome. The presence of this satellite DNA in other species of the genus *Henosepilachna* and *Epilachna* was also tested using PCR. The results indicate that this satellite DNA sequence is so far specific to *H. argus*.

CAPÍTULO III



Article

Isolation of a Pericentromeric Satellite DNA Family in *Chmootriba argus* (*Henosepilachna argus*) with an Unusual Short Repeat Unit (TTAAAA) for Beetles

Pablo Mora, Jesús Vela, Areli Ruiz-Mena, Teresa Palomeque and Pedro Lorite *

Department of Experimental Biology, Genetic Area, University of Jaén, 23071 Jaén, Spain; pmora@ujaen.es (P.M.); jvela@ujaen.es (J.V.); armena@ujaen.es (A.R.-M.); tpalome@ujaen.es (T.P.)

* Correspondence: plorite@ujaen.es; Tel: +34-953-212769

Received: 24 July 2019; Accepted: 17 September 2019; Published: 19 September 2019



Abstract: Ladybird beetles (Coccinellidae) are one of the largest groups of beetles. Among them, some species are of economic interest since they can act as a biological control for some agricultural pests whereas other species are phytophagous and can damage crops. *Chmootriba argus* (Coccinellidae, Epilachnini) has large heterochromatic pericentromeric blocks on all chromosomes, including both sexual chromosomes. Classical digestion of total genomic DNA using restriction endonucleases failed to find the satellite DNA located on these heterochromatic regions. Cloning of C0t-1 DNA resulted in the isolation of a repetitive DNA with a repeat unit of six base pairs, TTAAAA. The amount of TTAAAA repeat in the *C. argus* genome was about 20%. Fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis and digestion of chromosomes with the endonuclease *Tru9I* revealed that this repetitive DNA could be considered as the putative pericentromeric satellite DNA (satDNA) in this species. The presence of this satellite DNA was tested in other species of the tribe Epilachnini and it is also present in *Epilachna paenulata*. In both species, the TTAAAA repeat seems to be the main satellite DNA and it is located on the pericentromeric region on all chromosomes. The size of this satDNA, which has only six base pairs is unusual in Coleoptera satellite DNAs, where satDNAs usually have repeat units of a much larger size. Southern hybridization and FISH proved that this satDNA is conserved in some Epilachnini species but not in others. This result is in concordance with the controversial phylogenetic relationships among the genera of the tribe Epilachnini, where the limits between genera are unclear.

Keywords: Coleoptera; Coccinellidae; bryony ladybird; satellite DNA; C0t-1 DNA; heterochromatin; in situ hybridization

CAPÍTULO IV



Article

Satellitome Analysis in the Ladybird Beetle *Hippodamia variegata* (Coleoptera, Coccinellidae)

Pablo Mora ¹, Jesús Vela ¹, Francisco J. Ruiz-Ruano ², Areli Ruiz-Mena ¹,
Eugenia E. Montiel ¹, Teresa Palomeque ¹ and Pedro Lorite ^{1,*}

¹ Department of Experimental Biology, Genetic Area, University of Jaén, 23071 Jaén, Spain; pmora@ujaen.es (P.M.); jvela@ujaen.es (J.V.); armena@ujaen.es (A.R.-M.); emontiel@ujaen.es (E.E.M.); tpalome@ujaen.es (T.P.)

² Department of Organismal Biology, Systematic Biology, Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, SE-752 36 Uppsala, Sweden; francisco.ruiz-ruano@ebc.uu.se

* Correspondence: plorite@ujaen.es

Received: 18 June 2020; Accepted: 9 July 2020; Published: 13 July 2020



Abstract: *Hippodamia variegata* is one of the most commercialized ladybirds used for the biological control of aphid pest species in many economically important crops. This species is the first Coccinellidae whose satellitome has been studied by applying new sequencing technologies and bioinformatics tools. We found that 47% of the *H. variegata* genome is composed of repeated sequences. We identified 30 satellite DNA (satDNA) families with a median intragenomic divergence of 5.75% and A+T content between 45.6% and 74.7%. This species shows satDNA families with highly variable sizes although the most common size is 100–200 bp. However, we highlight the existence of a satDNA family with a repeat unit of 2 kb, the largest repeat unit described in Coleoptera. PCR amplifications for fluorescence in situ hybridization (FISH) probe generation were performed for the four most abundant satDNA families. FISH with the most abundant satDNA family as a probe shows its pericentromeric location on all chromosomes. This location is coincident with the heterochromatin revealed by C-banding and DAPI staining, also analyzed in this work. Hybridization signals for other satDNA families were located only on certain bivalents and the X chromosome. These satDNAs could be very useful as chromosomal markers due to their reduced location.

Keywords: Coleoptera; Coccinellidae; *Hippodamia variegata*; ladybird beetle; RepeatExplorer; satellite DNA; satellitome; in situ hybridization

CAPÍTULO V

Estudio comparativo del satelitoma en tres especies de Coccinélidos

Pablo Mora ¹, Jesús Vela ¹, Francisco J. Ruiz-Ruano ², Areli Ruiz-Mena ¹, Eugenia E. Montiel ¹, Teresa Palomeque ¹, Pedro Lorite ¹

1. Departamento de Biología Experimental. Área de Genética. Universidad de Jaén. Jaén, Spain.

2. Department of Organismal Biology, Systematic Biology, Evolutionary Biology Centre, Uppsala University. Uppsala, Sweden

Resumen: Se ha secuenciado el genoma de tres especies de coccinélidos (*Chnootriba argus*, *Epilachna paenulata* y *Adalia bipunctata*). La aplicación de diversas herramientas bioinformáticas ha permitido hacer un detallado estudio de su ADNsat, o satelitoma, tipo de ADN solo estudiado en coccinélidos en las tres especies indicadas y en *Hippodamia variegata*. El ADNsat de estas especies tiene un alto contenido en A+T. En *C. argus* se han detectado 44 familias de ADNsat, en *E. paenulata*, 19 familias y en *A. bipunctata*, 51 familias que constituyen el 22,8%, el 15,68% casi el 15% de sus genomas respectivamente. El tamaño de la unidad repetitiva en todas las familias de ADN satélite es variable. En *C. argus* y *E. paenulata*, se han analizado, al igual que anteriormente se había observado en *H. variegata*, familias de ADNsat cuyas unidades de repetición presentan el mayor tamaño descrito en coleópteros. En las cuatro especies de coccinélidos existe una familia de ADNsat principal, es decir con una abundancia superior con respecto a las demás familias de ADNsat. Este ADNsat principal en *C. argus* y *E. paenulata* consiste en la repetición del hexanucleótido TTAAAA, presente en las regiones pericentroméricas de los cromosomas de ambas especies. Entre estas especies hay otras dos familias con cierta similitud en la secuencia de su unidad de repetición. La presencia de familias de ADNsat compartidas y/o con un cierto grado de similitud entre *C. argus* y *E. paenulata* puede explicarse, al menos en parte, por su proximidad filogenética, ya que ambas están incluidas en la tribu Epilachnini. *A. bipunctata* y *C. argus* comparten una familia de ADNsat, poco representadas en sus respectivos genomas, pero con un alto porcentaje de similitud entre ellas (100% entre las respectivas secuencias consenso) y una muy baja variabilidad intraespecífica. Ambos taxones pertenecen a la misma familia, pero a distintas tribus. Familias de ADNsat compartidas por taxones filogenéticamente muy distantes se han descrito también en otros taxones. En general y salvo las excepciones indicadas, el satelitoma parece ser específico de cada especie, sugiriendo que la diferenciación y diversificación de los coccinélidos ha ido acompañada de cambios en sus genomas en relación con el ADNsat.

Palabras clave: Coleoptera, Coccinellidae, *Chnootriba argus*, *Epilachna paenulata*, *Adalia bipunctata*, RepeatExplorer, ADN satélite, satelitoma, NGS.